

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ IL1 β -3953C>T, IL6-174C>G НА СОДЕРЖАНИЕ IL-1 β И IL-6 У ПАЦИЕНТОВ С ЗАМЕДЛЕННОЙ КОНСОЛИДАЦИЕЙ ПЕРЕЛОМОВ ДЛИННЫХ КОСТЕЙ

Миromanов А.М.¹, Гусев К.А.¹, Старосельников А.Н.¹, Миронова О.Б.¹,
Миromanова Н.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», Минздрава России, Чита, e-mail: miromanov_a@mail.ru

Цель исследования: определить воздействие SNP IL1 β -3953C>T, IL6-174C>G на синтез кодируемых белков у пациентов с замедленной консолидацией переломов длинных костей нижних конечностей в Забайкальском крае. Проведено обследование 108 неродственных пациентов русской национальности в возрасте 18–44 лет с переломами длинных костей нижних конечностей, проживающих в Забайкальском крае. Контрольная группа (n=92) – респонденты, сопоставимые по возрасту (18–44 лет по ВОЗ), полу, месту проживания и национальности. Критерии исключения: наличие родственных связей; пациенты с острыми и/или хроническими сопутствующими заболеваниями, другими патологическими состояниями/травмами, хроническим алкоголизмом. В работе использованы следующие методы исследования: клинические; лабораторные (иммунологический – определение IL-1 β , IL-6; генетический (полиморфизм гена IL1 β -3953C>T и гена IL6-174C>G); инструментальные (рентгенография). Для оценки признаков консолидации применяли шкалу RUST. Исследования осуществляли через 2 месяца после получения травмы. Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics Version 25.0 (IBM, США). Определение генотипов гена IL1 β -3953C>T не показало достоверной разницы в исследуемых группах, тогда как при выявлении частоты генотипов гена IL6-174C>G отмечено статистически значимое преобладание -174G/G генотипа и -174G- аллели в группе с замедленной консолидацией. При носительстве генотипа -3953C/T и генотипа -3953T/T гена IL-1 β во всех исследуемых группах отмечается повышение синтеза IL-1 β , тогда как генотип -174C/G и генотип -174G/G гена IL-6 ассоциировались со снижением синтеза IL-6. В результате работы отмечено, что у пациентов с благоприятным течением переломов на 60-е сутки после травмы регистрируется повышение IL-1 β и IL-6 в плазме крови; наличие генотипа -3953C/C гена IL1 β и генотипа -174G/G гена IL6 способствует снижению содержания кодируемых белков (IL-1 β , IL-6); наличие генотипа -174G/G гена IL6 ассоциировано с риском развития нарушения консолидации.

Ключевые слова: перелом, нарушение консолидации, полиморфизм, гены, цитокины.

INFLUENCE OF IL1 β -3953C>T, IL6-174C>G GENE POLYMORPHISM ON IL-1 β AND IL-6 CONTENTS IN PATIENTS WITH DELAYED CONSOLIDATION OF LONG BONE FRACTURES

Miromanov A.M.¹, Gusev K.A.¹, Staroselnikov A.N.¹, Mironova O.B.¹,
Miromanova N.A.¹

¹FGBOU VO «Chita State Medical Academy», Ministry of Health of Russia, Chita, e-mail: miromanov_a@mail.ru

The aim of the study was to determine the effect of SNP IL1 β -3953C>T, IL6-174C>G on the synthesis of encoded proteins in patients with delayed consolidation of fractures of the long bones of the lower extremities in the Trans-Baikal Territory. 108 unrelated patients of Russian nationality aged 18–44 years with fractures of the long bones of the lower extremities, living in the Trans-Baikal Territory, were examined. Control group (n=92) – residents of comparable age (18–44 years according to WHO), gender, place of residence and nationality. Exclusion criteria: presence of family ties; patients with acute and / or chronic concomitant diseases, other pathological conditions / injuries, chronic alcoholism. The following research methods were used in the work: clinical; laboratory (immunological – determination of IL-1 β , IL-6; genetic (polymorphism of the IL1 β -3953C>T gene and IL6-174C>G gene); instrumental (radiography). To assess the signs of consolidation, the RUST scale was used. The studies were carried out after 2 months after injury. Statistical processing of the study results was carried out using the IBM SPSS Statistics Version 25.0 software package (IBM, USA). Determination of the genotypes of the IL1 β -3953C>T gene did not reveal a significant difference in the studied groups, while when identifying the frequency of the genotypes of the IL6-174C>G gene, a statistically significant predominance of the -174G/G genotype and -174G- allele was noted in the group with delayed consolidation. When carrying the -3953C/T genotype and -3953T/T genotype of the IL-1 β gene, all the studied groups showed an increase in IL-1 β synthesis, while the -174C/G genotype and -174G/G genotype of the IL-6 gene were associated with a decrease in IL synthesis -6. 1. In

patients with a favorable course of fractures, an increase in IL-1 β and IL-6 in blood plasma is recorded on the 60th day after injury. 2. The presence of the -3953C/C genotype of the IL1 β gene and the -174G/G genotype of the IL6 gene contribute to a decrease in the content of encoded proteins (IL-1 β , IL-6). 3. The presence of the -174G/G genotype of the IL6 gene is associated with the risk of developing consolidation disorders.

Keywords: fracture, impaired consolidation, polymorphism, genes, cytokines.

Нарушение консолидации переломов костей скелета является актуальной проблемой в мировой травматологии, достигая глобальной распространенности в 9 млн случаев в год. Ограниченные возможности терапии и диагностики нарушения регенерации кости по-прежнему приводят к тому, что пациенты живут с постоянной болью. Достигая уровня 5–10% от общего числа переломов и 23% для определенных сегментов конечностей, нарушение консолидации входит в десятку причин, наиболее значимо снижающих качество жизни, по данным последних исследований [1, 2].

Одной из наиболее важных проблем в данном вопросе является поздняя диагностика. Как правило, диагностика нарушения консолидации переломов происходит на сроке 3–9 месяцев, что в значительной степени усложняет и ограничивает выбор терапии, сводя все методики лечения к хирургическим [1]. С этой точки зрения все больший интерес ученых представляет изучение генетически детерминированных клеточных и иммунных взаимодействий в месте перелома, нарушение которых происходит гораздо раньше появления клинических признаков нарушения консолидации. Основой для начала процесса регенерации является формирование так называемого адаптивного гомеостаза, призванного сформировать баланс между провоспалительными и противовоспалительными факторами в месте формирования будущей мозоли. В эксперименте показано, что дисбаланс этих факторов как в ту, так и в другую сторону закономерно приводит к замедлению или нарушению консолидации [2]. Таким образом, определение уровня провоспалительных цитокинов могло бы способствовать оценке качества репаративного процесса. Однако нельзя не учитывать то факт, что генетически детерминированный механизм в разных популяциях может качественно отличаться. Яркими примерами такого явления могут являться полиморфизм генов, таких как: гаплотип BMP4 (rs2761884, rs17563, rs2071047, rs762642; GTAA); генотип T/G (rs3753793) в гене CYR61; генотип C/T или T/T по SNP rs2853550 в гене IL1B, генотип C/T или T/T по rs2297514 и генотип A/G или G/G по rs2248814 в гене NOS2, которые повышают риск нарушения консолидации [3]. Таким образом, исследование полиморфизма генов цитокинов и их влияния на содержание кодируемых белков представляется актуальной задачей, что и явилось целью нашего исследования.

Цель исследования – определить воздействие SNP *IL1 β -3953C>T*, *IL6-174C>G* на синтез кодируемых белков у пациентов с замедленной консолидацией переломов длинных костей нижних конечностей в Забайкальском крае.

Материалы и методы исследования

В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, 2013 – поправки) и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Проведено обследование 108 неродственных пациентов русской национальности в возрасте 18–44 лет с переломами длинных костей нижних конечностей, проживающих в Забайкальском крае. Первая группа – 62 пациента в возрасте 34,5 [18; 44] года с неосложненным течением переломов длинных костей нижних конечностей (группа клинического сравнения); вторая группа – 46 пациентов с замедленной консолидацией переломов в возрасте 36,0 [18; 44] лет.

Контрольная группа (n=92) – респонденты, сопоставимые по возрасту (18–44 лет по ВОЗ), полу, месту проживания и национальности.

Критерии исключения: наличие родственных связей; пациенты с острыми и/или хроническими сопутствующими заболеваниями, другими патологическими состояниями/травмами, хроническим алкоголизмом; пациенты и респонденты с дефектами оказания медицинской помощи (недостаточное «анатомичное» сопоставление костных отломков при репозиции, повторные оперативные вмешательства), а также лица, получавшие антирезорбтивную терапию и препараты кальция.

Распределение пациентов по группам осуществляли согласно локализации и характеру переломов длинных костей нижних конечностей. Для этого использовали классификацию «Ассоциации остеосинтеза» (АО) [4]. Группы пациентов с переломами были сопоставимы по полу, возрасту, обстоятельствам травмы, локализации, характеру перелома и проводимому лечению.

Генетические исследования осуществляли путем определения мутации *IL1β-3953C>T* и *IL6-174C>G*, используя наборы праймеров «Литех»-«SNP» (Россия). Концентрацию IL-1β и IL-6 в сыворотке крови устанавливали с помощью тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Россия) методом иммуноферментного анализа.

Клинические, лабораторные и инструментальные (рентгенография) исследования осуществляли через 2 месяца после травмы. Для оценки признаков консолидации использовали шкалу RUST [5] (табл. 1).

Таблица 1

Шкала для оценки консолидации переломов

*Количественное значение (ЕД)	1	2	3
Линия перелома	Прослеживается	Прослеживается	Нет

Костная мозоль	Нет	Есть	Есть
----------------	-----	------	------

Примечание: * – количественное значение устанавливается для медиального, латерального, переднего и заднего кортикального слоев большеберцовой кости (перелом консолидированный – 10 и более баллов).

Рентгенологические признаки окончательной консолидации характеризовали следующими параметрами: равномерная и непрерывная кальцинация мозоли, достигающей большей плотности, чем у здоровой кости; абсорбция и консолидация наружной мозоли; заполнение пространства между отломками непрерывными перекладинами.

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics Version 25.0 (лицензия № Z125-3301-14, IBM, США). При проведении статистического анализа авторы руководствовались принципами Международного комитета редакторов медицинских журналов (ICMJE) и рекомендациями «Статистический анализ и методы в публикуемой литературе» (SAMPL) [6, 7]. Оценку нормальности распределения признаков проводили с помощью W-критерия Шапиро–Уилка. С учетом распределения признаков, отличного от нормального, интервальные данные представлены в виде медианы, первого и третьего квартилей (Me [Q1; Q3]). Статистическая значимость различий показателей между группами оценивалась путем определения U-критерия Манна–Уитни и уровня значимости p. Во всех случаях $p < 0,05$ считали статистически значимым. Оценку статистической значимости различий номинальных показателей исследования проводили с использованием критерия χ^2 Пирсона. Зависимость относительных показателей оценивали путем сравнения полученного значения критерия χ^2 с критическим (определяли уровень значимости p) [8].

Результаты исследования и их обсуждение. При определении встречаемости аллелей и генотипов генов *IL1 β -3953C>T* и *IL6-174C>G* у больных с замедленной консолидацией переломов установлено, что генотип -174G/G гена *IL6* позволяет прогнозировать данное осложнение ввиду обнаружения связи его носительства с развитием данного патологического состояния ($p=0,01$). Напротив, при выявлении частоты встречаемости генотипов гена *IL1 β -3953C>T* достоверной разницы в исследуемых группах не отмечено (табл. 2, 3).

Таблица 2

Частота SNP *IL1 β -3953C>T* у больных с замедленной консолидацией переломов (χ^2 , df=2)

	Контроль (n=92)	1-я группа (n=62)	2-я группа (n=46)
-3953C- OR [95% CI]	0,880	0,879 0,99 [0,49–1,99]	0,859 0,83 [0,40–1,72]
-3953T- OR [95% CI] χ^2	0,120	0,121 1,01 [0,50–2,04] 0,00	0,141 1,21 [0,58–2,53] 0,26

u		0,97	0,61
u ¹			0,66
-3953CC OR [95% CI]	0,804	0,806 1,01 [0,45–2,29]	0,783 0,88 [0,37–2,09]
-3953CT OR [95% CI]	0,152	0,145 0,95 [0,38–2,34]	0,152 1,00 [0,37–2,68]
-3953TT OR [95% CI]	0,043	0,048 1,12 [0,24–5,18]	0,065 1,53 [0,33–7,17]
χ^2		0,03	0,3
u		0,98	0,86
u ¹			0,92

Примечание: u – значимость различий с контролем; u¹ – значимость различий с 1-й группой.

Таблица 3

Частота SNP *IL6-174C>G* у больных с замедленной консолидацией переломов (χ^2 , df=2)

	Контроль (n=92)	1-я группа (n=62)	2-я группа (n=46)
-174C- OR [95% CI]	0,560	0,556 0,99 [0,62–1,56]	0,370 0,46 [0,28–0,77]
-174G- OR [95% CI]	0,440	0,444 1,01 [0,64–1,60]	0,630 2,17 [1,30–3,63]
χ^2		0,00	8,88
u		0,95	0,003
u ¹			0,007
-174CC OR [95% CI]	0,326	0,323 0,98 [0,49–1,96]	0,174 0,44 [0,18–1,05]
-174CG OR [95% CI]	0,467	0,468 1,00 [0,53–1,91]	0,391 0,73 [0,36–1,50]
-174GG OR [95% CI]	0,207	0,210 1,02 [0,46–2,25]	0,435 2,96 [1,37–6,39]
χ^2		0,00	8,63
u		1,0	0,01
u ¹			0,03

Примечание: p – значимость различий с контролем; p₁ – значимость различий с 1-й группой.

Следующим этапом проведено определение концентрации кодируемых цитокинов (IL-1 β , IL-6) у исследуемых групп. Показано, что их содержание у пациентов с неосложненным течением переломов превышало значения контроля и группы с нарушением консолидации в 1,5, 1,4 и в 1,7 и 1,2 раза соответственно (табл. 4). Уровень исследуемых цитокинов в группе с замедленной консолидацией также находился выше контрольных значений, подтверждая роль IL-1 β и IL-6 в патогенезе нарушения консолидации переломов [9].

Таблица 4

Содержание цитокинов (IL-1 β , IL-6) в исследуемых группах на 2-й месяц после травмы

Группа	Контроль	1-я группа	2-я группа
Показатель			
IL-1 β (пг/мл)	5,99 (1,72; 10,61)	9,04 (4,78; 16,87)	6,62 (3,68; 12,98)

		u<0,001	u=0,005 u ¹ <0,001
IL-6 (пг/мл)	5,07 (0,23; 10,07)	8,58 (0,39; 13,74) u<0,001	6,89 (0,39; 12,9) u=0,008 u ¹ =0,008

Примечание: u – значимость различий с контролем; u¹ – значимость различий с 1-й группой.

При выявлении воздействия SNP *IL1β-3953C>T* и *IL6-174C>G* на синтез кодируемых белков обнаружено, что при носительстве генотипа -3953C/T и генотипа -3953T/T гена *IL1β* во всех исследуемых группах отмечается повышение синтеза IL-1β. В свою очередь, генотип -174C/G и генотип -174G/G гена *IL6*, напротив, ассоциировались со снижением синтеза IL-6 (табл. 5, 6).

Таблица 5

Концентрация IL-1β в зависимости от SNP *IL1β-3953C>T*

Генотип Группа	-3953CC	-3953CT	-3953TT
Контроль (n=92)	5,28 (3,91; 6,32) (n=74)	7,73 (7,51; 7,93) (n=14) u=0,041	10,22 [9,77; 10,60] (n=4) p<0,001 p ¹ <0,001
1-я группа (n=62)	8,13 (6,96; 9,69) (n=50)	12,04 (11,73; 12,17) (n=9) u<0,001	14,01 [13,65; 15,44] (n=3) u<0,001 u ¹ =0,011
2-я группа (n=46)	5,92 (5,14; 7,13) (n=36)	9,26 (8,85; 9,33) (n=7) u<0,001	10,78 [10,50; 11,88] (n=3) u<0,001 u ¹ <0,06

Примечание: u – значимость различий с -3953CC; u¹ - значимость различий с -3953CT.

Таблица 6

Концентрация IL-6 в зависимости от SNP *IL6-174C>G*

Генотип Группа	-174CC	-174CG	-174GG
Контроль (n=92)	7,04 (6,23; 7,67) (n=30)	4,81 (4,34; 5,23) (n=43) p<0,001	2,09 [1,79; 2,64] (n=19) p<0,001 p<0,001
1-я группа (n=62)	11,11 (10,36; 12,34) (n=20)	8,31 (7,05; 8,84) (n=29) p<0,001	3,63 [2,99; 4,39] (n=13) p<0,001 p<0,001
2-я группа (n=46)	10,91 (9,93; 11,99)	7,94 [7,13; 8,52] (n=18)	3,73 [3,27; 4,48] (n=20)

	(n=8)	p<0,001	p<0,001 p<0,001
--	-------	---------	--------------------

Примечание: u – значимость различий с -174CC; u¹ – значимость различий с -174CG.

Увеличение содержания IL-1 β и IL6 в плазме крови у пациентов с нормальным заживлением переломов и нарушением консолидации закономерно и согласуется с данными литературы [9]. Однако необходимо отметить, что в группе с замедленной консолидацией содержание IL-1 β и IL6 было ниже, чем в группе с нормальным заживлением перелома, что может свидетельствовать об активации процессов ремоделирования в группе клинического сравнения [10].

Наличие генотипа -3953C/C гена *IL1 β* и генотипов -174C/G, -174G/G гена *IL6* продемонстрировало статистически значимую тенденцию к снижению содержания кодируемых белков (IL-1 β , IL-6) в плазме крови. Снижение их концентрации и нарушение процессов репарации переломов объяснимы, поскольку IL-6, как и IL-1 β , являясь катаболическим цитокином [11], стимулирует продукцию RANKL, таким способом увеличивая остеокластогенез и процессы остеорезорбции. Можно сделать вывод, что если происходит угнетение IL-1 β , IL-6, то происходит угнетение и активности макрофагов и уменьшается костная резорбция [12], что очень важно на начальном этапе репаративной регенерации. Кроме того, снижение уровня IL-6 влияет и на его стимулирующее действие при высвобождении фактора роста эндотелия сосудов, что снижает возможности васкуляризации. Эксперименты *in vitro* показали, что IL-6 способствует экспрессии остеогенных белков RUNX2 и остеокальцина и, как следствие, стимулирует дифференцировку остеобластов [9].

Уровень IL-6 у пациентов с различными типами переломов возвращается к норме примерно через 6 месяцев после травмы, что свидетельствует о его решающей роли в содействии заживлению тканей, остеогенной регенерации на ранней стадии повреждения костной ткани и может быть использовано в качестве раннего маркера заживления переломов [9]. Можно предполагать, что полиморфизм гена *IL6-174G/G* вносит существенный вклад в замедленную консолидацию переломов и может служить ранним диагностическим маркером в прогнозировании данного осложнения.

Таким образом, установление SNP цитокинов и их воздействия на концентрацию кодируемых белков расширяет понимание механизмов замедленной консолидации при переломах костей конечностей и, возможно, в будущем будет содействовать доклинической диагностике и своевременной профилактике нарушения репаративной регенерации.

Выводы

1. У пациентов с благоприятным течением переломов на 60-е сутки после травмы регистрируется повышение IL-1 β и IL-6 в плазме крови.

2. Наличие генотипа -3953C/C гена *IL1β* и генотипа -174G/G гена *IL6* способствует снижению содержания кодируемых белков (IL-1β, IL-6).

3. Наличие генотипа -174G/G гена *IL6* ассоциировано с риском развития нарушения консолидации.

Список литературы

1. Stewart S.K. Fracture Non-Union: A review of clinical challenges and future research needs // Malaysian orthopaedic journal. 2019. Vol. 13. Is. 2. P. 1-10. DOI: 10.5704/MOJ.1907.001.
2. Maruyama M., Rhee C., Utsunomiya T., Zhang N., Ueno M., Yao Z., Goodman S.B. Modulation of the inflammatory response and bone healing // Frontiers in endocrinology (Lausanne). 2020. Vol. 11. P. 386. DOI: 10.3389/fendo.2020.00386.
3. Ding Z.-C., Lin Y.-K., Gan Y.-K., Tang T.-T. Molecular pathogenesis of fracture nonunion // Journal of orthopaedic translation. 2018. Vol. 14. P. 45-56. DOI: 10.1016/j.jot.2018.05.002.
4. Травматология: национальное руководство / под редакцией Г.П. Котельникова, С.П. Миронова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2022. 784 с.
5. Leow J.M., Clement N.D., Tawonsawatruk T., Simpson C.J., Simpson A.H.R.W. The radiographic union scale in tibial (RUST) fractures // Bone & joint research. 2016. Vol. 5. Is. 4. P. 116-121. DOI: 10.1302/2046-3758.54.2000628.
6. Alshogran O.Y., Al-Delaimy W.Y. Understanding of international committee of medical journal editors' authorship criteria among faculty members of pharmacy and other health sciences in Jordan // Journal of empirical research on human research ethics. 2018. Vol. 13. Is. 3. P. 276-284. DOI: 10.1177/1556264618764575.
7. Lang T.A., Altman D.G. Statistical analyses and methods in the published literature: the SAMPL guidelines // Medical Writing. 2016. Vol. 25. Is. 3. P. 31-36. DOI: 10.18243/eon/2016.9.7.4.
8. Мудров В.А. Алгоритмы статистического анализа качественных признаков в биомедицинских исследованиях с помощью пакета программ SPSS // Забайкальский медицинский вестник. 2020. № 1. С. 151-163.
9. Yang N., Liu Y. The role of the immune microenvironment in bone regeneration // International journal of medical sciences. 2021. Vol. 18. Is. 16. P. 3697-3707. DOI: 10.7150/ijms.61080.
10. Zhu G., Zhang T., Chen M., Yao K., Huang X., Zhang B., Li Y., Liu J., Wang Y., Zhao Z. Bone physiological microenvironment and healing mechanism: basis for future bone-tissue engineering scaffolds // Bioactive materials. 2021. Vol. 6. Is. 11. P. 4110-4140. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.03.043.

11. Тополянская С.В. Саркопения, ожирение, остеопороз и старость // Сеченовский вестник. 2020. Т. 11. № 4. С. 23-35. DOI: 10.47093/2218-7332.2020.11.4.23-35.
12. Шабанов О.В., Шабанов В.Н. Анализ экссудата периапикальных тканей на наличие IL-1 β и TNF- α при обострении и хроническом течении, малых и больших очагах деструкции костной ткани, а также различных состояниях апикальной констрикции при апикальных периодонтитах // Global Science and Innovations: materials international scientific conference (Tashkent, Uzbekistan, March 6 2020). Tashkent: DARA, 2020. P. 164-169.