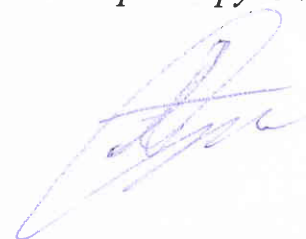


На правах рукописи



Старосельников Артем Николаевич

**НЕКОТОРЫЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ
ЗАМЕДЛЕННОЙ КОНСОЛИДАЦИИ ПЕРЕЛОМОВ
ДЛИННЫХ КОСТЕЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ**

3.3.3. Патологическая физиология
(медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Чита – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Мироманов Александр Михайлович

Официальные оппоненты:

Шилов Сергей Николаевич – доктор медицинских наук, доцент.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии

Ахтямов Ильдар Фуатович – доктор медицинских наук, профессор.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой травматологии, ортопедии и хирургии экстремальных состояний

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Иркутск

Защита диссертации состоится «19» июня 2024 года в ___ на заседании диссертационного совета 21.2.077.01 при ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ (672000, г. Чита, ул. Горького, 39а)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ (672000, г. Чита, ул. Горького, 39 «а», <http://chitgma.ru>)

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.м.н., доцент

Наталья Анатольевна Мироманова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Актуальность проблемы нарушенной консолидации переломов костей, в том числе и развитие ложных суставов в настоящее время определяется значительной частотой возникновения, трудностью лечения и высоким уровнем инвалидности. Замедленное срастание переломов костей конечностей, по данным разных авторов, развивается в 15-50% всех случаев переломов костных структур, а частота развития ложных суставов, даже при современных методах лечения, достигает 33%, при этом диафизарные переломы бедренной и большеберцовой костей приводят к несращению с риском в три-пять раз более высоким, чем другие переломы в тех же костях [Хоминец В.В., 2021; Косимов А.А., 2022; Садыков Р.И., 2022; Gómez-Barrena E., 2020; Kim M.S., 2022].

В настоящее время применяется колоссальное количество медицинских технологий по диагностике, лечению и профилактике нарушений репарации костной ткани при ее деструкции [Ахтямов И.Ф., 2020]. Однако, наблюдающаяся тенденция к сохранению, а по данным некоторых авторов и к увеличению количества нарушений консолидации и их последствий, побуждают к более глубокому изучению данной проблемы [Хоминец В.В., 2021; Rupp M., 2018; Zhao Z., 2019; Gómez-Barrena E., 2020; Haller P., 2023].

Известно, что практически любая травма, хирургическая операция оказывает неблагоприятный эффект на различные системы макроорганизма, что вызывает развитие различных осложнений [Семинский И.Ж. и др., 2022; Шилов С.Н. и др., 2022], в том числе нарушение репаративных процессов костной ткани [Ахтямов И.Ф., 2022]. Среди многочисленных факторов, определяющих исходы при переломах костей, выделяют значительное количество показателей различных систем организма человека, нарушение которых может приводить к изменению течения различных физиологических и биохимических процессов и, как следствие, к развитию осложнений. Определение их патогенетических механизмов является важным в выборе правильной лечебной тактики больного [Усков С.А., 2017; Мироманов А.М., 2019 – 2022; Гусев К.А., 2023; Kilichevna K.M., 2022].

Степень разработанности темы. К настоящему времени определено, что в увеличении сроков сращения переломов важную роль играет недостаточность иммобилизации, несостоятельность внутренних и наружных фиксирующих устройств, несоблюдение принципов диспансеризации, а также дисбаланс систем гомеостаза (иммунной, эндокринной, микрокровотока и пр.) [Новикова Т.В., 2018; Миронова О.Б., 2020; Пономарев П.Н., 2020; Мироманов А.М., 2021; Шостак П.Г., 2021; Самодай В.Г., 2022; Семененко М.П., 2022]. Проблема управления посттравматической регенерацией костной ткани является ключевой в травматологии и ортопедии [Замай Т.Н., 2021; Митрофанов А.В., 2021]. Регуляция остеогенеза при повреждении осуществляется сложным комплексом факторов, включающим механические условия для формирования полноценного регенерата, сосудистые реакции, влияние нейроэндокринной системы, действие метаболитов и ростовых факторов, состояние иммунной системы [Галицына Е.В., 2019; Осипенко А.В., 2019; Мироманов А.М., 2021]. Учитывая тот факт, что данная патология требует колоссальных финансовых затрат вследствие повторных госпитализаций, утраты трудоспособности и значимого снижения качества жизни пациентов, то изыскание персонифицированных (генетических) аспектов ее развития, а также методов диагностики и превентивных способов воздействия на течение репарации является первостепенной задачей в современной медицине [Кенис В.М., 2019; Ковалев А.В., 2021; Корокин М.В., 2022].

К сожалению, иммуногенетические механизмы развития нарушений консолидации переломов недостаточно отражены в отечественной и зарубежной литературе. Выявление новых патогенетических механизмов развития данного осложнения позволит прогнозировать его на ранних стадиях и своевременно проводить необходимые лечебно-профилактические мероприятия, что в конечном итоге приведет к уменьшению сроков нетрудоспособности пациентов, осуществит уменьшение экономических затрат на лечение и предотвратит возможную инвалидизацию больных.

Цель исследования: выявить молекулярно-генетические механизмы замедленной консолидации переломов длинных костей конечностей.

Задачи исследования:

1. Определить показатели маркеров метаболизма костной ткани (OPG, TGF-1 β , EGF, PTH, 25(OH)D, Ca, P), цитокинов (IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF α), высших жирных кислот и оценить их вклад в развитие замедленной консолидации переломов длинных костей конечностей.
2. Установить значение различных вариантов полиморфизма генов *IL1 β* (C3953T), *IL4* (C589T), *IL6* (C174G), *TNF α* (G308A), *TNFRSF11B* (G1181C), *PTH* (rs6256), *VDR* (BsmI G>A), *TGF β ₁* (A25P), *EGFR* (A2073T) в патогенезе замедленной консолидации переломов длинных костей конечностей и выявить их влияние на уровень кодируемых белков.
3. Установить патогенетически значимые критерии прогноза замедленной консолидации переломов длинных костей нижних конечностей.

Научная новизна

Впервые показан сочетанный вклад IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF α , OPG, TGF-1 β , EGF, PTH, 25(OH)D, Ca, P и ВЖК в развитии замедленной консолидации переломов длинных костей нижних конечностей. Отмечено, что на 60-е сутки травмы регистрируется значимое увеличение показателя IL-1 β , IL-6, TGF- β ₁, EGF, IL-4 и OPG только в группе с неосложненным течением переломов длинных костей. Доказано, что у пациентов при замедленной консолидации переломов регистрируется низкий уровень кальция, жирных кислот (C14:0, C18:0, C18:3 ω 3, C20:3 ω 6, C20:4 ω 6) и высокое содержание фосфора, PTH, C16:0a в сыворотке крови.

Впервые установлена роль межлокусных взаимодействий полиморфизма генов *IL1 β* (C3953T), *IL4* (C589T), *IL6* (C174G), *TNF α* (G308A), *TNFRSF11B* (G1181C), *TGF β ₁* (A25P), *EGFR* (A2073T), *PTH* (rs6256), *VDR* (BsmI G>A) в нарушении репаративной регенерации костной ткани.

Впервые показано, что при замедленной консолидации переломов выявлена более высокая частота носительства генотипа -174G/G гена *IL6*, генотипа -1181G/G гена *TNFRSF11B* и генотипа -283A/A гена *VDR-BsmI*. У пациентов с неосложненным течением переломов фиксируется более частое носительство

аллели -1181C- и -1181C/C гена *TNFRSF11B*, что может расцениваться как протективный фактор.

Носительство генотипа *IL4589TT*, *IL6174GG*, *TGFβ₁25ProPro*, *EGFR2073TT* и *TNFRSF11B1181C/C* сопровождается снижением экспрессии кодируемых белков (*IL-4*, *IL-6*, *TGFβ₁*, *EGF*, *OPG*, соответственно).

Впервые отмечено, что одновременное повышение содержания РТН, фосфора и снижение концентрации 25(ОН)D, кальция зависит от генотипа *PTH-rs62561AA* и *VDR-BsmI283A/A*.

Зарегистрировано, что носительство нормальной гомозиготы гена *TNFRSF11B-1181(G>C)* и мутантных гомозигот *TGFβ₁-25(Arg>Pro)*, *IL6-174(C>G)*, *VDR-BsmI283(G>A)*, *EGFR-2073(A>T)*, являются прогностическими критериями замедленной консолидации переломов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в расширении знаний о генетических факторах патогенеза замедленной консолидации при переломах длинных костей конечностей. Носительство генотипа -1181G/G гена *TNFRSF11B*, генотипа -25Pro/Pro гена *TGFβ₁*, генотипа -174G/G гена *IL6*, генотипа -2073T/T гена *EGFR* и генотипа -283A/A гена *VDR-BsmI* у жителей Забайкальского края является фактором риска нарушения консолидации переломов, а наличие генотипа -1181C/C гена *TNFRSF11B* претендует на роль протективного фактора замедленной консолидации.

Разработанная программа ЭВМ для определения риска замедленной консолидации переломов длинных костей конечностей, основанная на выявлении частоты носительства полиморфизма гена *TNFRSF11B-1181G>C*, гена *TGFβ₁-25Arg>Pro* и гена *IL6-174(C>G)*, позволяет определить риск замедленной консолидации при переломах костей конечностей.

Методология и методы исследования

В исследование включено 108 неродственных пациентов в возрасте от 18 до 44 лет с переломами длинных костей нижних конечностей, русской национальности, проживающие на территории Забайкальского края. Контрольную

группу составили 92 практически здоровых лиц аналогичного возраста, национальности и ареала проживания. В работе применялись: клинический метод исследования; лабораторные (экспресс метод для определения количественной оценки бактериальной обсемененности ран, ИФА, молекулярно-генетические, биохимические; инструментальные (рентгенография); статистические методы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Повышение уровня IL-1 β , IL-6, TGF- β ₁, EGF, IL-4, OPG, а также высших жирных кислот (C18:0, C18:3 ω 3, C18:3 ω 6, C20:3, C20:4) регистрируется на 60-ые сутки травмы только при неосложненном течении переломов.
2. У пациентов с замедленной консолидацией переломов длинных костей конечностей носительство генотипа *TNF α 308AA*, *IL1 β 3953TT* характеризуется высоким содержанием в сыворотке крови TNF α , IL-1 β , генотипа *IL4589TT*, *IL6174GG*, *TGF β ₁25ProPro*, *EGFR2073TT*, *TNFRSF11B1181C/C* низким уровнем IL-4, IL-6, TGF β ₁, EGF, OPG, а генотипа *PTH-rs62561AA*, *VDR-BsmI283A/A* одновременным повышением концентрации PTH, P и снижением 25(OH)D, Ca.
3. Прогностическими факторами замедленной консолидации при переломах длинных костей конечностей является генотип -1181G/G гена *TNFRSF11B-1181(G>C)*, генотип -25Pro/Pro гена *TGF β ₁-25(Arg>Pro)*, генотип -174G/G гена *IL6-174(C>G)*, генотип -283A/A гена *VDR-BsmI283(G>A)* и генотип – 2073T/T гена *EGFR-2073(A>T)*, а также их комбинации.

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертационное исследование выполнено в рамках комплексной научно-исследовательской работы - РК 034(02) регистрационный номер АААА-А16-116063010015-6 и одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «ЧГМА» Минздрава России (протокол №104 от 11.11.2020 года).

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений, современными методами исследования, соответствующим поставленной цели и задачам. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, подкреплены убедительными данными, наглядно представленными в таблицах, рисунках и клинических

наблюдениях. Анализ и интерпретация результатов проведены с помощью современных статистических методов.

Основные положения и результаты научного труда доложены и обсуждены в рамках заседаний: РОО «Научно-практическое общество травматологов-ортопедов Забайкалья» (Чита, 2020–2023); научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии» (Чита, 2020); VI съезда травматологов-ортопедов ДФО совместно со Всероссийской научно-практической конференцией с международным участием (Чита, 2021); XII Всероссийского съезда травматологов-ортопедов (Санкт-Петербург, 2022); межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы травматологии и ортопедии Дальнего востока», VII съезда травматологов-ортопедов ДФО (Улан-Удэ, 2023).

Результаты диссертационной работы внедрены в образовательный процесс кафедры патологической физиологии, травматологии и ортопедии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава РФ.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, из них 4 статьи в ведущих рецензируемых журналах, определенных ВАК Минобрнауки России, 2 из которых входят в международную базу цитирования Scopus, 1 программа для ЭВМ РФ.

Структура и объем диссертации

Диссертация содержит 145 страниц машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, перспективы дальнейшей разработки темы исследования, списка сокращений и списка использованной литературы (114 отечественных и 111 зарубежных источников). Работа иллюстрирована 40 таблицами и 14 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации и правилами клинической практики в Российской Федерации.

В исследование включено 108 пациентов в возрасте от 18 до 44 лет (молодой возраст по ВОЗ) с переломами длинных костей нижних конечностей: первая группа – 62 пациента с неосложнённым течением переломов длинных костей нижних конечностей (группа клинического сравнения); вторая группа – 46 пациентов с замедленной консолидацией переломов. Контрольная группа – 92 практически здоровых мужчин и женщин в возрасте от 18 до 44 лет (35,0 [18; 44]) (молодой возраст по ВОЗ).

Критерии исключения – пациенты с острыми и/или хроническими сопутствующими заболеваниями, другими патологическими состояниями/травмами, алкоголизмом. Кроме того, из исследования исключались пациенты и резиденты с дефектами оказания медицинской помощи (недостаточное «анатомичное» сопоставление костных отломков при репозиции, повторные оперативные вмешательства), а также пациенты, получавшие антирезорбтивную терапию и препараты кальция.

Схема дизайна исследования представлена на рисунке 1.

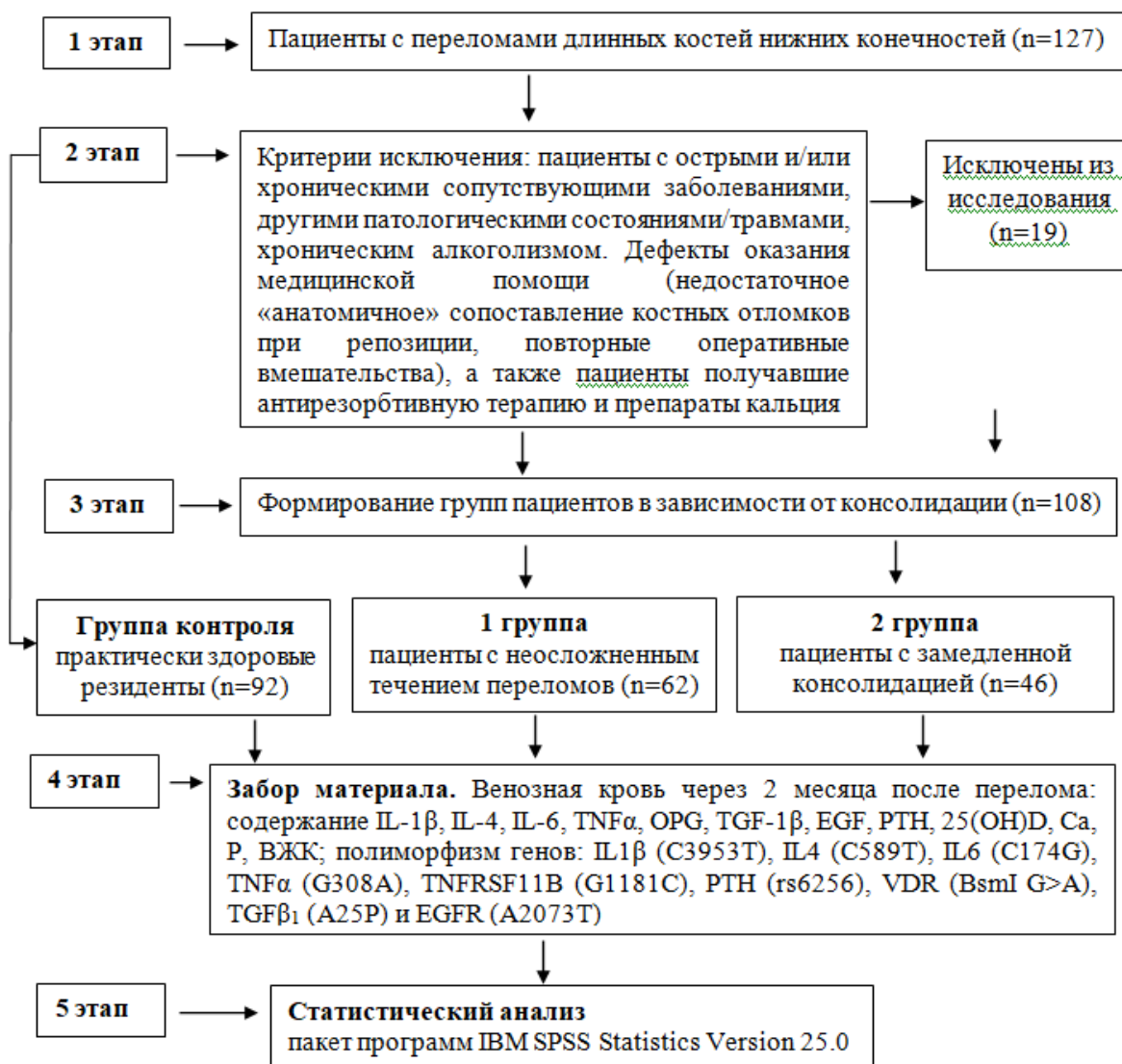


Рисунок 1. Дизайн исследования

Клинические методы исследования. В обследовании больных с переломами длинных костей конечностей использовались стандартные методы (Клинические рекомендации Министерства Здравоохранения РФ от 2021 г. по лечению переломов бедренной кости и костей голени). Сроки наблюдения за больными составили 2 месяца.

Лабораторные методы исследования. Для исследования лабораторных показателей использовалась периферическая кровь из локтевой вены.

1. Иммунологические исследования. Для определения концентрации цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6) использовали наборы реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск), содержание ростовых факторов (TGF β 1, EGF) определяли при

помощи тест-систем R&D Systems, Inc. (США). Уровень остеопротегерина (OPG) устанавливали с помощью набора реактивов ELISA Kit for Osteoprotegerin, Cloud-Clone Corp. (КНР, г. Ухань). Измерение данных показателей проводили методом ИФА [Матвеев В.А., 2020].

2. *Генетические исследования.* Для исследования выбраны точковые мутации *TNF α* в позиции 308 (G>A), *IL1 β* в позиции 3953 (C>T), *IL4* в позиции 589 (C>T), *IL6* в позиции 174 (C>G), *TGF β ₁* в позиции 25 (Arg>Pro) и *EGFR* в позиции 2073 (A>T), *TNFRSF11B* в позиции 1181 (G>C), *PTH* (rs6256), *VDR* (BsmI 283 G>A). Амплификацию фрагментов генов *TNF α* , *IL-1 β* , *IL-4*, *IL-6*, *OPG*, *PTH*, *VDR*, *TGF β ₁* и *EGFR* проводили в термоцикле (модель «Бис» - M111 (ООО «Бис-Н», Новосибирск)). В работе использовались стандартные наборы праймеров НПФ «Литех»-«SNP» (Москва).

3. *Биохимические исследования.* Материалом для исследования *PTH* и 25(OH)D служила сыворотка крови. Исследование осуществляли на иммунохимическом анализаторе ACCESS 2 (США). Уровень Са и Р в сыворотке крови выявляли фотометрическим, колориметрическим методом на анализаторе ARCHITECT plus c4000 (США). Показатели ВЖК определяли в периферической венозной крови с помощью стандартных методик. Количественный анализ летучих ВЖК выполняли по методу М.Д. Ардатской. Липиды экстрагировали методом J. Folch et al. – с целью определения спектра ВЖК (миристиновая – C₁₃H₂₇COOH, пальмитиновая – C₁₅H₃₁COOH, пальмитоолеиновая – C₁₅H₂₉COOH, стеариновая – C₁₇H₃₅COOH, олеиновая – C₁₇H₃₃COOH, линолевая – C₁₇H₃₁COOH, α -линоленовая – C₁₇H₂₉COOH, γ -линоленовая – C₁₇H₂₈COOH, дигомо- γ -линоленовая – C₁₉H₃₃COOH и арахидоновая – C₁₉H₃₁COOH). Затем осуществляли упаривание аликвота высших жирных кислот с последующим метилированием по К.М. Синяк. Очищение метиловых эфиров выполняли в хроматографической системе – в тонких слоях силикагеля гексан : диэтиловый эфир : ледяная уксусная кислота (в объеме 90 : 10 : 1). Следующим этапом осуществляли их экстрагирование смесью хроформ : метанол (в объеме 8 : 1). Анализ производили с помощью хроматографа «Кристалл-2000М» (Россия) с плазменно-ионизационным детектором и

капиллярной колонкой 0,35 ½ 50 FFAP (USA). Для расчета и определения пиков применяли программно-аппаратный комплекс «Analitika».

Инструментальные методы исследования. Рентгенологическое исследование повреждённого сегмента конечности пациентам выполняли в двух стандартных проекциях с захватом смежных суставов до начала лечения, после проведения лечебной манипуляции, через 2 недели, через 1 и 2 месяца после получения травмы. Для оценки признаков консолидации использовали шкалу RUST [Plumarom Y., 2021].

Статистические методы исследования. Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics Version 25.0 (США). Оценку нормальности распределения признаков проводили с помощью W-критерия Шапиро–Уилка. 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. Зависимость относительных показателей оценивалась путем сравнения полученного значения критерия χ^2 с критическим. Учитывая наличие результативных и факторных признаков, проспективный характер исследования, оценка значимости различий показателей исследования проводилась за счет определения относительного риска (ОР). Статистическая значимость ОР оценивалась, исходя из значений 95% доверительного интервала (95% ДИ). Для измерения силы и направления связи между изучаемыми явлениями использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Диагностическая ценность прогностической модели определена путем построения ROC-кривой с последующим определением площади под ней [Мудров В.А., 2022].

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Содержание показателей маркеров метаболизма костной ткани и ВЖК у пациентов с замедленной консолидацией переломов

У пациентов с неосложненным течением переломов длинных костей конечностей через 2 месяца после травмы отмечено отсутствие статистической значимости различий при определении концентрации цитокина $TNF\alpha$, как с группой контроля, так и с группой замедленной консолидации. Напротив, содержание $IL-1\beta$, $IL-6$, $TGF-\beta_1$, EGF , $IL-4$ и OPG в данной группе превышало не только контрольные значения (в 1,5, 1,7, 1,6, 1,6, 1,2 и 2,3 раза, соответственно), но и аналогичные параметры группы с развитием замедленной консолидации переломов (в 1,4, 1,3, 1,6, 1,5, 1,2 и 1,3 раза, соответственно) (рис. 2).

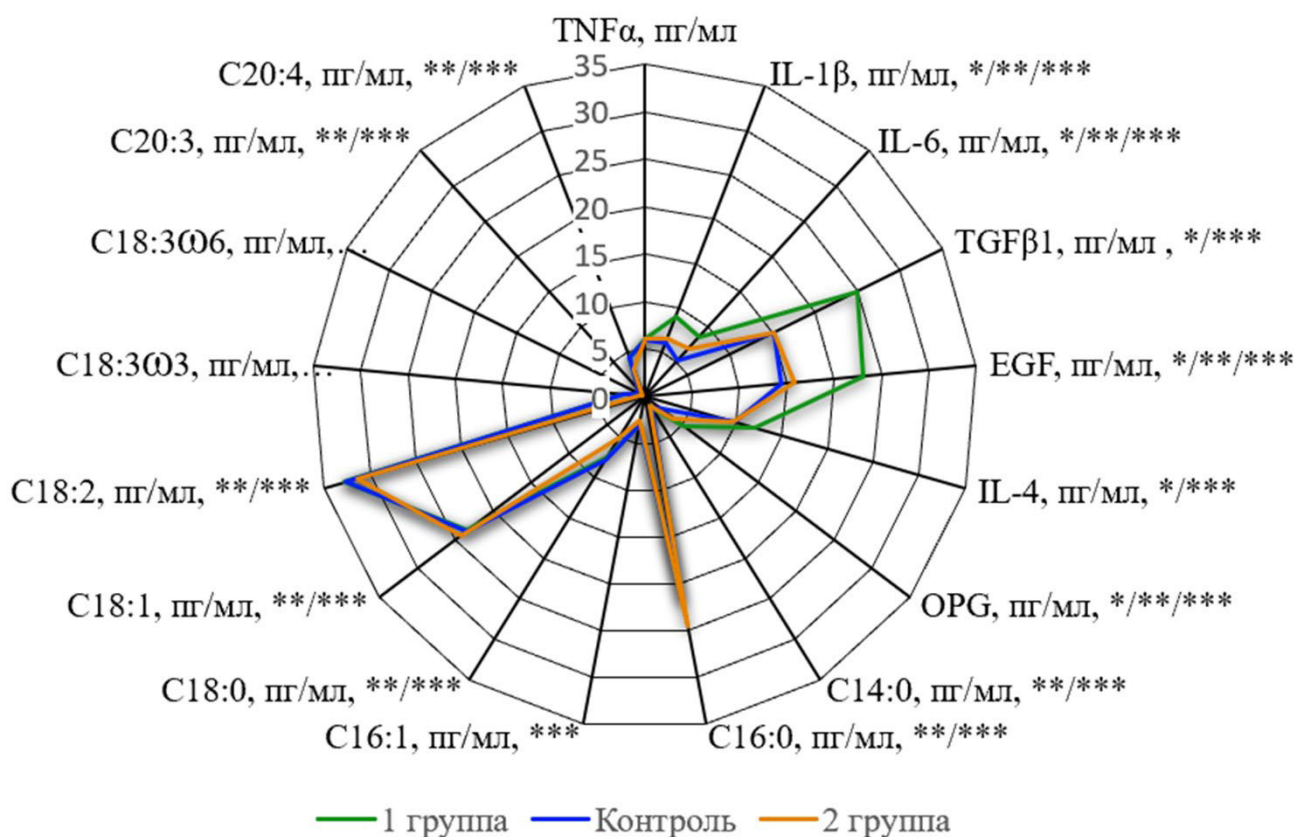


Рисунок 2. Уровень показателей маркеров метаболизма костной ткани и ВЖК в исследуемых группах

Примечание: * - статистическая значимость различий 1 группы с контролем при $p \leq 0,05$; ** - статистическая значимость различий 2 группы с контролем; *** - статистическая значимость различий 1 и 2 групп при $p \leq 0,05$.

У больных при нарушении консолидации переломов также зафиксировано отсутствие значимости различий с контрольными показателями цитокинов $TGF-\beta_1$ и $IL-4$ (рис. 2). При проведении исследования содержания ВЖК в венозной крови

выявлено, что количество С16:0 в группе пациентов с замедленной консолидацией в 1,1 раза больше, чем у пациентов остальных групп. Содержание С16:1 в контрольной группе превышает таковое в основной группе. Уровень С18:0 в 1,5 раза превышает аналогичные показатели группы с осложненным течением, а в группе с нормальным сращением переломов регистрируется увеличение этого показателя в 1,4 раза. Содержание в крови С18:3Ω3, С18:3Ω6, С20:3, С20:4 у контрольной группы и пациентов с нормальной консолидацией в 3,7, 2,8, 4,2 и 1,4 раза выше, чем в группе с нарушением консолидации переломов, соответственно (рис. 2).

При определении уровня 25(ОН)D в сыворотке крови не отмечено статистической значимости различий между исследуемыми группами. При замедленной консолидации переломов, у пациентов отмечалось снижение содержания Са в 1,1 раза, повышение Р и РТН в 1,1 раза по сравнению с аналогичными параметрами группы неосложненного течения и не отличались от группы контроля за исключением Р, содержание которого регистрировалось выше в 1,1 раза. Исходя из вышеизложенного, принципиальных различий в количестве РТН, 25(ОН)D, Са и Р, содержащихся в венозной крови на 2 месяц после получения травмы, мы не выявили, что может говорить о нормализации этих показателей в данный период.

Таким образом, исследуемые показатели объективно отображают течение репаративных процессов костной ткани, что подтверждает существенную роль изучаемых систем макроорганизма в патогенезе нарушений консолидации переломов [Мироманов А.М. и соавт., 2023; Старосельников А.Н. и соавт., 2023].

Определение частоты встречаемости аллелей и генотипов исследуемых SNP генов у пациентов с замедленной консолидацией переломов

Распределение частот аллелей и генотипов генов *TNFα(G308A)*, *IL1β(C3953T)*, *IL4(C589T)*, и *PTH(rs6256)* в группе больных с замедленной консолидацией переломов длинных костей конечностей и неосложнённым течением не отличалось от группы контроля, тогда как частота аллели -174G- гена

IL6, аллели -25Pro- гена *TGFβ₁*, аллели -2073T- гена *EGFR*, аллели -1181G- гена *TNFRSF11B* и аллели -283A- гена *VDR-BsmI* у пациентов с нарушением консолидации переломов превышала аналогичные показатели группы клинического сравнения и здоровых лиц. Одновременно с этим регистрировалось более высокое носительство генотипа -174G/G гена *IL6*, генотипа -25Pro/Pro гена *TGFβ₁*, генотипа -2073T/T гена *EGFR*, генотипа -1181G/G гена *TNFRSF11B* и генотипа -283A/A гена *VDR-BsmI*.

Расчет относительного риска между группой больных с неосложнённым течением переломов и при развитии замедленной консолидации выявил положительную ассоциацию (высокий риск) носительства аллели -174G- и генотипа -174G/G гена *IL6*; аллели -27Pro- и генотипа -25 Pro/Pro гена *TGFβ₁*; аллели -2073T- и генотипа -2073T/T гена *EGFR* с развитием данного осложнения, а носительство аллели -1181C- и генотипа -1181C/C гена *TNFRSF11B* - с нормальным течением репаративных процессов костной ткани [Мироманов А.М. и соавт., 2023; Старосельников А.Н. и соавт. 2023].

Влияние генотипов SNP на уровень изучаемых показателей

Установлено, что носительство генотипа -308A/A гена *TNFα-308G>A*, генотипа -3953T/T гена *IL1β-3953C>T* и генотипа -1181C/C гена *TNFRSF11B-1181G>C* способствует более высокой экспрессии кодируемых белков - TNF-α, IL1β, OPG соответственно, тогда как при носительстве генотипа -589T/T гена *IL4-589C>T*, генотипа -174G/G гена *IL6-174C>G*, генотипа -25Pro/Pro полиморфизма гена *TGFβ₁-25Arg>Pro* и генотипа -2073T/T гена *EGFR-2073A>T* регистрируется снижение содержания кодируемого белка - IL-4, IL-6, TGF-β₁, EGF, соответственно.

Рассматривая влияние частоты носительства полиморфизма гена *PTH-rs62561C>A* на маркеры метаболизма костной ткани отмечено, что генотип A/A способствует повышению уровня PTH, P и снижает количество 25(OH)D и Ca (табл. 1). Аналогичная тенденция зарегистрирована при носительстве генотипа -BsmI283A/A гена *VDR-BsmI 283G>A* (табл. 2).

Таблица 1

Содержание PTH, 25(OH)D, Ca и P в сыворотке крови в зависимости от генотипа полиморфизма гена *PTH-rs62561C>A*, Ме [P25-P75]

Показатели Генотип	PTH (пг/мл)	25(OH)D (нг/мл)	Ca (ммоль/л)	P (ммоль/л)
Контроль (n=92)				
C/C (n=68)	5,46 [3,10; 6,25]	39,46 [35,69; 64,45]	2,19 [2,15; 2,35]	1,26 [0,90; 1,38]
C/A (n=19)	7,29 [6,92; 8,00] ¹	25,17 [22,55; 27,33] ¹	2,07 [1,95; 2,13] ¹	1,42 [1,31; 1,45] ¹
A/A (n=5)	9,18 [9,09; 9,26] ^{1,2}	19,39 [18,03; 21,16] ^{1,2}	1,86 [1,82; 1,93] ^{1,2}	1,41 [1,40; 1,42] ¹
1 группа (n=62)				
C/C (n=47)	3,32 [2,07; 6,14]	49,38 [35,27; 70]	2,33 [2,19; 2,41]	1,07 [0,91; 1,35]
C/A (n=12)	6,5 [6,44; 6,57] ¹	29,11 [25,23; 30,19] ¹	2,15 [2,14; 2,16] ¹	1,44 [1,42; 1,45] ¹
A/A (n=3)	6,56 [6,55; 6,59] ¹	29,09 [27,91; 29,37] ¹	2,13 [2,13; 2,14] ¹	1,47 [1,46; 1,48] ^{1,2}
2 группа (n=46)				
C/C (n=33)	6,21 [5,80; 6,38]	37,04 [32,08; 40,98]	2,19 [2,16; 2,23]	1,41 [1,28; 1,44]
C/A (n=11)	6,50 [6,48; 6,52] ¹	31,49 [29,52; 35,27] ¹	2,15 [2,14; 2,17] ¹	1,45 [1,43; 1,46] ¹
A/A (n=2)	7,78 [7,75; 7,79] ^{1,2}	24,02 [22,93; 25,1] ^{1,2}	2,12 [2,11; 2,12] ^{1,2}	1,49 [1,48; 1,50] ^{1,2}

Примечание: u,¹ – статистическая значимость различий с генотипом C/C при p≤0,05; u,² – статистическая значимость различий с генотипом C/A при p≤0,05

Таблица 2

Содержание 25(OH)D, PTH, Ca и P в сыворотке крови в зависимости от генотипа полиморфизма гена *VDR-Bsm1283G>A*, Ме [P25-P75]

Показатели Генотип	25(OH)D (нг/мл)	PTH (пг/мл)	Ca (ммоль/л)	P (ммоль/л)
Контроль (n=92)				
G/G (n=33)	65,13 [50,76; 73,87]	3,08 [2,03; 4,13]	2,35 [2,29; 2,41]	0,89 [0,85; 1,01]
G/A (n=41)	35,43 [31,82; 38,12] ¹	6,28 [6,00; 6,44] ¹	2,15 [2,14; 2,16] ¹	1,34 [1,30; 1,39] ¹
A/A (n=18)	22,74 [19,36; 26,92] ^{1,2}	8,01 [6,965; 9,06] ^{1,2}	1,95 [1,86; 2,06] ^{1,2}	1,43 [1,42; 1,45] ^{1,2}
1 группа (n=62)				
G/G (n=29)	67,14 [50,18; 77,18]	2,31 [1,87; 3,27]	2,39 [2,35; 2,44]	0,93 [0,86; 1,04]
G/A	32,37	6,32	2,17	1,39

(n=27)	[30,00; 35,27] ¹	[6,14; 6,43] ¹	[2,15; 2,19] ¹	[1,35; 1,42] ¹
A/A (n=6)	29,19 [28,68; 29,41] ^{1,2}	6,53 [6,45; 6,57] ^{1,2}	2,145 [2,13; 2,15] ^{1,2}	1,45 [1,43; 1,47] ^{1,2}
2 группа (n=46)				
G/G (n=9)	52,38 [48,17; 70,21]	5,67 [4,26; 5,84]	2,28 [2,25; 2,39]	1,05 [0,91; 1,33]
G/A (n=23)	35,7 [32,85; 37,34] ¹	6,32 [6,12; 6,45] ¹	2,17 [2,16; 2,19] ¹	1,42 [1,41; 1,45] ¹
A/A (n=14)	29,45 [27,34; 30,08] ^{1,2}	6,49 [6,38; 6,53] ^{1,2}	2,14 [2,14; 2,16] ^{1,2}	1,44 [1,43; 1,47] ^{1,2}

Примечание: u_1^1 – статистическая значимость различий с генотипом G/G при $p \leq 0,05$; u_2^2 – статистическая значимость различий с генотипом G/A при $p \leq 0,05$

Корреляционные взаимосвязи SNP и изучаемых показателей у пациентов с у пациентов с замедленной консолидацией переломов

Взаимосвязи между изучаемыми полиморфизмами генов и их влиянием на нарушение консолидации отражены в таблице 3.

Таблица 3

Сила взаимосвязи исследуемых SNP генов с развитием замедленной консолидации переломов длинных костей конечностей

Показатели	V-Крамера	P	Сила взаимосвязи
<i>TNFα-308(G>A)</i>	0,06	0,8	несуществующая
<i>IL1β-3953(C>T)</i>	0,03	0,99	несуществующая
<i>IL4-589(C>T)</i>	0,06	0,8	несуществующая
<i>IL6-174(C>G)</i>	0,2	0,036	средняя
<i>TGFβ₁-25(Arg>Pro)</i>	0,64	<0,001	сильная
<i>EGFR-2073(A>T)</i>	0,61	<0,001	сильная
<i>TNFRSF11B-1181(G>C)</i>	0,61	<0,001	сильная
<i>PTH-rs62561(C>A)</i>	0,03	0,98	несуществующая
<i>VDR-BsmI283(G>A)</i>	0,21	0,019	средняя

Примечание: интерпретация значений V-Крамера (сила взаимосвязи): - менее 0,1 – несуществующая; - 0,1-0,2 – слабая; - 0,2-0,4 – средняя; - 0,4-0,6 – относительно сильная; - 0,6-0,8 – сильная; - 0,8-1,0 – очень сильная

При определении прогностической значимости оказывающих влияние полиморфизмов генов (чувствительности и специфичности) выявлено, что наиболее значимым из вышеуказанных полиморфизмов является - *TNFRSF11B-1181(G>C)* (табл. 4).

Таблица 4

Значимость полиморфизмов генов в прогнозе замедленной консолидации переломов длинных костей

Показатель	Sc	Sp	AUC	95% ДИ	p
<i>IL6-174(C>G)</i>	0,43	0,79	0,63	0,53-0,74	0,017
<i>TGFβ₁-25(Arg>Pro)</i>	0,74	0,58	0,75	0,65-0,85	<0,001
<i>EGFR-2073(A>T)</i>	0,5	0,9	0,72	0,62-0,82	<0,001
<i>TNFRSF11B-1181(G>C)</i>	0,7	0,85	0,79	0,7-0,88	<0,001
<i>VDR-BsmI283(G>A)</i>	0,8	0,47	0,68	0,65-0,85	0,002

Примечание: Sc – чувствительность; Sp – специфичность; AUC – площадь; 95% ДИ – 95% доверительный интервал; p – статистическая значимость при p<0,05

Анализируя воздействие межлокусных взаимодействий полиморфных вариантов генов кандидатов замедленной консолидации переломов установлено, что модель «*TNFRSF11B-1181(G>C)* × *TGFβ₁-25(Arg>Pro)* × *IL6-174(C>G)*» является наиболее значимой в прогнозировании данного осложнения (Sc – 0,83; Sp – 0,84; AUC – 0,88; 95% ДИ – 0,81-0,95%; p<0,001).

Следующим этапом нами выполнена оценка корреляционных взаимосвязей между изучаемыми маркерами метаболизма костной ткани (табл. 5).

Таблица 5

Корреляционные взаимосвязи маркеров метаболизма костной ткани на 60 сутки после травмы

Показатели												Обозначения	
	TGF1β	EGF	IL1β	IL6	TNFα	IL4	OPG	PTH	25OHD	Ca	P		связь слабая
TGF1β	1,00	0,63	0,34	0,61	0,12	0,28	0,42	-0,1	0,02	0,14	0,02		
EGF		1,00	0,62	0,39	0,1	0,3	0,39	-0,1	0,03	0,13	-0,0		

IL1 β			1,00	0,21	0,05	0,2	0,74	-0,2	0,11	0,18	-0,0		умеренная связь
IL6				1,00	0,07	0,16	0,3	-0,2	0,16	0,23	-0,1		заметная связь
TNF α					1,00	0,38	0,00	0,09	-0,09	-0,1	0,1		заметная связь
IL4						1,00	0,22	-0,0	-0,01	0,06	-0,0		высокая связь
OPG							1,00	-0,2	0,09	0,2	-0,1		высокая связь
PTH								1,00	-0,93	-0,9	0,9		весьма высокая связь
25OHD									1,00	0,9	-0,9		весьма высокая связь
Ca										1,00	-0,9		отсутствие значимости различий
P											1,00		отсутствие значимости различий

Примечание: менее 0,3 – связь слабая; 0,3-0,5 – умеренная связь; 0,5-0,7 – заметная связь; 0,7-0,9 – высокая связь; 0,9-1 – весьма высокая связь; белый цвет – отсутствие значимости различий.

Отмечается наличие положительной заметной связи между содержанием TGF1 β и EGF, TGF1 β и IL6, IL1 β и EGF, а также положительной высокой связи между IL1 β и OPG. Наличие данных феноменов подтверждает тот факт, что в воспалительном процессе, в том числе при консолидации переломов костей, участвует большое количество цитокинов [Мироманов А.М. и соавт., 2023]. Стоит также отметить отсутствие статистической разницы различий показателей корреляционных взаимосвязей TNF α почти со всеми исследуемыми показателями, что объясняется снижением активной роли фактора некроза опухоли альфа в процессе консолидации переломов на 60 сутки. Обращает на себя внимание положительная высокая связь между такими маркерами метаболизма фосфорно-кальциевого обмена, как витамином D и кальцием, PTH и фосфором. В свою очередь имеет место быть высокая отрицательная связь между содержанием паратиреоидного гормона, витамина D и кальция, а также фосфора, кальция и витамина D. Получившиеся корреляционные взаимосвязи между витамином D, паратиреоидным гормоном, кальцием и фосфором объясняются их классическим взаимодействием в минеральном обмене [Старосельников А.Н. и соавт., 2022].

Математическая модель прогноза замедленной консолидации переломов длинных костей конечностей

На основании бинарной логистической регрессии в уравнение были включены наиболее информативные показатели (полиморфизм гена *TNFRSF11B-1181(G>C)*, гена *TGFβ1-25(Arg>Pro)*, гена *IL6-174(C>G)*) и определена их значимость в структуре модели. Уравнение логистической регрессии имеет следующий вид:

$$K = \frac{1}{1 + e^{0,89 + 1,61 \times TNFRSF11B - 1,25 \times TGF\beta 1 - 0,6 \times IL6}}, \text{ где } K - \text{ вероятность}$$

замедленной консолидации; 1,61 – константа (регрессионный коэффициент b_0); 1,25 и 0,6 – нестандартизованные коэффициенты b ; *TNFRSF11B* – полиморфизм гена *TNFRSF11B-1181(G>C)*, *TGFβ1* – полиморфизм гена *TGFβ1-25(Arg>Pro)*, *IL6* – полиморфизм гена *IL6-174(C>G)* принимающие значение «0» при наличии нормальной гомозиготы, «1» – при наличии гетерозиготы и значение «2» – при наличии мутантной гомозиготы; e – основание натурального логарифма ($e \sim 2,72$). При значении $K > 0,425$ имеется высокий риск замедленной консолидации. Чувствительность разработанной прогностической модели составляет – 0,83, специфичность – 0,84; площадь под ROC-кривой составляет – 0,88 (95% ДИ = 0,81–0,95); $p < 0,001$ (рис. 3).

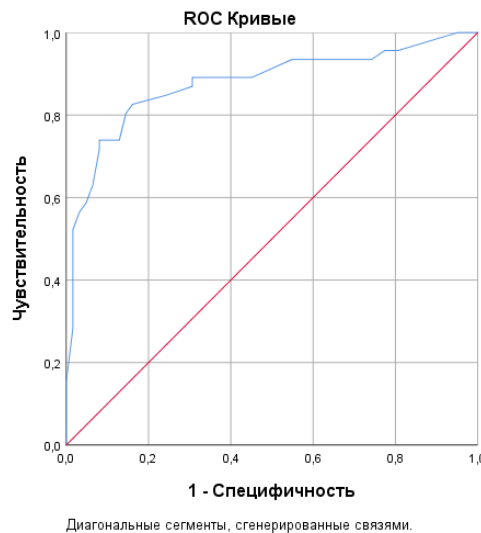


Рисунок 3. ROC-анализ вероятности замедленной консолидации по значению разработанного коэффициента (K)

Учитывая результаты, полученные в процессе наших исследований, представляется схема патогенеза замедленной консолидации переломов (рис. 4).

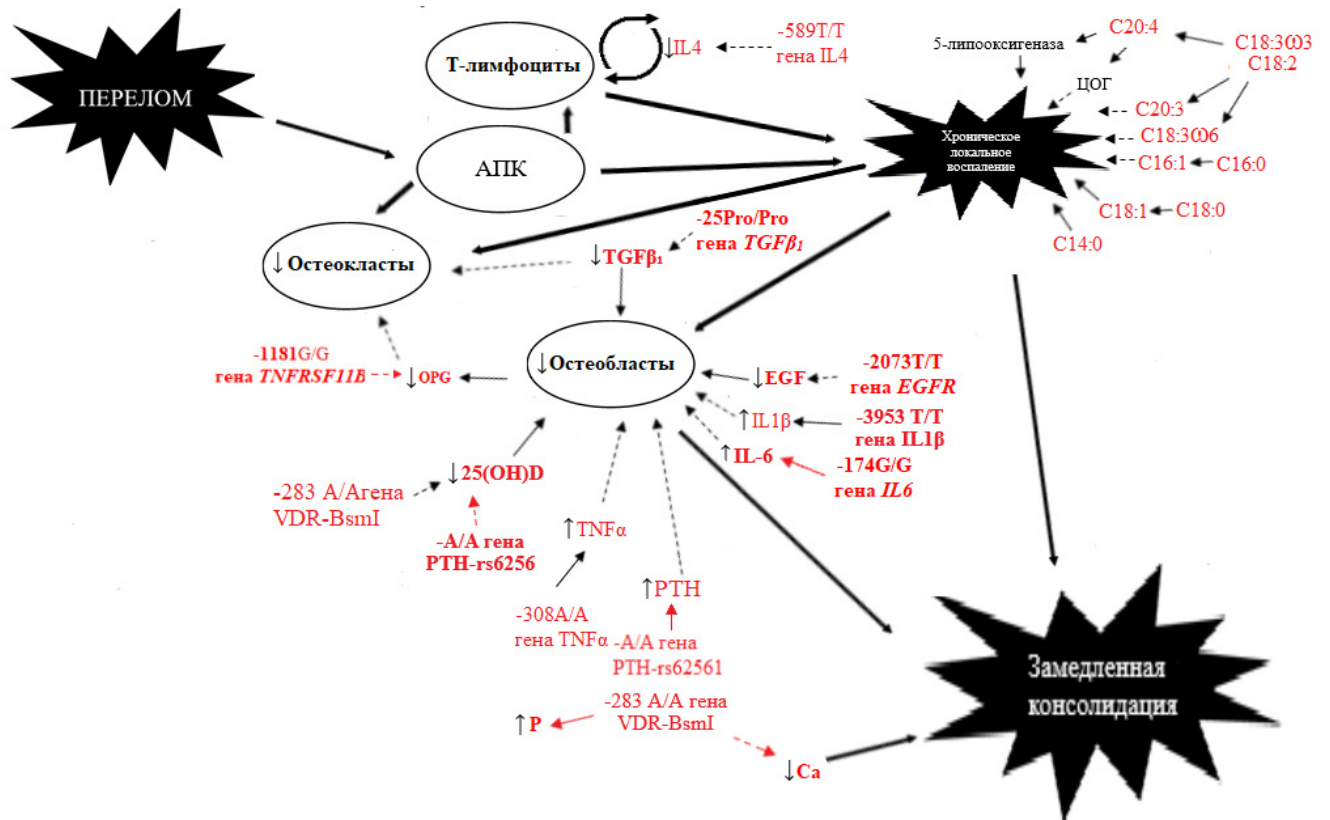


Рисунок 4. Модифицированная схема некоторых патогенетических механизмов развития замедленной консолидации при переломах длинных костей конечностей
Примечание: - красным цветом выделены исследуемые показатели; - сплошная линия – инициация; - пунктирная линия – ингибирование.

Таким образом, иммуногенетические механизмы в патогенезе замедленного сращения переломов являются важной составляющей, позволяющие интенсифицировать современные диагностические и лечебные процессы. Данная научная работа соответствует концепции приоритетного направления стратегии развития науки и здравоохранения России, в частности – «развитие персонализированной медицины, основанной на современных научных достижениях», «разработка и внедрение современных молекулярно-генетических методов прогнозирования, диагностики и мониторинга течения заболеваний» [Указ Президента РФ № 254 от 06.06.2019, № 145 от 28.02.2024].

ВЫВОДЫ

1. У пациентов при неосложненном течении переломов длинных костей конечностей через 2 месяца после травмы отмечено значимое увеличение в сыворотке крови показателя IL-1 β , IL-6, TGF- β ₁, EGF, IL-4 и OPG относительно контроля и группы с замедленной консолидацией. В группе с нарушением консолидации отмечается снижение содержания Са в 1,1 раза, повышение Р и РТН в 1,1 раза по сравнению с аналогичными параметрами группы неосложненного течения. При замедленной консолидации регистрируется снижение уровня высших жирных кислот C14:0, C18:0, C18:3 ω 3, C20:3 ω 6, C20:4 ω 6 и повышение C16:0.
2. Распределение частот аллелей и генотипов генов *TNF α (G308A)*, *IL1 β (C3953T)*, *IL4(C589T)*, и *PTH(rs6256)* у больных с замедленной консолидацией и неосложнённым течением не отличается от контроля. Частота аллели -174G- гена *IL6*, аллели -25Pro- гена *TGF β ₁*, аллели -2073T- гена *EGFR*, аллели -1181G- гена *TNFRSF11B* и аллели -283A- гена *VDR-BsmI* у пациентов с нарушением консолидации переломов превышает аналогичные показатели группы клинического сравнения и здоровых лиц, одновременно с этим регистрируется более высокое носительство генотипа -174G/G гена *IL6*, генотипа -25Pro/Pro гена *TGF β ₁*, генотипа -2073T/T гена *EGFR*, генотипа -1181G/G гена *TNFRSF11B* и генотипа -283A/A гена *VDR-BsmI*.
3. При носительстве мутантных гомозигот -308A/A гена *TNF α* , -3953T/T гена *IL1 β* в сыворотке крови регистрируется повышение уровня кодируемых белков (TNF α , IL-1 β). Носительство генотипов -589T/T гена *IL4*, -174G/G гена *IL6*, -25Pro/Pro гена *TGF β ₁*, -2073T/T гена *EGFR* и -1181C/C гена *TNFRSF11B* способствует снижению уровня IL-6, TGF β ₁, EGF, OPG, соответственно. При носительстве мутантного генотипа -A/A гена *PTH-rs62561*, -283A/A гена *VDR-BsmI* фиксируется одновременное увеличение содержания РТН, Р и уменьшение уровня 25(OH)D, Са.
4. Предрасполагающими факторами замедленной консолидации у пациентов с переломами длинных костей нижних конечностей является носительство

мутантных гомозигот генов *TGFβ₁-25(Arg>Pro)*, *IL6-174(C>G)*, *VDR-BsmI283(G>A)*, *EGFR-2073(A>T)* и нормальной гомозиготы *TNFRSF11B-1181(G>C)*. Межлокусные взаимодействия полиморфных вариантов генов *TNFRSF11B-1181(G>C)* × *TGFβ₁-25(Arg>Pro)* × *IL6-174(C>G)* × *VDR-BsmI283(G>A)* × *EGFR-2073(A>T)* повышают риск замедленной консолидации переломов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в ведущих научных рецензируемых журналах, определенных ВАК Минобрнауки России:

1. Диагностическое значение показателей высших жирных кислот в оценке развития замедленной консолидации переломов / А.М. Мироманов, О.Б. Миронова, А.Н. Старосельников, Н.А. Мироманова. – DOI 10.24411/1819-1495-2020-10020 // Политравма. – 2020. – № 2. – С. 54-58 (Scopus).
2. Современные генетические и иммунологические аспекты патогенеза нарушения консолидации переломов (обзор литературы) / А.М. Мироманов, К.А. Гусев, А.Н. Старосельников [и др.]. – DOI 10.29413/ABS.2022-7.2.6 // Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal). – 2022. – Т. 7, № 2. – С. 49-64 (Scopus).
3. Современные аспекты участия интерлейкина-1 бета и интерлейкина-6 в регенерации и обменных процессах костной ткани (обзор литературы) / А.Н. Старосельников, К.А. Гусев, О.Б. Миронова, А.М. Мироманов. – DOI 10.23888/НМЖ2023113447-458 // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2023. – Т. 11, № 3. – С. 447-458.
4. Влияние полиморфизма генов *IL1B-3953C>T*, *IL6-174C>G* на содержание *IL-1B* и *IL-6* у пациентов с замедленной консолидацией переломов длинных костей / А.М. Мироманов, К.А. Гусев, А.Н. Старосельников [и др.]. – DOI 10.17513/spno.32712 // Современные проблемы науки и образования. – 2023. – № 4. – С. 82.

Патенты на изобретения и полезные модели:

5. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2023665756 Российская Федерация. Программа для определения риска замедленной консолидации переломов длинных костей конечностей / Мироманов А.М., Гусев К.А., Старосельников А.Н. [и др.] ; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2023663572 ; дата поступления 28.06.2023 ; дата государственной регистрации в реестре программ для ЭВМ 19.07.2023. – 1 с.

Публикации в прочих изданиях:

6. Патогенетические механизмы развития осложнений при переломах длинных костей конечностей / О.Б. Миронова, К.А. Гусев, С.А. Усков, А.Н. Старосельников // Актуальные проблемы патофизиологии : научно-практическая конференция с международным участием, г. Чита, 28 октября 2020 г. / под общей редакцией Н.В. Ларёвой. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2020. – С. 74-78. – 1 CD-ROM. – Загл. с титул. экрана.
7. Генетические аспекты развития осложнений при переломах / А.М. Мироманов, О.Б. Миронова, А.Н. Старосельников [и др.] // VI съезд травматологов-ортопедов Дальневосточного федерального округа совместно со Всероссийской научно-практической конференцией с международным участием «Травматология, ортопедия и восстановительная медицина Дальнего Востока: достижения, проблемы, перспективы» : сборник научных трудов, 16-17 сентября 2021 г., г. Чита / под ред. А.М. Мироманова. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2021. – С. 99-103.
8. Гусев К.А. Персонализированный прогноз риска нарушения консолидации переломов костей конечностей / К.А. Гусев, А.М. Мироманов, А.Н. Старосельников // XII Всероссийский съезд травматологов-ортопедов : сборник тезисов, г. Москва, 1-3 декабря 2022 г. – Санкт-Петербург : Человек и его здоровье, 2022. – С. 251-252.
9. Полиморфизм генов IL1B-3953C>T, IL6-174C>G и уровень IL1B, IL6 у пациентов с нарушением консолидации переломов / А.Н. Старосельников, К.А.

Гусев, О.Б. Миронова, А.М. Мироманов // Актуальные вопросы травматологии и ортопедии Дальнего Востока : VII съезд травматологов-ортопедов Дальневосточного федерального округа : сборник тезисов Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием, г. Улан-Удэ, 25-26 августа 2023 г. – Улан-Удэ, 2023. – С. 62.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЖК- высшие жирные кислоты

IL – интерлейкин

EGF – эпидермальный фактор роста

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста

TGF – трансформирующий фактор роста

PTH – паратиреоидный гормон

OPG – остеопротегерин

TNF – фактор некроза опухоли

Ca – кальций

P – фосфор

25(OH)D – витамин D

VDR – рецептор витамина D

ПЦР – полимеразная цепная реакция

SNP – однонуклеотидный полиморфизм

ИФА – иммуноферментный анализ

Подписано в печать 17.04.2024. Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman

Формат 60x84 1/16. Авт. л. 1,0 Тираж 100. Заказ № 33/2024.

Отпечатано в редакционно-издательском центре ЧГМА 672000, Чита, ул.

Горького, 39а.