

УДК: 616-001.5-002.3:616-092

Гусев К.А., Миromanов А.М., Миromanова Н.А., Витковский Ю.А.

**ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА EGFR-2073A>T И ЭКСПРЕССИЯ РОСТОВОГО  
ФАКТОРА EGF У БОЛЬНЫХ С НАРУШЕНИЕМ КОНСОЛИДАЦИИ  
ПЕРЕЛОМОВ ДЛИННЫХ КОСТЕЙ КОНЕЧНОСТЕЙ**

ФГБОУ ВО Читинская государственная медицинская академия, г. Чита

**Резюме.** Представлены результаты исследования влияния полиморфного маркера гена эпидермального фактора роста в позиции 2073A>T на экспрессию EGF у больных с нарушением консолидации переломов костей конечностей в Забайкальском крае. Первую группу составили 62 пациента с неосложненным течением переломов (группа клинического сравнения). Вторую группу (n=46) – больные с нарушением консолидации переломов (в раннем послеоперационном периоде осложнений не зафиксировано, однако в позднем периоде зафиксировано нарушение консолидации по типу замедленной консолидации). Контрольную группу составили 100 практически здоровых доноров в возрасте от 20 до 40 лет. Сформированные группы являлись однородными по возрасту, полу, характеру и локализации переломов и проводимому лечению. Установлено, что у больных с нарушением консолидации переломов регистрируются более частое носительство генотипа -2073T/T гена EGFR. Наличие генотипа -2073T/T рецептора гена EGFR в геномсопровождается уменьшением продукции EGF.

**Ключевые слова:** полиморфизм, гены, переломы, нарушение консолидации.

Gusev K.A., Miromanov A.M., Miromanova N.A., Vitkovsky Yu.A.

**INFLUENCE OF POLYMORPHISM OF GENE EGFR-2073A>T ON EXPRESSION  
TRANSFORMING GROWTH FACTOR EGF AT PATIENTS WITH DISTURBANCE  
OF CONSOLIDATION OF FRACTURES OF LONG BONES OF EXTREMITIES**

**Summary.** Results of research of influence of a polymorphic marker of transforming growth factor beta 1 gene are presented to positions -25Arg>Pro on an expression coded transforming growth factor beta 1 at patients with disturbance of consolidation of fractures of bones of extremities in Zabaikalian edge. The first group was made by 62 patients with an uncomplicated current of fractures (group of clinical comparison). The second group (n = 46) patients with disturbance of consolidation of fractures (in the early postoperative period of complications it is not registered, however in the late period is fixed development of disturbance of consolidation as the slowed down consolidation). The control group was made by practically healthy 100 donors at the age from 20 till 40 years. The generated groups were homogeneous for an age, gender, character and localisation of fractures and spent treatment. Criterion of an exception of groups was presence of acute or chronic accompanying diseases. It is established, that at patients with disturbance of consolidation of fractures higher carriage of a genotype EGFR-2073A>Tis registered. Genotype presence -2073T/Tpolymorphism of gene EGFR promotes significant depression of an expression epidermal growth factor.

**Keywords:** polymorphism, genes, fractures, delayed consolidation

**Введение.** Среди всех повреждений переломы конечностей встречаются достаточно часто, составляя 19%, и даже несмотря на постоянное совершенствование консервативных и оперативных методов лечения, сопровождаются развитием разнообразных осложнений, не имеющих тенденции к снижению [6].

На фоне всех травм конечностей особую актуальность приобретают переломы с нарушением консолидации, которые могут достигать 50% от всех травм опорно-двигательного аппарата, а частота развития ложных суставов варьирует от 4,7 до 33,2%. В структуре последствий травм длинных костей псевдоартрозы бедра составляют по частоте до 30,8%, голени до 50,6%, плеча до 30%, а образующиеся при этом анатомо-функциональные нарушения конечности являются причиной стойкой инвалидности у 11,6-44,9% больных [6, 9]. Высокая частота неудовлетворительных результатов лечения закономерно повышает теоретический и практический интерес к дальнейшему изучению и уточнению патогенетических механизмов развития замедленной консолидации при переломах [1, 6].

В организме секретируются многочисленные медиаторы (цитокины), играющие ключевую роль в репаративных процессах. Одним из таких медиаторов является эпидермальный фактор роста (EGF) [3].

EGF стимулирует пролиферацию фибробластов и влияет на продукцию ими простагландинов, протеогликанов, коллагена, ростовых факторов и ряда цитокинов, включая колониестимулирующие факторы, интерлейкины и интерферон, что в конечном итоге способствует ускорению регенерации раневого процесса [12, 13]. EGF осуществляет свое действие с участием мембранного рецептора – EGFR, который принадлежит к семейству рецепторов ErbB. Рецепторы данного семейства состоят из внеклеточного лиганд-связывающего домена, гидрофобного трансмембранного домена и внутриклеточного домена, обладающего тирозинкиназной активностью и играющего ключевую роль при запуске внутриклеточных путей передачи сигнала [14]. Хотя рецептор EGF был открыт более 30 лет назад, механизм его активации до сих пор не ясен и интенсивно исследуется [11, 15].

Показано, что экспрессия того или иного биологически активного вещества (цитокина) генетически запрограммирована [2, 3, 10]. В настоящее время, полиморфизмы гена *EGFR* активно исследуются при злокачественных новообразованиях, ревматоидном артрите [7].

Таким образом, изучение генетического полиморфизма цитокинов, их рецепторов и эффекторных молекул, принимающих участие в миграции клеток, репарации поврежденной ткани, механизмах регуляции межклеточных взаимодействий у больных при травме, а также поиск генетических и иммунологических маркеров развития осложнений представляется перспективным как в теоретическом, так и в практическом отношении.

**Цель исследования** – изучить влияние полиморфизма гена *EGFR-2073A>T* на экспрессию EGF у больных с нарушением консолидации переломов в Забайкальском крае.

**Материалы и методы.** Проведено обследование 108 пациентов в возрасте от 20 до 40 лет с переломами длинных костей конечностей, лечившихся в травматологических стационарах г. Читы. Первую группу составили 62 пациента с неосложнённым течением переломов (группа клинического сравнения), вторую группу – 46 больных с осложнённым течением (в позднем послеоперационном периоде зарегистрировано нарушение консолидации переломов по типу замедленной консолидации). Контрольную группу составили 100 практически здоровых мужчин и женщин в возрасте от 20 до 40 лет.

Формирование групп пациентов осуществляли в соответствии с классификацией переломов, предложенной М.Е. Мюллером и соавт. (1996).

В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, 2011 – поправки) и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утверждёнными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Всем пациентам с закрытыми переломами проводилась открытая репозиция отломков с последующим металлоостеосинтезом пластинами или штифтами. Больным с открытыми переломами при поступлении выполнялась первичная хирургическая обработка и наложение аппаратов наружной фиксации. В дальнейшем применялась традиционная консервативная терапия (антибактериальные средства, дезагреганты, местное медикаментозное лечение и др.). Сформированные группы являлись относительно однородными как по возрасту, полу, характеру и локализации переломов, так и по проводимому лечению. Критерием исключения из групп являлось наличие острых или хронических сопутствующих заболеваний.

Материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из периферической венозной крови. Для исследования выбрана точковая мутация EGFR в позиции 2073A>T. Амплификацию фрагмента исследуемого гена проводили в термоцикле (модель Ре «Бис» – M111 (ООО «Бис-Н», Новосибирск). В работе использовались стандартные наборы праймеров научно-производственной фирмы «Литех»-«SNP» (Москва). Визуализация продуктов амплификации выполнена с помощью электрофореза в 3 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия в проходящем ультрафиолетовом свете [5]. Определение концентрации цитокина EGF осуществляли с помощью набора реагентов ООО

«Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Забор материала (венозная кровь) для лабораторного исследования осуществлялся на 10 сутки после травмы. Сроки наблюдения за больными составили: при поступлении в стационар (1 сутки после травмы), 10 сутки после оперативного лечения, в дальнейшем через 3 месяца.

Полученные данные обработаны с помощью пакета программ «STATISTICA 6.1» (Stat Soft, USA), «Microsoft Office Excel 2010 for Windows 7», «БИОСТАТ». Для описания характера распределения количественных признаков определялись средние величины (M), стандартные отклонения (SD). Для сравнения показателей пациентов с осложнённым и неосложнённым течением переломов длинных костей конечностей использовали критерий Манна-Уитни. Для анализа групп по качественному бинарному признаку применялся критерий  $\chi^2$ . Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Первым этапом работы осуществлено выявление частоты распределения аллелей и генотипов полиморфного гена *EGFR-2073A>T* в исследуемых группах (табл. 1).

Таблица 1

#### Частота генотипов гена *EGFR-2073A>T* и его аллельных вариантов среди здоровых резидентов и пациентов с переломами костей конечностей ( $\chi^2$ , $df = 1$ )

| Аллель / Генотип | Группа | Контроль (n=100) | Неосложненное течение (n=62) | Замедленная консолидация (n=46) |
|------------------|--------|------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Аллель - А       |        | 0,605            | 0,605                        | 0,315*/**                       |
| Аллель - Т       |        | 0,395            | 0,395                        | 0,658*/**                       |
| Генотип - А/А    |        | 0,29             | 0,306                        | 0,13*/**                        |
| Генотип - А/Т    |        | 0,63             | 0,597                        | 0,37*/**                        |
| Генотип - Т/Т    |        | 0,08             | 0,097                        | 0,5*/**                         |

*Примечание:* \* – статистическая значимость различий с контролем; \*\* – статистическая значимость различий между группой неосложненного течения и замедленной консолидацией.

Анализируя частоты распределения генотипа полиморфизма гена *EGFR-2073A>T* у пациентов в исследуемых группах, выявлено значительное преобладание гетерозиготного варианта в группе с замедленной консолидацией (генотип -2073А/Т гена *EGFR* регистрировался более чем в 59% случаев, в то время как в группе клинического сравнения менее чем в 10%). Рассматривая частоту встречаемости аллелей гена *EGFR-2073A>T*, отмечено, что аллель -2073Т- достоверно ( $p=0,0001$ ) чаще встречалась у пациентов с замедленной консолидацией, что, также позволяет нам говорить о положительной ассоциации (высоком риске) носительства аллеля -2073Т- гена *EGFR* и генотипа -2073Т/Т гена *EGFR* с нарушением регенерации костной ткани [5].

Вторым этапом проведено изучение общего содержания ростового фактора EGF на 10-е сутки после травмы (табл. 2).

Таблица 2

#### Содержание EGF у больных с неосложнённым течением переломов длинных костей конечностей и нарушением консолидации на 10-е сутки после травмы, пг/мл (M $\pm$ SD)

| Показатель | Группа | Контроль (n=100) | I группа (n=62)              | II группа (n=46)                               |
|------------|--------|------------------|------------------------------|------------------------------------------------|
| EGF        |        | 69,41 $\pm$ 24,2 | 113,9 $\pm$ 27<br>$p=0,0001$ | 82,22 $\pm$ 18,4<br>$p=0,0001$<br>$p_1=0,0001$ |

*Примечание:*  $p$  – статистическая значимость различий с контролем;  $p_1$  – статистическая значимость различий с группой клинического сравнения.

Количественные показатели EGF у пациентов с неосложненным течением и нарушением консолидации превышали аналогичные значения в контрольной группе в 1,6 и 1,2 раза соответственно, что является закономерным и говорит о продолжающихся регенераторных процессах в костной ткани [5]. Однако у больных с нарушением консолидации регистрировалось снижение данного параметра в 1,3 раза по сопоставлению с группой клинического сравнения, что подтверждает ведущую роль исследуемого белка в процессах регенерации тканей и свидетельствует о нарушении консолидации перелома [5, 6].

Следующим этапом установлено влияние генотипов полиморфизма гена *EGFR-2073A>T* на уровень продукции кодируемого цитокина (табл. 3).

Таблица 3

**Содержание EGF на 10-е сутки в крови у травмированных больных в зависимости от генотипа полиморфизма гена *EGFR-2073A>T*, пг/мл (M ± SD)**

| Генотип       | Группа | Контроль                                                             | Неосложнённое течение                                                           | Замедленная консолидация                                                                                  |
|---------------|--------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Генотип - A/A |        | 97,24±11,18 (n=29)                                                   | 144,5±10,69 (n=19)<br>p=0,001                                                   | 112,4±3,3 (n=6)<br>p=0,003<br>p <sub>1</sub> =0,0001                                                      |
| Генотип - A/T |        | 62,1±14,9 (n=63)<br>p <sub>2</sub> =0,0001                           | 105,2±17,24 (n=37)<br>p=0,0001<br>p <sub>2</sub> =0,0001                        | 91,77±10,2 (n=17)<br>p=0,0001<br>p <sub>1</sub> =0,004<br>p <sub>2</sub> =0,0001                          |
| Генотип - T/T |        | 26,14±3,22 (n=8)<br>p <sub>2</sub> =0,0001<br>p <sub>3</sub> =0,0001 | 70,33±2,4 (n=6)<br>p=0,0001<br>p <sub>2</sub> =0,0001<br>p <sub>3</sub> =0,0001 | 67,29±8,2 (n=23)<br>p=0,0001<br>p <sub>1</sub> =0,383<br>p <sub>2</sub> =0,0001<br>p <sub>3</sub> =0,0001 |

*Примечание:* p – статистическая значимость различий с контролем; p<sub>1</sub> – статистическая значимость различий с неосложнённым течением переломов; p<sub>2</sub> – статистическая значимость различий с генотипом A/A; p<sub>3</sub> – статистическая значимость различий с генотипом A/T.

Изучая влияние полиморфизма гена *EGFR-2073A>T* на содержание цитокина EGF установлено, что в группе больных с неосложненным течением переломов при наличии генотипа -2073A/A регистрировалось увеличение продукции исследуемого ростового фактора в 1,4 и 2,1 раза по сопоставлению с аналогичным показателем при носительстве генотипа -2073A/T и генотипа -2073T/T, соответственно. Аналогичная экспрессия EGF в зависимости от носительства генотипа выявлена не только в группе с нарушением консолидации переломов, но и в группе контроля (табл. 3).

Таким образом, наличие генотипа -2073T/T полиморфизма гена *EGFR* у пациентов с переломами костей конечностей значимо снижает экспрессию EGF, что в свою очередь приводит к дисбалансу процессов ремоделирования костной ткани и нарушению консолидации переломов [4, 6].

Однако, исходя из данных о роли EGFR, можно предположить, что в зависимости от совокупности других факторов, неблагоприятным может оказаться как низкий, так и высокий уровень, и соответственно, носительство альтернативных аллелей полиморфных участков гена, влияющих на уровень продукции белка. Функциональная значимость полиморфизма генов в работах разных исследователей неоднозначна, что, по-видимому, обусловлено природой патогенеза заболевания, особенностями клеточных линий, стимуляторов и другими условиями эксперимента [7, 8].

У пациентов с нарушением консолидации переломов наиболее часто встречается гомозиготный генотип мутаций -2073T/T гена *EGFR*, что повышает вероятность развития нарушения регенераторных процессов при переломах. Данный факт указывает на важный вклад аллельного полиморфизма генов данного цитокина в индивидуальные различия паци-

ентов по характеру течения репаративной регенерации [5], вследствие разной экспрессии кодируемого цитокина [4, 8].

Идентификация генов и их влияния на экспрессию кодируемых белков способствует пониманию фундаментальных процессов патогенеза нарушения репаративных процессов в костной ткани, что в конечном итоге позволит сделать долгосрочный индивидуальный прогноз для пациента и при необходимости проводить необходимые профилактические мероприятия для предотвращения возможного осложнения.

**Выводы:** 1. У больных с нарушением консолидации переломов регистрируется более частое носительство генотипа - 2073T/Тгена *EGFR*. 2. Наличие в геноме генотипа -2073T/Т гена *EGFR* способствует более низкой экспрессии эпидермального фактора роста EGF.

### Литература:

1. Берченко Г.Н. Биология заживления переломов кости и влияние биоконпозиционного наноструктурированного материала коллапан на активизацию репаративного остеогенеза / Г.Н. Берченко // Медицинский алфавит. Больница. – 2011. – № 1. – С. 12-17.
2. Генетический полиморфизм цитокинов / В.Н. Цыган [и др.] // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2010. – № 2. – С. 211-219.
3. Кетлинский С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. – СПб. : Фолиант, 2008. – 552 с.
4. Мироманов А.М. Влияние полиморфизма гена  $TGF\beta 1-25Arg>Pro$  на экспрессию ростового фактора  $TGF\beta 1$  у больных с нарушением консолидации переломов в Забайкальском крае / А.М. Мироманов, К.А. Гусев, Н.А. Мироманова // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 1-5. – С. 1008-1012.
5. Мироманов А.М. Полиморфизм гена  $TGF\beta 1 (Arg25Pro)$  и гена  $EGF (A2073T)$  у больных с нарушением консолидации переломов в Забайкальском крае / А.М. Мироманов, К.А. Гусев, С.А. Усков // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10. – Ч. 7. – С. 1360-1364.
6. Мироманов А.М. Прогностические критерии развития осложнений при переломах костей конечностей / А.М. Мироманов, Е.В. Намоконов. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2014. – 175 с.
7. Молекулярно-генетические исследования в практике онкологической клиники / Н.Е. Торопова [и др.] // Известия Самарского научного центра РАН. – 2015. – № 2. – С. 690-696.
8. Оценка значимости полиморфизмов генов  $LRP5$ ,  $VMP4$ ,  $TGF\beta 1$  при постменопаузальном остеопорозе / В.А. Мякоткин [и др.] // Научно-практическая ревматология. – 2008. – № 3. – С. 8-15.
9. Сочетанное применение обогащенной тромбоцитами аутоплазмы и биоконпозиционного материала Коллапан в комплексном лечении больных с длительно несрастающими переломами и ложными суставами длинных костей конечностей / Г.А. Кесян [и др.] // Вестник травматологии и ортопедии им Н.Н. Приорова. – 2011. – № 2. – С. 26-32.
10. Cytokine gene polymorphism in human disease : on-line databases, supplement 1 / J. Bidwell [et al.] // Genes Immun. – 2001. – Vol. 2. – P. 61-70.
11. Engineered epidermal growth factor mutants with faster binding on-rates correlate with enhanced receptor activation // J.L. Lahti [et al.] // FEBS Lett. – 2011. – Vol. 585. – P. 1135-1139.
12. Feng J. Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) and necrotizing enterocolitis / J. Feng, O.N. El-Assal, G.E. Besner // Semin Pediatr Surg. – 2005. – Vol. 14. – P. 167-174.
13. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor overexpression in transgenic mice increases resistance to necrotizing enterocolitis / A. Radulescu [et al.] // J Pediatr Surg. – 2010. – Vol. 45. – P. 1933-1939.
14. Leahy D.J. Structure and function of the epidermal growth factor (EGF/ErbB) family of receptors / D.J. Leahy // Advances in Protein Chemistry. – 2004. – Vol. 68. – P. 1-27.
15. Regulation of the catalytic activity of the EGF receptor / N.F. Endres [et al.] // Curr Opin Struct Biol. – 2011. – Vol. 21. – P. 777-784.