

УДК 575.224.22: 612.398.192:616.71-001.59

БЕЗСМЕРТНИЙ Ю.О.

НДІ реабілітації інвалідів Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова

ПОШИРЕНІСТЬ МУТАЦІЇ ПРОМОТОРА ГЕНА eNOS T786C У ХВОРИХ ІЗ ХИБНИМИ СУГЛОБАМИ ДОВГИХ КІСТОК: ЗВ'ЯЗОК ІЗ РІВНЕМ ГОМОЦИСТЕЇНУ ТА МЕДІАТОРАМИ ЗАПАЛЕННЯ

Резюме. У статті подані порівняльні результати поширеності мутації промотора гена eNOS T786C у 130 хворих із хибними суглобами довгих кісток та в осіб із консолідованими переломами. Встановлено, що частота зустрічаємості С-алелі серед хворих із хибними суглобами була в 1,35 раза вищою, ніж серед осіб із консолідованими переломами. Мутація промотора гена eNOS T786C асоціювалась із розвитком гіпопластичних та апластичних типів хибних суглобів, збільшенням частки осіб із гіпергомоцистеїнемією, підвищенням вмістом медіаторів запалення та розвитком нейродистрофічного синдрому і рефрактур.

Ключові слова: мутація eNOS T786C, хибний суглоб, гіпергомоцистеїнемія, медіатори запалення.

Порушення репаративної регенерації кісток залишаються однією з невирішених проблем як у медичному, так і в соціально-економічному аспекті, оскільки посідають чільне місце серед причин тимчасової та стійкої непрацездатності населення [5]. З огляду на факт прогресуючого зростання техногенності травми, збільшення частоти множинних та комбінованих пошкоджень кісток з'ясування інтимних механізмів порушень репаративного остеогенезу та оптимізація методів профілактики та лікування незрощень довгих кісток і хибних суглобів є проблемою, яка потребує термінового вирішення.

Відомо, що перебіг репаративного остеогенезу залежить від локального кровообігу в зоні ушкодження [5], що певною мірою детермінується станом периферійних судин до моменту травми. В останні роки з'явилися переконливі докази, що порушення ендотеліальної секреції вазоактивного медіатора оксиду азоту впливає на кісткову тканину [3, 4, 6] і асоціюється з порушенням структурно-функціонального стану кісткової тканини, розвитком остеопорузу та остеопоротичних переломів [9, 10]. В окремих експериментальних роботах висвітлено важливу роль NO в реалізації патогенетичних механізмів негативного впливу гомоцистеїну (ГЦ) на кістку. Так, за умов інгібування синтази оксиду азоту вірогідно потенціювався остеотоксичний ефект гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ) [3] і пригнічувалась диференціація кісткоутворюючих клітин [11]. Тому постає питання й щодо ролі порушень судинної продукції оксиду азоту в процесах репаративного остеогенезу та формування хибних суглобів.

Одним із визнаних генетичних чинників, що суттєво порушує ендотеліальний синтез NO, є поліморфізм промотора гена eNOS T786C [8]. Зниження здатності судинної стінки до продукції оксиду азоту, як відомо, пов'язане з включенням вазоконстрикторних механізмів, ішемією та тромбозами. Гіпотетично поліморфізм гена eNOS T786C може виявитись фактором, що впливає на перебіг репаративного остеогенезу, однак досліджень у даному напрямку раніше не проводилось.

Мета роботи: вивчити поширеність поліморфізму промотора гена eNOS T786C в осіб із консолідованими переломами та хибними суглобами довгих кісток та оцінити його зв'язок із клініко-рентгенологічними типами хибних суглобів, наявністю ускладнень, гіпергомоцистеїнемією та запальним синдромом.

Матеріал та методи

До групи спостереження увійшли 118 (20,13 %) із 586 обстежених хворих із хибними суглобами довгих кісток на рівні діафізу, які не мали встановлених об'єктивних та ятрогенних чинників порушень репаративного остеогенезу. Середній вік становив $39,34 \pm 11,01$ року. Осіб чоловічої статі було 91 (77,12 %), жіночої — 27 (22,88 %). Тривалість захворювання від 11 до 126 міс. За клініко-рентгенологічною характеристикою хибного суглоба нормопластичний тип діагностовано у 24 (20,34 %), гіперпластичний — у 21 (17,8 %), гіпопластичний — у

© Безсмертний Ю.О., 2013

© «Травма», 2013

© Заславський О.Ю., 2013

36 (30,5 %), атрофічний — у 37 (31,36 %) хворих. Рефрактури та нейродистрофічний синдром відмічались у 24 (20,34 %) та 39 (33,05 %) осіб відповідно. До групи контролю увійшли 48 хворих із консолюдованими діафізарними переломами, порівнянні з групою хворих із хибними суглобами за віком, статтю, локалізацією ушкодження, частотою супутньої патології.

Забір крові для молекулярно-генетичних досліджень здійснювали в стандартних умовах — з 8:00 до 9:00, натще, після нічного голодування, з ліктьової вени за допомогою вакутейнерів у пробірці Vacuette (Greiner Bio-One, Австрія) з 3,8% розчином цитрату натрію (у співвідношенні 9 : 1) та без антикоагулянтів. Уміст загального ГЦ, медіаторів запалення С-реактивного білка (СРБ) та інтерлейкіну-6 (ІЛ-6) визначали імуноферментним методом за наборами Homocysteine EIA (Axis-Shield, Англія), hsCRP ELISA (DRG, США) та ІЛ-6 ELISA (Diacclone, Франція) відповідно до інструкції фірми-виробника на аналізаторі STAT FAX 303/PLUS. При ранжируванні рівнів ГЦ користувались критеріями D.W. Jacobsen (1998) та референтними інтервалами, розробленими [1] для вітчизняної популяції здорових дорослих осіб. Ранжирування рівнів С-реактивного білка та інтерлейкіну-6 проводили згідно з вітчизняними критеріями та референтними інтервалами, розробленими І.І. Андрушко [2].

Для генетичних досліджень відбирали проби цільної крові, стабілізованої цитратом натрію, які до тестування зберігали при температурі -20°C . Генотипування проводилось методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із наступним рестрикційним аналізом продуктів ПЛР. Вивчалась мутація гена ендотеліальної синтази нітрогену монооксиду (NOS 3 T786C).

Статистичний аналіз матеріалу проводився за допомогою стандартних методів із застосуванням пакету прикладних програм MS Excel XP та Statistica SPSS 10.0 for Windows (ліцензійний номер 305147890).

Результати і їх обговорення

При дослідженні поліморфізму промотора гена eNOS T786C було встановлено, що серед осіб із консолюдованими переломами співвідношення нормальних гомозигот (786-ТТ), гетерозигот (786-ТС) та гомозигот із патологічним генотипом 786-СС становило 50,0, 43,8 та 6,2 % відповідно (табл. 1). Розподіл частот генотипів ТТ/ТС/СС у групі осіб із консолюдованими переломами відповідав рівновазі Харді — Вайнберга і узгоджувався з даними щодо поширеності поліморфізму гена eNOS T786C серед практично здорових осіб в українській популяції [7]. Розподіл частот зустрічальності вказаних генотипів у групі хворих із хибними суглобами також підкорявся закону Харді — Вайнберга, однак відрізнявся від такого в групі порівняння. Серед хворих із хибними суглобами спостерігалась тенденція до зменшення частки нормальних гомозигот 786-ТТ і вірогідно у 2,6 раза збільшувалась частка гомозигот 786-СС. Відповідно частота зустрічальності С-алелі серед хворих із хибними суглобами була вищою, ніж серед осіб із консолюдованими переломами, і становила 37,7 % проти 28,1 %.

Типологічний аналіз показав, що серед хворих із нормопластичним типом поширеність С-алелі промотора eNOS та співвідношення генотипів ТТ/ТС/СС узгоджувались із такими в групі хворих із консолюдованими переломами (50,0, 41,7 та 8,3 %). У групі осіб із гіперпластичним типом спостерігалось незначне зменшення частоти генотипу 786-ТТ та збільшення частоти генотипу 786-СС. У той же час серед хворих із гіпопластичним та атрофічним типом частка нормальних гомозигот 786-ТТ була меншою (в 1,4 раза), ніж серед хворих із нормопластичним типом, натомість частіше виявлялись гетерозиготи 786-ТС, а частка патологічних гомозигот 786-СС зростала в 2,3 та 2,6 раза відповідно. Частота С-алелі при авітальних типах хибних суглобів

Таблиця 1. Частота генотипів eNOS T786C в осіб із консолюдованими переломами та хибними суглобами довгих кісток

Характеристика групи		Частота генотипів eNOS T786C, n (%)			Частота С-алелі, %
		786-ТТ	786-ТС	786-СС	
1	Консолюдовані переломи, n = 48	24 (50,0)	21 (43,8)	3 (6,2)	28,1
2	Хворі з хибними суглобами, n = 118	48 (40,7)	51 (43,2)	19 (16,1)	37,7
	p _{1,2}	> 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05
У тому числі залежно від клініко-рентгенологічного типу хибного суглоба					
3	Нормопластичний тип, n = 24	12 (50,0)	10 (41,7)	2 (8,3)	29,2
4	Гіперпластичний тип, n = 21	10 (47,6)	9 (42,9)	2 (9,5)	31,0
	p _{3,4}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
5	Гіпопластичний тип, n = 36	13 (36,1)	16 (44,4)	7 (19,4)	41,7
	p _{3,5}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
6	Атрофічний тип, n = 37	13 (35,1)	16 (43,2)	8 (21,6)	43,2
	p _{3,6}	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

сягала 41,7–43,2 % порівняно з 29–31 % при вітальних типах.

Аналіз частот генотипів eNOS T786C залежно від наявності нейротрофічного синдрому та рефрактур виявив суттєві відмінності між групами (табл. 2). Так, серед хворих із нейродистрофічним синдромом частота зустрічальності генотипу 786-ТТ була вірогідно меншою (у 2,5 раза), а патологічного генотипу 786-СС, навпаки, більшою (у 3,5 раза), ніж серед хворих без нейродистрофічного синдрому. Частота патологічної С-алелі в групі хворих із нейродистрофічним синдромом становила 55,1 % проти 29,0 % у групі хворих без цього ускладнення. Аналогічні за спрямованістю, хоча і менш виражені, тенденції виявились при аналізі частот генотипів eNOS T786C у хворих із рефрактурами та без них. Зокрема, серед хворих без рефрактур частка нормальних гомозигот ТТ була вищою (в 1,8 раза), а частка патологічних гомозигот СС, навпаки, нижчою (у 2,3 раза), ніж серед хворих із рефрактурами.

Виявилось, що середній рівень ГЦ у патологічних гомозигот 786-СС вірогідно вищий (на 12,4 %), ніж у нормальних гомозигот 786-ТТ (табл. 3). Серед носіїв генотипу 786-СС також вірогідно частіше виявлялись хворі з ГЦ, ніж серед носіїв генотипів 786-ТТ та 786-ТС.

Встановлено, що у хворих із хибними суглобами гетеро- і особливо гомозиготне носійство С-алелі супроводжувалось вірогідним збільшенням умісту прозапальних медіаторів у сироватці крові (табл. 4). Так, у гетерозигот 786-ТС і гомозигот 786-СС рівень СРБ вірогідно перевищував такий у нормальних гомозигот ТТ на 23,9 та 46,6 %, а рівень інтерлейкіну-6 — на 13,4 та 35,4 % відповідно. Виявлені відмінності пояснюються більш високою частотою зустрічальності аберантних рівнів медіаторів запалення у хворих із хибними суглобами — носіїв патологічної С-алелі промотора гена eNOS (табл. 5).

Отже, за поширеністю поліморфізму промотора гена eNOS T786C хворі з хибними суглобами відрізня-

Таблиця 2. Частота генотипів eNOS T786C у хворих із хибними суглобами довгих кісток залежно від наявності рефрактур та нейродистрофічного синдрому

Характеристика групи		Частота генотипів eNOS T786C, n (%)			Частота С-алелі, %
		786-ТТ	786-ТС	786-СС	
1	Без нейродистрофічного синдрому, n = 79	40 (50,6)	32 (40,5)	7 (8,9)	29,0
2	З нейродистрофічним синдромом, n = 39	8 (20,5)	19 (48,7)	12 (30,8)	55,1
	p _{1,2}	< 0,01	> 0,05	< 0,01	< 0,01
3	Хворі без рефрактур, n = 94	42 (44,7)	40 (42,6)	12 (12,8)	34,0
4	Хворі з рефрактурами, n = 24	6 (25,0)	11 (45,8)	7 (29,2)	52,1
	p _{3,4}	0,1	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Таблиця 3. Рівень гомоцистеїну та частота ГЦ у хворих із хибними суглобами довгих кісток залежно від генотипу eNOS T786C

Генотип eNOS T786C		ГЦ, мкмоль/л	Частота ГЦ (> 15 мкмоль/л)
		M ± m	n (%)
1	Гомозиготи 786-ТТ, n = 48	13,70 ± 0,42	20 (41,7)
2	Гетерозиготи 786-ТС, n = 51	14,40 ± 0,42	28 (54,9)
	p _{1,2}	> 0,05	> 0,05
3	Гомозиготи 786-СС, n = 19	15,40 ± 0,66	13 (68,4)
	p _{3,1}	< 0,05	< 0,05
	p _{3,2}	> 0,05	> 0,05

Таблиця 4. Вміст маркерів запалення в сироватці крові у хворих із хибними суглобами довгих кісток залежно від генотипу eNOS T786C (M ± m)

Генотип eNOS T786C		С-реактивний білок, мг/л	Інтерлейкін-6, нг/л
1	Гомозиготи 786-ТТ, n = 48	4,76 ± 0,32	7,68 ± 0,34
2	Гетерозиготи 786-ТС, n = 51	5,90 ± 0,34	8,71 ± 0,32
	p _{1,2}	< 0,05	< 0,05
3	Гомозиготи 786-СС, n = 19	6,98 ± 0,50	10,40 ± 0,38
	p _{3,1}	< 0,01	< 0,001
	p _{3,2}	> 0,05	< 0,01

Таблиця 5. Частота виявлення аберантних рівнів медіаторів запалення у хворих із хибними суглобами довгих кісток залежно від генотипу eNOS T786C, n (%)

Генотип eNOS T786C		Частота виявлення аберантних рівнів медіаторів запалення, n (%)	
		С-реактивний білок	Інтерлейкін-6
		> 5,0 мг/л	> 9,0 нг/л
1	Гомозиготи 786-ТТ, n = 48	9 (18,8)	10 (20,8)
2	Гетерозиготи 786-ТС, n = 51	21 (41,2)	20 (39,2)
	p _{1,2}	< 0,05	< 0,05
3	Гомозиготи 786-СС, n = 19	14 (73,7)	16 (84,2)
	p _{3,1}	< 0,01	< 0,001
	p _{3,2}	< 0,05	< 0,001

ються від осіб із консолідованими переломами: спостерігається зростання частоти зустрічальності патологічної С-алелі, вірогідно зростає частота генотипу СС і знижується частота нормального генотипу ТТ. Гомозиготи СС концентруються переважно в групах хворих із гіпопластичним та атрофічним типом хибних суглобів, на той час як частотний розподіл генотипів серед хворих із нормопластичним типом наближається до такого в осіб із консолідованими переломами.

Висновки

1. При генотипуванні eNOS T786C у хворих із хибними суглобами довгих кісток спостерігали тенденцію до зменшення частки нормальних гомозигот 786-ТТ, збільшення кількості гетерозигот (786-СТ) та патологічних гомозигот (786-СС). Частота зустрічальності С-алелі серед хворих із хибними суглобами була вищою, ніж серед осіб із консолідованими переломами, і становила 37,7 проти 28,1 %.

2. Частка патологічних гомозигот 786-СС серед хворих із гіпопластичним та атрофічним типом хибного суглоба була вищою у 2,3 та 2,6 раза відповідно, ніж серед хворих із нормопластичним типом. Частота С-алелі при авітальних типах хибних суглобів сягала 41,7–43,2 % порівняно з 29–31 % при вітальних типах.

3. Гомозиготні носії С-алелі переважали серед хворих із нейродистрофічним синдромом та рефрактурами. Серед хворих із генотипом eNOS 786-СС частіше виявлялись особи з аберантними рівнями ГЦ та маркерів запалення.

Список літератури

1. Андрушко І.І. Гіпергомоцистеїнемія як фактор патогенезу атеросклерозу та ішемічної хвороби серця; механізми її проатерогенної дії: автореф. дис. на здобуття наук. ступ. докт. мед. наук : спец. 14.01.11 «Кардіологія» / І.І. Андрушко. — К., 2012. — 34 с.
2. Андрушко І.І. Рівні С-реактивного білка та інтерлейкіну-6 у здорових осіб та у хворих на ішемічну хворобу серця / І.І. Андрушко // Буковинський медичний вісник. — 2008. — Т. 12, № 3. — С. 12–17.
3. Безсмертний Ю.О. Ендотеліальна секреція вазоактивних молекул у різні періоди репаративного остеогенезу при гі-

пергомоцистеїнемії / Ю.О. Безсмертний // Буковинський медичний вісник, 2012. — Т. 16, № 2(62). — С. 3–6.

4. Заїчко Н.В. Рівні гоомоцистеїну, цистеїну та гідрогенсульфіду в плазмі крові пацієнтів з тромбозами глибоких вен нижніх кінцівок: зв'язок з поліморфізмом C677T в гені метилентетрагідрофолатредуктази / Н.В. Заїчко // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. — 2010. — № 4. — С. 35–41.
5. Корж Н.А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Нарушение регенерации кости (Сообщение 2) / Н.А. Корж, К.К. Романенко, Л.Д. Горидова // Ортопедия, травматология и протезирование. — 2006. — № 1. — С. 84–90.
6. Метаболізм гоомоцистеїну та його роль у патології / Пен-тук О.О., Луцок М.Б., Андрушко І.І., Постовітенко К.П. // Укр. біохім. журн. — 2003. — Т. 75, № 1. — С. 5–17.
7. Поліморфізм T-786C промотора гена ендотеліальної NO-синтази: зв'язок з ефективністю тромболітичної терапії у пацієнтів з острым інфарктом міокарда / Пархоменко А.Н., Кожухов С.Н., Лутай Я.М. і др. // Український медичний часопис. — 2008. — № 4(66). — VII–VIII. — С. 20–23.
8. Распространенность, патогенетическое и прогностическое значение полиморфизма промотора гена эндотелиальной NO-синтазы у больных с острым коронарным синдромом [Текст] / А.Н. Пархоменко, Я.М. Лутай, В.Е. Досенко и др. // Український кардіологічний журнал. — 2005. — № 4. — С. 20–27.
9. Hydrogen sulfide protects MC3T3-E1 osteoblastic cells against H(2)O(2)-induced oxidative damage-implications for the treatment of osteoporosis / Xu Z.S., Wang X.Y., Xiao D.M. [et al.] // Free Radic Biol Med. — 2011. — Vol. 50, № 10. — P. 1314–1323.
10. L-arginine prevents bone loss and bone collagen breakdown in cyclosporin A-treated rats / Fiore C.E., Pennisi P., Cutuli V.M. [et al.] // Eur. J. Pharmacol. — 2000. — Vol. 408, № 3. — P. 323–326.
11. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition / Ocarino N.M., Boeloni J.N., Goes A.M. [et al.] // Nitric Oxide. — 2008. — Vol. 19, № 4. — P. 320–325.

Отримано 15.03.13 □

Бессмертный Ю.А.

НИИ реабилитации инвалидов Винницкого национального
медицинского университета им. Н.И. Пирогова

**РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МУТАЦИИ ПРОМОТОРА
ГЕНА ENOS T786C У БОЛЬНЫХ С ЛОЖНЫМИ
СУСТАВАМИ ДЛИННЫХ КОСТЕЙ: СВЯЗЬ С УРОВНЕМ
ГОМОЦИСТЕИНА И МЕДИАТОРАМИ ВОСПАЛЕНИЯ**

Резюме. В статье представлены сравнительные результаты распространенности мутации промотора гена eNOS T786C у 130 больных с ложными суставами длинных костей и у лиц с консолидированными переломами. Установлено, что частота встречаемости С-аллели среди больных с ложными суставами была в 1,35 раза выше, чем у лиц с консолидированными переломами. Мутация промотора гена eNOS T786C ассоциировалась с развитием гипопластических и апластических типов ложных суставов, увеличением доли лиц с гипергомоцистеинемией, повышенным содержанием медиаторов воспаления, развитием нейродистрофического синдрома и рефрактур.

Ключевые слова: мутация eNOS T786C, ложный сустав, гипергомоцистеинемия, медиаторы воспаления.

Bezsmertny Yu.O.

Research Institute for Rehabilitation of Disabled Persons
at Vinnytsya National Medical University named
after M.I. Pyrogov, Vinnytsya, Ukraine

**THE FREQUENCY OF MUTATIONS IN GENE PROMOTER
ENOS T786C IN PATIENTS WITH FALSE JOINTS OF LONG
BONES: RELATIONSHIP WITH HOMOCYSTEINE LEVEL AND
INFLAMMATORY MEDIATORS**

Summary. The paper presents the comparative results of the prevalence of eNOS gene promoter mutation T786C in 130 patients with false joints of long bones and in those with consolidated fractures. It is found that the frequency of occurrence of the C-allele in patients with false joints was 1.35 times higher than for people with consolidated fractures. ENOS gene promoter mutation T786C was associated with the development of hypoplastic and aplastic types of false joints, increase in the proportion of persons with hyperhomocysteinemia, elevated inflammatory mediators, development of neurodystrophic syndrome and refractures.

Key words: eNOS T786C mutation, false joint, hyperhomocysteinemia, inflammatory mediators.