

Ю.О. Безсмертний

МУТАЦІЯ ПРОМОТОРА ГЕНА СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ eNOS T786C У ХВОРИХ З ХИБНИМИ СУГЛОБАМИ ДОВГИХ КІСТОК: ЗВ'ЯЗОК З РІВНЕМ ЛІПІДІВ ТА ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЮ ФУНКЦІЄЮ СУДИН

*НДІ реабілітації інвалідів Вінницького національного
медичного університету ім. М.І. Пирогова
(директор – д. мед. н., проф. В.І. Шевчук)
Вінниця, 21029, Україна
Institute of Rehabilitation, Vinnitsa national medical university M.I. Pirogov
Vinnitsa, 21029, Ukraine
e-mail: bess_mert_niy@mail.ru*

Ключові слова: мутація eNOS T786C, хибний суглоб, ліпіди, ендотеліальна функція
Key words: mutation eNOS T786C, pseudoarthrosis, lipids, endothelial function

Реферат. Мутація промотора гена синтази оксиду азота eNOS T786C у больних с ложными суставами длинных костей: взаимосвязь с уровнем липидов и эндотелиальной функцией сосудов. **Бессмертний Ю.А.** Цель работы: изучить распространенность полиморфизма промотора гена eNOS T786C у лиц с ложными суставами длинных костей и оценить его связь с уровнем липидов и эндотелиальной функцией сосудов. Материалы и методы исследования. У 118 больных с ложными суставами длинных костей изучена частота мутации промотора гена eNOS T786C и определена ее взаимосвязь с уровнем липидов и эндотелиальной функцией сосудов. Группу контроля составили 48 больных с консолидированными диафизарными переломами, репрезентативные по возрасту, полу и локализации повреждения. Результаты и их обсуждение. Патологические гомозиготы eNOS 786-CC накапливаются преимущественно в группах больных с гипопластическим и атрофическим типом ложных суставов, в то время как частота распределения генотипов среди больных с нормопластичным типом соответствует такому у лиц с консолидированными переломами. Среди больных с генотипом eNOS 786-CC чаще выявляются лица с aberrантными уровнями липидов и структурно-функциональными изменениями общей сонной, плечевой и бедренной артерий. Выводы. У больных с ложными суставами длинных костей отмечается тенденция к уменьшению доли нормальных гомозигот (786-TT), увеличению гетерозигот (786-CT) и доли лиц с патологическим генотипом 786-CC. Мутация гена eNOS T786C ассоциировалась с развитием гипопластических и апластических типов ложных суставов, увеличением доли лиц с aberrантными уровнями липидов, эндотелиальной дисфункцией центральных и периферических сосудов.

Abstract. Mutation of the gene promoter synthase nitric oxide eNOS T786C in patients with pseudoarthrosis of long bones: relationship with lipid levels and endothelial function. **Bezsmertnyi Yu.O.** Objective: The prevalence of gene promoter polymorphism eNOS T786C and its relationship with the level of lipids and vascular endothelial function in patients with pseudoarthrosis of long bones was investigated. Materials and methods. In 118 patients with pseudoarthrosis of long bones frequency of mutation of gene promoter eNOS T786C was studied and its relationship to lipid levels and vascular endothelial function was determined. The control group consisted of 48 patients with consolidated diaphyseal fractures, representative by age, gender and location of the damage. Results and discussion. Pathological homozygotes eNOS 786-CC accumulate predominantly in patients with hypoplastic and atrophic type of pseudoarthrosis. The frequency of genotypes distribution in patients with normoplastic type of pseudoarthrosis corresponded to the same in people with consolidated fractures. In patients with genotype eNOS 786-CC more often individuals with aberrant lipid levels and structural and functional changes in the common carotid, brachial and femoral arteries are identified. Conclusions. In patients with pseudoarthrosis of long bones tendency to decrease in the proportion of normal homozygotes (786-TT), increase in heterozygotes (786-CT) and the proportion of individuals with abnormal genotype 786-CC is observed. The mutation in gene T786C eNOS was associated with the development of hypoplastic and aplastic types of pseudoarthrosis, increasing the proportion of persons with aberrant lipid levels, endothelial dysfunction of the central and peripheral vessels.

Перебіг репаративної регенерації кісткової тканини характеризується певною стадійністю. Послідовність стадій та їх часові характеристики залежать від багатьох факторів: обсягу та кін-

тики травми, функціональних порушень окремих регуляторних систем, остеоіндуктивного потенціалу організму, імунологічного статусу, метабо-

лічних розладів, ендокринних порушень, облітеруючих захворювань судин та ін [3].

Одним з провідних чинників, що впливає на репаративний остеогенез, є стан кровообігу в зоні ушкодження [1, 3], який певною мірою детермінується станом периферійних судин до моменту травми. В останні роки опубліковані дані [5, 8], які свідчать, що порушення судинної продукції оксиду азоту асоціюються з структурно-функціональними змінами кісткової тканини і залучені в патогенетичні механізми розвитку остеопорузу та остеопоротичних переломів. За умов дефіциту синтезу оксиду азоту підвищувалась експресія факторів росту біологічно активних речовин, матриксних протеїназ, змінювався базальний тонус судин, порушувалась ендотеліальна функція, пригнічувалась диференціація кісткоутворюючих клітин [8, 10]. Відомо, що одним з генетичних чинників, що порушує ендотеліальний синтез NO, є поліморфізм промотора гена синтази оксиду азоту eNOS T786C [6, 9]. Разом з тим, роль поліморфізму гена eNOS T786C у процесах репаративного остеогенезу та формуванні хибних суглобів довгих кісток залишається не вивченою.

Мета роботи: дослідити поширеність поліморфізму промотору гена eNOS T786C у осіб з хибними суглобами довгих кісток та оцінити його зв'язок з рівнем ліпідів та ендотеліальною функцією судин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

До групи спостереження увійшло 118 (20,13%) з 586 обстежених хворих з 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 суглобу нормопластичний тип діагностовано у 24 (20,34%), гіперпластичний – у 21 (17,8%), гіпопластичний – у 36 (30,5%), атрофічний – у 37 (31,36%) хворих. До групи контролю увійшли 48 хворих з консолидованими діафізарними переломами, репрезентативні групі хворих з хибними суглобами за віком, статтю, локалізацією ушкодження, частотою супутньої патології.

Забір крові для молекулярно-генетичних досліджень здійснювали в стандартних умовах – з 8 до 9 годин ранку, натще, після нічного голодування, з ліктьової вени за допомогою вакутейнерів у пробірки Vacuette (Greiner Bio-One, Австрія) з 3,8% розчином цитрату натрію (у спів-

відношенні 9:1) та без антикоагулянтів. Вміст загального холестерину, холестерину ліпопротеїнів високої густини (ЛПВГ) та тригліцеридів у сироватці крові визначали уніфікованими методами з використанням вітчизняних стандартних наборів «Холестерин-Ф», «Тригліцериди» (Філісіт-Діагностика, Україна), «Альфа-холестерин» (Реагент, Україна). Рівень холестерину ліпопротеїнів низької густини (ЛПНГ) розраховувався за формулою W. Friedwald: Холестерин ЛПНГ = Загальний холестерин – холестерин ЛПВГ – (0,45 x Тригліцериди) [4]. При ранжируванні рівнів ліпідів у сироватці крові користувались критеріями Європейського товариства кардіологів та Європейського товариства гіпертензії (2007), рекомендаціями Асоціації кардіологів України (2011). Критеріями дисліпідемії вважали рівень загального холестерину >5,0 ммоль/л, холестерину ЛПНГ >3,0 ммоль/л, холестерину ЛПВГ <1,0 та 1,2 ммоль/л (для чоловіків та жінок, відповідно), тригліцеридів >1,7 ммоль/л.

Товщину комплексу інтима-медіа (ТІМ) плечових, стегнових та загальних сонних артерій оцінювали в мм методом дуплексного ультразвукового сканування з лінійним датчиком 7 МГц на апараті “Sonoline 6000 C” (Medison, Південна Корея). Ендотелій-залежну вазодилатацію правої плечової артерії визначали (ЕЗВД ПА) за стандартною методикою. Нормальними показниками вважали приріст діаметра досліджуваної артерії після реакції гіперемії через 30 та 90 с. більше ніж 10%.

Для генетичних досліджень відбирали проби цільної крові, стабілізованої цитратом натрію, які до тестування зберігали при -20°C . Генотипування проводилось методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) з подальшим рестрикційним аналізом продуктів ПЛР. Вивчалась мутація гену ендотеліальної синтази нітроген 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 № 305147890).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При дослідженні поліморфізму промотора гена eNOS T786C було встановлено, що серед осіб з консолидованими переломами співвідношення нормальних гомозигот (786-ТТ), гетерозигот (786-ТС) та гомозигот з патологічним генотипом 786-СС становило 50,0, 43,8 та 6,2% відповідно (табл. 1). Розподіл частот генотипів ТТ/ТС/СС у групі осіб з консолидованими переломами відповідав рівновазі Харді-Вайнберга й

узгоджувався з даними щодо поширеності поліморфізму гена eNOS T786C серед практично здорових осіб в українській популяції [6, 7]. Розподіл частот вказаних генотипів, що зустрічалися у групі хворих з хибними суглобами, також підпорядковувся закону Харді-Вайнберга, однак відрізнявся від такого в групі порівняння. Серед хворих з хибними суглобами спостерігалась

тенденція до зменшення частки нормальних гомозигот 786-ТТ і достовірно в 2,6 разу збільшувалась частка гомозигот 786-СС. Відповідно частота С-алелю, що зустрічався серед хворих з хибними суглобами, була вищою, ніж серед осіб з консолидованими переломами, і становила 37,7% проти 28,1%.

Таблиця 1

Частота генотипів eNOS T786C у осіб з консолидованими переломами та хибними суглобами довгих кісток

Характеристика групи	Частота генотипів eNOS T786C, n (%)			Частота С-алелю, %
	786-ТТ	786-ТC	786-СС	
1 Хворі з консолидованими переломами, 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
p1,2	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05
У тому числі залежно від клініко-рентгенологічного типу хибного суглобу				
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
p3,4	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
5 Гіпопластичний тип, n=36	13 36,1%	16 44,4%	7 19,4%	41,7
p3,5	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
6 Атрофічний тип, n=37	13 35,1%	16 43,2%	8 21,6%	43,2
p3,6	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Типологічний аналіз показав, що серед хворих з нормопластичним типом поширеність С-алелю промотора eNOS та співвідношення генотипів ТТ/ТC/СС узгоджувалась з такою в групі хворих з консолидованими переломами (50,0, 41,7 та 8,3%). У групі хворих з гіперпластичним типом спостерігалось незначне зменшення частоти генотипу 786-ТТ та збільшення частоти генотипу 786-СС. У той же час серед хворих з гіпопластичним та атрофічним типом частка нормальних гомозигот 786-ТТ була меншою (в 1,4 разу), ніж серед хворих з нормопластичним типом, натомість частіше виявлялись гетерозиготи 786-ТC, а частка патологічних гомозигот 786-СС зростала в 2,3 та 2,6 разу відповідно.

Частота С-алелю при авітальних типах хибних суглобів сягала 41,7 та 43,2% порівняно з 29-31% при вітальних типах.

Аналіз показників ліпідного обміну у хворих з хибними суглобами залежно від поліморфізму промотору гена eNOS T786C показав, що у гомозиготних носіїв С-алелю виявлялись більш виразні ознаки атерогенних дисліпідемій (табл. 2). Так, у гомозигот СС рівні загального холестерину та холестерину ЛПНГ були достовірно вищими на 10,0 та 14,8%, а рівень холестерину ЛПВГ, навпаки, меншим на 16,1%, ніж у нормальних гомозигот ТТ. У той же час, суттєвих відмінностей за вмістом ліпідів у сироватці крові

між гомозиготами ТТ та гетерозиготами ТС не спостерігалось.

Результати ранжирування рівнів ліпідів у сироватці крові хворих з хибними суглобами підтвердили, що серед гомозиготних носіїв С-алелю реєструється достовірне зростання частки осіб з аберантними рівнями загального холестерину та холестерину ЛПВГ і на рівні стійкої

тенденції збільшувалась частка осіб з високими рівнями ЛПНГ та тригліцеридів (табл. 3). Зокрема, частота виявлення рівнів загального холестерину $>5,0$ ммоль/л у групі хворих з хибними суглобами – патологічних гомозигот СС перевищувала таку в 1,5 разу в групі нормальних гомозигот ТТ.

Таблиця 2

Вміст ліпідів у сироватці крові у хворих з хибними суглобами довгих кісток залежно від генотипу eNOS T786C (M ± m)

Генотип eNOS T786C	Вміст ліпідів у сироватці крові, ммоль/л			
	загальний холестерин	холестерин ЛПНГ	холестерин ЛПВГ	тригліцериди
1 Гомозиготи 786-ТТ, n=48	5,38±0,13	3,57±0,14	1,08±0,03	1,63±0,09
2 Гетерозиготи 786-ТС, n=51	5,49±0,13	3,72±0,13	1,05±0,03	1,59±0,07
Р _{1,2}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
3 Гомозиготи 786-СС, n=19	5,92±0,16	4,10±0,18	0,93±0,05	1,95±0,16
Р _{3,1}	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05
Р _{3,2}	0,1	>0,05	<0,05	<0,05

Аналіз стану ендотеліальної функції у хворих з хибними суглобами залежно від поліморфізму промотору гена eNOS T786C виявив наявність тісної асоціації між генотипом та показниками структурно-функціонального стану центральних та периферичних судин (табл. 4). Так, навіть вже у гетерозигот ТС реєструвались достовірно більш високі показники ТІМ загальної сонної, плечової та стегнової артерії та нижча здатність плечової артерії до ендотелій-залежної вазоди-

лятації, ніж у нормальних гомозигот. У патологічних гомозигот СС показники ТІМ загальної сонної, плечової та стегнової артерії були достовірно вищими на 17,0, 21,2 та 16,0%, ніж у нормальних гомозигот ТТ, та на 8,53, 13,1 та 7,25%, ніж у гетерозигот ТС. Відповідно показник ЕЗВД ПА на 90 сек. після гіперемії у гомозигот СС виявився достовірно нижчим (на 38,3%), ніж у носіїв генотипу ТТ.

Таблиця 3

Частота виявлення аберантних рівнів ліпідів у сироватці крові у хворих з хибними суглобами залежно від генотипу eNOS T786C, n (%)

Генотип eNOS T786C	Частота виявлення аберантних рівнів ліпідів, n (%)			
	загальний холестерин	холестерин ЛПНГ	холестерин ЛПВГ	тригліцериди
	>5,0 ммоль/л	>3,0 ммоль/л	<1,0 ммоль/л	>1,7 ммоль/л
1 Гомозиготи 786-ТТ, n=48	27 56,2%	30 62,5%	20 41,7%	19 39,6%
2 Гетерозиготи 786-ТС, n=51	33 64,7%	36 70,6%	23 45,0%	15 29,4%
Р _{1,2}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
3 Гомозиготи 786-СС, n=19	16 84,2%	16 84,2%	13 68,4%	12 63,1%
Р _{3,1}	<0,05	0,1	<0,05	0,1
Р _{3,2}	0,1	>0,05	0,1	<0,05

За поширеністю поліморфізму промотору гена eNOS T786C хворі з хибними суглобами відрізняються від осіб з консолідованими переломами: спостерігається зростання частоти зустрічності патологічного С-алелю, достовірно зростає частота генотипу СС і знижується частота нормального генотипу ТТ. Гомозиготи СС накопичуються переважно у групах хворих з гіпопластичним та атрофічним типом хибних суглобів, у той час як частотний розподіл генотипів серед хворих з нормопластичним типом

наближається до такого у осіб з консолідованими переломами. Серед хворих з генотипом СС частіше виявляються особи з аберантними рівнями ліпідів. Негативний вплив мутації промотору гена eNOS T786C на структурно-функціональний стан судин хворих з хибними суглобами достовірно ілюструють зростання ТІМ загальної сонної, плечової та стегнової артерій та зниження ендотелій-залежної вазодилатації не лише у патологічних гомозигот СС, а й у гетерозигот ТС.

Таблиця 4

Стан ендотеліальної функції у хворих з хибними суглобами довгих кісток залежно від генотипу eNOS T786C (M ± m)

Генотип eNOS T786C	ТІМ судин, мм			ЕЗВД ПА на 90 с.
	ЗСА	плечова	стегнова	
1 Гомозиготи 786-ТТ, n=48	0,885±0,018	0,391±0,009	0,905±0,018	8,55±0,40
2 Гетерозиготи 786-ТС, n=51	0,949±0,024	0,419±0,010	0,979±0,024	7,24±0,038
p1,2	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05
3 Гомозиготи 786-СС, n=19	1,03±0,031	0,474±0,013	1,05±0,033	6,18±0,043
p3,1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
p3,2	<0,05	<0,01	>0,05	>0,05

ВИСНОВКИ

1. Порушення репаративної регенерації довгих кісток асоціюється з поліморфізмом гена синтази оксиду азоту eNOS T786C та збільшенням частки осіб з патологічним генотипом СС. Гомозиготи СС накопичуються переважно у групах хворих з гіпопластичним та атрофічним типом хибних суглобів, у той час як частотний розподіл генотипів серед хворих з нормопластичним типом наближається до такого в осіб з консолідованими переломами.

2. Серед хворих з гомозиготним носійством С-алелю частіше виявляли особи з аберантними рівнями ліпідів та ендотеліальною дисфункцією центральних та периферичних судин.

3. Перспективи подальших розвідок направлені на розробку та впровадження патогенетично обґрунтованих методів профілактики та лікування розладів репаративної регенерації довгих кісток при метаболічних та молекулярно-генетичних порушеннях.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Влияние механизма травмы на состояние периостальных источников остеорепаляции / В.Г. Климовицкий, В.М. Оксимец, В.Ю. Черныш, А.Г. Попандупуло // Травма. – 2008. – Т.9, №4. – С. 390-395

2. Коваленко В.М. Серцево-судинні захворювання: Класифікація, стандарти діагностики та лікування. Асоціація кардіологів України / В.М. Коваленко, М.І. Лутай, Ю.М. Сіренко. – К., 2011. – 96 с.

3. 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.

4. Мітченко О.І. Дисліпідемія: діагностика, профілактика та лікування: метод. рекомендації Асоціації кардіологів України / О.І. Мітченко, М.І. Лутай – К., 2011. – 48 с.

5. Поворознюк В.В. Вплив дисліпідемій на стан мінеральної щільності кісткової тканини / В.В. Поворознюк, О.І. Нішкунмай // Укр. мед. альманах. – 2010. – Т. 13, № 1. – С. 107-110.

6. Полиморфизм T-786C промотора гена ендотеліальної NO-синтази: зв'язь з ефективністю тромболітичної терапії у пацієнтів з острым інфарктом міокарда / А.Н. Пархоменко, С.Н. Кожухов, Я.М. Лутай [и др.] // Укр. мед. часопис. – 2008. – №4 (66), VII-VIII. – С. 20-23.

7. Распространенность, патогенетическое и прогностическое значение полиморфизма промотора гена эндотелиальной NO-синтетазы у больных с острым коронарным синдромом / А.Н. Пархоменко, Я.М. Лутай, В.Е. Досенко [и др.] // Укр. кардіол. журнал. – 2005. – № 4. – С. 20-27.

8. Hydrogen sulfide protects MC3T3-E1 osteoblastic cells against H₂O₂-induced oxidative damage-implications for the treatment of osteoporosis / Z.S. Xu, X.Y. Wang, D.M. Xiao [et al.] // Free Radic Biol Med. – 2011. – Vol. 50, N 10. – P. 1314-1323.

9. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition / N.M. Ocarino, J.N. Boeloni, A.M. Goes [et al.] // Nitric Oxide. – 2008. – Vol. 19, N 4. – P. 320-325.

10. The effects of shockwave on bone healing and systemic concentrations of nitric oxide (NO), TGF-beta1, VEGF and BMP-2 in long bone non-unions / C. J. Wang, K. D. Yang, J. Y. Ko [et al.] // Nitric Oxide. – 2009. – Vol. 20, N 4. – P.298-303.

REFERENCES

1. Klimovitskiy VG, Oksimets VM, Chernyish VYu, Popandopulo AG. Vliyanie mehanizma travmy na sostoyanie periostalnykh istochnikov osteoreparatsii. *Travma*. 2008;9(4):390-5

2. Kovalenko VM, Lutay MI, Sirenko YuM. Sertsevo-sudinnii zahvoryuvannya: Klasifikatsiya, standarti diagnostiki ta likuvannya. Asotsiatsiya kardiologiv Ukrayini. K. 2011;96.

3. Korzh NA, Romanenko KK, Goridova LD. Reparativnaya regeneratsiya kosti: sovremennyi vzglyad na problemu. Narushenie regeneratsii kosti. Soobschenie 2. *Ortopediya, travmatologiya i protezirovanie*. 2006;1:84-90.

4. Mitchenko OI, Lutay MI. Dislipidemiya: diagnostika, profilaktika ta likuvannya. Metodichni rekomendatsiyi asotsiatsiyi kardiologiv Ukrayini. K. 2011;48.

5. Povoroznyuk VV, Nishkumay OI. Vpliv dislipidemiy na stan mineralnoyi schilnosti kistkovoyi tkanini. *Ukr med almanah*. 2010;13(1):107-10.

6. Parhomenko AN, Kozhuhov SN, Lutay YaM. Polimorfizm T-786C promotora gena endotelialnoy NO-

sintazy: svyaz s effektivnostyu tromboliticheskoy terapii u patsientov s ostrym infarktom miokarda. *Ukr med chasopis*. 2008;4(66):20-23.

7. Parhomenko AN, Lutay YaM, Dosenko VE. Rasprostranennost, patogeneticheskoe i prognosticheskoe znachenie polimorfizma promotora gena endotelialnoy NO-sintetazy u bolnykh s ostrym koronarnym sindromom. *Ukr kardiolog zhurnal*. 2005;4:20-27.

8. Xu ZS, Wang XY, Xiao DM. Hydrogen sulfide protects MC3T3-E1 osteoblastic cells against H₂O₂-induced oxidative damage-implications for the treatment of osteoporosis. *Free Radic Biol Med*. 2011;50(10):1314-23.

9. Ocarino NM, Boeloni JN, Goes AM. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. *Nitric Oxide*. 2008;19(4):320-5.

10. Wang CJ, Yang KD, Ko JY. The effects of shockwave on bone healing and systemic concentrations of nitric oxide (NO), TGF-beta1, VEGF and BMP-2 in long bone non-unions. *Nitric Oxide*. 2009;20(4):298-303.

