

УДК 575.224.22:612.398.192:616.71-001.59

Ю.О. Безсмертний

Науково-дослідний інститут реабілітації інвалідів Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова

ПОШИРЕНІСТЬ МУТАЦІЙ ГЕНІВ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ T786C ТА МЕТИЛЕНТЕТРАГІДРОФОЛАТРЕДУКТАЗИ C677T У ХВОРИХ ІЗ РОЗЛАДАМИ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗУ ДОВГИХ КІСТОК

Ключові слова: мутація, синтаза оксиду азоту T786C, метилентетрагідрофолатредуктаза C677T, хибний суглоб, гіпергомоцистеїнемія.

Резюме. У статті представлені порівняльні результати поширеності мутації генів синтази оксиду азоту eNOS T786C та метилентетрагідрофолатредуктази MTHFR C677T у 118 хворих із розладами репаративного остеогенезу довгих кісток та в осіб із консолидованими переломами. Встановлено, що серед хворих із хибними суглобами довгих кісток відмічається тенденція до зниження частоти нормальних гомозигот 677-CC MTHFR, 786-TT eNOS та зростання частоти асоційованих патологічних поліморфізмів (677-T MTHFR + 786-C eNOS). Негативний вплив мутацій генів MTHFR C677T та eNOS T786C на перебіг репаративного остеогенезу та структурно-функціональний стан кісткової тканини реалізується шляхом акселерації розвитку гіпергомоцистеїнемії, запального синдрому, атерогенної дисліпідемії та ендотеліальної дисфункції судин.

Вступ

Відомо, що перебіг репаративного остеогенезу залежить від локального кровообігу в зоні ушкодження [5], який певною мірою детермінується станом периферійних судин до моменту травми. В останні роки з'явилися переконливі докази, що порушення метаболізму гомоцистеїну (ГЦ) (гіпергомоцистеїнемія) асоціюється з порушенням структурно-функціонального стану кісткової тканини, розвитком остеопорозу та остеопоротичних переломів [8, 15]. Механізми токсичної дії високих рівнів ГЦ на кісткову тканину здебільшого пов'язують з активацією процесів демінералізації кісток, деградації колагену, розвитком оксидативного стресу, гіпометилуванням, дестабілізацією геному та хімічною модифікацією білків [3, 6, 10, 12]. Негативна дія високих рівнів ГЦ значною мірою опосередковується через судинні механізми в основі яких лежать порушення продукції вазодилаторів (NO, H₂S) оксидативні та проатерогенні пошкодження периферійних судин [1, 3, 7, 9]. Провідна роль у реалізації патогенетичних механізмів негативного впливу ГЦ на кістку відводиться саме NO. За умов інгібування синтази оксиду азоту достовірно потенціюється остеотоксичний ефект гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ) [13, 14], пригнічується диференціація кістоутворюючих клітин [11].

Згідно результатів власних досліджень [3], порушення репаративного остеогенезу довгих кісток, що призводять до формування хибних суглобів, також асоціюються з порушенням обміну ГЦ

та дисбалансом у системі оксиду азоту. Значимість вказаних метаболічних порушень підтверджується і тим, що їх поширеність як і мутацій генів ферментів обміну гомоцистеїну метилентетрагідрофолатредуктази (MTHFR C677T) та промотору гена синтази оксиду азоту (eNOS T786C) серед хворих із хибними суглобами значно вища, ніж серед осіб із консолидованими переломами [12, 13]. Цілком очевидно, що поліморфізми вказаних генів можуть поєднуватись, особливо з урахуванням зростання поширеності патологічних алелей серед хворих із хибними суглобами, але на даний час інформація про це в доступній літературі відсутня.

Мета дослідження

Вивчити поширеність поєднань мутацій генів синтази оксиду азоту (eNOS T786C) і метилентетрагідрофолатредуктази (MTHFR C677T) в осіб з консолидованими переломами та у хворих з хибними суглобами довгих кісток, оцінити їх зв'язок із рівнем гомоцистеїну, ліпідів та станом судин.

Матеріал і методи

До групи спостереження увійшло 118 (20,13%) з 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 ± 11,01 роки. Чоловіків було - 91 (77,12%), жінок - 27 (22,88%). Тривалість захво-

рування 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 із консолидованими діафізарними переломами, репрезентативні групі хворих з хибними суглобами за віком, статтю, локалізацією ушкодження, частотою супутньої патології.

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. При ранжируванні рівнів ліпідів у сироватці крові користувалися 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 [2]. Рівень загального ГЦ визначали набором "Homo-cysteine EIA" (Axis-Shield, Англія), інтерлейкіну-6 - набором "IL-6 ELISA" (Diacclone, Франція) імуноферментними методами відповідно до інструкції фірми-виробника на аналізаторі STAT FAX 303/PLUS [1].

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" (Medisson, Південна

Корея). Ендотеліязалежну 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 10%.

Для генетичних досліджень відбирали проби цільної крові, стабілізованої цитратом натрію, які до тестування зберігали при -20°C . Генотипування проводилося методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступним рестрикційним аналізом продуктів ПЛР. Вивчалась мутація генів ендотеліальної синтази нітроген монооксиду (eNOS T786C) та метилентетрагідрофолат-редуктази (MTHFR C677T).

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).

Обговорення результатів дослідження

Встановлено, що в групі осіб із консолидованими переломами виявилось лише 16,6% нормальних гомозигот 677-CC MTHFR + 786-TT eNOS, 33,3% "чистих" носіїв алелю 677-T MTHFR, 35,4% "чистих" носіїв алелю 786-C eNOS та 14,6% носіїв обох поліморфізмів 677-T MTHFR + 786-C eNOS в гетеро- та гомозиготному варіантах (табл. 1).

Серед хворих з хибними суглобами реєстрували стійку тенденцію до зниження частоти нормальних гомозигот 677-CC MTHFR + 786-TT eNOS і до зростання частоти асоційованих поліморфізмів (677-T MTHFR + 786-C eNOS). В той же час, частоти "чистих" носіїв алелей 677-T MTHFR та 786-C eNOS в групах хворих із хибними суглобами та осіб з консолидованими

Таблиця 1

Частота комбінування поліморфізму генів MTHFR C677T та eNOS T786C в осіб із консолидованими переломами та хибними суглобами довгих кісток

Характеристика групи		Нормальні гомозиготи			
		Носії поліморфних алелей, n (%)			
		677-CC MTHFR + 786-TT eNOS	677-T MTHFR	786-C eNOS	677-T MTHFR + 786-C eNOS
1	Хворі з консолидованими переломами, n=48	8 (16,6%)	16 (33,3%)	17 (35,4%)	7 (14,6%)
2	Хворі з хибними суглобами, n=118	7 (5,9%)	41 (34,7%)	39 (33,1%)	31 (26,3%)
	p _{1,2}	0,1	$>0,05$	$>0,05$	0,1

переломами були співставними.

Аналіз біохімічних показників у хворих з ізольованими та комбінованими поліморфізмами гена MTHFR C677T та промотору гена eNOS T786C показав, що наявність алелю 677-T MTHFR достовірно асоціюється зі збільшенням вмісту ГЦ в сироватці крові, викликає тенденцію до зменшення вмісту ЛПВГ, але практично не відображається на рівні загального холестерину та інтерлейкіну-6 (табл. 2). Наявність алелю 786-C eNOS суттєво не впливала на рівні ГЦ, холестерину та інтерлейкіну-6 у хворих з хибними суглобами. Поряд з цим, поліморфізм 786-C eNOS потенціював гіпергомоцистеїнемічний, про-

запальний та проатерогенний вплив поліморфізму 677-T MTHFR. Про це свідчать достовірно більш високі рівні ГЦ, інтерлейкіну-6, ЛПНГ та нижчий рівень ЛПВГ у носіїв обох патологічних алелей 677-T MTHFR + 786-C eNOS, ніж у нормальних гомозигот та носіїв одного з поліморфізмів.

Встановлено, що наявність патологічних алелей MTHFR 677-T і eNOS 786-C тісно асоціюється з порушенням структурно-функціонального стану судин. При цьому, виразність ендотеліальної дисфункції у носіїв алелю 677-T MTHFR була меншою, ніж у носіїв алелю 786-C eNOS (табл. 3). Про це свідчить наявність достовірно більш високих показників ТІМ судин у

Таблиця 2

Вміст гомоцистеїну, ліпідів та інтерлейкіну-6 в сироватці крові у хворих з хибними суглобами залежно від комбінування поліморфізмів MTHFR C677T та eNOS T786C (M±m)

Характеристика групи		ГЦ, мкмоль/л	Загальний холестерин, ммоль/л	Холестерин ЛПНГ, ммоль/л	Холестерин ЛПВГ, ммоль/л	Інтерлейкін -6, нг/л
1	677-CC MTHFR + 786-TT eNOS, n=7	11,0±1,18	5,40±0,24	3,51±0,22	1,14±0,05	7,63±1,30
Носії поліморфних алелей						
2	677-T MTHFR, n=41	14,7±0,31	5,38±0,15	3,58±0,16	1,06±0,03	7,69±0,34
	p _{2,1}	<0,01	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
3	786-C eNOS, n=39	13,4±0,50	5,47±0,13	3,62±0,14	1,09±0,04	8,47±0,34
	p _{3,1}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	p _{3,2}	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
4	677-T MTHFR + 786-C eNOS, n=31	16,0±0,41	5,78±0,17	4,08±0,17	0,93±0,03	10,0±0,38
	p _{4,1}	<0,01	>0,05	<0,05	<0,01	>0,05
	p _{4,2}	<0,05	>0,05	<0,05	<0,01	<0,05
	p _{4,3}	<0,01	>0,05	<0,05	<0,01	<0,05

носіїв алелю 786-C NOS на 20-30%, ніж у нормальних гомозигот (677-CC MTHFR + 786-TT eNOS) і на 10%, ніж у носіїв алелю 677-T MTHFR. При асоціації поліморфізмів 677-T MTHFR + 786-C eNOS їх небажаний вплив на структурно-функціональний стан судин істотно потенціювався, що підтверджується найвищими показниками ТІМ судин та найнижчими значеннями ЕЗВД ПА в цій групі хворих з хибними суглобами.

Таким чином, результати досліджень свідчать

про патогенетичну роль поліморфізму гена ферменту обміну ГЦ - метилентетрагідрофолатредуктази C677T та промотору гена ендотеліальної синтази оксиду азоту T786C в процесах репаративного остеогенезу. Одним із патогенетичних шляхів впливу поєднаних мутацій MTHFR C677T та eNOS T786C на структурно-функціональний стан кісток є акселерація формування несприятливого патерна: ГГЦ, запального синдрому, атерогенної дисліпідемії, ендотеліальної дисфункції та ремоделювання судин.

Таблиця 3

Стан ендотеліальної функції у хворих з хибними суглобами довгих кісток залежно від комбінування поліморфізму генів MTHFR C677T та eNOS T786C (M±m)

Характеристика групи	Товщина ІМ судин, мм		ЕЗВД ПА на 90 сек.
	ЗСА	Стегнова	
677-CC MTHFR + 786-TT eNOS, n=7 (нормальні гомозиготи)	0,757±0,053	0,714±0,035	8,49±0,69
Носії поліморфних алелей			
677-T MTHFR, n=41	0,839±0,028	0,883±0,031	8,22±0,44
p _{2,1}	>0,05	<0,05	>0,05
786-C eNOS, n=39	0,926±0,026	0,953±0,026	8,26±0,34
p _{3,1}	<0,05	<0,05	>0,05
p _{3,2}	<0,05	>0,05	>0,05
677-T MTHFR + 786-C eNOS, n=31	1,03±0,03	1,06±0,03	6,69±0,44
p _{4,1}	<0,001	<0,001	<0,05
p _{4,2}	<0,01	<0,01	<0,05
p _{4,3}	<0,05	<0,05	<0,05

Висновки

1. У хворих з хибними суглобами довгих кісток відмічається тенденція до зниження частоти нормальних гомозигот 677-CC MTHFR + 786-TT eNOS та зростання частоти асоційованих поліморфізмів (677-T MTHFR + 786-C eNOS). При цьому, частки "чистих" носіїв алелей 677-T MTHFR та 786-C eNOS в групах хворих із хибними суглобами та осіб із консолидованими переломами були співставними.

2. Наявність алелю 677-T MTHFR достовірно асоціюється зі збільшенням вмісту ГЦ у сироватці крові, викликає тенденцію до зменшення вмісту ЛПВГ, але практично не відображається на рівні загального холестерину та інтерлейкіну-6.

3. Мутація 786-C eNOS потенціє гіпергомоцистеїнемічний, прозапальний та проатерогенний вплив поліморфізму 677-T MTHFR і асоціюється зі збільшенням частки осіб із високими рівнями ГЦ, інтерлейкіну-6, ЛПНГ та структурно-функціональними змінами центральних та периферичних судин.

Перспективи подальших досліджень направлені на розробку та впровадження патогенетично обґрунтованих методів профілактики та лікування порушень репаративної регенерації довгих кісток при гіпергомоцистеїнемії та асоційованих станах.

Література. 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. - Київ, 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 // Бук. мед. вісник. - 2008. - Т. 12, №3. - С. 12-17. 3. Безсмертний Ю.О. Ендотеліальна секреція вазоактивних молекул у різні періоди репаративного остеогенезу при гіпергомоцистеїнемії / Ю.О. Безсмертний // Бук. мед. вісник, 2012. - Том 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 С677Т в гені метилентетрагідрофолатредуктази / Н.В. Заїчко // Експерим. та клін. фізіол. 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, травматол. и протезир. - 2006. - № 1. - С. 84-90. 6. Поліморфізм Т-786С промотора гена ендотеліальної NO-синтази: зв'язок 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 ендотеліальної NO-синтази у больных с острым коронарным синдромом / А.Н. Пархоменко, Я.М. Лутай, В.Е. Досенко [и др.] // Укр. кардіол. ж. - 2005. - N 4. - С. 20-27. 8. Cysteine, homocysteine and bone mineral density: a role for body composition? / A.K. Elshorbagy, C.G. Gjesdal, E. Nurk [et al.] // Bone. - 2009. - №5. - P. 954-8. 9. Hydrogen sulfide protects MC3T3-E1 osteoblastic cells against H(2)O(2)-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, №10. - P. 1314-1323. 10. Hyperhomocysteinemia induces a tissue specific accumulation of homocysteine in bone by collagen binding and adversely affects bone / M. Herrmann, A. Tami, B. Wildemann [et al.] // Bone. - 2009. - Vol. 44, №3. - P.467-475. 11. Ocarino N.M. 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 // Nitric Oxide. - 2008. - Vol. 19, № 4. - P. 320-325. 12. Shiraki M. The synergistic effect of bone mineral density and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism (C677T) on fractures / M. Shiraki, T. Urano, T. Kuroda // J Bone Miner Metab. - 2008. - Vol. 26, № 6. - P. 595-602. 13. The effects of homocysteine and MTHFR genotype on hip bone loss and fracture risk in elderly women / K. Zhu, J.

Beilby, I. M. Dick [et al] // Osteoporos Int. - 2009. - Vol. 20, № 7. - P. 1183-1191. 14. 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. - P. 298-303. 15. Yilmaz N. Homocysteine oxidative stress and relation to bone mineral density in post-menopausal osteoporosis / N. Yilmaz, E. Eren // Aging Clin Exp Res. - 2009. - Vol. 21. - P. 353-7.

**РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МУТАЦИЙ ГЕНОВ
ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ СИНТАЗЫ ОКИСИ АЗОТА
T786C И МЕТИЛЕНТЕТРАГИДРО-
ФОЛАТРЕДУКТАЗЫ C677T У БОЛЬНЫХ С
НАРУШЕНИЯМИ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА
ДЛИННЫХ КОСТЕЙ**

Ю. А. Безсмертний

Резюме. В статье представлены сравнительные результаты распространенности мутации генов синтазы оксида азота eNOS T786C и метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR C677T у 118 больных с нарушениями репаративного остеогенеза длинных костей и у лиц с консолидированными переломами. Выявлено, что среди больных с ложными суставами длинных костей отмечается тенденция к снижению частоты нормальных гомозигот 677-CC MTHFR, 786-TT eNOS и увеличение частоты ассоциированных патологических полиморфизмов (677-T MTHFR + 786-C eNOS). Негативное влияние мутаций генов MTHFR C677T и eNOS T786C на течение репаративного остеогенеза и структурно-функциональное состояние костной ткани реализуется путем акселерации развития гипергомоцистеинемии, воспалительного синдрома, атерогенной дислипидемии и эндотелиальной дисфункции сосудов.

Ключевые слова: мутация, синтаза оксида азота T786C, метилентетрагидрофолатредуктаза C677T, ложный сустав, гипергомоцистеинемия.

**PREVALENCE OF MUTATIONS IN THE GENES
ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE T786C
AND METHYLENETETRAHYDROFOLATE
REDUCTASE C677T IN PATIENTS WITH DISORDERS
OF REPARATIVE OSTEOGENESIS OF LONG BONES**

Yu. A. Bezsmertny

Abstract. The aim of the article is to investigate the preva-

lence of mutations of genes nitric oxide synthase (eNOS T786C) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T) in patients with consolidated fractures and in patients with non-union of long bones and perform an assessment of their relationship with the level of homocysteine, lipids and vascular condition.

Comparative results of the prevalence of mutations in the genes of nitric oxide synthase and eNOS T786C methylenetetrahydrofolate reductase C677T MTHFR in 118 patients with disorders of reparative osteogenesis of long bones and in 48 people with consolidated fractures were studied.

Tendency to a decrease in frequency of normal homozygotes 677-CC MTHFR, 786-TT eNOS and increased frequency of associated pathological polymorphisms (677-T MTHFR + 786 C eNOS) were found to be observed among patients with bone nonunion of long bones. The negative impact of MTHFR C677T gene mutations and eNOS T786C on the course of reparative osteogenesis and structural-functional state of the bone tissue is realized through the acceleration of hyperhomocysteinemia, inflammatory syndrome, atherogenic dyslipidemia and vascular endothelial dysfunction.

The T allele of MTHFR-677 was associated with significantly increased content of homocysteine in serum, reduced content of HDL cholesterol, and did not affect the levels of total cholesterol and interleukin-6.

Mutation eNOS 786-C potentiated the development of hyperhomocysteinemia, a proinflammatory and proatherogenic influence of polymorphism 677-T MTHFR, and was accompanied by an increase in the proportion of individuals with high levels of homocysteine, interleukin-6, LDL cholesterol, and structural and functional changes in the central and peripheral vessels.

Key words: mutation T786C nitric oxide synthase, methylenetetrahydrofolate reductase C677T, bone nonunion, hyperhomocysteinemia.

**Scientific Research Institute of Invalid Rehabilitation of
Vinnitsa National Pirogov Memorial Medical University**

Clin. and experim. pathol. - 2015. - Vol. 14, №2 (52). - P. 22-26.

Надійшла до редакції 1.05.2015

Рецензент – проф. В.Л. Васюк

© Ю.О. Безсмертний, 2015