

THE CONDITION OF BONE TISSUE IN EXPERIMENTAL OSTEOPOROSIS WITH A FRACTURE OF THE FEMUR DIAPHYSIS WITH THE USE OF VARIOUS TITANIUM IMPLANTS

Y.V. Maistrovskaya¹, S.V. Gnedenkov², R.E. Kostiv¹, E.A. Kotsurby¹, L.G. Ugay¹, M.F. Pogorely¹, E.V. Masliantsev¹

¹ Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690002 Russian Federation), ² Institute of Chemistry of the FEB RAS (159 100-letiya Vladivostoka Ave. Vladivostok 690022 Russian Federation)

Objective. The analysis of the effectiveness of titanium implants based on the BT-6 alloy with calcium-phosphate coating at fractures of the femur on the background of systemic osteoporosis in the experiment was carried out.

Methods. The work was performed on 27 rats of Wistar males, in 24 of which, divided into four groups, glucocorticoid-induced osteoporosis was reproduced, followed by modeling of the closed fracture of the diaphyseal part of the femur. In two groups of animals, fixation of fragments was performed by the method of closed intramedullary retrograde osteosynthesis using uncoated titanium implants and coated with hydroxyapatite. Comparison groups were formed by animals, the healing of fractures in which passed without the use of implants, and animals with osteoporosis without fracture. The control group included three healthy animals. On the 14th, 30th and 60th day of the experiment, a histological and morphometric assessment of the bone tissue condition was performed.

Results. The use of implants coated with hydroxyapatite in osteosynthesis in conditions of osteoporosis led to an earlier generation of bone tissue. Thus, the thickness of the cortical bone and thickness of trabeculae were significantly higher in rats with osteosynthesis covered with implants. On the 14th day of the experiment, the coarse-fibrous connective tissue appeared in the fracture zone of the designated group of animals, which on the 30th day began to transform into the lamellar bone, and on the 60th day the bone loss was completely restored. If an uncovered implant was placed on the 60th day, foci of imperfect osteogenesis and osteoid with a low degree of mineralization were preserved in the fracture zone, and in animals with which the implant was not installed, the fibreticular tissue was preserved.

Conclusions. The dynamics of the bone tissue condition in fractures in rats with the model of osteoporosis testifies to the acceleration of the regeneration process due to the use of titanium implants coated with hydroxyapatite. So we may regard the use of such devices as a promising way to improve the results of fracture treatment in conditions of systemic osteoporosis.

Keywords: osteosynthesis, calcium-phosphate coating of implants, callus, morphometry

Pacific Medical Journal, 2017, No. 4, p. 60–65.

УДК 616.12-005.4-06:616.71-007.234:616.153.96:575

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2017.4.65–68

Частота аллелей и генотипов полиморфизма гена С-реактивного белка у женщин с ишемической болезнью сердца и постменопаузальным остеопорозом

С.Ю. Царенюк, В.В. Горбунов, А.А. Дутова

Читинская государственная медицинская академия (672090, г. Чита, ул. Горького 39а)

На основе полимеразной цепной реакции изучена частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфизмов С1444Т, С1846Т, С3872Т и А717G гена С-реактивного белка (СРБ) у 205 женщин русской национальности 60–76 лет, 162 из которых страдали ишемической болезнью сердца (ИБС), в т.ч. 76 – в сочетании с остеопорозом. При ИБС выявлены статистически значимые различия в распределении аллелей и генотипов для полиморфизмов СРБ С3872Т и С1444Т по сравнению со здоровыми лицами. При этом среди здоровых чаще обнаруживается аллель Т и гомозиготный генотип ТТ полиморфного участка С3872Т. У пациенток с ИБС аллель Т и генотип ТТ полиморфизма С1444Т встречались чаще и были ассоциированы с увеличением риска ИБС в 1,5 раза. Не найдено взаимосвязи между наличием остеопороза и полиморфизмами СРБ. Установлено, что полиморфизм С1444Т ассоциирован с переломами лучевой кости, при носительстве генотипа СС их риск повышался в 1,5 раза. Полиморфизм С1846Т был связан с опасностью позвоночных переломов: у носителей генотипа СТ риск переломов этой локализации повышался в 4,5 раза.

Ключевые слова: С1444Т, С1846Т, С3872Т, А717G

Постменопаузальный остеопороз – многофакторное заболевание, обусловленное процессами старения организма и генетической предрасположенностью [11]. Наиболее полно изучено влияние генетических факторов на формирование пика костной массы. В исследованиях близнецов показано, что монозиготные сибсы имеют меньше различий в пиковой костной массе, чем дизиготные [1]. Генетическая составляющая остеопороза формируется за счет взаимодействия многих генов. В качестве кандидатов здесь выступают гены гормона роста, инсулиноподобного фактора роста-1, гены их рецепторов, гены

рецепторов витамина D, эстрогенов, коллагена I типа и аполипопротеина E [12].

В последние годы получены данные, свидетельствующие, что остеопороз, кальцификация аорты и клапанов сердца, а также атеросклеротическое поражение сосудов – взаимосвязанные патологические процессы [3, 6]. Установлено, что у пациентов со снижением минеральной плотности костной ткани (МПКТ) чаще наблюдается увеличение уровня липидов, развивается более тяжелый коронарный атеросклероз, повышен риск инсульта и инфаркта [4]. По данным P. Van der Recke et al. [15], остеопоротические переломы позвоночника оказались независимым фактором риска летальности в связи с заболеваниями

Царенюк Светлана Юрьевна – канд. мед. наук, доцент кафедры патологической анатомии и внутренних болезней ЧГМА; e-mail: sveta-tsarenok@yandex.ru

сердечно-сосудистой системы. Полученные данные позволяют предположить, что нарастание частоты остеопороза, эктопической кальцификации и атеросклероза у одних и тех же пациентов невозможно объяснить только неспецифическими возрастными факторами, вероятно, они имеют общую патогенетическую основу.

В настоящее время воспаление рассматривается как важное звено в инициации, прогрессировании и исходах атеросклероза. В проспективных исследованиях определена взаимосвязь между уровнями С-реактивного белка (СРБ) и риском кардиоваскулярных событий [13]. Предполагают, что базовые уровни СРБ зависят от полиморфизма гена, кодирующего данный белок. Так, было установлено, что аллель гена СРБ +1444С>Т связана с изменением базовой концентрации белка в плазме крови [14]. Кроме того, установлена связь между некоторыми полиморфизмами этого гена и развитием кардиоваскулярных заболеваний [5].

В последнее время внимание исследователей привлекает влияние иммунного воспаления на состояние МПКТ. Классической моделью такого взаимодействия является деструкция околоуставной кости у пациентов с ревматоидным артритом [7]. При других воспалительных ревматических заболеваниях также наблюдается остеопороз, который, по всей видимости, связан с иммунным воспалением. Одним из маркеров иммунного воспаления служит СРБ, базовые уровни которого в существенной степени зависят от индивидуальных генетических особенностей [10]. Кроме того, установлено, что воспалительные ревматические заболевания – фактор риска развития атеросклероза и остеопороза у молодых лиц. Предполагается, что причиной этих осложнений выступает системное воспаление. СРБ – основной протеин острой фазы воспаления, который, регулируя функцию нейтрофилов по принципу обратной связи, усиливает фагоцитоз и модулирует высвобождение молекул адгезии. В доступной литературе мы не нашли сведений о полиморфизме гена СРБ при остеопорозе.

Учитывая взаимосвязь остеопороза и атеросклероза, а также влияния иммунного воспаления на состояние минеральной плотности костной ткани и атерогенеза, нами определена цель исследования – изучить полиморфизмы гена СРБ (С1444Т, С1846Т; С3872Т; А717Г) у женщин с ишемической болезнью сердца (ИБС) и остеопорозом.

Материал и методы

Обследовано 205 женщин постменопаузального периода в возрасте от 60 до 76 лет, проживавших на территории Забайкальского края, русской национальности. У 162 женщин верифицирован диагноз ИБС, из них у 76 выявлен постменопаузальный остеопороз – 1-я (клиническая) группа. Диагноз остеопороза выставлялся на основании рентгеновской остеоденситометрии, при значениях Т-критерия $-2,5$ SD и ниже и наличии низкоэнергетических переломов типичной локализации

в анамнезе, случившихся в возрасте старше 50 лет. 86 женщин с ИБС без остеопороза сформировали 2-ю (клиническую) группу. 43 женщины контрольной группы не имели риска сердечно-сосудистых заболеваний, факторов риска остеопороза, при рентгеновской остеоденситометрии у них определена нормальная МПКТ. Исследование проведено согласно принципам надлежащей клинической практики и Хельсинкской декларации ВОЗ.

Всем испытуемым с помощью полимеразной цепной реакции проводили молекулярно-генетическое исследование с определением полиморфизма гена СРБ (С1444Т, С1846Т, С3872Т, А717Г). Выполнено попарное сравнение клинических групп с контролем и межгрупповое сравнение с целью исключения ассоциации исследуемых полиморфизмов с наличием ИБС и установления возможной связи с наличием остеопороза. Использовали реактивы ООО «Литех» (Москва). Амплификацию фрагментов гена проводили в термцикле (модель «Бис»-М111). Анализ подвергалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь». Визуализация продуктов амплификации выполнена с помощью электрофореза в 3% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Статистическая обработка данных проводилась посредством on-line калькулятора (http://gen-exp.ru.calculator_org.php). Для сравнения частот распределения аллелей и генотипов в группах использовали критерий χ^2 . Достоверными считали различия при $p < 0,05$. Методом оценки шансов с 95%-ным доверительным интервалом рассчитана степень риска развития события.

Результаты исследования

При сравнении 1-й группы с контролем можно заключить, что статистически значимое различие распределения аллелей и генотипов выявлено только для двух полиморфизмов гена СРБ: С3872Т и С1444Т. По полиморфизму С3872Т в 1-й группе чаще встречались аллель С и реже аллель Т, а в группе здоровых лиц чаще выявлялся гомозиготный генотип ТТ. Наличие генотипа ТТ ассоциировано со снижением риска заболевания. Относительно полиморфизма С1444Т получены следующие результаты: в 1-й группе аллель Т выявлялась чаще, ее наличие ассоциировалось с увеличением риска заболевания в 1,5 раза. В этой же группе частота обнаружения гомозиготного генотипа ТТ была выше и ассоциировалась с 1,5-кратным увеличением риска заболевания (табл. 1).

Во 2-й группе получены аналогичные результаты: статистически значимое различие с контролем в распределении аллелей и генотипов между группами выявлено для двух полиморфизмов – С3872Т и С1444Т. Чаще встречалась аллель С полиморфизма С3872Т и реже – аллель Т. Гомозиготный генотип ТТ в контроле преобладал и был ассоциирован со снижением риска заболевания. Относительно полиморфизма СРБ С1444Т установлено, что аллель

Т чаще обнаруживалась у женщин с ИБС, а аллель С – у здоровых (контроль). Гомозиготный генотип данного полиморфизма относительно чаще выявлялся у представителей 2-й группы, однако различия с контролем здесь не достигли уровня статистической значимости. Гомозиготный генотип СС значимо чаще регистрировался у здоровых лиц (табл. 2).

Для определения ассоциации полиморфизмов с развитием остеопороза сравнивали между собой клинические группы, но статистически значимых различий в распределении аллелей и генотипов здесь обнаружено не было. Однако при анализе распределения аллелей и генотипов в зависимости от локализации остеопоротических переломов была выявлена ассоциация между полиморфизмом С1444Т и переломами дистальных отделов лучевой кости: для пациенток с генотипом СС риск таких переломов был выше в 1,5 раза (отношение шансов – 1,49, 95% доверительный интервал – 1,2–1,85). По полиморфизму С1846Т установлена связь с переломами позвонков: у женщин с наличием генотипа СТ их риск увеличивался в 4,5 раза (отношение шансов – 4,45, 95% доверительный интервал – 1,05–18,73).

Обсуждения полученных данных

Согласно результатам проведенных ранее исследований, была определена ассоциация между некоторыми мутациями в гене С-реактивного белка и предрасположенностью к коронарным заболеваниям. При исследовании представителей этнической популяции Хань в Китае сделан вывод, что аллель –717А гена СРБ вызывает у них предрасположенность к сердечно-сосудистым заболеваниям. Однако связи с уровнем СРБ в плазме крови здесь найдено не было [5]. В нашем исследовании подобная взаимосвязь также не обнаружена, что отчасти можно объяснить этнически одинаковым составом клинических групп. Относительно полиморфизма С1444Т выяснено, что повышенный уровень СРБ регистрировался для аллеля Т. Кроме того, выявлена позитивная связь между носительством генотипа ТТ и развитием инфаркта миокарда [2]. В нашем исследовании показано, что у женщин с ИБС в сочетании с остеопорозом аллель Т и гомозиготный генотип ТТ встречались достоверно чаще, наличие этого генотипа было ассоциировано с 1,5-кратным повышением риска развития заболевания. При сравнении группы женщин с изолированной ИБС и контроля обнаружена сходная тенденция, однако статистической достоверности данные отличия не достигали.

В 2003–2004 гг. при исследовании AIRGENE на европейской популяции, включавшей 1003 человека, было раскрыто, что минорный аллель 3872Т полиморфизма С3872Т ассоциирован со снижением уровня СРБ и уменьшением риска смертельного исхода при сердечно-сосудистых заболеваниях [8]. Нами установлено, что аллель Т и гомозиготный генотип в 1-й и 2-й группах встречались достоверно реже, чем

Таблица 1
Частота аллелей и генотипов полиморфизма генов СРБ у женщин с ИБС и постменопаузальным остеопорозом

Полиморфизм гена СРБ		Частота, %		OR ²	95% CI ³	
		1-я группа	Контроль			
С3872Т	аллель	С	0,59 ¹	0,44	1,24	1,02–1,52
		Т	0,41 ¹	0,56	0,84	0,65–0,92
	генотип	СС	31,6	20,9	1,20	0,92–1,57
		ТТ	13,2 ¹	32,6	0,59	0,36–0,98
С1846Т	аллель	С	0,59 ¹	0,74	0,81	0,67–0,97
		Т	0,41 ¹	0,26	0,81	0,67–0,97
	генотип	СС	31,6	16,3	1,34	1,01–1,69
		ТТ	13,2	25,6	0,70	0,44–1,13
С1444Т	аллель	С	0,58 ¹	0,84	0,67	0,56–0,80
		Т	0,42 ¹	0,16	1,48	1,24–1,76
	генотип	СС	32,9 ¹	69,8	0,57	0,41–0,78
		ТТ	15,8 ¹	2,30	1,52	1,22–1,90
А717G	аллель	А	0,76	0,84	0,85	0,69–1,05
		Г	0,24	0,16	0,90	0,74–1,08
	генотип	АА	60,5	69,8	0,86	0,66–1,13
		ГГ	7,9	2,3	1,37	0,98–1,91
		АГ	31,6	27,9	1,06	0,80–1,41

Здесь и в табл. 2:

¹ Разница с контролем статистически значима.

² Odds Ratio – соотношение шансов.

³ Confidence Interval – доверительный интервал.

Таблица 2
Частота аллелей и генотипов полиморфизма генов СРБ у женщин с ИБС

Полиморфизм гена СРБ		Частота, %		OR ²	95% CI ³	
		2-я группа	Контроль			
С3872Т	аллель	С	0,62 ¹	0,44	1,22	1,06–1,54
		Т	0,38 ¹	0,56	0,78	0,64–0,93
	генотип	СС	31,6	20,9	1,25	0,99–1,58
		ТТ	11,6 ¹	32,6	0,57	0,35–0,93
С1846Т	аллель	С	0,56 ¹	0,74	0,77	0,65–0,91
		Т	0,44 ¹	0,26	0,79	0,66–0,96
	генотип	СС	30,2	16,3	1,26	0,99–1,59
		ТТ	6,97 ¹	25,6	0,49	0,25–0,95
С1444Т	аллель	С	0,65 ¹	0,84	0,75	0,63–0,88
		Т	0,35 ¹	0,16	1,33	1,13–1,56
	генотип	СС	43,0 ¹	69,8	0,69	0,54–0,89
		ТТ	12,8	2,3	1,43	1,14–1,77
А717G	аллель	А	0,71 ¹	0,84	0,80	0,67–0,95
		Г	0,29 ¹	0,16	1,40	1,09–1,80
	генотип	АА	52,3	69,8	0,79	0,62–1,00
		ГГ	10,5	2,3	1,39	1,08–1,77
		АГ	37,2	27,9	1,14	0,89–1,45

в контроле. Наличие гомозиготного генотипа ассоциировалось с уменьшением риска развития заболевания. Наконец, на базе исследования Cardiovascular Health Study получены результаты, свидетельствующие о связи 1846С/Т с содержанием СРБ и, как следствие, со смертностью от сердечно-сосудистых

заболеваний [9]. Мы же не увидели значимой разницы по частоте гетерозиготного генотипа, вероятно, он ассоциирован именно с исходами сердечно-сосудистых заболеваний, а не с риском их развития. Хотелось бы отметить, что гомозиготный генотип ТТ данного полиморфизма чаще регистрировался в группе здоровых лиц.

Не было установлено различий в частоте аллелей и генотипов полиморфизмов между группами женщин с сочетанной патологией и изолированной ИБС. Но при анализе распределения аллелей и генотипов в зависимости от локализации остеопоротических переломов была выявлена ассоциация по полиморфизму С1444Т с переломами дистальных отделов лучевой кости, а по полиморфизму С1846Т – с переломами позвонков.

Заключение

Полиморфизмы С3872Т и С1444Т гена СРБ ассоциированы с ИБС. У носителей аллели Т и генотипа ТТ полиморфизма С1444Т в 1,5 раза увеличен риск ИБС. Нет различий в распределении аллелей и генотипов изучаемых полиморфизмов при сравнении женщин, имеющих сочетание ИБС и остеопороза, со страдавшими только ИБС. Риск развития переломов лучевой кости ассоциирован с полиморфизмом С1444Т, для женщин с генотипом СС он выше в 1,5 раза. Риск переломов позвонков ассоциирован с полиморфизмом С1846Т, причем у носителей генотипа СТ – в 4,5 раза.

Литература / References

1. Короткова Т.А. Влияние генетических и внешнесредовых факторов на формирование пиковой костной массы у подростков // Остеопороз и остеопатии. 2004. № 3. С. 34–37.
Korotkova T.A. Influence of genetic and external factors on the formation of peak bone mass in adolescents // Osteoporosis and osteopathy. 2004. No. 3. P. 34–37.
2. Шахнович Р.М., Сулинина Т.С., Барсова Р.М. Полиморфизм С1444Т гена СРБ и концентрация С-реактивного белка в сыворотке крови при инфаркте миокарда // Кардиология. 2010. № 8. С. 4–12.
Shakhnovich R.M., Sulina T.S., Barsova R.M. Polymorphism of С1444Т gene of СРБ and concentration of С-reactive protein in blood serum with myocardial infarction // Cardiology. 2010. No. 8. P. 4–12.
3. Barendolts E.I., Berman M., Kukreja S.C. [et al.]. Osteoporosis and coronary atherosclerosis in asymptomatic postmenopausal women // Calcif. Tissue Int. 1998. Vol. 62, No. 3. P. 209–213.
4. Browner W.S., Soley D.G., Vogt T.M. Non-trauma mortality in elderly women with low bone mineral density // Lancet. 1991. Vol. 338. P. 335–338.
5. Chen J., Zhao J., Huang J. [et al.]. -717A>G polymorphism of human C-reactive protein gene associated with coronary heart disease in ethnic Han Chinese: the Beijing atherosclerosis study // J. Mol. Med. 2005. Vol. 83, No. 1. P. 72–78.
6. Hak A.E., Pols H.A.P., Van Hemert A.M. [et al.]. Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause. A population-based longitudinal study // Arterioscler. Throm. Vass. Biol. 2000. Vol. 20. P. 1926–1931.
7. Karouzakis E., Neidhart M., Gay R.E. Molecular and cellular basis of rheumatoid joint distraction // Immunol. Lett. 2006. Vol. 106, No. 1. P. 8–137
8. Kolz M., Koenig W., Müller M. [et al.]. DNA variants, plasma levels and variability of C-reactive protein in myocardial infarction survivors: results from the AIRGENE study // European Heart Journal. 2007. Vol. 29. P. 1250–1258.

9. Lange L.A., Carlson C.S., Hindorf L.A. [et al.]. Association of polymorphisms in the CRP gene with circulating C-reactive protein levels and cardiovascular events // JAMA. 2006. Vol. 296. P. 2703–2711.
10. Pankow J.S., Folsom A.R., Cushman M. Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation: the NHLBI family heart study // Atherosclerosis. 2001. Vol. 154. P. 681–689.
11. Pocock N.A., Eisman J.A., Hopper J.L. [et al.]. Genetic determinants of bone mass in adults: a twin study // J. Clin. Invest. 1987. Vol. 80. P. 706–710.
12. Ratson S.H. The genetic of osteoporosis // Bone. 1999. Vol. 25, No. 1. P. 85–86.
13. Ridker P.M., Bassuk S.S., Toth P.P. C-reactive protein and risk of cardiovascular disease: evidence and clinical application // Curr. Atherosclerosis. 2003. Vol. 5. P. 341–349.
14. Szalai A.J., Wu J., Lange E.M. [et al.]. Single-nucleotide polymorphisms in the C-reactive protein gene promoter that affect transcription factor binding, after transcriptional activity, and association with differences in baseline serum CRP level // J. Mol. Med. 2005. Vol. 83, No. 6. P. 440–447.
15. Van der Recke P., Hansen M.A., Hassager C. The association between low bone mass at the menopause and cardiovascular mortality // Am. J. Med. 1999. Vol. 106. P. 273–278.

Поступила в редакцию 25.10.2017.

THE FREQUENCY OF ALLELES AND GENOTYPES OF POLYMORPHISM OF C-REACTIVE PROTEIN GENE IN WOMEN WITH ISCHEMIC HEART DISEASE AND POSTMENOPAUSAL OSTEOPOROSIS

S.Yu. Tsarenok, V.V. Gorbunov, A.A. Dutova
Chita State Medical Academy (39a Gorkogo St. Chita 672090
Russian Federation)

Objective. Aim: to study the frequency of alleles and genotypes of polymorphisms of the C-reactive protein (CRP) gene (C1444T, C1846T; C3872T; A717G) in women with ischemic heart disease (IHD) and osteoporosis.

Methods. 205 postmenopausal women aged from 60 to 76 years, living in the Trans-Baikal Territory, Russian nationality were examined. In 162 women, the diagnosis of IHD was verified, among them 76 postmenopausal osteoporosis (the first clinical group) was detected. 86 women with IHD (without osteoporosis) made up the second clinical group. 43 women of the control group did not have a risk of cardiovascular diseases and osteoporosis. Molecular genetic investigation was performed by polymerase chain reaction.

Results. A statistically significant difference in the distribution of alleles and genotypes for CRP polymorphisms: C3872T and C1444T was found in women with IHD comparison with healthy individuals. The T allele and the homozygous TT genotype of the polymorphic region C3872T were more often detected among healthy individuals. For polymorphism C1444T it was established that in patients with IHD allele T and genotype TT were more frequent and associated with an increase in the risk of IHD by 1.5 times. We have not identified the relationship between the presence of osteoporosis and the studied polymorphisms of CRP. We studied the distribution of alleles and genotypes depending on the localization of fractures. It was established that C1444T polymorphism is associated with fractures of the radial bone, polymorphism C1846T is associated with an increased risk of vertebral fractures.

Conclusions. C3872T and C1444T polymorphisms of the CRP gene are associated with IHD. In carriers of T allele and CT genotype of C1444T polymorphism, the risk of IHD increased 1.5 times. We did not find any differences in the distribution of alleles and genotypes of the studied polymorphisms when comparing women who have a combination of IHD and osteoporosis with women with IHD. The risk of development of fractures of the radial bone is associated with polymorphism C1444T. For women with CC genotype, the risk is increased by 1.5 times. The risk of vertebral fractures is associated with polymorphism C1846T. The carriers of CT genotype risk increased by 4.5 times.

Keywords: C1444T, C1846T, C3872T, A717G

Pacific Medical Journal, 2017, No. 4, p. 65–68.