

© В. В. Внуков¹, И. В. Кролевец²,
С. Б. Панина¹, Н. П. Милютин¹,
А. А. Ананян¹, А. А. Плотников¹,
М. А. Забродин²

¹ ФГАОУ ВПО Южный федеральный университет;

² ГБОУ ВПО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава РФ

Гонартроз (ГА) — артроз коленного сустава, одним из ведущих факторов риска развития которого является травма. Целью работы явилось исследование ассоциации вариантов полиморфных генов *nNOS* и *eNOS* с риском развития посттравматического ГА (ПТГА) у жителей Ростовской области. Результаты свидетельствуют о развитии нитрозильного стресса в плазме крови и синовиальной жидкости (СЖ) при ПТГА. При этом содержание нитритов/нитратов в СЖ связано с генотипом локуса $-786T > C$ *eNOS*; носительство мутантного аллеля $-786C$ приводит к снижению содержания NO_x^- . Аллель $-84A$ полиморфного гена *nNOS* может быть ассоциирован с риском развития ПТГА и повышением интенсивности апоптоза хондроцитов, что подтверждается электронно-микроскопическим исследованием хрящевой ткани, содержащей хондроциты на ранних и поздних стадиях апоптоза.

✿ **Ключевые слова:**

посттравматический гонартроз; NO-синтазы; нитрозильный стресс; апоптоз хондроцитов.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ NO-СИНТАЗ С РАЗВИТИЕМ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО ГОНАРТРОЗА У ЖИТЕЛЕЙ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Гонартроз (ГА) — артроз коленного сустава, возраст-ассоциированное заболевание, распространенная причина хронической нетрудоспособности и инвалидности. Известно, что от ГА в мире страдают более 251 млн человек; у 30 % пациентов, перенесших травмы передней крестообразной связки или мениска, развивается посттравматический гонартроз (ПТГА) в течение 5 лет после травмы, у 50 % таких пациентов — через 10–20 лет (Cattano et al., 2013). Важным фактором риска развития артроза является травма, которая способна инициировать процесс воспаления в тканях сустава, приводить к прогрессирующей дегенерации хряща и развитию посттравматического артроза (Anderson et al., 2011). Многими исследованиями показана роль полиморфных маркеров различных генов в предрасположенности к артрозу, в том числе, к посттравматическому гонартрозу (Sward et al., 2010; Valdes et al., 2013).

Известно, что в хондроцитах человека под действием изоферментов синтаз оксида азота (NOS) синтезируется оксид азота NO^* , причем при ГА синтез активируется, что подтверждено использованием антител к нитротирозину (Loeser et al., 2002). NO^* является ключевым индуктором апоптоза хондроцитов, приводящего к дегенеративным изменениям тканей сустава. Содержание 3-нитротирозина, маркера нитрозильного стресса, коррелирует с уровнем апоптоза хондроцитов и областями истощения протеогликанов при индуцированном артрозе (Hashimoto et al., 1998). NO^* при взаимодействии с супероксидом образует пероксинитрит и гидроксильные радикалы, повреждающие ткани и запускающие процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) (Feelisch, 2008). Апоптоз хондроцитов и продукция NO^* отмечаются на самых ранних стадиях артроза. NO^* синтезируется с участием трех изоформ NO-синтаз: нейрональной *nNOS* (NOS1), индуцибельной *iNOS* (NOS2) и эндотелиальной *eNOS* (NOS3), при этом эксперименты свидетельствуют о том, что все три изоформы NOS экспрессируются и являются активными в хондроцитах ростовой пластинки (Abramson, 2008a). Известно, что нейрональная и эндотелиальная NO-синтазы играют важную роль в пролиферации, созревании и апоптозе хондроцитов. У *nNOS*- и *eNOS*-нокаутных мышей наблюдались нарушения данных процессов и сниженное количество пролиферирующих хондроцитов (Yan et al., 2010; Yan et al., 2012). Анализ литературы показывает, что ассоциация полиморфных маркеров генов NO-синтаз с развитием артроза не изучена.

Целью работы явилось исследование ассоциации вариантов $-84G > A$ (rs41279104) гена *nNOS* и $-786T > C$ (rs2070744) гена *eNOS* с риском развития посттравматического гонартроза у жителей Ростовской области, а также выявление взаимосвязи между изученными вариантами генов и уровнем нитрозильного стресса в крови и синовиальной жидкости и интенсивностью апоптоза хондроцитов у пациентов с ПТГА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Критериями включения в группу для генетико-биохимического исследования являлись следующие характеристики: боль в коленном суставе, затрудненная ходьба, ограничение движений в суставе, подтвержденный диагноз — посттравматический гонартроз (ПТГА) II–III стадий по шкале Kellgren/Lawrence.

Поступила в редакцию 20.04.2015
Принята к публикации 11.08.2015

Критериями исключения являлись: дисплазия скелета, коллагенозы, алкогольная/наркотическая зависимость, почечная/печеночная недостаточность. В итоге в группу были включены 117 пациентов с ПТГА (39 % мужчин и 61 % женщин; средний возраст $46,33 \pm 1,44$ лет; средний ИМТ $26,7 \pm 0,83$ кг/м²). В контрольную группу было включено 94 человека (37 % мужчин и 63 % женщин; средний возраст $44,01 \pm 1,55$ лет; средняя величина индекса массы тела (ИМТ) $25,41 \pm 0,58$ кг/м²) без признаков ГА в анамнезе, что было подтверждено рентгенологическим методом. Все обследованные пациенты имели русскую национальность и проживали на территории Ростовской области. Электронно-микроскопические исследования апоптоза хондроцитов проводили с использованием биоптатов хряща коленного сустава 35 пациентов с посттравматическим гонартрозом, взятых при артроскопии.

Кровь (10 мл) отбирали в утренние часы натощак из локтевой вены в стерильные пробирки с К2-ЭДТА в качестве антикоагулянта, получали плазму крови. Синовиальную жидкость (СЖ) отбирали в стерильные пробирки с гепарином путем артроцентеза коленного сустава, далее центрифугировали; супернатант использовали для биохимического анализа.

Для экстракции ДНК из периферической крови использовали коммерческий набор «ДНК-Экспресс-Кровь» (Литех, Россия). Для идентификации вариантов полиморфных генов нейрональной (*nNOS*) и эндотелиальной (*eNOS*) NO-синтаз использовали полимеразную цепную реакцию. В исследовании были использованы коммерческие диагностикумы SNP-экспресс (Литех, Россия). Следующий цикл повторялся 35 раз: денатурация 70 с при 93 °С, отжиг 10 с при 64 °С, элонгация 80 с при 72 °С. Ампликоны разделяли путем электрофореза в 3%-м агарозном геле, окрашивали этидиум бромидом и визуализировали в трансиллюминаторе GelDoc (BioRad, США).

Определение общего содержания нитритов/нитратов (NO_x^-) в плазме и СЖ проводили колориметрическим методом, основанном на реакции Грисса (Голиков, Николаева, 2004), с использованием спектрофотометра Beckman Coulter DU 800 (USA).

Для электронно-микроскопического исследования апоптоза хондроцитов кусочки хряща поэтапно фиксировались в 2,5 % растворе глутаральдегида, затем в 1 % растворе четырехоксида осмия на фосфатном буфере при pH 7,4. После обезвоживания в спиртах восходящей концентрации и ацетоне материал заливался в аралдит. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме ЛКВ, контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца. Изучение препаратов проводили в электронном микроскопе УЭМВ100 К при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Статистический анализ с использованием элементов непараметрического и множественного регрессионного анализа проводился в пакете программ Statistica 6.1.

Для сравнения независимых групп использовали U-критерий Манна–Уитни и H-критерий Краскела–Уоллиса. Данные представляли как медиану (25–75 % квантили) или $M \pm m$. Корреляционные взаимосвязи оценивали с помощью ранговой корреляции Спирмена. Распределение генотипов проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга, различия частот аллелей и генотипов между группами оценивали с помощью критерия χ^2 , для оценки ассоциации полиморфизма и посттравматического ГА рассчитывали отношения шансов (OR) с 95 % доверительным интервалом (CI). Для моделирования межгенных взаимодействий использовали метод редукции многофакторной размерности (MDR) в среде открытой программы MDRv.3.0.2 и ее модифицированной версии — Generalized MDR — GMDRv0.9. (Moore, Williams, 2002). Во всех вариантах статистического анализа критический уровень значимости принимался при $p < 0,05$, тенденцию к достоверным различиям принимали при $0,05 < p < 0,1$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам генотипирования, распределение частот генотипов $-84G>A$ гена *nNOS* соответствовало закону Харди–Вайнберга как среди здоровых лиц ($\chi^2 = 3,05$, $p = 0,08$), так и среди пациентов с ПТГА ($\chi^2 = 0,41$, $p = 0,52$). Аналогичные закономерности были показаны для локуса $-786T>C$ гена *eNOS* — для контрольной группы ($\chi^2 = 0,46$, $p = 0,50$), для группы пациентов с ПТГА ($\chi^2 = 0,09$, $p = 0,76$).

Было установлено, что частоты аллелей полиморфного локуса $-84G>A$ гена *nNOS* различаются между пациентами с ПТГА и контрольной группами (табл. 1).

Исходя из полученных результатов, аллель $-84A$ гена *nNOS* ассоциирован с развитием посттравматического гонартроза. Аллель $-84G$ может иметь «протективное» значение.

Известно, что нейрональная NO-синтаза (*nNOS*) функционирует в различных типах клеток за пределами нервной системы. В кодирующем регионе гена *nNOS*, локализованном на участке 12q24.22 и насчитывающем 35 экзонов, обнаружено 19 полиморфных локусов; из которых три идентифицированы в экзоне 1 с, только один из них, $-84G>A$, является функционально значимым и снижает уровень транскрипции гена на 30 % (Serra et al., 2011; Saur et al., 2004). Для *nNOS*-нокаутных мышей характерны нарушения в хрящевой ткани, которая характеризуется уменьшенным количеством хондроцитов, наличием клеток с преждевременным завершением клеточного цикла и повышенным уровнем апоптоза, а также замедленным ростом и меньшей длиной трубчатых костей (Amin et al., 1995; Saur et al., 2004; Yan et al., 2012). В работе (Van't Hof et al., 2004) продемонстрировано, что *nNOS*-нокаутные мыши имели увеличенную минеральную плотность костной ткани, но сниженные

Таблица 1

Распределение генотипов и аллелей вариантов $-84G > A$ гена *nNOS* и $-786T > C$ гена *eNOS* в контрольной группе и группе пациентов с ПТГА

Генотипы/аллели	Контроль (N = 94), %	ПТГА (N = 117), %	OR (95 % CI)	χ^2 (p)
<i>nNOS-84G > A</i>				
GG	85,1	70,1	0,41 (0,21–0,82)	5,06 (0,02)
GA	12,8	28,2	2,68 (1,30–5,56)	
AA	2,1	1,7	0,80 (0,11–5,79)	
G	91,5	84,2	0,50 (0,27–0,92)	7,41 (0,02)
A	8,5	15,8	2,02 (1,08–3,76)	
<i>eNOS-786T > C</i>				
TT	35,1	29,6	0,78 (0,43–1,41)	1,41 (0,49)
TC	51,1	50,9	0,99 (0,57–1,73)	
CC	13,8	19,4	1,50 (0,71–3,20)	
T	60,6	55,1	0,80 (0,54–1,18)	1,27 (0,26)
C	39,4	44,9	1,26 (0,84–1,87)	

темпы ее обмена, что связывают с важной ролью данной изоформы в регуляции этих процессов (Van't Hof et al., 2004).

Точечная замена в позиции $-84G > A$ экзона 1 с промотора гена *nNOS*, вероятно, вносит вклад в уменьшение экспрессии гена *nNOS*: генотип $-84AA$ и аллель $-84A$ связаны со сниженной на 30 % экспрессией *nNOS*, что может снижать эффективность важнейшего сигнального пути NO/cGMP/cGMP-зависимые киназы (Miao et al., 2010). Известно, что этот путь ингибирует активность каспаз, в том числе благодаря регуляции генов семейства Bcl-2 (Olson, Garban, 2008). По-видимому, репрессия данного пути может привести к активации каспазного каскада и индукции апоптоза. Аллель $-84A$, согласно результатам нашего исследования, встречается в группе пациентов с ПТГА чаще по сравнению со здоровыми людьми. В соответствии с этим можно предположить сопряженное снижение экспрессии гена *nNOS* и изменение регуляции соответствующих каскадов, например, каспазного каскада программируемой клеточной гибели. Следует отметить, что согласно (Elfering et al., 2002), NO-синтаза может быть локализована на внутренней митохондриальной мембране и является миристоилированным и фосфорилированным продуктом гена *nNOS*.

В нашем исследовании не было установлено статистически значимых различий частот генотипов и аллелей локуса $-786T > C$ полиморфного гена *eNOS* между группами пациентов с гонартрозом и здоровых лиц (табл. 1). Ген *eNOS* локализован на участке хромосомы 7q35-36 и содержит 26 экзонов, в настоящее время идентифицировано около 400 полиморфных маркеров в этом гене (Liu et al., 2014; Ryk et al., 2011). Известно, что локус $-786T > C$ в промоторе гена *eNOS* характеризуется частотой минорного аллеля среди представителей европеоидной расы 0,30 и ассоциирован с сердечно-сосудистыми заболеваниями, диабетической нефропатией, раком простаты и молочной железы (Ryk et al., 2011). В работе

(Nakayama et al., 1999) было показано, что замена $T \rightarrow C$ в позиции -786 приводит к значительному уменьшению активности промотора гена *eNOS*, и, соответственно, к снижению экспрессии, что вносит вклад в предрасположенность пациентов с мутантным генотипом к развитию коронарного спазма.

При посттравматическом гонартрозе, как показало проведенное биохимическое исследование, содержание стабильных метаболитов оксида азота — нитритов/нитратов (NO_x^-) — в плазме крови было равно 20,91 (15,82–28,90) $\mu M/l$, что на 32 % больше по сравнению с нормой, составляющей 15,81 (15,47–17,11) $\mu M/l$ ($U = 120,0$, $p = 0,022$). Содержание NO_x^- в синовиальной жидкости составило 22,11 (15,97–26,28) $\mu M/l$, что на 40 % выше, если сравнивать с плазмой здоровых людей ($U = 137,5$, $p = 0,014$). Высокие локальные концентрации NO_x^- негативно влияют на функции хондроцитов, ингибируя синтез компонентов матрикса коллагена и протеогликанов, активируя металлопротеиназы, уменьшая экспрессию антагониста рецептора IL-1 β , ингибируя пролиферацию хондроцитов (Abramson, 2008b; Mazzetti et al., 2001). Провоспалительные цитокины играют важную роль в образовании активных форм кислорода и азота (NO^*), которые вносят существенный вклад в прогрессирование артроза (Feelisch, 2008). Нитрозильный стресс, развивающийся в плазме крови и синовиальной жидкости пациентов с ПТГА, может быть обусловлен активацией индуцибельной NO-синтазы (iNOS), которая экспрессируется в хрящевой ткани и продуцирует большие количества NO^* при артрозе под действием провоспалительных цитокинов (Castro et al., 2006). Следует отметить, что iNOS, преимущественно, регулируется на уровне транскрипции, при этом промотор гена *iNOS* содержит сайты связывания многих транскрипционных факторов: AP-1, CREB, HIF, NF-kB и др., в том числе, индуцируемых IL-1 β и TNF α (Pautz et al., 2010). Согласно исследованию (Bentz et al., 2012), спе-

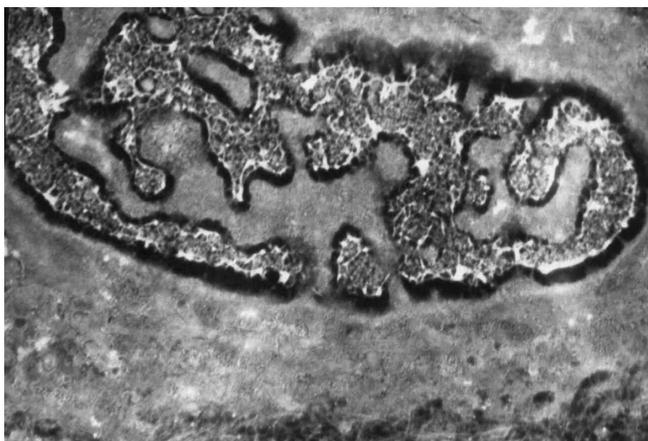


Рис. 1. Грубая конденсация хроматина и деформация ядра в хондроците, находящемся в необратимой фазе апоптоза. Электроннограмма. Ув. $\times 12\,000$

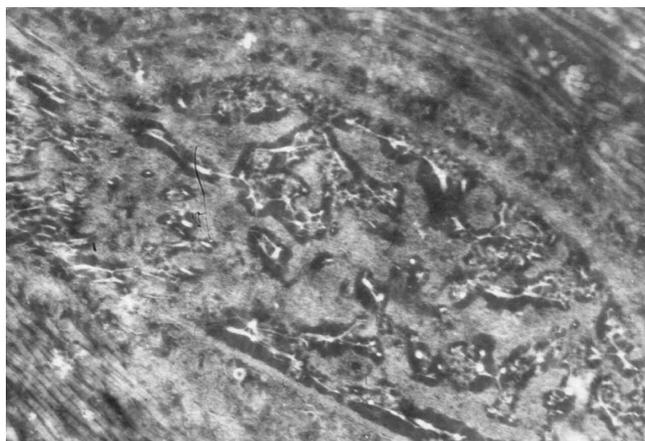


Рис. 2. Фрагментация ядра и цитоплазмы хондроцита — терминальная фаза апоптоза. Электроннограмма. Ув. $\times 15\,000$

цифический ингибитор $i\text{NOS}_L\text{-NIL}$ снижает образование активных форм кислорода и азота (АФКА) и интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ), а также ингибирует процесс апоптоза, индуцированного АФКА, при артрозе. Это подтверждает участие оксида азота, образуемого $i\text{NOS}$, в процессах программируемой гибели хондроцитов.

Электронно-микроскопическое исследование подтвердило наличие в хрящевой ткани хондроцитов, находящихся на различных стадиях апоптоза. На ранних стадиях апоптотической дегенерации выявлены хондроциты сохранный структуры, имеющие целостную клеточную и ядерную оболочки, структурированную цитоплазму и хроматин в ядре. В дальнейшем наблюдаются более грубые изменения, характеризующие апоптотические процессы как необратимые. В ядрах появляются глубокие складки, полости, в которые проникает цитоплазма (рис. 1).

На более поздних стадиях апоптоза выявлена фрагментация ядра на более мелкие частицы. В дальнейшем наблюдается фрагментация не только ядра, но и цитоплазмы с образованием типичных апоптотических телец (рис. 2). Следует отметить, что хондроциты могут подвергаться специфической форме программируемой клеточной гибели — хондроптозу, который рассматривается как вариант классического апоптоза и часто наблюдается при гонартрозе *in vivo* (Perez et al., 2005). При хондроптозе имеет место гиперплазия комплекса Гольджи и мембран эндоплазматического ретикула, сегментация цитоплазмы и образование компартментов клетки, где происходит расщепление компонентов цитоплазмы и органелл. Все это способствует самодеструкции хондроцитов, что подтверждается присутствием в хряще пустых лакун. Таким образом, электронно-микроскопическое исследование хряща коленного сустава пациентов с ПТГА показало наличие деструктивных изменений с признаками апоптоза хондроцитов.

Для определения связи между уровнем нитрозильного стресса и генотипом пациентов использовался множественный регрессионный анализ. В качестве зависимой переменной было принято содержание нитритов/нитратов (NO_x^-) в плазме или СЖ, в качестве независимых переменных — пол, возраст, индекс массы тела, рентгенологическая стадия заболевания и генотип локусов $-786T > C$ $e\text{NOS}$ и $-84G > A$ $n\text{NOS}$. В результате для зависимой переменной — NO_x^- в плазме крови — в уравнение регрессии (коэффициент множественной корреляции $R = 0,556$; $p = 0,029$) были включены два предиктора: $y = 3,7 - 0,026x_1 + 0,189x_2$, где x_1 — индекс массы тела пациента ($p = 0,069$), а x_2 — пол пациента ($p = 0,18$): женский пол — 0, мужской — 1. Из всех переменных в уравнение регрессии ($R = 0,567$; $p = 0,014$) для содержания NO_x^- в синовиальной жидкости были также включены два предиктора: $y = 2,5 - 0,199x_1 + 0,023x_2$, где x_1 — генотип локуса $-786T > C$ $e\text{NOS}$ ($p = 0,049$): TT — 0, TC — 1, CC — 2, x_2 — ИМТ ($p = 0,08$). Результаты данного математического моделирования свидетельствуют о том, что варианты $-786T > C$ гена $e\text{NOS}$ статистически достоверно связаны с концентрацией нитритов/нитратов в СЖ при посттравматическом гонартрозе. Сравнив уровни содержания NO_x^- в СЖ трех групп пациентов с различными генотипами (-786 TT , TC , CC), обнаружили тенденцию к различию этих трех групп ($H = 5,9$, $p = 0,0523$): при генотипе TT содержание NO_x^- составило $23,13$ ($21,78\text{--}26,64$) $\mu\text{M}/\text{л}$, при генотипе TC — $22,38$ ($13,82\text{--}23,68$) $\mu\text{M}/\text{л}$, при генотипе CC — $11,22$ ($11,09\text{--}16,70$) $\mu\text{M}/\text{л}$. Эти результаты согласуются с данными литературы о снижении активности промотора гена у здоровых лиц-носителей мутантного аллеля C (Nakayama et al., 1999). Пациенты с диабетом, имеющие генотип TC , также характеризуются более низким уровнем образования NO^+ , чем гомозиготы TT (Welkriana et al., 2011). Протеомный и экспрессионный анализ культуры эндотелиальных клеток человека

с генотипом двух видов — *TT* и *CC* — показывает, что клетки с генотипом *CC* обладают сниженной экспрессией *eNOS* и сниженной способностью к синтезу NO^{\cdot} , по сравнению с клетками, имеющими генотип *TT* (Asif et al., 2009). Концентрация NO_x^- в плазме крови у здоровых людей и пациентов с глаукомой в египетской популяции также была значительно меньше при генотипе (*TC + CC*), по сравнению с генотипом *TT* локуса $-786T>C$ *eNOS* (Emam et al., 2014).

Проведение двухлокусного моделирования межгенных взаимодействий *nNOS/G-84A* × *eNOS/T-786C* с помощью программы GMDR показало, что данная модель отражает выраженную тенденцию к достоверному антагонизму эффектов этих двух локусов, о чем свидетельствует следующее сочетание показателей: опытная взвешенная точность (Training Bal. Acc.) составила — 0,6002, контрольная взвешенная точность (Testing Bal. Acc.) — 0,5922, воспроизводимость модели (*CV Consistency*) — 10/10, значимость — 10 ($p=0,0547$). Показатели точности этой модели оказались более оптимальными по сравнению с однолокусной моделью, учитывающей только варианты *G-84A nNOS*. Программа GMDR дает возможность определить оптимальную модель ген-генного и ген-средового взаимодействия, позволяющую с наиболее высокой точностью предсказать наличие или отсутствие предрасположенности к заболеванию (Moore, Williams, 2002). В настоящей работе нами не было выяв-

лено ассоциации полиморфизма *T-786C eNOS* с риском развития ПТГА, однако в сочетании с генотипом локуса *G-84A nNOS* он может участвовать в определении степени риска развития данной патологии (рис. 3).

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о развитии нитрозильного стресса в плазме крови и синовиальной жидкости при посттравматическом гонартрозе, при этом содержание нитритов/нитратов в СЖ было связано с генотипом локуса $-786T>C$ гена *eNOS*: носительство мутантного аллеля $-786C$ приводит к снижению содержания NO_x^- . Аллель $-84A$ гена *nNOS* может быть ассоциирован с риском развития посттравматического ГА и повышением интенсивности апоптоза хондроцитов, что подтверждается электронно-микроскопическим исследованием хрящевой ткани, содержащей хондроциты, находящиеся на ранних и поздних стадиях программируемой клеточной гибели.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Базовая часть государственного задания № 213.01-11/2014-32).

ЛИТЕРАТУРА

1. Голиков П. П., Николаева Н. Ю. (2004) Метод определения нитрита/нитрата (NO_x^-) в сыворотке крови. *Вопр. биомед. химии.* № 1: С. 79–85.
2. Abramson S. B. (2008a) Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* V. 10 (2): P. 1–7.
3. Abramson S. B. (2008b) Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage.* V. 16 (2): S15–20.
4. Amin A. R., Cesare P. E., Vyas P. et al. (1995) The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* V. 182: P. 2097–2102.
5. Anderson D. D., Chubinskaya S., Guilak F. et al. (2011) Post-traumatic osteoarthritis: improved understanding and opportunities for early intervention. *J. Orthop. Res.* V. 29: P. 802–809.
6. Asif A. R., Oellerich M., Armstrong V. W. et al. (2009) T-786C polymorphism of the nos-3 gene and the endothelial cell response to fluid shear stress — a proteome analyses. *J. Proteome. Res.* V. 8 (6): P. 3161–3168.
7. Bentz M., Zaouter C., Shi Q. et al. (2012) Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents lipid peroxidation in osteoarthritic chondrocytes. *J. Cell Biochem.* V. 113: P. 2256–2267.
8. Castro R. R., Cunha F. Q., Silva F. S. Jr., Rocha F. A. (2006) A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis-evidence of a role for nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage.* V. 14 (8): P. 769–776.
9. Cattano N. M., Barbe M. F., Massicotte V. S. et al. (2013) Joint trauma initiates knee osteoarthritis

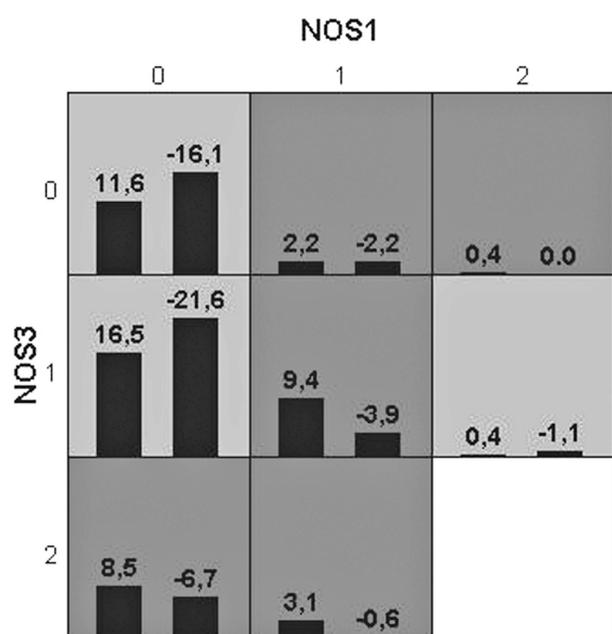


Рис. 3. Двухлокусная модель межгенных взаимодействий *NOS1/ G-84A* × *NOS3/T-786C*. Темно-серым цветом выделены сочетания генотипов повышенного риска, светло-серым — генотипов пониженного риска, белым — не встречающиеся сочетания генотипов. В каждой ячейке слева — группа больных ПТГА, справа — контрольная группа. 0 — нормальная гомозигота, 1 — гетерозигота, 2 — мутантная гомозигота

- through biochemical and biomechanical processes and interactions. *OA Muskuloskelet. Med.* V. 1 (1): P. 1–6.
10. Elfering S.L., Sarkela T.M., Giulivi C. (2002) Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* V. 277: P. 38079–38088.
 11. Emam W.A., Zidan H.E., Abdulhalim B.-E.H. et al. (2014) Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and susceptibility to high-tension primary open-angle glaucoma in an Egyptian cohort. *Mol. Vis.* V. 20: P. 804–811.
 12. Feelisch M. (2008) The chemical biology of nitric oxide — an outsider's reflections about its role in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* V. 16 (2): S3–13.
 13. Hashimoto S., Takahashi K., Amiel D. (1998) Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* V. 41: S41.
 14. Liu D., Jiang Z., Dai L. et al. (2014) Association between the $-786T>C$ polymorphism in the promoter region of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and risk of coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis. *Gene.* V. 545: P. 175–183.
 15. Loeser R.F., Carlson C.S., Del Carlo M., Cole A. (2002) Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1beta and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1. *Arthritis Rheum.* V. 46: P. 2349–2357.
 16. Mazzetti I., Grigolo B., Pulsatelli L. et al. (2001) Differential roles of nitric oxide and oxygen radicals in chondrocytes affected by osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Clin. Sci.* V. 101: P. 593–599.
 17. Miao X., Garcia-Barcelo M.M., So M. et al. (2010) Lack of association between nNOS $-84G>A$ polymorphism and risk of infantile hypertrophic pyloric stenosis in a Chinese population. *J. Pediatr. Surg.* V. 45: P. 709–713.
 18. Moore J.H., Williams S.W. (2002) New strategies for identifying gene-gene interactions in hypertension. *Ann. Med.* V. 34: P. 88–95.
 19. Nakayama M., Yasue H., Yoshimura M. et al. (1999) T-786→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation.* V. 99: P. 2864–2870.
 20. Olson S.Y., Garban H.J. (2008) Regulation of apoptosis-related genes by nitric oxide in cancer. *Nitric Oxide.* V. 19: P. 170–176.
 21. Pautz A., Art J., Hahn S. et al. (2010) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide.* V. 23: P. 75–93.
 22. Perez H.E., Luna M.J., Rojas M.L., Kouri J.B. (2005) Chondroptosis: An immunohistochemical study of apoptosis and Golgi complex in chondrocytes from human osteoarthritic cartilage. *Apoptosis.* V. 10: P. 1105–1110.
 23. Ryk C., Wiklund N.P., Nyberg T., Verdier P.J. (2011) Polymorphisms in nitric-oxide synthase 3 may influence the risk of urinary-bladder cancer. *Nitric Oxide.* V. 25: P. 338–343.
 24. Saur D., Vanderwinden J.M., Seidler B. et al. (2004) Single nucleotide promoter polymorphism alters transcription of neuronal nitric oxide synthase exon 1c in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 101 (6): P. 1662–1667.
 25. Serra A., Schuchardt K., Genuneit J. et al. (2011) Genomic variants in the coding region of neuronal nitric oxide synthase (NOS1) in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *J. Pediatr. Surg.* V. 46: P. 1903–1908.
 26. Sward P., Kostogiannis I., Neuman P. et al. (2010) Differences in the radiological characteristics between post-traumatic and non-traumatic knee osteoarthritis. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* V. 20: P. 731–739.
 27. Valdes A.M., Doherty S.A., Muir K.R. et al. (2013) The genetic contribution to severe post-traumatic osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* V. 72: P. 1687–1690.
 28. Van't Hof R.J., Macphee J., Libouban H. et al. (2004) Regulation of bone mass and bone turnover by neuronal nitric oxide synthase. *Endocrinol.* V. 145 (11): P. 5068–5074.
 29. Welkriana P.W., Sunatri, Hastuti P. (2011) T-786C polymorphism in nitric oxide synthase 3 gene and nitric oxide level of diabetic retinopathy in Javanese population. *Indonesian Journal of Biotechnology.* V. 16 (2): P. 126–131.
 30. Yan Q., Feng Q., Beier F. (2010) Endothelial nitric oxide synthase deficiency in mice results in reduced chondrocyte proliferation and endochondral bone growth. *Arthritis Rheum.* V. 62 (7): P. 2013–2022.
 31. Yan Q., Feng Q., Beier F. (2012) Reduced chondrocyte proliferation, earlier cell cycle exit and increased apoptosis in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *Osteoarthritis Cartilage.* V. 20: P. 144–151.

THE ASSOCIATION BETWEEN NO-SYNTHASES GENE POLYMORPHISMS AND POST-TRAUMATIC KNEE OSTEOARTHRITIS DEVELOPMENT AMONG ROSTOV REGION RESIDENTS

Vnukov V. V., Krolevets I. V., Panina S. B., Milyutina N. P., Ananyan A. A., Plotnikov A. A., Zabrodin M. A.

✿ **SUMMARY:** *Background.* Knee osteoarthritis (OA) is a common chronic degenerative disease. The risk factors for the development of knee OA are joint trauma and genetic predisposition. The aim of the present work was to study the associations between gene polymorphisms $-84G>A$ nNOS and $-786T>C$ eNOS and the risk of post-traumatic knee osteoarthritis (PTOA) development among Rostov region residents and to define the interactions between these polymorphisms and nitrite level in the plasma and synovial fluid (SF) and chondrocyte apoptosis in patients with PTOA. *Materials and Methods.* Case-control study involved 117 post-traumatic knee OA patients and 94 healthy controls.

The nNOS and eNOS polymorphisms were determined by polymerase chain reaction. The nitrite concentrations in the plasma and synovial fluid were defined using Griess reaction. Chondrocyte apoptosis in cartilage sections was assessed morphologically by electron microscopy. **Results.** The *G-84A nNOS* genotype showed statistical differences between groups. The A allele is associated with PTOA development (OR 2,02, CI 1,08-3,76, $p=0,02$). The *eNOS* genotype did not show statistical difference between groups. The NO_x^- concentration was higher both in plasma ($p=0,022$) and synovial fluid ($p=0,014$) of PTOA patients compared with plasma of healthy subjects. Multiple regression analyses demonstrated that the nitrite level in the SF is linked with $-786T>C$ NOS3 genotype; the $-786C$ allele led to the decreasing in NO_x^- concentration. The electron microscopy confirmed the presence of early and late apoptotic chondrocytes in PTOA cartilage tissue. **Conclusion.** The *G-84A nNOS* polymorphism may be associated with PTOA development and chondrocyte apoptosis intensification. The $-786C$ allele of $-786T>C$ NOS3 is associated with reduced NO_x^- concentration in the synovial fluid.

✿ **KEY WORDS:** post-traumatic knee osteoarthritis; NO-synthases; nitro-oxidative stress; chondrocyte apoptosis.

✿ **REFERENCES (TRANSLITERATED)**

- Golikov P.P., Nikolaeva N. Yu. (2004) Metod opredelenija nitrita/nitrata (NO_x) v syvorotke krovi. [The method for measuring of nitrite/nitrate (NO_x) serum level]. *Vopr. Biomed. Chim.* N 1: P. 79–85.
- Abramson S.B. (2008a) Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* V. 10 (2): P. 1–7.
- Abramson S.B. (2008b) Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage.* V. 16 (2): S15–20.
- Amin A.R., Cesare P.E., Vyas P. et al. (1995) The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* V. 182: P. 2097–2102.
- Anderson D.D., Chubinskaya S., Guilak F. et al. (2011) Post-traumatic osteoarthritis: improved understanding and opportunities for early intervention. *J. Orthop. Res.* V. 29: P. 802–809.
- Asif A.R., Oellerich M., Armstrong V.W. et al. (2009) T-786C polymorphism of the nos-3 gene and the endothelial cell response to fluid shear stress — a proteome analyses. *J. Proteome. Res.* V. 8 (6): P. 3161–3168.
- Bentz M., Zaouter C., Shi Q. et al. (2012) Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents lipid peroxidation in osteoarthritic chondrocytes. *J. Cell Biochem.* V. 113: P. 2256–2267.
- Castro R.R., Cunha F.Q., Silva F.S. Jr., Rocha F.A. (2006) A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis-evidence of a role for nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage.* V. 14 (8): P. 769–776.
- Cattano N.M., Barbe M.F., Massicotte V.S. et al. (2013) Joint trauma initiates knee osteoarthritis through biochemical and biomechanical processes and interactions. *OA Muskuloskelet. Med.* V. 1 (1): P. 1–6.
- Elfering S.L., Sarkela T.M., Giulivi C. (2002) Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* V. 277: P. 38079–38088.
- Emam W.A., Zidan H.E., Abdulhalim B.-E.H. et al. (2014) Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and susceptibility to high-tension primary open-angle glaucoma in an Egyptian cohort. *Mol. Vis.* V. 20: P. 804–811.
- Feelisch M. (2008) The chemical biology of nitric oxide — an outsider's reflections about its role in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* V. 16 (2): S3–13.
- Hashimoto S., Takahashi K., Amiel D. (1998) Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* V. 41: S41.
- Liu D., Jiang Z., Dai L. et al. (2014) Association between the $-786T>C$ polymorphism in the promoter region of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and risk of coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis. *Gene.* V. 545: P. 175–183.
- Loeser R.F., Carlson C.S., Del Carlo M., Cole A. (2002) Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1beta and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1. *Arthritis Rheum.* V. 46: P. 2349–2357.
- Mazzetti I., Grigolo B., Pulsatelli L. et al. (2001) Differential roles of nitric oxide and oxygen radicals in chondrocytes affected by osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Clin. Sci.* V. 101: P. 593–599.
- Miao X., Garcia-Barcelo M.M., So M. et al. (2010) Lack of association between nNOS $-84G>A$ polymorphism and risk of infantile hypertrophic pyloric stenosis in a Chinese population. *J. Pediatr. Surg.* V. 45: P. 709–713.
- Moore J.H., Williams S.W. (2002) New strategies for identifying gene-gene interactions in hypertension. *Ann. Med.* V. 34: P. 88–95.
- Nakayama M., Yasue H., Yoshimura M. et al. (1999) T-786 \rightarrow C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation.* V. 99: P. 2864–2870.
- Olson S.Y., Garban H.J. (2008) Regulation of apoptosis-related genes by nitric oxide in cancer. *Nitric Oxide.* V. 19: P. 170–176.
- Pautz A., Art J., Hahn S. et al. (2010) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide.* V. 23: P. 75–93.
- Perez H.E., Luna M.J., Rojas M.L., Kouri J.B. (2005) Chondroptosis: An immunohistochemical study of apoptosis and Golgi complex in chondrocytes

- from human osteoarthritic cartilage. *Apoptosis*. V. 10: P. 1105–1110.
23. Ryk C., Wiklund N.P., Nyberg T., Verdier P.J. (2011) Polymorphisms in nitric-oxide synthase 3 may influence the risk of urinary-bladder cancer. *Nitric Oxide*. V. 25: P. 338–343.
 24. Saur D., Vanderwinden J.M., Seidler B. et al. (2004) Single nucleotide promoter polymorphism alters transcription of neuronal nitric oxide synthase exon 1c in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 101 (6): P. 1662–1667.
 25. Serra A., Schuchardt K., Genuneit J. et al. (2011) Genomic variants in the coding region of neuronal nitric oxide synthase (NOS1) in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *J. Pediatr. Surg.* V. 46: P. 1903–1908.
 26. Sward P., Kostogiannis I., Neuman P. et al. (2010) Differences in the radiological characteristics between post-traumatic and non-traumatic knee osteoarthritis. *Scand. J. Med. Sci. Sports*. V. 20: P. 731–739.
 27. Valdes A.M., Doherty S.A., Muir K.R. et al. (2013) The genetic contribution to severe post-traumatic osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* V. 72: P. 1687–1690.
 28. Van't Hof R.J., Macphee J., Libouban H. et al. (2004) Regulation of bone mass and bone turnover by neuronal nitric oxide synthase. *Endocrinol.* V. 145 (11): P. 5068–5074.
 29. Welkriana P.W., Sunatri, Hastuti P. (2011) T-786C polymorphism in nitric oxide synthase 3 gene and nitric oxide level of diabetic retinopathy in Javanese population. *Indonesian Journal of Biotechnology*. V. 16 (2): P. 126–131.
 30. Yan Q., Feng Q., Beier F. (2010) Endothelial nitric oxide synthase deficiency in mice results in reduced chondrocyte proliferation and endochondral bone growth. *Arthritis Rheum.* V. 62 (7): P. 2013–2022.
 31. Yan Q., Feng Q., Beier F. (2012) Reduced chondrocyte proliferation, earlier cell cycle exit and increased apoptosis in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *Osteoarthritis Cartilage*. V. 20: P. 144–151.

✉ Информация об авторах

Внуков Валерий Валентинович — д. б. н., зав. кафедрой биохимии и микробиологии. ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет». 344006, Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, д. 105/42. E-mail: vvbio@rambler.ru.

Кролевец Игорь Владимирович — д. м. н., доц., кафедра травматологии и ортопедии. Ростовский государственный медицинский университет Минздрава РФ. 344007, Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., д. 29. E-mail: kivrostov@mail.ru.

Панина Светлана Борисовна — аспирант, кафедра биохимии и микробиологии. ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет». 344006, Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, д. 105/42. E-mail: tailana@donnetwork.ru.

Милютин Наталья Петровна — к. б. н., проф., кафедра биохимии и микробиологии. ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет». 344006, Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, д. 105/42. E-mail: natmilut@rambler.ru.

Ананян Анжелика Аршаковна — к. б. н., доц., кафедра биохимии и микробиологии. ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет». 344006, Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, д. 105/42. E-mail: aaabio@mail.ru.

Плотников Андрей Александрович — аспирант, кафедра биохимии и микробиологии. ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет». 344006, Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, д. 105/42. E-mail: plotnik0703@rambler.ru.

Забродин Михаил Алексеевич — аспирант, кафедра травматологии и ортопедии. Ростовский государственный медицинский университет Минздрава РФ. 344007, Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., д. 29. E-mail: dr.zabrodin@rambler.ru.

Vnukov Valeriy Valentinovich — A chair, PhD, Biochemistry and Microbiology Department. Southern Federal University. 344006, Rostov-on-Don, Bolshaya Sadovaya St., 105/42, Russia. E-mail: vvbio@rambler.ru.

Krolevets Igor' Vladimirovich — MD, Traumatology and Orthopaedic Surgery Department. Rostov State Medical University. 344007, Rostov-on-Don, Nakhichevanskiy pereulok, 29, Russia. E-mail: kivrostov@mail.ru.

Panina Svetlana Borisovna — post-graduate student, Biochemistry and Microbiology Department. Southern Federal University. 344006, Rostov-on-Don, Bolshaya Sadovaya St., 105/42, Russia. E-mail: tailana@donnetwork.ru.

Milyutina Natal'ya Petrovna — Prof., PhD, Biochemistry and Microbiology Department. Southern Federal University. 344006, Rostov-on-Don, Bolshaya Sadovaya St., 105/42, Russia. E-mail: natmilut@rambler.ru.

Ananyan Anzhelika Arshakovna — PhD, Biochemistry and Microbiology Department. Southern Federal University. 344006, Rostov-on-Don, Bolshaya Sadovaya St., 105/42, Russia. E-mail: aaabio@mail.ru.

Plotnikov Andrey Aleksandrovich — post-graduate student, Biochemistry and Microbiology Department. Southern Federal University. 344006, Rostov-on-Don, Bolshaya Sadovaya St., 105/42, Russia. E-mail: plotnik0703@rambler.ru.

Zabrodin Mikhail Alekseevich — post-graduate student, Traumatology and Orthopaedic Surgery Department. Rostov State Medical University. 344007, Rostov-on-Don, Nakhichevanskiy pereulok, 29, Russia. E-mail: dr.zabrodin@rambler.ru.