

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# **Rolul polimorfismelor *ASPN* în apariția coxartrozei primare**

---

Doctorand **Claudiu ILEA**

---

Conducător de doctorat **Prof. Univ. Dr. Dan LUCACIU**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
**IULIU HAȚIEGANU**  
CLUJ-NAPOCA

Cluj-Napoca  
2015

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	13
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	15
<b>1. Etiopatogenia coxartrozei primare</b>	17
1.1. Introducere și scurt istoric	17
1.2. Clasificarea etiologică a coxartrozei	18
1.3. Etiologia coxartrozei primare	18
1.3.1. Vârsta și sex	19
1.3.2. Rasă-etnie	20
1.3.3. Factori metabolici și nutriționali	21
1.3.4. Factori endocrini	22
1.3.5. Factori vasculari	23
1.3.6. Factori mecanici	23
1.3.7. Densitatea minerală osoasă	24
1.3.8. Factori genetici	25
1.4. Patogenia coxartrozei primare	26
1.4.1. Teorii patogenetice	27
1.4.2. Anatomie patologică	29
1.4.2.1. Aspecte lezionale biomecanice	29
1.4.2.2. Aspecte macroscopice	29
1.4.2.3. Aspecte microscopice	30
<b>2. Rolul asporinei în coxartroza primară</b>	33
2.1. Genetica coxartrozei primare	33
2.2. Relatia între polimorfismele <i>ASPN</i> și coxartroza primară	36
2.2.1. Asporina – date generale	36
2.2.2. Asporina - structură și funcție	38
2.2.3. Rolul polimorfismelor <i>ASPN</i> în coxartroza primară	39
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	43
<b>1. Ipoteza de lucru și obiective</b>	45
<b>2. Metodologie generală</b>	47
2.1. Populația luată în studiu	47
2.2. Recoltarea probelor de ADN	48
2.3. Identificarea polimorfismelor mononucleotidice ale genei <i>ASPN</i>	48
2.4. Aprecierea deficitului funcțional al pacienților cu coxartroză	51
2.5. Aprecierea severității radiologice a pacienților cu coxartroză	53
2.6. Analiza statistică	53
<b>3. Studiul I. Identificarea polimorfismelor genei <i>ASPN</i> care predispun la apariția coxartrozei primare</b>	55
3.1. Introducere	55
3.2. Ipoteza de lucru	55
3.3. Material și metodă	56

3.4.	Rezultate	57
3.4.1.	Caracteristicile demografice și genetice ale populației studiate	57
3.4.2.	Corelații privind frecvența alelelor identificate în funcție de prezența coxartrozei	60
3.4.3.	Corelații între alelele mai frecvent întâlnite luate două câte două și prezența coxartrozei	66
3.5.	Discuții	70
3.6.	Concluzii	72
<b>4.</b>	<b>Studiul II. Corelarea polimorfismelor genei ASPN cu severitatea afectării funcționale la pacienții cu coxartroză primară</b>	<b>73</b>
4.1.	Introducere	73
4.2.	Ipoteza de lucru	74
4.3.	Material și metodă	74
4.4.	Rezultate	75
4.4.1.	Corelații între valorile scorului Harris modificat și frecvența alelelor ASPN	76
4.4.2.	Corelații între alelele mai frecvente luate două câte două și scorul funcțional Harris	79
4.4.3.	Corelații între prezența coxartrozei bilaterale și frecvența alelelor ASPN	81
4.4.4.	Corelații între alelele mai frecvente luate două câte două și prezența coxartrozei bilaterale	83
4.5.	Discuții	85
4.6.	Concluzii	87
<b>5.</b>	<b>Studiul III Corelarea polimorfismelor genei ASPN cu severitatea afectării radiologice la pacienții cu coxartroză primară</b>	<b>89</b>
5.1.	Introducere	89
5.2.	Ipoteza de lucru	90
5.3.	Material și metodă	90
5.4.	Rezultate	91
5.4.1.	Corelații între alelele mai frecvente vs celelalte alele combinate și stadiul radiologic Croft	93
5.4.2.	Corelații între alelele mai frecvent întâlnite luate două câte două și stadiul radiologic Croft	98
5.5.	Discuții	102
5.6.	Concluzii	103
<b>6.</b>	<b>Concluzii generale</b>	<b>105</b>
<b>7.</b>	<b>Originalitatea și contribuția inovatoare a tezei</b>	<b>107</b>
<b>8.</b>	<b>REFERINȚE</b>	<b>109</b>

**Cuvinte cheie:** coxartroză, determinism genetic, asporină, polimorfisme genetice

## INTRODUCERE

Artroza primară a șoldului (coxartroza primară) reprezintă o cauză majoră de durere și dizabilitate fizică la nivel mondial, generatoare de importante costuri economice și sociale în țările dezvoltate. În etiologia acestei afecțiuni complexe au fost incriminați numeroși factori de mediu (vârstă, sex, obezitate, ocupație), precum și factori genetici. Conceptele moderne privitoare la etiologia bolii artrozice studiază dezechilibrul între procesele anabolice și catabolice care au loc la nivelul cartilajului articular, cu afectarea balanței dintre producerea și degradarea componentelor matricei extracelulare cartilaginose ca răspuns la stresul mecanic și cu participarea mediatorilor inflamatori.

Studii de dată recentă arată că factorii genetici dețin un rol important în inițierea și progresia coxartrozei, dintre numeroasele gene candidate o atenție deosebită fiind acordată genelor aparținând familiei de proteine SLRP (**S**mall**L**eu**c**ine-**r**ich**R**epeat**P**roteo**g**lycans). Asporina (ASPN) este o proteină a matricei extracelulare cartilaginose din familia SLRP, care leagă TGF-beta (**T**rans**f**orming**G**rowth**F**actor**β**), un factor cheie cu rol major cunoscut în procesul de condrogeneză. Au fost descrise mai multe variante polimorfice (D8-D19) ale asporinei date de numărul de repetiții ale acidului aspartic aspartic (D) la capatul amino-terminal, cea mai frecventă fiind reprezentată de polimorfismul D13. Acestea au fost asociate cu boala artrozică cu diverse localizări. Alela D14 a fost găsită suprareprezentată la populația cu coxartroză și gonartroză din Japonia, în timp ce alela D13 s-a dovedit a conferi protecție față de boala artrozică. Cercetătorii japonezi au demonstrat și o asociere a prezenței alelei D14 cu severitatea bolii artrozice. Cercetări ulterioare au arătat o frecvență crescută a alelei D14 pentru pacienții de sex masculin cu coxartroză primară din Marea Britanie, dar polimorfismele genei ASPN nu au putut fi asociate cu etiologia coxartrozei pentru populația caucaziană din Spania. De dată mai recentă, polimorfismul D15 a fost asociat cu prezența gonartrozei la populațiile greacă și iraniană. Studiile pe populația chineză Han au găsit o asociere pozitivă a polimorfismelor D14 și D16 pentru spondilita anchilozantă, D13 având efect protectiv și o frecvență a D14 crescută semnificativ față de D13 pentru pacienții cu displazie de șold. O altă cercetare a evidențiat asocierea polimorfismului D14 cu discopatia lombară degenerativă în Asia.

Asadar, asocierea între asporină și boala artrozică pentru diferite grupuri populaționale prezintă rezultate contradictorii. În studiul nostru, am încercat să evaluăm asocierea acestor polimorfisme cu coxartroza primară pentru pacienții din România.

## CONTRIBUTIA PERSONALA

În această teză de doctorat, ne-am propus să studiem modul în care variante polimorfice mononucleotidice ale genei *ASPN* influențează apariția coxartrozei primare pe de o parte, precum și dacă severitatea bolii este influențată de către aceste polimorfisme, pe de altă parte. Teza cuprinde trei direcții de cercetare, materializate în trei studii și anume:

- identificarea polimorfismelor mononucleotidice ale genei *ASPN* care predispun la apariția coxartrozei primare pentru populația din România;
- asocierea polimorfismelor identificate cu severitatea deficitului funcțional al pacienților;
- corelarea polimorfismelor identificate cu severitatea radiologică a leziunilor pentru coxartroză.

Obiectivele principale ale tezei de doctorat au fost:

1. Identificarea polimorfismelor mononucleotidice ale genei *ASPN* la un lot de 100 de subiecți, 50 dintre acestia cu coxartroză primară în stadiu avansat, propuși pentru artroplastie de șold și 50 de subiecți martor, fără istoric de coxartroză.
2. Corelarea polimorfismelor identificate la nivelul celor două grupuri studiate și identificarea variantelor polimorfice ale genei *ASPN* care predispun la coxartroză.
3. Corelarea polimorfismelor identificate cu severitatea bolii, apreciată printr-un scor radiologic și un scor funcțional.

### **Studiul I. Identificarea polimorfismelor genei *ASPN* care predispun la apariția coxartrozei primare**

**Ipoteza de lucru.** S-a determinat frecvența alelelor pentru *ASPN* la un lot de 50 de pacienți cu coxartroză primară, cu simptomatologie suficient de avansată încât să fie propuși pentru artroplastie de șold comparativ cu un lot egal de subiecți martor, fără coxartroză, cu caracteristici demografice similare. Ca obiective asociate, s-a urmărit stabilirea de corelații între rolurile jucate de fiecare dintre aceste alele în raport cu celelalte în apariția coxartrozei primare.

**Material și metodă.** Populația inclusă în studiu a cuprins un lot de 50 de pacienți cu coxartroză primară (27 de femei și 23 de bărbați), cu vârsta cuprinsă între 50 și 74 de ani, care au fost internați în Clinica de Ortopedie Cluj-Napoca în vederea

artroplastiei de șold și un număr egal de subiecți martor, cu aceleași caracteristici demografice. Toți subiecții incluși în studiu au fost de naționalitate română și au provenit din aceeași zonă geografică a țării - Transilvania.

Recoltarea probelor pentru toți subiecții studiați s-a efectuat de la nivelul mucoasei bucale. Pentru purificarea ADN genomic total (ADNg) a fost utilizat kitul de purificare *Animal and Fungi DNA purification kit* (Jena Bioscience) cu respectarea tuturor instrucțiunilor producătorului. Concentrația și puritatea probelor de ADN au fost determinate utilizând metoda spectrofotometrică. Prin PCR a fost amplificat un fragment din gena *ASPN* ce conține regiunea de interes, utilizând amorsele Fw1 și Rw1.

Prođușii PCR au fost analizați cu ajutorul electroforezei în gel de agaroză. Fragmentele ADN de interes (300 pb) au fost excizate din gel și purificate cu ajutorul unui kit de purificare a produșilor PCR din gel (*Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit*). Produșii PCR au fost secvențializați prin metoda Sanger, utilizând amorsa Fw1. Secvențele obținute au fost analizate cu programul *Bio Edit* iar polimorfismele au fost determinate manual.

Datele calitative s-au prezentat prin număr și procente. Asocierea între date de tip calitativ s-a făcut prin testul  $\chi$  pătrat sau testul Fisher exact. S-a testat asocierea între creșterea valorilor pentru genotip și creșterea valorilor pentru prezența coxartrozei folosind testul Chi pătrat de trend, cu  $p$  calculat prin simulare Monte Carlo. Pentru toate testele folosite s-a utilizat nivelul de semnificație statistică de 0,05.

**Rezultate/discuții.** Asemănător cu datele obținute în studiile efectuate pe populațiile din Japonia, Spania și Marea Britanie, pentru subiecții noștri alela D13 a fost găsită cu frecvența cea mai mare atât la pacienții cu coxartroză (42%), cât și în lotul fără coxartroză (52%), fiind urmată de alela D15 (24 % în lotul de pacienți și 18% în lotul de control) și apoi de alela D14 (19% în lotul de pacienți și 17% în lotul de control). În studiul nostru, am identificat ca foarte semnificativă statistic asocierea între prezența alelelor *ASPN* și coxartroza primară *versus* control ( $p=0,007$ ) pentru subiecții de sex masculin. Acest fapt sugerează că polimorfismele D repetitive ale asporinei ar avea un rol important în apariția coxartrozei primare pentru bărbații din România. Totodată, am găsit o asociere semnificativă pentru frecvența crescută a alelei D13 (cunoscută ca alelă protectivă față de boala artrozică) la bărbații din lotul de control ( $p=0,02$ ), în timp ce alela D14 a fost găsită cu o frecvență foarte semnificativ crescută la bărbații cu coxartroză ( $p=0,005$ ), fapt care pare să confirme și pentru populația de sex masculin din România rezultatele raportate de studiul pe populația cu coxartroză din Marea Britanie. Alela D14 a fost găsită semnificativ mai frecventă la femeile din lotul de control ( $p=0,02$ ) comparativ cu femeile cu coxartroză, sugerând faptul că această alelă ar putea conferi protecție față de apariția coxartrozei pentru femeile din România.

La comparațiile efectuate între frecvența alelelor D14 vs D 13, D15 vs D13 și D14 vs D15 nu s-au înregistrat rezultate semnificative între lotul de pacienți și lotul de

control înainte de stratificare. După stratificarea în funcție de sex a subiecților, s-a obținut  $p=0,003$  pentru subiecții de sex masculin în favoarea alelei D14 față de alela D13 și  $p=0,05$  pentru subiecții de sex feminin în favoarea alelelor D13 și D15 față de alela D14. Aceste rezultate demonstrează că alela D14 este asociată cu un risc crescut de a dezvolta coxartroză pentru bărbații din România comparativ cu alela D13, în timp ce pentru femeile din România această alelă este asociată cu un risc mai mic de a dezvolta coxartroză, în comparație cu alelele D13 și D15.

**Concluzii.** Datele obținute pentru populația noastră sugerează asocierea coxartrozei primare cu polimorfismele D repetitive ale ASPN. Frecvența crescută a alelei D14 la subiecții de sex masculin crește riscul apariției coxartrozei primare, în timp ce pentru femeile din România această alelă pare să ofere un grad de protecție față de apariția coxartrozei. Alela D13 a fost asociată cu risc scăzut de a dezvolta coxartroză primară pentru bărbații din România. Bărbații care au alela D14 prezintă un risc crescut de a face coxartroză comparativ cu cei care au alela D13, în timp ce la femeile din România alela D14 este asociată cu un risc redus de a dezvolta coxartroză, comparativ cu alelele D13 și D15.

## **Studiul II. Corelarea polimorfismelor genei ASPN cu severitatea funcțională la pacienții cu coxartroză primară**

**Ipoteza de lucru.** Obiectivul studiului de față a constat în identificarea posibilelor asocieri între frecvența polimorfismelor genei ASPN și severitatea deficitului funcțional la pacienți cu coxartroză primară din România. Pentru lotul de pacienți cu coxartroză s-au corelat polimorfismele genei ASPN identificate în studiul I cu severitatea deficitului funcțional al acestora, apreciată pe baza prezenței coxartrozei la ambele șolduri la o parte din pacienți și pe baza scorului de afectare funcțională Harris modificat calculat pentru fiecare pacient.

**Material și metodă.** Fiecare pacient cu coxartroză supus studiului a completat un chestionar standard privind severitatea afectării funcționale dată de coxartroză. Pentru fiecare pacient a fost calculat scorul Harris modificat, obținut prin sumarea cotațiilor individuale pentru durere, funcție și mobilitate, în urma analizării chestionarului completat.

S-au corelat medianele scorului Harris calculat pentru fiecare pacient cu frecvența polimorfismelor genei ASPN identificate și prezentate în studiul I. Pentru alelele mai frecvent întâlnite s-au efectuat și comparații între ele, luate două câte două, privind severitatea funcțională a coxartrozei. Toate corelațiile s-au făcut și cu localizarea bolii artrozice la unul sau la ambele șolduri pentru pacienții cu coxartroză primară studiați. Aceste asocieri au fost făcute pentru întreg lotul de pacienți atât nestratificat, cât și după stratificare în funcție de sexul acestora.

**Rezultate/discuții.** Corelațiile între alelele cele mai frecvent întâlnite în populația noastră și scorul funcțional Harris nu evidențiază asocieri statistic semnificative între frecvența alelelor D13 și D14 și severitatea coxartrozei, nici fără stratificare și nici după stratificare pe sexe.

Totuși, am reușit să evidențiem o asociere cu semnificație statistică pentru frecvența alelei D15 cu scorul funcțional Harris modificat, pentru pacienții de sex masculin. Creșterea frecvenței alelei D15 a fost corelată semnificativ cu valori crescute pentru scorul Harris modificat, sugerând posibilitatea ca alela respectivă să confere bărbaților cu coxartroză primară din România un deficit funcțional mai puțin sever ( $p=0,03$ ). Analiza frecvenței alelei D13 vs alela D15 în funcție de scorul Harris modificat a scos în evidență din nou o asociere semnificativă pentru bărbații din România. Creșterea frecvenței alelei D15 se asociază cu creșterea valorilor diferenței medianelor scorului funcțional Harris, deci cu un deficit funcțional mai puțin sever la pacienții ce au alela D15, față de pacienții care au alela D13 ( $p=0,03$ ).

Legat de prezența coxartrozei la ambele șolduri pentru lotul de pacienți studiat, nu am găsit asocieri cu semnificație statistică între frecvența alelelor D13 și D15 cu coxartroza bilaterală, nici fără stratificare și nici după stratificare în funcție de sexul pacienților. Pentru alela D14 s-a evidențiat o corelație semnificativă statistic cu coxartroza bilaterală în lotul de pacienți nestratificat ( $p=0,04$ ).

**Concluzii.** Pentru populația noastră, prezența alelei D14 la pacienții cu coxartroză primară a fost asociată cu un deficit funcțional mai accentuat comparativ cu pacienții care nu au această alelă. Severitatea funcțională crescută pentru acești pacienți s-a datorat în principal localizării la ambele șolduri a bolii artrozice.

Alela D15 a fost asociată pentru populația noastră cu un scor Harris mai ridicat și prin urmare cu un deficit funcțional mai puțin sever.

### **Studiul III. Corelarea polimorfismelor genei *ASPN* cu severitatea afectării radiologice la pacienții cu coxartroză primară**

**Ipoteza de lucru.** Obiectivul studiului de a constata în identificarea alelelor genei *ASPN*, la pacienți cu coxartroză primară din România, care sunt asociate cu o severitate crescută a leziunilor radiologice.

**Material și metodă.** Populația luată în studiu a fost reprezentată de lotul de 50 de pacienți cu coxartroză primară simptomatică, internați în Clinica de Ortopedie Cluj-Napoca în vederea intervenției chirurgicale pentru artroplastie de șold.



S-au utilizat rezultatele obținute în studiul I privind alelele ASPN identificate și frecvența acestora la lotul de pacienți studiat. Aprecierea severității leziunilor radiologice a fost făcută folosind clasificarea radiologică Croft.

S-a urmărit corelarea asocierii alelelor ASPN întâlnite cu stadiul radiologic Croft calculat pentru pacienții cu coxartroză. Ulterior, s-au efectuat comparații pentru alelele mai frecvent întâlnite, luate două câte două și stadiul radiologic Croft. Aceste asocieri au fost făcute atât nestratificat, cât și după stratificare în funcție de sex a pacienților.

**Rezultate/discuții.** În cadrul lotului de pacienți cu coxartroză, am caracterizat severitatea bolii în funcție de alelele pe care pacienții le au, efectuând asocieri ale acestora cu stadiul radiologic Croft. Toți pacienții studiați au prezentat modificări radiografice care au fost încadrate în stadiile III, IV și V Croft, cu o pondere mai mare pentru stadiul IV - 25 de pacienți (50%) și stadiul V - 20 pacienți (40%).

În lotul de pacienți cu coxartroză primară studiat a fost găsită o asociere semnificativă a creșterii frecvenței alelei D13 cu scăderea severității leziunilor radiologice înainte de stratificare ( $p=0,02$ ), asociere regăsită la pacienții de sex feminin ( $p=0,02$ ) după stratificare în funcție de sex. Acest fapt sugerează că alela D13 ar putea fi o alelă protectivă față de formele de coxartroză cu severitate radiologică crescută, în special pentru pacienții de sex feminin cu coxartroză primară din România.

Asocierea alelei D14 cu creșterea severității radiologice la pacienții cu coxartroză a fost foarte semnificativă ( $p<0,001$ ) înainte de stratificare, cu  $p=0,01$  la pacienții de sex masculin și  $p=0,03$  la pacienții de sex feminin, după stratificare în funcție de sex a lotului de pacienți. Aceasta sugerează că frecvența crescută a alelei D14 este asociată cu severitatea radiologică accentuată pentru pacienții cu coxartroză primară din România. Asocierea a fost mai pronunțată pentru pacienții de sex masculin decât pentru pacienții de sex feminin.

Nu au fost identificate diferențe semnificative, înainte și după stratificare (în funcție de sex) a lotului de pacienți cu coxartroză, atunci când s-a analizat asocierea severității leziunilor radiologice cu frecvența alelei D15.

Corelarea alelelor cel mai frecvent întâlnite cu severitatea crescută a scorului radiologic pentru lotul de pacienți, a relevat diferențe foarte semnificative în asocierea frecvenței crescute a alelei D14 față de alela D13 ( $p<0,001$ ) pentru toți pacienții, cu valori mai mari pentru femei ( $p=0,003$ ) decât pentru bărbați ( $p=0,04$ ). Astfel, se pare că alela D14, în comparație cu alela D13, este responsabilă de apariția coxartrozei cu fenotip radiologic mai sever, în special la pacienții de sex feminin din România.

Nu s-au înregistrat diferențe semnificative, privind severitatea radiologică a leziunilor pentru coxartroză în grupul de pacienți, atunci când s-a comparat frecvența alelei D15 vs alela D13 cu stadiul radiologic Croft.

Corelarea frecvenței alelei D14 vs alela D15 cu stadiul radiologic pentru pacienții studiați a evidențiat o asociere foarte semnificativă a frecvenței crescute a alelei D14 vs alela D15 cu severitatea radiologică crescută a coxartrozei ( $p < 0,001$ ), tendință regăsită și după stratificare în funcție de sex la pacienții de sex masculin ( $p = 0,008$ ), dar cu semnificație mai scăzută la pacienții de sex feminin ( $p = 0,01$ ). Astfel, se pare că alela D14 este responsabilă de un fenotip artrozic mai sever în comparație cu alela D15 la pacienții cu coxartroză primară de sex masculin din România și într-o măsură mai mică la pacienții de sex feminin.

**Concluzii.** Datele obținute pentru populația noastră sugerează asocierea fenotipului radiologic mai sever pentru coxartroza primară cu alela D14 atât pentru pacienții de sex masculin, cât și pentru pacienții de sex feminin din România, cu valori mai mari ale asocierii pentru pacienții bărbați. Alela D13 a fost asociată cu modificări radiologice mai puțin severe la pacienții de sex feminin cu coxartroză primară din România, fiind considerată alelă protectivă față de formele de coxartroză cu severitate radiologică crescută la acești pacienți.

## Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

**Trebuie subliniat că este pentru prima dată în România când se face un astfel de studiu interdisciplinar cu privire la implicațiile polimorfismelor genetice în apariția coxartrozei primare.**

Datele obținute sunt absolut originale, au fost realizate în întregime în România și au fost valorificate prin două lucrări științifice publicate în revista *Medical Connections/Conexiuni Medicale* (revistă indexată în Bazele Internaționale de Date: BID).

Recoltarea probelor de ADN a fost făcută din celule ale mucoasei bucale și nu din sânge periferic, disconfortul pacienților dat de această manoperă fiind minim și complianța acestora crescută. În studiile efectuate până în prezent de cercetători străini citați în această teză s-a folosit sânge periferic. Noi am demonstrat că în celulele din mucoasa bucală, recoltate printr-o procedură simplă și netraumatizantă, este suficient ADN și de foarte bună calitate.

Corelarea polimorfismelor *ASPN* s-a făcut atât cu prezența coxartrozei primare, cât și cu severitatea radiologică și funcțională a acestei boli, obținându-se rezultate cu semnificație statistică. Datele obținute de noi pot fi foarte importante, în abordarea clinică viitoare a strategiilor de prevenție și terapie, pentru pacienții cu coxartroză primară.

---

SUMMARY OF THE PhD THESIS

# ***ASPN* polymorphisms role in the development of primary hip osteoarthritis**

---

PhD Student **Claudiu ILEA**

---

PhD Advisor **Prof. Dr. Dan LUCACIU**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

Cluj-Napoca  
2015

## TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	13
<b>THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	15
<b>1. Etiopathogeny of primary hip osteoarthritis</b>	17
1.1. Introduction and brief history	17
1.2. Etiological classification of hip osteoarthritis	18
1.3. The etiology of primary hip osteoarthritis	18
1.3.1. Age and sex	19
1.3.2. Race - ethnicity	20
1.3.3. Nutritional and metabolic factors	21
1.3.4. Endocrine factors	22
1.3.5. Vascular factors	23
1.3.6. Mechanical factors	23
1.3.7. Bone mineral density	24
1.3.8. Genetic factors	25
1.4. The pathogenesis of primary hip osteoarthritis	26
1.4.1. Pathogenetic theories	27
1.4.2. Pathological anatomy	29
1.4.2.1. Biomechanical aspects of lesions	29
1.4.2.2. Physical appearance	29
1.4.2.3. Microscopic appearance	30
<b>2. Asporin role in primary osteoarthritis</b>	33
2.1. Genetics of primary hip osteoarthritis	33
2.2. The relationship between ASPN polymorphisms and primary hip osteoarthritis	36
2.2.1. Asporin - general data	36
2.2.2. Asporin - structure and function	38
2.2.3. The role of ASPN polymorphisms in primary hip osteoarthritis	39
<b>PERSONAL CONTRIBUTIONS</b>	43
<b>1. Hypothesis and objectives</b>	45
<b>2. General methodology</b>	47
2.1. Studied population	47
2.2. DNA sampling	48
2.3. Identification of the ASPN gene nucleotide polymorphisms	48
2.4. Assessment of functional deficit in patients with hip osteoarthritis	51
2.5. Radiological severity assessment in patients with hip osteoarthritis	53
2.6. Statistical analysis	53
<b>3. Study I. Identification of ASPN gene polymorphisms that predispose to the occurrence of primary hip osteoarthritis</b>	55
3.1. Introduction	55
3.2. Hypothesis	55

3.3.	Material and method	56
3.4.	Results	57
3.4.1.	Demographic and genetic characteristics of the studied population	57
3.4.2.	Frequency of identified alleles correlations and the presence of hip osteoarthritis	60
3.4.3.	Most frequent pairwise alleles correlations and the presence of hip osteoarthritis	66
3.5.	Discussions	70
3.6.	Conclusion	72
<b>4.</b>	<b>Study II. Linking ASPN gene polymorphisms with the severity of functional impairment in patients with primary osteoarthritis</b>	<b>73</b>
4.1.	Introduction	73
4.2.	Hypothesis	74
4.3.	Material and method	74
4.4.	Results	75
4.4.1.	Correlation between ASPN allele frequency and modified Harris hip score	76
4.4.2.	Correlations between most common pairwise alleles and Harris functional score	79
4.4.3.	Correlations between ASPN alleles frequency and bilateral hip osteoarthritis	81
4.4.4.	Correlations between most common pairwise alleles and the presence of bilateral hip osteoarthritis	83
4.5.	Discussions	85
4.6.	Conclusion	87
<b>5.</b>	<b>Study III. ASPN gene polymorphisms correlation with the radiological severity damage in patients with primary hip osteoarthritis</b>	<b>89</b>
5.1.	Introduction	89
5.2.	Hypothesis	90
5.3.	Material and method	90
5.4.	Results	91
5.4.1.	Correlations between most frequently alleles vs other combined alleles and Croft radiological stage	93
5.4.2.	Correlations between most common pairwise alleles and Croft radiological stage	98
5.5.	Discussions	102
5.6.	Conclusion	103
<b>6.</b>	<b>General conclusions</b>	<b>105</b>
<b>7.</b>	<b>The originality and innovative contribution of the thesis</b>	<b>107</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCES</b>	<b>109</b>

**Keywords:** hip osteoarthritis, genetic determinism, asporin, genetic polymorphisms

## INTROUCTION

Primary osteoarthritis of the hip (hip osteoarthritis) is a major cause of pain and physical disability worldwide, generating significant economical and social costs in developed countries. Numerous environmental factors (age, sex, obesity, occupation) and genetic factors have been involved in the complex etiology of this disease. Modern concepts related to the etiology of osteoarthritis targets the imbalance between the anabolic and catabolic processes occurring in the articular cartilage, affecting the balance between production and degradation of cartilage matrix components, in response to mechanical stress and with the participation of inflammatory mediators. Recent studies have shown that genetic factors have an important role in the initiation and progression of hip osteoarthritis, among many candidate genes a particular attention is being paid to the family of protein genes belonging SLRP (*Small Leucine-rich Repeat Proteoglycans*). Asporin (ASPN) is an extracellular cartilaginous matrix protein belonging to SLRP family binding TGF-beta (*Transforming Growth Factor beta*), a key factor with major role in chondrogenesis. Several polymorphic variants (D8-D19) of ASPN, due to aspartic acid (D)-repeats, have been described. This repetitive polymorphism is located at the 5' end of the gene, respectively in the N-terminus end of the protein, 13 repetitions allele (D13) being the most frequent allele found in populations. These polymorphisms have been associated with osteoarthritis at various sites. D14 allele was over-represented in the population with hip and knee osteoarthritis in Japan, while the D13 allele proved to confer protection against osteoarthritis. The Japanese study also reported a D14 allele association with the severity of osteoarthritis. Subsequent research showed an increased frequency of D14 allele for UK male patients with primary hip osteoarthritis, but ASPN gene polymorphisms were not associated with the etiology of hip osteoarthritis for the Caucasian population in Spain. More recent, D15 polymorphism was associated with the presence of knee osteoarthritis in Greek and Iranian populations. Studies on Han Chinese population have found a positive association between D14 and D16 polymorphisms and ankylosing spondylitis, D13 having a protective effect and D14 polymorphism frequency significantly increased compared with D13 for patients with hip dysplasia. Another study revealed an association between D14 polymorphism and lumbar-disc degeneration in Asia.

Thus, the association between asporin and osteoarthritis for different populations show conflicting results. In our study, we tried to evaluate the association of asporin polymorphisms with primary hip osteoarthritis in Romanian patients.

## PERSONAL CONTRIBUTION

In this thesis, we plan to study how the *ASPN* gene single nucleotide polymorphic variants influencing the onset of primary hip osteoarthritis, and whether the severity of the disease is influenced by these polymorphisms. The thesis includes three lines of research, resulted in three studies:

- identification of *ASPN* gene nucleotide polymorphisms that predispose to the occurrence of primary hip osteoarthritis in romanian population;
- association between identified polymorphisms and the severity of patients functional deficit;
- correlation of identified *ASPN* polymorphisms with the severity of radiological lesions in hip osteoarthritis.

The main objectives of this thesis were:

1. Identification of *ASPN* gene polymorphisms in a group of 100 subjects, 50 of them with advanced primary hip osteoarthritis, proposed for hip arthroplasty and 50 control subjects, without history of hip osteoarthritis.
2. Correlation of identified polymorphisms in the two studied groups and identify *ASPN* polymorphic gene variants that predispose to hip osteoarthritis.
3. Correlation of identified *ASNP* polymorphisms with disease severity, assessed by a radiological and functional score.

### **Study I. Identification of *ASPN* gene polymorphisms that predispose to the occurrence primary hip osteoarthritis**

**Hypothesis.** *ASPN* allele frequency was determined for a group of 50 patients with primary hip osteoarthritis, symptomatic sufficiently advanced that hip arthroplasty was proposed, compared with an equally control group of subjects, without hip osteoarthritis, with similar demographic characteristics. The associated intended objectives was establishing correlations between the roles played by each of these alleles compared to others in primary hip osteoarthritis development.

**Material and method.** Study population group consisted of 50 patients with primary hip osteoarthritis (27 women and 23 men), aged between 50 and 74 years, who were admitted to the Orthopaedic Clinic of Cluj-Napoca in order to

performe hip arthroplasty and an equal number of control subjects, with the same demographic characteristics. All subjects in the study were of Romanian nationality and were from the same geographical area of the country - Transylvania.

Sampling was carried out by buccal cytobrush and mouthwash. *Animal and Fungi DNA purification kit* (Jena Bioscience) was used to purify the genomic DNA (gDNA). DNA concentration and purity of samples were determined using the spectrophotometric method. Gene fragment containing the *ASPN* interest region was amplified by PCR, using Fw1 and Rw1 primers.

PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. The target PCR products (300 bp) were excised from the gel and purified using a PCR purification kit (*Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit*). PCR products were sequenced by Sanger method using Fw1 primer. The samples were sequenced by sequencing service provider (Macrogen). The sequences were analyzed with *BioEdit* program and the polymorphisms were determined manually.

Qualitative data were presented by numbers and percentages. The association between qualitative data was done by  $\chi$  square test or Fisher exact test. The association between genotype and the presence of increased levels of hip osteoarthritis was tested using Chi square test for trend, with  $p$  calculated by Monte Carlo simulation. For all tests we used statistical significance level of 0.05.

**Results/discussion.** Similar to data obtained from studies carried out on Japan, Spain and the UK populations, for our subjects D13 allele was found with the highest frequency both in patients with hip osteoarthritis (42%) and in the group without hip osteoarthritis (52%), followed by the D15 allele (24% in the group of patients and 18% in controls) and then the D14 allele (19% in the group of patients and 17% in controls). In our study we identified as significant statistically the association between the presence of *ASPN* alleles and primary hip osteoarthritis versus control ( $p=0.007$ ) for male subjects. This suggests that D-repeate asporine polymorphisms would have an important role in the development of primary hip osteoarthritis for Romanian male. However, we found a significant association between the D13 allele frequency (known as protective allele against osteoarthritis) in the male control group ( $p=0.02$ ), while the D14 allele frequency was found highly significant increased in male with hip osteoarthritis ( $p=0.005$ ), which seems to confirm the results of the UK study for the male Romanian population. D14 allele was found significantly more often in women control group ( $p=0.02$ ) compared to women with hip osteoarthritis, suggesting that this allele might confer protection for hip osteoarthritis appearance in Romanian women.

When comparing D14 vs D13, D15 vs D13 and D14 vs D15 allele frequency, there were no statistically significant results between the group of patients and control group, before stratification. After stratification, we observed an increased frequency of D14 vs D13 allele to men with hip osteoarthritis ( $p=0.003$ ) and low D14 frequency to D13 and D15 alleles for women with hip osteoarthritis ( $p=0.05$ ). These results



demonstrate that D14 allele is associated with an increased risk of developing hip osteoarthritis for Romanian male compared with D13 allele, while for Romanian women this allele is associated with a lower risk of developing hip osteoarthritis, compared with alleles D13 and D15.

**Conclusions.** The obtained data for our population suggests association between primary hip osteoarthritis with D-repeat *ASPN* polymorphism. Increased frequency of D14 allele in male subjects determine a higher risk for primary hip osteoarthritis, while this allele seems to offer protection against the occurrence of hip osteoarthritis in Romanian women. D13 allele was associated with decreased risk of developing primary hip osteoarthritis in Romanian male. Expression of D14 allele in male determine an increased risk to hip osteoarthritis compared with D13, while D14 allele in Romanian women is associated with a reduced risk of hip osteoarthritis, compared with D13 and D15 alleles.

## **Study II. Linking *ASPN* gene polymorphisms with functional severity in patients with primary hip osteoarthritis**

**Hypothesis.** The objective of this study was to identify possible associations between *ASPN* gene polymorphisms frequency with the severity of functional deficit, in Romanian patients with primary hip osteoarthritis. For the studied group, *ASPN* gene polymorphisms identified in the study I were correlated with severity of functional deficit, assessed by the presence of bilateral hip osteoarthritis in some patients and modified Harris hip score calculated for each patient.

**Material and method.** Each patient with hip osteoarthritis completed a standard questionnaire concerning the severity of functional impairment. For each patient, modified Harris hip score was calculated by adding the individual quotations for pain, function and mobility, after analyzing the completed questionnaire.

Median Harris hip calculated score was correlated for each patient with the frequency of *ASPN* gene polymorphisms, identified and presented in the study I. Comparisons between most frequent pairwise alleles and functional severity of hip osteoarthritis were conducted. All correlations were made for the location of hip osteoarthritis in one or both hips. These associations were made for the entire group of patients, before and after stratification according to gender.

**Results/discussion.** Correlations between alleles most frequent in our population and Harris modified score does not show statistically significant associations, between D13 and D14 allele frequency and severity of hip osteoarthritis, before or after stratification according to gender.

However, we demonstrated a statistically significant association between D15 allele frequency and Harris modified score in male patients. D15 allele increasing frequency was significantly correlated with elevated values of modified Harris hip score, suggesting the possibility that D15 is conferring a less severe functional impairment for Romanian male population with primary hip osteoarthritis ( $p=0.03$ ). The analysis of D13 vs D15 allele frequency, according to the modified Harris hip score, revealed a significant association for Romanian male. Increased D15 allele frequency is associated with an elevated medians difference of Harris modified score, so with a less severe functional impairment in D15 patients compared to D13 ( $p=0.03$ ).

Regarding the presence of bilataeral osteoarthritis in study group, we didn't found significant statistically association between the frequency of D13 and D15 alleles, before and after stratification according by gender. For D14 allele, a statistically significant correlation with bilateral hip osteoarthritis was demonstrated for patient group, without stratification ( $p=0.04$ ).

**Conclusions.** For our study population, presence of D14 allele in patients with primary hip osteoarthritis was associated with a more pronounced functional impairment, compared to patients who do not have this allele. Increased functional severity in these patients was mainly due to localization of osteoarthritis in both hips.

D15 allele was associated with a higher Harris hip score and therefore a less severe functional impairment.

### **Study III. Linking ASPN gene polymorphisms with the severity of radiographic damage in patients with primary hip osteoarthritis**

**Hypothesis.** The objective of this study was to identify *ASPN* gene alleles, in Romanian patients with primary hip osteoarthritis, that are associated with an increased severity of radiological lesions.

**Material and method.** Study population group consisted of 50 patients with symptomatic primary hip osteoarthritis, hospitalized in Cluj-Napoca Orthopedics Clinic in order for hip arthroplasty surgery. The results regarding *ASPN* identified alleles obtained in study I were used. Radiological severity lesion was performed using Croft scale.

Correlation between *ASPN* identified alleles and Croft radiological calculated score, for patients with osteoarthritis, was performed. Subsequently, comparisons between the most frequent pairwise alleles and radiological stage Croft were determined. These associations were made before and after stratification according to gender.

**Results/discussion.** In the patients group, we characterized disease severity depending on the identified alleles, making association with Croft radiological stage. All study patients had radiographic changes that were classified in III, IV, and V Croft stages, with a higher percent for stage IV - 25 patients (50 %) and stage V - 20 patients (40 %).

In primary hip osteoarthritis study group, we found a significant association of increased D13 allele frequency with decreasing radiological severity ( $p=0.02$ ) before layering, association found in female patients ( $p=0.02$ ) after gender stratification. This fact suggests that D13 allele could be a protective allele against increased severity radiological forms, especially for Romanian female patients.

D14 allele association with increasing severity of radiological hip osteoarthritis is highly significant before stratification ( $p<0.001$ ), with  $p=0.01$  for male patients and  $p=0.03$  for female patients, after stratification. This suggests that the increased frequency of D14 allele is associated with increased severity of radiographic primary hip osteoarthritis, for Romanian patients. The association was stronger for male patients than female patients.

There were no significant differences, before and after stratification (by gender), for D15 allele frequency in association with radiological severity of hip osteoarthritis.

Linking most commonly encountered alleles with increased radiological score revealed significant differences between D14 high frequency association towards D13 allele ( $p<0.001$ ) for all patients, with higher values for female patients ( $p=0.003$ ) than male patients ( $p=0.04$ ). It seems that D14 allele, in comparison with D13 allele, is responsible for more severe radiological phenotype, particularly in female Romanian patients.

There were no significant differences regarding the severity of radiological injuries in patient group, when D15 vs D13 allele frequency was compared with Croft radiological stage.

Linking D14 vs D15 allele frequency with radiological stage showed a very significant association of D14 vs D15 allele increased frequency, with higher radiological severity of hip osteoarthritis ( $p<0.001$ ). The same trend was recovered after stratification according to gender for male patients ( $p=0.008$ ), but not for female patients ( $p=0.01$ ). It seemed that D14 allele is responsible for more severe arthritic phenotype, compared with D15 allele, in Romanian male patients with primary hip osteoarthritis and in a less extent in female patients.

**Conclusions.** The data for our study population suggests more severe radiological phenotype association for D14 allele for both male and female patients, with higher values for male patients. D13 allele was associated with less severe radiological changes in Romanian female patients with primary hip osteoarthritis, being considered a protective allele against severe radiological forms of hip osteoarthritis in these patients.

---

## **The originality and innovative contributions of the thesis**

**This is the first interdisciplinary study performed in Romania, regarding the implications of the genetic polymorphisms in primary hip osteoarthritis.**

Data are absolutely original, it were obtained entirely in Romania and were valued by two scientific papers published in *Medical Connections Journal* (indexed in International Data Base: IDB).

DNA sampling was carried out by buccal cytobrush and mouthwash, not from peripheral blood, patient discomfort beeing minimal with an increased compliance. In all others studies, conducted so far by foreign researchers cited in this thesis, peripheral blood was used. We have shown that buccal cells, obtained through a simple and non-traumatic procedure, there is sufficient and high quality DNA.

*ASPN* polymorphisms correlation was made with the presence of primary hip osteoarthritis and also with radiological and functional severity of the disease, obtaining statistically significant results. Our data can be very important, in future clinical prevention strategies and therapies, for patients with primary hip osteoarthritis.