

УДК 616-001.7+577.218

ББК 54.582.85+28.04

Пушкарев В. П., Дятлов Д. А., Чмутов А. М.,  
Деданов К. А., Пушкарева Ю. Э., Астапенков Д. С.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ МЕЖДУ ВАРИАЦИЕЙ RS679620 MMP3 ГЕНА И РАЗРЫВОМ ПЕРЕДНЕЙ КРЕСТООБРАЗНОЙ СВЯЗКИ СРЕДИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ЕВРОПЕОИДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ УРАЛЬСКОГО РЕГИОНА РОССИИ

Разрыв передней крестообразной связки (ПКС) коленного сустава является тяжелым, многофакторным заболеванием. Целью исследования была оценка влияния вариации rs679620 MMP3 гена на риск возникновения разрыва ПКС в европеоидной популяции Уральского региона России. Было обследовано 55 пациентов с разрывом ПКС и 298 человек контрольной группы. Обе группы не отличались по полу, возрасту, росту, массе и индексу массы тела. Генотипические частоты в контрольной группе находились в равновесии Харди-Вайнберга (РХВ). В группе с разрывом ПКС выявлено отклонение от РХВ ( $P = 0,014$ ), связанное с недостатком гетерозиготных носителей. Критерий согласия не выявил существенного отличия генотипических частот между 2 группами ( $P = 0,098$ ).

**Ключевые слова:** генетический анализ, разрыв передней крестообразной связки, равновесие Харди-Вайнберга.

Коленный сустав, в связи с анатомическими и биомеханическими особенностями, является одним из важнейших и в то же время наиболее уязвимым суставом в человеческом организме. Чаще всего встречаются разрывы передней крестообразной связки (ПКС), которые, по результатам исследований ряда авторов, в большинстве случаев приводят к развитию нестабильности коленного сустава [1]. В среднем за год в общей популяции приходится 30-35 случаев разрыва ПКС на 100 000 человек [5; 6]. Разрыв ПКС является одной из самых частых травм в спорте - 2,6 % от общего количества [3]. Самыми травмоопасными видами спорта по отношению к разрыву ПКС являются гимнастика, футбол, горные лыжи, сноуборд, борьба, хоккей с шайбой, волейбол и др. [3].

Разрыв ПКС является сложным расстройством с несколькими внутренними и внешними факторами риска (включая наследственные). В 2005 году R.K. Flynn at all. установили, что у пациентов с разрывом ПКС отмечается в 2 раза более высокая вероятность развития этой патологии среди родственников первой линии родства по сравнению с теми, у кого нет разрыва ПКС [4].

Матричные металлопротеиназы (ММП) являются главными физиологическими медиаторами деградации и ремоделирования

внеклеточного матрикса (ВМ). Семейство ММП включает 25 родственных цинк-содержащих ферментов, способных разрушать компоненты ВМ. Несколько генов ММП, включая MMP1, MMP3, MMP10 и MMP12, были картированы у человека на хромосоме 11q22.3. Варианты генетической последовательности внутри этого участка ДНК были ассоциированы с несколькими комплексными фенотипами, такими как: ревматоидный артрит, остеоартрит, дегенерация межпозвоночных дисков, идиопатический сколиоз и др. [9]. Три сцепленных полиморфизмов MMP3 гена были связаны с риском хронической ахиллесовой тендинопатии у европеоидов ЮАР [8]. Один из этих полиморфизмов, rs679620 (G→A), приводящий к замене глутамата на лизин в положении 45 аминокислотной последовательности про-MMP3, в составе 4 вариантного гаплотипа с вариациями в MMP1, MMP10 и MMP12 генах, был связан с риском разрыва ПКС у европеоидов ЮАР [7].

Целью нашего исследования было оценить возможное влияние вариации rs679620 MMP3 гена на риск разрыва ПКС в европеоидной популяции Уральского региона России.

### Материалы и методы исследования.

Было обследовано 353 неродственных физически активных европеоидных жителей г.

Челябинска. Группа пациентов с разрывом ПКС включала 55 человек, из которых 40 человек проходили лечение в травматологических отделениях дорожной клинической больницы г. Челябинска ОАО «РЖД» и Челябинской областной клинической больницы. Диагноз «разрыв ПКС» был поставлен на основании физикальных и инструментальных методов (сонография, магнитно-резонансное исследование, артроскопия коленного сустава). 15 человек с разрывом ПКС были выявлены в ходе анкетирования при углубленном обследовании спортсменов в НИИ Олимпийского спорта Уральского государственного университета физической культуры. У пациентов с разрывом ПКС собирали сведения о возрасте, в котором произошла травма, обстоятельствах травмы (тренировки или соревнования в любительском или профессиональном спорте, автотравмы, бытовые травмы), факт занятия любительским или профессиональным спортом.

Контрольная группа состояла из 298 человек, занимающихся профессиональным или любительским спортом, у которых на момент исследования отсутствовали симптомы разрыва ПКС. Пациенты с разрывом ПКС и члены контрольной группы подписали личное информированное согласие на участие в обследовании.

Биологические образцы были взяты в виде либо цельной крови с добавлением цитрата натрия в качестве антикоагулянта, либо буккального эпителия. Геномную ДНК экстрагировали «Набором реагентов для выделения ДНК из различного биологического материала Diatom™ DNA Prep» (ООО «Лаборатория Изоген», Россия). Количество

ДНК измеряли на флуорометре Qubit 2.0 (Invitrogene, США). Генотипирование вариации rs679620 MMP3 гена проводили с помощью набора TaqMan® SNP Genotyping Assay, Assay ID C\_\_3047717\_1\_ на приборе для ПЦР в режиме реального времени StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Результаты экспериментов обрабатывались с помощью TaqMan® Genotyper Software v. 1.0 (Applied Biosystems, США). Для повышения надежности генотипирования 20 % образцов ДНК исследовались дважды со 100 % совпадением результатов.

Статистическую обработку проводили с помощью программного обеспечения IBM SPSS v. 21. Отклонение генотипических частот вариации rs143383 GDF5 гена от равновесия Харди-Вайнберга (PXB) в исследованных группах оценивали точным методом Фишера с помощью программы GDA (<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>).

#### Результаты исследования и их обсуждение

Группа пациентов с разрывом ПКС и контрольная группы имели сходные показатели по полу, возрасту, росту, массе и индексу массы тела (ИМТ). В группе с разрывом ПКС 44 человека (80 %) занимались физкультурой и спортом, семеро (12,7 %) не занимались и у четверых (7,3 %) нет данных. Обстоятельствами возникновения травмы у 37 пациентов (67,3 %) были тренировки или участие в соревнованиях на любительском или профессиональном уровне, у 14 (25,5 %) – бытовая или автотравма, у четверых (7,3 %) нет данных (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристики участников группы с разрывом ПКС и контрольной группы на момент травмы

Показатели	Разрыв ПКС (n=55)	Контроль (n=298)
женщины	12 (22 %)	75 (25 %)
мужчины	43 (78 %)	223 (75 %)
Возраст (лет)*	33,1 ± 1,61	32,2 ± 0,6
Вес (кг)*	82,2 ± 1,9	80,7 ± 1,6
Рост (см)*	174,2 ± 1,2	174,1 ± 0,9
ИМТ (кг/м2)*	27,0 ± 0,5	26,5 ± 0,4

Примечание:

\*Показатель представлен как среднее арифметическое ± стандартная ошибка.

## Генотипические и аллельные частоты.

Данные о генотипических и аллельных частотах вариации rs679620 *MMP3* гена представлены в таблице 2. Точный метод, выполненный с помощью программы GDA, подтвердил нулевую гипотезу отсутствия в контрольной группе существенного отклонения генотипических частот исследуемой

вариации от PХВ ( $P = 0,553$ ). В группе пациентов с разрывом ПКС выявлено отклонение от PХВ ( $P = 0,014$ ), связанное с недостатком гетерозиготных носителей. Частота минорного Т-аллеля в контрольной группе составляет 0,450 и сходна со значениями в других европеоидных популяциях [7; 8].

Таблица 2 – Генотипические и аллельные частоты вариации rs679620 *MMP3* гена в группе с разрывом ПКС и в контрольной группе.

Группы	ТТ	СТ	СС	Т	С
Разрыв ПКС (n = 55)	0,309 (17)	0,327 (18)	0,364 (20)	0,473	0,527
Контрольная Группа (n = 298)	0,211 (63)	0,477 (142)	0,312 (93)	0,450	0,550

Примечание. В скобках представлено количество обследованных.

Оценку различия генотипических частот между двумя группами проводили с помощью критерия согласия. Учитывая небольшой размер выборки пациентов с разрывом ПКС, наряду с  $\chi^2$  критерием Пирсона, использовали точный метод Фишера и критерий отношения правдоподобия, так как последние два теста дают более адекватные оценки при малых размерах выборки. Были получены следующие результаты:  $\chi^2 = 4,622$  при двух степенях свободы,  $P = 0,096$ , тест отношения правдоподобия = 4,648 при двух степенях свободы,  $P = 0,101$ , точный критерий Фишера = 4,740,  $P = 0,092$ . Таким образом, по 3 тестам вероятность отличия генотипических частот между двумя группами выше порогового значения 0,05.

При сравнении количества носителей СТ генотипа против СС + ТТ генотипов в группе пациентов с разрывом ПКС и в контроле получены следующие результаты:  $\chi^2$  тест с поправкой на непрерывность равен 3,592 при одной степени свободы,  $P = 0,058$ , тест отношения правдоподобия = 4,269 при одной степени свободы,  $P = 0,055$ .

Таким образом, в группе пациентов с разрывом ПКС нами выявлено отклонение генотипических частот вариации rs679620 *MMP3* гена от PХВ ( $P = 0,014$ ), связанное с недостатком гетерозиготных носителей. Вероятность различия генотипических частот между контролем и группой с разрывом ПКС выше порогового значения 0,05. Можно предположить, что влияние вариации

rs679620 *MMP3* гена на риск развития разрыва ПКС более слабое по сравнению с вариацией rs143383 *GDF5* гена. Ассоциация последней вариации с риском развития данной патологии в российской европеоидной популяции была показана нами ранее [2]. Увеличение объема выборки пациентов с разрывом ПКС необходимо для решения вопроса о вкладе вариации rs679620 *MMP3* гена в развитие разрыва ПКС в российской европеоидной популяции.

### Список литературы

1. Миронов, С. П. Повреждения связок коленного сустава / С. П. Миронов, А. К. Орлецкий, М. Б. Цыкунов. - М. : Лесар, 1999. - 208 с.
2. Взаимосвязь между вариацией rs143383 *GDF5* гена и разрывом передней крестообразной связки коленного сустава в российской популяции / В. П. Пушкарев, А. М. Чмутов, Д. А. Дятлов и др. // Лечебная физкультура и спортивная медицина. - 2013. - № 12. - С. 43-47.
3. Спортивные травмы. Основные принципы профилактики и лечения / под общ. ред. П. А. Ф. Х Ренстрема. - Киев : Олимпийская литература, 2002. - 378 с.
4. Flynn, R. K., Pedersen, C. L., Birmingham, T. B. et al. The familial predisposition toward tearing the anterior cruciate ligament: a case control study // Am. J. Sports Med. - 2005. - Vol. 33, № 1. - P. 23-28.

5. Granan, L. P., Bahr, R., Steindal, K. et al. Development of a national cruciate ligament surgery registry: the Norwegian National Knee Ligament Registry // *Am. J. Sports Med.* – 2008. – Vol. 36. – P. 308-315.

6. Harner, C. D., Paulos, L. E., Greenwald A. E. et al. Detailed analysis of patients with bilateral anterior cruciate ligament injuries // *Am. J. Sports Med.* – 1994. – Vol. 22, № 1. – P. 37-43.

7. Posthumus, M., Collins, M., van der Merwe L. et al. Matrix metalloproteinase genes on chromosome 11q22 and the risk of anterior cruciate ligament (ACL) rupture // *Scand*

*J Med Sci Sports.* – 2012. – Vol. 22, № 4. – P. 523-533.

8. Raleigh, S. M., van der Merwe, L., Ribbans W. J. et al. Variants within the *MMP3* gene are associated with Achilles tendinopathy: possible interaction with the *COL5A1* gene // *Br J Sports Med.* – 2009. Vol. 43, № 7. – P. 514-520.

9. September, A. V., Posthumus, M., Collins, M. Application of genomics in the prevention, treatment and management of Achilles tendinopathy and anterior cruciate ligament ruptures // *Recent Pat DNA Gene Seq.* – 2012. - Vol. 6, № 3. – P. 216-223.