



## ГЕНЕТИКА

УДК 577.21:617.55-007

### ВОВЛЕЧЕННОСТЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ НЕКОТОРЫХ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В РАЗВИТИЕ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ВЕНТРАЛЬНЫХ ГРЫЖ У ЧЕЛОВЕКА

**И.И. БАРТ<sup>1</sup>**  
**В.П. ИВАНОВ<sup>1</sup>**  
**С.В. ИВАНОВ<sup>1</sup>**  
**Е.В. ТРУБНИКОВА<sup>2</sup>**

<sup>1)</sup> Курский государственный  
медицинский университет

<sup>2)</sup> Курский государственный  
университет

*e-mail: ilyabarth@gmail.com*

В статье представлены полиморфизмы генов матриксной металлопротеиназы 3 и матриксной металлопротеиназы 9 у больных с послеоперационными вентральными грыжами. Основой послеоперационного рубца является соединительная ткань, основу которой составляют коллагеновые волокна. Ведущую роль в патогенезе послеоперационного грыжеобразования лежит разрыхление ткани, которая формировала послеоперационный рубец. Матриксные металлопротеиназы разрушают коллагеновые волокна. В результате исследования были найдены достоверные ассоциации между развитием послеоперационных грыж у человека и наличием мутантного аллеля 6А гена MMP3 в позиции -1171.

Ключевые слова: послеоперационные вентральные грыжи, матриксные металлопротеиназы, ПЦР-ПДРФ анализ, полиморфизм генов.

**Актуальность.** Послеоперационная вентральная грыжа является самым распространенным послеоперационным осложнением абдоминальной хирургии, достигая 20% уровня после срединной лапаротомии. Рядом рандомизированных исследований показано, что после аутопластики грыжевых выпячиваний около 50% послеоперационных грыж рецидивируют. В связи с этим пациенты вынуждены переносить очередное оперативное вмешательство, что сопровождается дополнительными рисками [Hoer J, Lawong G, Klinge U., 2002].

Известно, что основой послеоперационного рубца является соединительная ткань, структурным компонентом которой являются коллагеновые волокна. Их основная функция заключается в поддержке специфической структуры органов и тканей в процессе развития организма. Способность коллагена упорядочивать и стабилизировать клеточные ансамбли, с которыми он контактирует, определяется тем его строгой упорядоченностью и стабильностью.

Процессы деградации коллагеновых волокон, главным образом, регулируются за счет функционирования матриксных металлопротеиназ (ММП), обладающие высочайшим спектром биологических функций. Они играют ключевую роль в разрушении большинства компонентов внеклеточной матрицы. [3, 5]. Известно около 25 разновидностей металлопротеиназ.

Основное свойство матриксных металлопротеиназ – это способность специфически гидролизывать основные белки экстраклеточного матрикса. В своем большинстве ММП секретируются клетками в виде неактивных ферментов, их активация приводит к протеолитическому разложению окружающих клетку белков [1, 4, 6]. Некоторые ММП обладают свойствами активизировать друг друга. Для ингибиции протеолиза существуют специфические ингибиторы металлопротеиназ [1].

Выделяют три большие группы матриксных металлопротеиназ: коллагеназы, желатиназы и стромелизины. Коллагеназы гидролизуют интерстициальные коллагены I, II и III типов, которые являются основными компонентом экстраклеточного матрикса. Желатиназы



гидролизуют коллаген IV типа, который является основным компонентом базальных мембран. Стромелизины гидролизуют протеогликаны и целый ряд адгезивных белков.

Рассмотрим две металлопротеиназы, которые подверглись нашему исследованию.

ММР-3, также называемая стромелизином-1, катализирует деградацию многих компонентов соединительной ткани, включая протеогликаны, линк-белок, коллаген типов II, IV, IX и XI, ламинин и фибронектин. ММР-3 может также влиять на деградацию экстрацеллюлярного матрикса через активацию проколлагеназы-1. ММР-3 секретируется как профермент массой 57 кДа и активируется *in vivo* путем ограниченного протеолиза тканевыми и плазматическими эндопептидазами. Активность ММР-3 ингибируется TIMP (тканевой ингибитор металлопротеиназ), который взаимодействует с активной ММР-3 в стехиометрическом соотношении 1:1. Полагают, что равновесие между ММР-3 и TIMP – определяющий фактор в разрушении межклеточного матрикса. Активность ММР-3 также может ингибироваться  $\alpha$ 2-макроглобулином. Считают, что ММР-3 играет важную роль в естественных процессах тканевого ремоделирования и патологических процессах (остеоартритах и ревматоидных артритах).

Ряд исследователей считают стромализин 1 естественным коканцерогенным фактором [4].

ММР-9 (желатиназа В) является зимогеном массой 92 кДа. ММР-9 включают в себя денатурированный коллаген I типа (желатин), нативные коллагены типов IV, V, VII, X и XI, фибриноген, витронектин, IL-1 и энтактин, который соединяет ламинин и коллаген IV типа. Основная функция ММР-9 – это участие в процессах воспаления, ремоделирования ткани и репарации, мобилизации матрикс связанных факторов роста, процессинга цитокинов, также она играет ведущую роль в ангиогенезе, растворяя стромальные элементы, она тем самым прокладывает путь для растущих капилляров [2]. Известно, что ее экспрессия коррелирует с десмоплазией [2].

Итак, **целью** нашего исследования явилось изучение полиморфизмов генов ММР3 1171 5А/6А и ММР9 1562 С/Т у больных с послеоперационными вентральными грыжами.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования послужила выборка из 267 пациентов, представителей русской национальности, уроженцев курской области, находившихся на стационарном лечении в отделении общей хирургии курской областной клинической больницы. Забор материала проводился на месте.

Экспериментальная группа больных составила 110 человек с абдоминальными грыжами. Из них 89 женщин и 21 мужчина. Средний возраст больных составил  $54,4 \pm 10,9$  года. Преобладающей возрастной группой были люди от 51 до 60 лет (45 человек). Вторыми по величине были возрастные группы 41-50 лет и 61-70 лет, по 18,2% и 23,7% соответственно. 9% и 7,3% составили больные в возрастах 31-40 лет и более 71 года соответственно.

Контрольная группа составила 157 человек. В нее вошли люди без грыжевой болезни, без тяжелых соматических патологий – таких, как онкологические заболевания, сахарный диабет, тяжелые формы ишемической болезни сердца (в том числе инфаркты миокарда), артериальной гипертензии и др., находившиеся на стационарном лечении в отделении общей хирургии. Из них 125 женщин и 32 мужчины. Средний возраст их составил  $51,2 \pm 12,6$  года. Преобладающей возрастной группой, так же, как и в экспериментальной группе, были лица 51-60 лет (49 человек).

ПЦР-анализ. Для анализа полиморфизма -1562 С/Т ММР9 была произведена амплификация фрагментов промоторной области данного гена с использованием следующих праймеров: прямой – 5' GCCTGGCACAATAGTAGGCC 3', обратный праймер – 5' CTTCCTAGC-CAGCCGGCATC 3'. Условия ПЦР были следующие: 2 минуты денатурации при температуре 95°C, далее 35 циклов 95°C 30 сек., 58°C 30 сек., 72°C 30 сек., завершающий шаг 72°C в течении 10 минут. Продукты ПЦР-реакции были визуализированы в трансиллюминаторе под ультрафиолетовым светом после электрофореза на 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Для ПДРФ анализа была использована рестриктаза SphI. Рестрикция производилась при 37°C в течении 10 часов. Для разделения продуктов рестрикции производился электрофорез на 3% агарозном геле в течении 40 минут. Аллель С имела 1 фрагмент длиной 460 п.н., аллель Т имела 2 фрагмента длиной 258+202 п.н., гетерозиготные особи имели комбинацию из всех 3 фрагментов – 460, 258, 202 п.н.

Для анализа полиморфизма -1171 5А/6А ММР3 была произведена амплификация фрагментов промоторной области данного гена с использованием следующих праймеров: прямой – 5'-GGTTCCTCCATTCTTTGATGGGGAAGA-3', обратный праймер – 5'-CTTCCTGGAATTCATGATGCCACCACT-3'. Условия ПЦР были следующие: 5 минут денатурации при температуре 94°C, далее 35 циклов 94°C, 45 сек., 66°C, 45 сек., 72°C 45 сек., завершающий шаг 72°C в течении 15 минут. Продукты ПЦР-реакции были визуализированы в трансиллюминаторе под ультрафиолетовым светом после электрофореза на 3% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Для ПДРФ анализа была использована рестриктаза Tth111I. Рестрикция производилась при 60°C в течении 10 часов. Для разделения продуктов рестрикции производился электрофорез на 1,5% агарозном геле в течении 40 минут. Аллель 5А имела 1 фрагмент



длиной 129 п.н., аллель 6A имела 2 фрагмента длиной 97+32 п.н., гетерозиготные особи имели комбинацию из всех 3 фрагментов – 129, 97 и 32 п.н.

Аmplification производилась методикой ПЦР-ПДРФ. Амплификацию проводили на многоканальном термоциклере "Терцик" (НПО "ДНК-Технология", Москва). С целью оптимизации ПЦР для каждой пары праймеров рассчитывали оптимальный температурно-временной режим отжига и подбирали соответствующую концентрацию MgCl<sub>2</sub>.

Статистические методы. Для оценки соответствия распределений генотипов и для сравнения частот аллелей и генотипов в выборках больных и здоровых людей использовали критерий Хи-квадрат Пирсона с поправкой Йейтса на непрерывность. Ожидаемую гетерозиготность рассчитывали по Ne<sub>i</sub>, также рассчитывали относительное отклонение ожидаемой гетерозиготности от наблюдаемой.

Для сравнения частот аллелей и генотипов между группами больных и здоровых людей также использовали критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса на непрерывность [Пузырев, Фрейдин и др., 2009]. Об ассоциации аллелей или генотипов с предрасположенностью к послеоперационному грыжеобразованию судили по величине отношения шансов (OR).

Во всех случаях уровень статистической значимости принимали за 95% (p<0,05).

**Результаты.** Распределение частот генотипов данных полиморфизмов и их соответствие популяционному равновесию Харди – Вайберга (РХВ) проводилось отдельно в экспериментальной и контрольной группах. Результаты данного анализа представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

**Распределение частот генотипов и значения гетерозиготности по полиморфным вариантам генов в контрольной выборке**

Ген	Полиморфизм и его локализация в гене	генотип	Распределение генотипов		Уровень гетерозиготности		χ <sup>2</sup> , (p)
					Но	Не	
ММР3	1171 5A/6A	1171 5A5A	85	55%	0.351	0.397	1,13 (p>0,05)
		1171 5A6A	54	35,2%			
		1171 6A6A	15	9,8%			
ММР9	1562 C/T	1562 CC	99	76%	0.215	0.227	0.27 (p>0,05)
		1562 CT	28	21%			
		1562 TT	3	3%			

Но – наблюдаемая

Не – ожидаемая гетерозиготность

χ<sup>2</sup> Пирсона и достигнутый уровень значимости для теста на РХВ (df=1).

Таблица 2

**Распределение частот генотипов и значения гетерозиготности по полиморфным вариантам генов в экспериментальной группе**

Ген	Полиморфизм и его локализация в гене	генотип	Распределение генотипов		Уровень гетерозиготности		χ <sup>2</sup> , (p)
					Но	Не	
ММР3	1171 5A/6A	1171 5A5A	28	30,8%	0,527	0,490	0,29 (p>0,05)
		1171 5A6A	48	52,7%			
		1171 6A6A	15	16,5%			
ММР9	1562 C/T	1562 CC	68	78,2%	0,172	0,229	1,41 (p>0,05)
		1562 CT	15	17,3%			
		1562 TT	4	4,6%			

Но – наблюдаемая

Не – ожидаемая гетерозиготность

χ<sup>2</sup> Пирсона и достигнутый уровень значимости для теста на РХВ (df=1).

В обеих группах по обоим полиморфизмам двух генов распределение частот генотипов соответствовало критерию Харди-Вайнберга.

Далее был проведен сравнительный анализ частот аллелей и частот генотипов в обеих выборках и их сравнительный анализ между собой. Получены отношения шансов (OR) и их 95% доверительный интервал.



Таблица 3

**Сравнительная характеристика частот аллелей полиморфизмов генов MMP3 и MMP9 в экспериментальной и контрольной группах**

Ген	Поли-морфизм	Аллели	Частоты аллелей				Критерий различий $\chi^2, (p)$	OR (95% CI)
			n	Больные	n	Контроль		
MMP3	1171 5A/6A	1171 5A	110	0,571	128	0,727	12,55* (0,0004)	0,5 (0,34-0,74)
		1171 6A		0,429		0,273		2,0 (1,36-2,94)
MMP9	1562 C/T	1562 C	110	0,868	130	0,869	0 (0,97)	0,99 (0,56-1,74)
		1562 T		0,132		0,131		1,01 (0,57-1,79)

Из табл. 3 следует, что частоты аллелей по полиморфизму MMP3 1171 5A/6A между группами контроля и эксперимента имели статистически достоверные различия, критерий  $\chi^2$  достигал 12,55, при этом отношении шансов по мутантным аллелям было 2,0, по диким аллелям 0,5. По полиморфизму MMP9 1562 C/T статистически достоверных различий между частотами диких и мутантных аллелей выявлено не было.

В таблице 4 представлены результаты сравнительного анализа частот генотипов по обоим полиморфизмам в обеих выборках. Из нее следует, что в полиморфизме MMP3 1171 5A/6A были найдены статистически достоверные различия. При этом максимальное отношение шансов было по гетерозиготным особям, OR=2,07. По мутантным генотипам отношение шансов было несколько меньшим и составило 1,83. По дикому генотипу отношение шансов достигало лишь 0,36.

По полиморфизму MMP9 1562 C/T статистически достоверных различий по частотам генотипов выявлено не было. Отношение шансов для диких генотипов составило 1,12, для гетерозиготных особей 0,76. Но, в то же время, для диких генотипов отношение шансов достигало 2,04.

Таблица 4

**Сравнительная характеристика частот генотипов полиморфизмов генов MMP3 и MMP9 в экспериментальной и контрольной группах**

Ген	Поли-морфизм	Гено-типы	Частоты генотипов				Критерий различий $\chi^2, (p)$	OR (95% CI)
			n	Больные	n	Контроль		
MMP3	1171 5A/6A	5A5A	110	0,308	128	0,552	13,82* (0,001)	0,36 (0,21-0,62)
		5A/6A		0,527		0,351		2,07 (1,22-3,51)
		6A/6A		0,165		0,097		1,83 (0,85-3,94)
MMP9	1562 C/T	C/C	110	0,782	130	0,762	1,36 (0,51)	1,12 (0,59-2,14)
		C/T		0,172		0,215		0,76 (0,8-1,52)
		T/T		0,046		0,023		2,04 (0,45-9,35)

**Выводы.** Были выявлены статистически достоверные различия между группой людей с послеоперационными вентральными грыжами и группой лиц контрольной группы по полиморфизму 1171 5A/6A в гене MMP3. Для мутантных генотипов отношение шансов составило 1,83, для гетерозигот 2,07. Что может свидетельствовать о достоверной вовлеченности данного полиморфизма в развитие послеоперационных грыж у человека.

В структуре полиморфизма MMP9 1562 C/T достоверных различий между группой больных с послеоперационными вентральными грыжами и у лиц контрольной группы не установлено.

### Литература

1. Birkedal-Hansen H. //Crit. Rev. Oral. Biol. / H. Birkedal-Hansen, W.G.I. Moore, M.K. Bodden et al.// Med. – 1993. Vol. 4. P. 197.
2. Blasi F. Biochimica et Biophysica / F. Blasi, M.P. Stoppelli //Acta. 1998. Vol. 1423. P. 35–44.
3. Carrabba M. Eziopathogenesis dell'artrosi / M. Carrabba, B. Colombo, A. Galanti // In: R. Marcolongo (Ed.) L'artrosi. Realizzazioni scientifiche. – Milan, 1998. – P. 49–68.
4. Kleiner D.E. Curr. Opinion.Cell. Biol. / D.E. Kleiner, W.G. Stetler- Stevenson // 1993. – Vol. 5. – P. 891.
5. Malemud C.J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. / C.J. Malemud // Front Biosci. 2006;11:1696–1701
6. Wojtyczka A. Closing of an extensive abdominal wall defect with an implant of preserved dura mater in animal experiments. Mechanical and morphological studies / A. Wojtyczka // Z. Exp. Chir. Transplant. Kunstliche Organe. – 1989. – Vol. 22, № 6. – P. 330 – 336.



## **MATRIX METALLOPROTEINASE POLYMORPHISMS AND IT'S INVOLVEMENT INTO INCISIONAL HERNIA DEVELOPMENT AT PERSON**

**I.I. BART<sup>1</sup>**

**V.P. IVANOV<sup>1</sup>**

**S.V. IVANOV<sup>1</sup>**

**E.V. TRUBNIKOVA<sup>2</sup>**

<sup>1)</sup> *Kursk State Medical University*

<sup>2)</sup> *Kursk State University*

*e-mail:ilyabarth@gmail.com*

The article presents polymorphisms of matrix metalloproteinase 3 and matrix metalloproteinase 9 in case of incision hernia development. The base of the incision is connective tissue, and the base of connective tissue are collagen fibers. In pathogenesis of the incision hernias the mechanism of destroying that tissue, which formed a postoperative incision, is most important. Matrix metalloproteinases are those molecules, which destroy collagen fibers. As a result we found a reliable associations between development of incision hernias and existence a mutant allele 6A of MMP3 gene in a -1171 position.

Keywords: incision hernias, matrix metalloproteinase, PCR-RFLP, gene polymorphisms.