



Роль полиморфного локуса *VNTR* гена агрекана в развитии остеоартроза у женщин

Д.А. Шаповалова¹✉, А.В.Тюрин², С.С. Литвинов¹, Э.К. Хуснутдинова¹, Р.И. Хусаинова¹

¹ Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

² Башкирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Уфа, Россия

Остеоартроз (ОА) – наиболее распространенное многофакторное заболевание суставов, одним из вероятных факторов риска развития которого является недифференцированная дисплазия соединительной ткани (нДСТ) – генетически детерминированное нарушение структуры соединительной ткани, в том числе и в суставах. Проблема сочетания ОА с фенотипическими проявлениями нДСТ чрезвычайно актуальна, является как фундаментальной, так и практической задачей, решение которой будет способствовать разработке подходов ранней диагностики ОА и профилактике заболевания. Агрекан представляет собой основной протеогликан внеклеточного матрикса суставного хряща, он отвечает за способность ткани выдерживать сжимающие нагрузки. У 316 женщин (средний возраст 50.5 ± 4.77), обследованных на наличие признаков нДСТ и ОА, выполнено исследование полиморфизма *VNTR* гена агрекана (*ACAN*), который представлен варибельным числом тандемных повторов, каждый из которых состоит из 57 нуклеотидов. Осуществлен поиск ассоциаций изученного локуса с ОА в целом, с учетом локализации патологического процесса, а также наличия признаков нДСТ. Обнаружено 12 аллельных вариантов и 24 генотипа *VNTR* полиморфизма гена агрекана (*ACAN*), наиболее частыми оказались аллели с 27, 28 и 26 повторами. Установлена значимость аллеля с 27 повторами в формировании остеоартроза у женщин в целом ($\chi^2 = 6.297$, $p = 0.012$, odds ratio (OR) = 1.50; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1.09–2.05), ОА коленных суставов ($\chi^2 = 4.613$, $p = 0.031$, OR = 1.52; 95 % ДИ 1.04–2.23) и полиартроза ($\chi^2 = 4.181$, $p = 0.04$, OR = 1.68; 95 % ДИ 1.02–2.78). Гомозиготный генотип *27*27 ассоциирован с остеоартрозом в целом как в изолированном состоянии ($\chi^2 = 3.921$, $p = 0.047$, OR = 1.72; 95 % ДИ 1–2.96), так и в сочетании с недифференцированной дисплазией соединительной ткани ($\chi^2 = 5.415$, $p = 0.019$, OR = 2.34; 95 % ДИ 1.13–4.83) у женщин.

Ключевые слова: остеоартроз; недифференцированная дисплазия соединительной ткани; агрекан; *VNTR* полиморфизм; генетическая предрасположенность.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шаповалова Д.А., Тюрин А.В., Литвинов С.С., Хуснутдинова Э.К., Хусаинова Р.И. Роль полиморфного локуса *VNTR* гена агрекана в развитии остеоартроза у женщин. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(7):865-872. DOI 10.18699/VJ18.427

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shapovalova D.A., Tyurin A.V., Litvinov S.S., Khusnutdinova E.K., Khusainova R.I. The role of *VNTR* aggrecan gene polymorphism in the development of osteoarthritis in women. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):865-872. DOI 10.18699/VJ18.427 (in Russian)

The role of *VNTR* aggrecan gene polymorphism in the development of osteoarthritis in women

D.A. Shapovalova¹✉, A.V. Tyurin², S.S. Litvinov¹, E.K. Khusnutdinova¹, R.I. Khusainova¹

¹ Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre, RAS, Ufa, Russia

² Bashkir State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ufa, Russia

Osteoarthritis (OA) is a common multifactorial joint disease. Undifferentiated connective tissue dysplasia (uCTD) is a genetically determined lesion of the connective tissue structures, including joints, and it can be one of the factors predisposing to development of OA. Solving the problem of comorbidity of OA and uCTD signs will contribute to the early diagnosis and prophylactics of OA. Aggrecan is one of the major structural components of cartilage and it provides the ability to resist compressive loads throughout life. We examined 316 women (mean age 50.5 ± 4.77) for signs of uCTD and OA. A study of the aggrecan gene (*ACAN*) *VNTR* polymorphism, which is represented by a variable number of 57 nucleotide repeats, was performed. We searched for associations between the *VNTR* locus and OA in general and with an account of the localization of the pathological process, as well as with the presence of uCTD signs. Twelve allelic variants and 24 genotypes of the *VNTR* polymorphism of the aggrecan gene (*ACAN*) were identified, the most frequent variants were alleles with 27, 28 and 26 repeats. A significance of allele *27 ($\chi^2 = 6.297$, $p = 0.012$, odds ratio (OR) = 1.50; 95 % confidence interval (CI) 1.09–2.05) in the development of OA in general, knee OA ($\chi^2 = 4.613$, $p = 0.031$, OR = 1.52; 95 % CI 1.04–2.23), and multiple OA ($\chi^2 = 4.181$, $p = 0.04$, OR = 1.68; 95 % CI 1.02–2.78) was revealed. Homozygous genotype *27*27 was associated with OA ($\chi^2 = 3.921$, $p = 0.047$, OR = 1.72; 95 % CI 1–2.96), and OA with uCTD signs in women ($\chi^2 = 5.415$, $p = 0.019$, OR = 2.34; 95 % CI 1.13–4.83).

Key words: osteoarthritis; non-differentiated connective tissue dysplasia; aggrecan; *VNTR* polymorphism; genetic predisposition.

Остеоартроз (остеоартрит – в зарубежной литературе) – прогрессирующее заболевание суставов неизвестной этиологии, характеризующееся поражением всех компонентов сустава – хряща, субхондральной кости, синовиальной оболочки, связок, капсулы околоуставных мышц (Reynard, Loughlin, 2013; Steinberg, Zeggini, 2016). Остеоартроз (ОА) является самым распространенным заболеванием суставов в мире, он поражает примерно 10 % мужчин и 18 % женщин старше 60 лет (Wang et al., 2016).

Множество факторов, включая возраст, женский пол, избыточный вес тела, травмы, аномалии развития суставов, вносят вклад в развитие ОА (Brandt et al., 2009; Musumeci et al., 2015). Одним из таких факторов, вероятно предрасполагающих к развитию ОА, выступает недифференцированная дисплазия соединительной ткани (нДСТ) – генетически детерминированное нарушение развития соединительной ткани, характеризующееся дефектами волокнистых структур и основного вещества, приводящее к расстройству гомеостаза на тканевом, органном и организменном уровнях (Тябут, Каратыш, 2009). В номенклатуре болезней (МКБ-10) термин «дисплазия соединительной ткани» не значит нозологической единицей, отдельные синдромы как дифференцированных (наследственных), так и недифференцированных (многофакторных) форм ДСТ «рассеяны» в различных рубриках XIII и XVII классов.

Считается, что у 10–22.5 % населения мира встречаются фенотипические признаки нДСТ различной выраженности, не укладывающиеся в структуру наследственных синдромов (Кадурина, Горбунова, 2009), которые, как правило, носят прогрессирующий характер и лежат в основе формирования значительного числа соматической патологии, ухудшая прогноз основного заболевания (Земцовский, 2008).

Недифференцированная дисплазия соединительной ткани характеризуется нарушением строения и функций межклеточного вещества соединительной ткани, что патогенетически сходно с развитием ОА (Нечаева и др., 2008; Яковлев, Нечаева, 2011). Такие изменения затрагивают не только фибриллярный компонент матрикса – волокна коллагена, эластина, фибриллина, но и другие компоненты матрикса, важнейший из которых – агрекан. Он представляет собой главный протеогликан суставного хряща, отвечает за способность ткани выдерживать сжимающие нагрузки, с которыми суставы сталкиваются на протяжении всей жизни. Эта функция тесно связана со структурой макромолекулы агрекана, образующей большие протеогликановые агрегаты в сочетании с гиалуроновой кислотой (Roughley, Mort, 2014; Mort et al., 2016). Агрекан содержит три сферических домена (G1, G2, G3) и короткий интерглобулярный домен между G1 и G2 доменами (Doerge et al., 1991; de Souza et al., 2008). Область G1 отвечает за взаимодействие гиалуроновой кислоты с агреканом (Hardingham, 1979), длинный домен гликозаминогликана, находящийся между доменами G2 и G3, состоит из смежных областей, содержащих цепи кератинсульфата (КС) и хондроитинсульфата (ХС) (Roughley et al., 2006). Цепи КС и ХС обеспечивают осмотические свойства, ответственные за сохранение воды при нагруз-

ках, предотвращая повреждения тканей (Urban et al., 1979; Mort et al., 2016). Белок агрекан кодируется геном *ACAN* (*AGCI*), расположенным на 15-й хромосоме в регионе *q26.1* (Doerge et al., 1991; de Souza et al., 2008). Установлена роль мутаций этого гена в развитии некоторых видов хондродисплазии, множественно-эпифизальной дисплазии, рассекающего остеохондрита, сопровождающихся развитием раннего ОА (Gibson, Briggs, 2016). Ряд исследований выявил ассоциации полиморфных вариантов гена агрекана с развитием патологии межпозвоночных дисков и связочного аппарата (Kawaguchi et al., 1999; Roughley et al., 2006; Ryder et al., 2008; Xu et al., 2012). Обнаружена значимость *VNTR* полиморфизма, расположенного в 12-м экзоне гена агрекана, который состоит из варьирующего числа tandemных повторов протяженностью 57 нуклеотидов, кодирующих 19 аминокислот. Описаны аллели в диапазоне от 13 до 34 повторов. Каждый повтор содержит серин-глициновые пары как две возможные точки крепления для цепей ХС, крайний диапазон аллелей может обуславливать вариацию количества ХС цепей в мономере белка до 30 % (Rodriguez et al., 2006; de Souza et al., 2008). Таким образом, длина основного белка изменяется прямо пропорционально количеству повторов, изменение этой длины может привести к изменениям в функциональных свойствах соединительной ткани и хряща (Doerge et al., 1997). Имеющиеся данные о влиянии аллелей *VNTR* на соединительную ткань противоречивы и требуют дальнейших исследований.

Целью настоящего исследования был поиск ассоциаций аллелей и генотипов *VNTR* локуса гена *ACAN* с формированием ОА различных локализаций с учетом наличия признаков нДСТ у женщин, проживающих в Республике Башкортостан.

Материалы и методы

В качестве материала для исследования использовали образцы ДНК 316 женщин (средний возраст 50.5 ± 4.77), обследованных на наличие признаков нДСТ и ОА в терапевтическом отделении городской клинической больницы № 18, а также в поликлиниках № 2, 18, 38 Уфы. Исследование одобрено биоэтическими комитетами ФГБОУ ВО Башкирского государственного медицинского университета и Института биохимии и генетики обособленного структурного подразделения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта».

По этническому составу выборку составляли женщины: 116 (37 %) русского, 122 (36 %) – татарского, 27 (8 %) башкирского происхождения, метисы и представители других этносов – 51 (16 %). Этническая принадлежность определялась на основании информации о предках до третьего поколения. В связи с этнической неоднородностью выборки нами проведена оценка наличия значимых различий в распределении частот генотипов между группами разной этнической принадлежности с применением компьютерной программы RxC (Rows × Columns), кото-

рая позволяет провести точный тест Фишера на таблице сопряженности любого размера посредством использования алгоритма Метрополиса (Miller, 1997). Не выявлено статистически значимых различий между группами лиц с русской, татарской и башкирской этнической принадлежностью ($p = 0.089$), что позволяет рассматривать выборку без разделения на группы по этнической принадлежности.

Критерием исключения из исследования были наличие онкологической патологии, системных заболеваний соединительной ткани, признаков активного воспалительного процесса как инфекционной, так и неинфекционной этиологии, травматические повреждения суставов в анамнезе, беременность (или кормящие женщины), отказ от участия в исследовании.

Группу женщин с ОА составили 155 пациенток, группу сравнения – 161 женщина без признаков ОА. Диагноз ОА выставлен в соответствии с критериями Американской ассоциации ревматологов (1995 г.), классификацией В.А. Насоновой и М.Г. Астапенко (1989) и рентгенологическим подтверждением. Полиартроз диагностирован у 38 женщин (24.52 %), гонартроз – у 81 (52.26 %), коксоартроз – у 36 женщин (23.22 %). Рентгенологическая стадия II (по Kellgren-Lawrence) была у 97 пациенток (61.4 %), III – у 40 (25.3 %), IV – у 21 (13.3 %). Длительность заболевания составила от 3 до 18 лет (в среднем 4.7 ± 1.8 года). Симптоматический нДСТ был выявлен у 151 человека, среди них у 123 женщин (81.45 %) – легкой степени, у 28 (18.54 %) – выраженной степени. Наличие фенотипических признаков нДСТ оценивалось в баллах по критериям, предложенным Т.И. Кадуриной и Л.Н. Аббакумовой (2008), в модификации авторов. При сумме баллов от 9 до 14 определялась нДСТ легкой степени, свыше 15 баллов – выраженная. Было сформировано несколько групп сравнения, в зависимости от наличия и отсутствия признаков ОА в изолированном и коморбидном состоянии с нДСТ, локализации ОА и выраженности нДСТ. Численность каждой выборки указана в табл. 1–3.

ДНК выделяли из периферической крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1985). Генотипирование проводили с применением метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Фрагменты полиморфного локуса *VNTR* гена *ACAN* были амплифицированы с использованием прямого праймера 5'-TAG AGG GCT CTG CCT CTG GAG TTG-3' и обратного праймера 5'-AGG TCC CCT ACC GCA GAG GTA GAA-3'. Для реакции амплификации использовали прибор Thermal Cycler 2720 Applied Biosystems. Амплифицированные фрагменты варьировали от 1143 пар оснований (п. о.) для аллеля с 19 повторами, до 1770 п. о. для аллеля с 30 повторами. Продукты ПЦР разделяли в 6 % полиакриламидном геле при одинаковой длине разгона (25 см) и окрашивали раствором бромид аэтидия. Число повторов подтверждено методом секвенирования по Сэнгеру. Оценку результатов электрофореза осуществляли с использованием видеогельдокументирующей системы Geldokulant (Франция).

Статистическая обработка полученных данных проведена на основании общепринятых методов вариационной статистики с использованием стандартных пакетов Microsoft Excel 2007, Statistica 6.0, MedCalc, Rows × Co-

lums. При сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и контроля применялся критерий χ^2 . Для таблиц сопряженности 2×2 использован критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность, если частота хотя бы в одной ячейке таблицы была меньше или равна 5. Степень ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов (OR). Исследование клинико-генетических взаимодействий проводилось с использованием метода многофакторной логистической регрессии с построением ROC-кривых; состоятельность итоговых уравнений регрессии оценивали путем вычисления площади под кривой (AUC – area under ROC curve), показатель которой в диапазоне 0.6–0.7 считался средним, 0.7–0.8 – хорошим, 0.8–0.9 – очень хорошим. Поправка на множественность сравнений рассчитывалась с применением метода Бенджамини–Хокберга (FDR – false discovery rate).

Результаты

В исследованной нами выборке женщин выявлено 12 аллельных вариантов и 29 генотипов *VNTR* полиморфизма гена *ACAN*, содержащих от 19 до 30 повторов, наиболее частыми из которых оказались аллели с 26 (14.74 %), 27 (44.47 %) и 28 (31.97 %) повторами как у пациентов с ОА, так и в контрольной группе (см. табл. 1). Аллели с числом повторов 19, 20, 21, 24, 30 были редкими и встречались в единичных случаях. Гетерозиготность по исследуемому локусу в целом составила 62.97 %.

Для подтверждения размера повторов нами было выбрано три гомозиготных по исследуемому локусу образца с разным числом повторов и проведено секвенирование по Сэнгеру. При этом были обнаружены вариации нуклеотидов (ACC ACT, ACC GCT, ACT GCT и ACT ACT) в 17 и 18 кодонах внутри повторов, состоящих из 57 нуклеотидов (19 кодонов). В исследованиях К.Д. Doege с коллегами (1997) сообщалось о полиморфизме внутри повторов, наши результаты согласуются с этими данными. Вариант ACT GCT является самым распространенным. Таким образом, существует не только полиморфизм в числе повторов, но и однонуклеотидный полиморфизм внутри локуса, что приводит к высокой гетерогенности белка агрекана.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей между группами пациентов и контроля выявил статистически значимые различия по частоте аллеля *27 между группами женщин с ОА (0.497) и контроля (0.398) ($\chi^2 = 6.297, p = 0.012$), OR составил 1.50 (95 % ДИ 1.09–2.05), что свидетельствовало о повышенном риске развития ОА для носителей аллеля *27. При рассмотрении выборки пациентов с ОА, в зависимости от локализации патологического процесса, аллель *27 наиболее часто встречался у женщин с артрозом нескольких суставов (полиартроз), достигая 0.526, с наименьшей частотой выявлен у женщин с коксартрозом (0.458). Обнаружена ассоциация аллеля *27 с полиартрозом и гонартрозом ($\chi^2 = 4.181; p = 0.04$; OR = 1.68 (95 % ДИ 1.02–2.78) и $\chi^2 = 4.613; p = 0.031$; OR = 1.52 (95 % ДИ 1.04–2.23) соответственно). Отсутствие ассоциации с ОА тазобедренного сустава, возможно, связано с малочисленностью этой группы женщин. Таким образом, аллель *27 является маркером риска развития ОА в целом и его различных локализаций.

Table 1. Comparison of allelic frequencies of the VNTR polymorphism in the ACAN gene in women with OA, hip OA, knee OA, polyarthritis, and the control group

Allele	Groups compared				
	Control (161)	OA (155)	HOA (36)	KOA	PA (38)
19	1 (0.003)	0	0	0	0
20	0	2 (0.006)	0	1 (0.006)	1 (0.013)
21	1 (0.003)	1 (0.003)	0	1 (0.006)	0
22	0	2 (0.006)	1 (0.014)	0	1 (0.013)
23	1 (0.003)	3 (0.011)	0	2 (0.012)	1 (0.013)
24	1 (0.003)	0	0	0	0
25	13 (0.040)	6 (0.019)	0	3 (0.019)	3 (0.040)
26	52 (0.161)	42 (0.135)	13 (0.181)	22 (0.136)	7 (0.092)
27	128 (0.397)	154 (0.497) $\chi^2 = 6.297$ $p = 0.012$ OR = 1.50 CI 1.09–2.05	33 (0.458) $\chi^2 = 0.900$ $p = 0.342$	81 (0.500) $\chi^2 = 4.613$ $p = 0.031$ OR = 1.52 CI 1.04–2.23	40 (0.526) $\chi^2 = 4.181$ $p = 0.04$ OR = 1.68 CI 1.02–2.78
28	117 (0.363)	95 (0.306)	24 (0.333)	48 (0.297)	23 (0.303)
29	8 (0.025)	3 (0.011)	1 (0.014)	2 (0.012)	0
30	0	2 (0.006)	0	2 (0.012)	0

Designations: HOA, hip osteoarthritis; KOA, knee osteoarthritis; PA, polyarthrosis (involving several joints).

Table 2. Comparison of allelic frequencies of the VNTR polymorphism in the ACAN gene in OA women with uCTD signs, uCTD of various grades, and control groups

Allele	Groups compared				Groups compared	
	Control (165)	uCTD (151)	uCTD moderate (123)	uCTD severe (28)	OA+ uCTD+ (93)	OA- uCTD- (103)
19	1 (0.003)	0	0	0	0	1 (0.005)
20	0	2 (0.007)	2 (0.008)	0	2 (0.011)	0
21	1 (0.003)	1 (0.003)	1 (0.004)	0	1 (0.005)	1 (0.005)
22	1 (0.003)	1 (0.003)	1 (0.004)	0	1 (0.005)	0
23	3 (0.009)	1 (0.003)	0	1 (0.018)	1 (0.005)	1 (0.005)
24	1 (0.003)	0	0	0	0	1 (0.005)
25	12 (0.036)	7 (0.023)	4 (0.017)	3 (0.054)	4 (0.022)	10 (0.048)
26	55 (0.167)	39 (0.129)	33 (0.134)	6 (0.107)	23 (0.124)	36 (0.175)
27	138 (0.418)	144 (0.477) $\chi^2 = 2.194$ $p = 0.138$	117 (0.476)	27 (0.482)	92 (0.495) $\chi^2 = 6.305$ $p = 0.012^*$ OR = 1.674 CI 1.12–2.51	76 (0.369)
28	110 (0.334)	102 (0.339)	84 (0.341)	18 (0.321)	60 (0.323)	75 (0.364)
29	7 (0.021)	4 (0.013)	3 (0.012)	1 (0.018)	1 (0.005)	5 (0.024)
30	1 (0.003)	1 (0.003)	1 (0.004)	0	1 (0.005)	0

* The association remains significant after applying the multifactorial logistic regression analysis.
uCTD, undifferentiated connective tissue dysplasia.

При анализе распределения частот аллелей изучаемого полиморфизма у пациентов с ОА с учетом наличия нДСТ нами было обнаружено статистически значимое преобладание аллеля *27 у лиц с ОА в сочетании с нДСТ (0.495)

($\chi^2 = 6.305$, $p = 0.012$, OR = 1.67; 95 % ДИ 1.12–2.51), при этом показатель OR стал выше, чем при анализе ОА без учета признаков нДСТ, что свидетельствует о повышении риска развития ОА у женщин с нДСТ (см. табл. 2).

Table 3. Comparison of allelic frequencies of the *VNTR* polymorphism in the *ACAN* gene in patients with OA vs. the control group, patients with uCTD vs. the control group, and OA + uCTD patients vs. the control group in women

Genotype	Groups compared		Groups compared		Groups compared	
	OA+ (155)	OA- (161)	uCTD+ (151)	uCTD- (165)	OA+uCTD+ (93)	OA-uCTD- (103)
19/27	0	1 (0.006)	0	1 (0.006)	0	1 (0.010)
20/25	1 (0.006)	0	1 (0.007)	0	1 (0.011)	0
20/28	1 (0.006)	0	1 (0.007)	0	1 (0.011)	0
21/27	0	1 (0.006)	0	1 (0.006)	0	1 (0.010)
21/28	1 (0.006)	0	1 (0.007)	0	1 (0.011)	0
22/28	2 (0.013)	0	1 (0.007)	1 (0.006)	1 (0.011)	0
23/27	1 (0.006)	1 (0.006)	1 (0.007)	1 (0.006)	1 (0.011)	1 (0.010)
23/28	1 (0.006)	0	0	1 (0.006)	0	0
24/27	0	1 (0.006)	0	1 (0.006)	0	1 (0.010)
25/26	1 (0.006)	1 (0.006)	0	2 (0.013)	0	1 (0.010)
25/27	3 (0.020)	8 (0.051)	5 (0.033)	6 (0.036)	3 (0.032)	6 (0.058)
25/28	1 (0.006)	3 (0.019)	1 (0.007)	3 (0.018)	0	2 (0.019)
25/29	0	1 (0.006)	0	1 (0.006)	0	1 (0.010)
26/26	1 (0.006)	4 (0.025)	0	5 (0.030)	0	4 (0.039)
26/27	24 (0.156)	20 (0.124)	17 (0.113)	27 (0.164)	11 (0.117)	14 (0.136)
26/28	15 (0.098)	23 (0.143)	22 (0.145)	16 (0.097)	12 (0.129)	13 (0.126)
26/29	1 (0.006)	0	0	1 (0.006)	0	0
27/27	41 (0.265) $\chi^2 = 3.921$ $p = 0.047$ OR = 1.72 CI 1–2.96	28 (0.174)	39 (0.258)	30 (0.182)	25 (0.269) $\chi^2 = 5.415$ $p = 0.019^*$ OR = 2.34 CI 1.13–4.83	14 (0.136)
27/28	41 (0.265)	35 (0.217)	38 (0.251)	38 (0.230)	25 (0.269)	22 (0.213)
27/29	2 (0.013)	5 (0.031)	4 (0.026)	3 (0.018)	1 (0.011)	2 (0.019)
27/30	1 (0.006)	0	1 (0.007)	0	1 (0.011)	0
28/28	16 (0.104)	27 (0.168)	19 (0.125)	24 (0.145)	10 (0.107)	18 (0.175)
28/29	0	2 (0.012)	0	2 (0.013)	0	2 (0.019)
28/30	1 (0.006)	0	0	1 (0.006)	0	0

* The association remains significant after multifactorial logistic regression analysis.

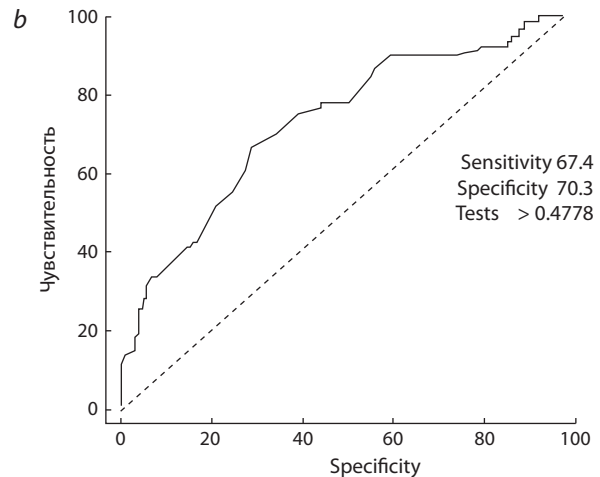
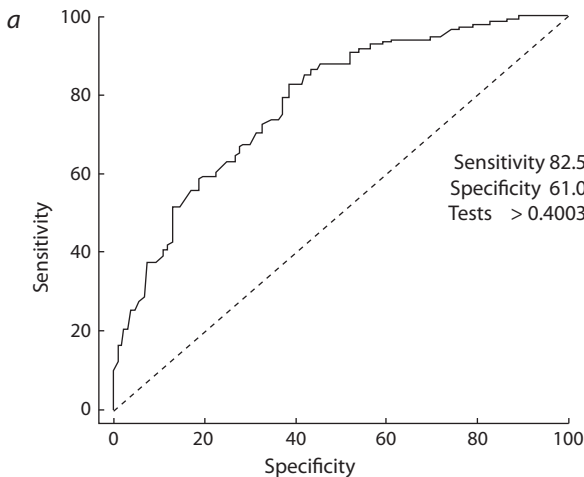
Не выявлена ассоциация аллеля *27 ($\chi^2 = 2.194$, $p = 0.138$) с нДСТ без учета наличия патологии сустава и с учетом ее степени тяжести (см. табл. 2).

Сравнительный анализ распределения частот генотипов локуса *VNTR* гена *ACAN* показал, что гомозиготный генотип *27*27 статистически значимо чаще встречается также у женщин с ОА без учета наличия признаков нДСТ (0.265) и с ОА в сочетании с нДСТ (0.269) по сравнению с группами контроля (0.174 и 0.136; $\chi^2 = 3.921$, $p = 0.047$ и $\chi^2 = 5.415$, $p = 0.019$ соответственно) и оказался маркером повышенного риска развития ОА в изолированном и коморбидном с нДСТ состояниях (OR = 1.72; 95 % ДИ 1–2.96 и OR = 2.34; 95 % ДИ 1.13–4.83) соответственно (см. табл. 3).

С учетом того что заболевание многофакторное, для комплексной оценки клинико-генетических взаимодей-

ствий был применен метод многофакторной логистической регрессии. Были использованы две модели – для развития ОА в целом и для ОА в сочетании с нДСТ (рисунки).

В предварительное уравнение регрессии было включено четыре клинических предиктора (возраст, индекс массы тела, степень тяжести нДСТ, сумма баллов нДСТ) и варианты генотипов локуса *VNTR*. По результатам анализа, в итоговое уравнение регрессии для ОА в целом вошли возраст, наличие нДСТ и генотип *27*27 локуса *VNTR*, для сочетания ОА и нДСТ – возраст и генотип *27*27 локуса *VNTR*. Обе полученные модели были статистически значимы ($F = 2.76$; $p = 0.0078$ и $F = 2.15$; $p = 0.0055$ соответственно) и обладали достаточной прогностической состоятельностью (AUC = 0.781 и AUC = 0.727 соответственно).



ROC analysis: (a) for OA; (b) for OA with uCTD signs.

Несмотря на снижение статистической значимости ряда ассоциаций после введения поправки на множественность сравнений, тенденция к преобладанию частоты генотипа *27*27 сохраняется в целом и для сочетанной патологии (OA + нДСТ +), являясь предиктором в регрессионной модели. Это позволяет рассматривать *27*27 как один из факторов риска развития патологии и подчеркивает его роль в патогенезе нарушения метаболизма соединительной ткани.

Таким образом, выявлена ассоциация аллеля *27 *VNTR* полиморфизма гена *ACAN* и его гомозиготного генотипа в формировании OA в целом, различных локализаций и в сочетании с нДСТ у женщин.

Обсуждение

Результаты исследований влияния аллельных вариантов локуса *VNTR* гена *ACAN* на состояние хряща и соединительной ткани немногочисленны и противоречивы. Длина основного белка изменяется прямо пропорционально количеству повторов, и вариация этой длины может привести к нарушению функции хряща при OA, внося свой вклад в структуру внеклеточного матрикса и его механические свойства (Doege et al., 1997; de Souza et al., 2008). Молекулы агрекана, имеющие более длинные домены ХС, будут обладать повышенной плотностью и, предположительно, лучшими осмотическими свойствами. Поэтому можно прогнозировать, что ткань, содержащая агрекан с более короткими доменами ХС, может функционально уступать и быть более восприимчивой к механическому воздействию. Однако такая закономерность соблюдается не всегда.

Исследования *VNTR* полиморфизма в популяциях России ранее не проводились. В числе первых нозологий, при которых изучена роль *VNTR* полиморфизма гена *ACAN*, были боль в спине и дегенеративные поражения межпозвоночных дисков. Результаты этих исследований обобщены в двух метаанализах. В одном из них, проведенном J. Gu с коллегами (2013), использованы данные 965 больных с дегенеративными поражениями межпозвоночных дисков и 982 человек контрольной группы из восьми исследований. Все обследованные были разделены на три

группы, в зависимости от количества повторов локуса *VNTR* – «короткие» аллели (13–25 повторов), «нормальные» (26–27 повторов) и «длинные» (28–32 повторов). Короткие аллели увеличивали риск развития заболевания на 56 % в целом (OR 1.54; $p = 0.03$) и до 65 % у пациентов азиатской этнической группы (OR = 1.65; $p = 0.004$). Анализ европеоидов не выявил статистически значимых ассоциаций. В другом метаанализе, опубликованном годом ранее, G. Xu с коллегами (2012) проводили сравнение между пациентами с малым (менее 23 и 25) и большим числом повторов. Короткие аллели увеличивали риск развития заболевания как в целом по популяции, так и при делении, в зависимости от этнической принадлежности.

T.V. de Souza с коллегами (2008) выявили ассоциацию коротких аллельных вариантов локуса *VNTR* с развитием ревматоидного артрита. Значение «аллельного индекса» – средней длины двух аллелей – в группе контроля статистически значимо превышало таковое у пациентов с ревматоидным артритом (53.7 и 52.7 соответственно, $p = 0.001$).

Изучение влияния локуса *VNTR* гена *ACAN* на развитие OA началось в конце 20-го века. По результатам работ W.E. Horton с коллегами (1998), в выборке из 93 мужчин (от 60 лет и старше) наличие аллеля *27 было ассоциировано с OA кистей (OR = 3.23), но не было обнаружено статистически значимой связи между аллелем *27 и OA других локализаций, что частично согласуется с полученной нами ассоциацией аллеля *27 с OA в целом, а также с OA коленных суставов и полиостеоартрозом.

В исследовании O.P. Kämäräinen с коллегами (2006), включавшем 630 женщин финской популяции от 45 до 60 лет, напротив, аллель *27 был протективным в развитии OA кистей рук. Аллельные варианты с большим количеством повторов (28–34) в гомозиготном состоянии увеличивали риск развития патологии ($p = 0.036$; OR = 1.73), что противоречит результатам наших исследований. P.J. Roughley с коллегами (2006) не обнаружили статистической связи между аллелем *27 и OA у 63 мужчин и женщин европейского происхождения с OA тазобедренных суставов, что подтверждают и наши результаты.

Исследование 134 близнецов К.М. Kirk с коллегами (2003) показало незначительный протективный эффект аллелей *25 и *26 для развития гонартроза и *28 для развития коксартроза, что также не противоречит нашим данным.

По результатам секвенирования и сравнения с результатами К.Д. Доеге с коллегами (1997), нами был обнаружен уже известный полиморфизм в 17-м и 18-м кодонах каждого повтора, встречающийся во всех трех гомозиготных исследованных образцах, содержащих 19 и 26 повторов внутри каждого аллеля. Наши исследования подтверждают также описанный ранее аминокислотный полиморфизм, поскольку замена первого или последнего нуклеотида 18-го или 19-го кодона приводит к чередованию аминокислот Thr/Ser/Ala.

Таким образом, полученные нами результаты являются ценным вкладом в представления о роли полиморфного локуса *VNTR* гена *ACAN* при нарушении структуры и функции соединительной ткани и хряща. Ассоциация аллеля *27 и его гомозиготного генотипа с развитием патологии суставов демонстрирует неоднозначность суждения о влиянии длины белковой молекулы на морфофункциональные характеристики суставного хряща и соединительной ткани в целом. Вероятно, этот аллельный вариант и его белковый продукт могут обладать повышенным сродством к воздействию протеолитических ферментов, отвечающих за катаболизм межклеточного матрикса соединительной ткани. Для окончательного установления роли *VNTR* полиморфизма гена *ACAN* в развитии заболеваний соединительной ткани в целом и ОА в частности необходимы проведение исследований в популяциях разных регионов и различного происхождения, а также анализ гено-фенотипических корреляций и морфофункциональных особенностей хряща у лиц с варьируемыми аллельными вариантами *VNTR* полиморфизма гена *ACAN*.

Acknowledgement

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 16-04-01487a, and the Federal Agency for Scientific Organizations, program for supporting bioresource collections.

Experiments were performed with the equipment of the Agidel' Shared Access Center and the unique KODINK research facility.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Земцовский Э.В. Недифференцированные дисплазии соединительной ткани. Попытка нового осмысления концепции. Мед. вестн. Север. Кавказа. 2008;2(10):8-14. [Zemtsovsky E.V. Undifferentiated connective tissue dysplasiae. Attempt of a new interpretation of the concept. Meditsinskiy Vestnik Severnogo Kavkaza = Medical Journal of the North Caucasus. 2008;2(10):8-14. (in Russian)]
Кадурина Т.И., Аббакумова Л.Н. Оценка степени тяжести недифференцированной дисплазии соединительной ткани у детей. Мед. вестн. Север. Кавказа. 2008;2(10):15-20. [Kadurina T.I., Abbakumova L.N. Assessment of the severity of undifferentiated connective tissue dysplasia in children. Meditsinskiy Vestnik Severnogo Kavkaza = Medical Journal of the North Caucasus. 2008;2(10):15-20. (in Russian)]

Кадурина Т.И., Горбунова В.Н. Дифференцированная и недифференцированная дисплазия соединительной ткани. Дисплазия соединительной ткани: руководство для врачей. СПб.: ЭЛБИ, 2009;704. [Kadurina T.I., Gorbunova V.N. Differentiated and undifferentiated connective tissue dysplasia. Connective Tissue Dysplasia: a Guide for Doctors. St. Petersburg: ELBI Publ., 2009;704. (in Russian)]
Насонова В.А., Астапенко М.Г. Клиническая ревматология. Руководство для врачей. М.: Медицина, 1989;592. [Nasonova V.A., Astapenko M.G. Clinical Rheumatology. A Guide for Doctors. Moscow: Meditsyna Publ., 1989;592. (in Russian)]
Нечаева Г.И., Яковлев В.М., Конев В.П., Друк И.В., Морозов С.Л. Дисплазия соединительной ткани: основные клинические синдромы, формулировка диагноза, лечение. Лечащий врач. 2008; 2:22-28. [Nechaeva G.I., Yakovlev V.M., Konev V.P., Druk I.V., Morozov S.L. Connective tissue dysplasia: basic clinical syndromes, diagnosis formulation, treatment. Lechaschiy Vrach = Therapist. 2008;76-80. (in Russian)]
Тябук Т.Д., Каратыш О.М. Недифференцированная дисплазия соединительной ткани. Современная ревматология. 2009;2:19-23. [Tyabut T.D., Karatysh O.M. Undifferentiated connective tissue dysplasia. Sovremennaya Revmatologiya = Modern Rheumatology. 2009;2:19-23. (in Russian)]
Яковлев В.М., Нечаева Г.И. Системные дисплазии соединительной ткани: актуальность проблемы в клинике внутренних болезней. Сиб. мед. журн. 2011;26:9-13. [Yakovlev V.M., Nechaeva G.I. Systemic dysplasia of connective tissue: the clinical significance of the problem for internal diseases. Sibirskiy Meditsinskiy Zhurnal = Siberian Medical Journal. 2011;26:9-13. (in Russian)]
Brandt K.D., Dieppe P., Radin E. Etiopathogenesis of osteoarthritis. Med. Clin. North. Am. 2009;93(1):1-24. DOI 10.1016/j.mcna.2008.08.009.
de Souza T.B., Mentz E.F., Brenol C.V., Xavier R.M., Brenol J.C., Chies J.A., Simon D. Association between the aggrecan gene and rheumatoid arthritis. J. Rheumatol. 2008;35(12):2325-2328. DOI 10.3899/jrheum.071326.
Doege K.J., Coulter S.N., Meek L.M., Maslen K., Wood J.G. A Human-specific Polymorphism in the Coding Region of the Aggrecan Gene variable number of tandem repeats produce a range of core protein sizes in the general population. The Journal of Biological Chemistry. 1997;272(21):13974-13979. PMID:9153261.
Doege K.J., Sasaki M., Kimura T., Yamada Y. Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. J. Biol. Chem. 1991;266:894-902. PMID: 1985970.
Gibson B.G., Briggs M.D. The aggrecanopathies; an evolving phenotypic spectrum of human genetic skeletal diseases. Orphanet J. Rare Dis. 2016;11:86. DOI 10.1186/s13023-016-0459-2.
Gu J., Guan F., Guan G., Xu G., Wang X., Zhao W., Ji Y., Yan J. Aggrecan variable number of tandem repeat polymorphism and lumbar disc degeneration: a meta-analysis. Spine (Phila Pa 1976). 2013; 38(25):E1600-E1607. DOI 10.1097/BRS.0000000000000012.
Hardingham T.E. The role of link-protein in the structure of cartilage proteoglycan aggregates. Biochem. J. 1979;177:237-247. PMC1186361.
Horton W.E., Lethbridge-Cejku M., Hochberg M.C., Balakir R., Precht P., Plato C.C., Tobin J.D., Meek L., Doege K. An association between an aggrecan polymorphic allele and bilateral hand osteoarthritis in elderly white men: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA) Osteoarthritis Cart. 1998;6(4):245-251. PMID: 9876393.
Kawaguchi Y., Osada R., Kanamori M., Ishihara H., Ohmori K., Matsui H., Kimura T. Association between an aggrecan gene polymorphism and lumbar disc degeneration. Spine. (Phila Pa 1976). 1999; 24(23):2456-2460.
Kämäräinen O.P., Solovieva S., Vehmas T., Luoma K., Leino-Arjas P., Riihimäki H., Ala-Kokko L., Männikkö M. Aggrecan core protein of

- a certain length is protective against hand osteoarthritis. *Osteoarthritis*. 2006;14(10):1075-1080. DOI 10.1016/j.joca.2006.04.005.
- Kirk K.M., Doege K.J., Hecht J., Bellamy N., Martin N.G. osteoarthritis of the hands, hips and knees in an Australian twin sample – evidence of association with the aggrecan *VNTR* polymorphism. *Twin Res.* 2003;6(1):62-66. PMID: 12626230.
- Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. *Methods Mol. Biol.* 1985;2:31-34. DOI 10.1385/0-89603-064-4:31.
- Miller M.P. RxC: A Program for the Analysis of Contingency Tables via the Metropolis Algorithm Computer. Department of Biological Sciences. Northern Arizona University: Flagstaff, 1997. <http://www.marksgeneticssoftware.net/rxc.htm>.
- Mort J.S., Geng Y., William D., Fisher W.D., Roughley P.J. Aggrecan heterogeneity in articular cartilage from patients with osteoarthritis. *BMC Musculoskelet. Disord.* 2016;17:89. DOI 10.1186/s12891-016-0944-8.
- Musumeci G., Aiello F.C., Szychlinska M.A., Di Rosa M., Castrogiovanni P., Mobasher A. Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(3):6093-6112. DOI 10.3390/ijms16036093.
- Reynard L.N., Loughlin J. The genetics and functional analysis of primary osteoarthritis susceptibility. *Expert Rev. Mol. Med.* 2013;15:e2. DOI 10.1017/erm.2013.4.
- Rodriguez E., Roland S.K., Plaas A., Roughley P.J. The glycosaminoglycan attachment regions of human aggrecan. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(27):18444-18450. DOI 10.1074/jbc.M512531200.
- Roughley P., Martens D., Rantakokko J., Alini M., Mwale F., Antoniou J. The involvement of aggrecan polymorphism in degeneration of human intervertebral disc and articular cartilage. *Eur. Cell Mater.* 2006;11:1-7. DOI 10.22203/eCM.v011a01.
- Roughley P.J., Mort J.S. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *J. Exp. Orthop.* 2014;1:8. DOI 10.1186/s40634-014-0008-7.
- Ryder J.J., Garrison K., Song F., Hooper L., Skinner J., Loke Y., Loughlin J., Higgins J.P., MacGregor A.J. Genetic associations in peripheral joint osteoarthritis and spinal degenerative disease: A systematic review. *Ann. Rheum. Dis.* 2008;67:5584-5591. DOI 10.1136/ard.2007.073874.
- Steinberg J., Zeggini E. Functional genomics in osteoarthritis: Past, present, and future. *J. Orthop. Res.* 2016;7:1105-1110. DOI 10.1002/jor.23296.
- Urban J.P.G., Maroudas A., Bayliss M.T., Dillon J. Swelling pressures of proteoglycans at the concentrations found in cartilaginous tissues. *Biorheology.* 1979;16:447-464. DOI 10.3233/BIR-1979-16609.
- Wang T., Liang Y., Li H., Li H., He Q., Xue Y., Shen C., Zhang C., Xiang J., Ding J., Qiao L., Zheng Q. Single nucleotide polymorphisms and osteoarthritis: an overview and a meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(7):1-13. DOI 10.1097/MD.0000000000002811.
- Xu G., Mei Q., Zhou D., Wu J., Han L. Vitamin D receptor gene and aggrecan gene polymorphisms and the risk of intervertebral disc degeneration – a meta-analysis. *PLoS One.* 2012;7(11):e50243. DOI 10.1371/journal.pone.0050243.

ORCID ID

- D.A. Shapovalova orcid.org/0000-0002-0921-4684
A.V. Tyurin orcid.org/0000-0002-0841-3024
S.S. Litvinov orcid.org/0000-0002-5999-149X
E.K. Khusnutdinova orcid.org/0000-0003-2987-3334
R.I. Khusainova orcid.org/0000-0002-8643-850X