

Ассоциация полиморфизмов промоторных участков генов *MMP2*, *MMP3* и *MMP9* с факторами сердечно-сосудистого риска у больных ревматоидным артритом

Омельченко В.О.¹, Летагина Е.А.¹, Шевченко А.В.¹, Коненков В.И.¹, Поспелова Т.И.², Королев М.А.¹

¹НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск)

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Association of polymorphisms in the promoter regions of *MMP2*, *MMP3* and *MMP9* genes with cardiovascular risk factors in patients with rheumatoid arthritis

Omelchenko V.O.¹, Letyagina E.A.¹, Shevchenko A.V.¹, Konenkov V.I.¹, Pospelova T.I.², Korolev M.A.¹

¹Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk)

²Novosibirsk State Medical University

АННОТАЦИЯ

С целью изучения ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов промоторных участков генов *MMP2*, *MMP3* и *MMP9* с факторами сердечно-сосудистого риска и поражением каротидных артерий у больных ревматоидным артритом (РА) были обследованы 212 больных РА (181 женщина, 31 мужчина; средний возраст — 58.0 года) с умеренной и высокой активностью заболевания (средняя оценка по DAS28 — 4.96). В ходе исследования устанавливались традиционные и связанные с течением воспалительной артропатии факторы сердечно-сосудистого риска; проводилось генотипирование с определением однонуклеотидных полиморфизмов *MMP3* 5A-1171 6A (rs3025058), *MMP9* C-1562T (rs3918242), *MMP2* C-1306T (rs2438650). С помощью ультразвуковой доплерографии брахиоцефальных артерий выявляли атеросклеротические бляшки (АБ).

У больных с генотипом *MMP9* -1562TT АБ встречались чаще, чем у носителей дикого аллеля С (71.4 % против 26.3 %, $p = 0.022$), и эта ассоциация сохранялась даже после корректировки по возрасту и полу. Генотип *MMP2* -1306TT встречался у 18.6 % больных с АБ в сравнении с 7.9 % у больных без бляшки ($p = 0.025$), но после коррекции по возрасту и полу данные различия нивелировались ($p = 0.14$).

Таким образом, выявлены отличия встречаемости различных генотипов *MMP2* и *MMP9* в зависимости от наличия АБ у больных РА, что свидетельствует о возможном влиянии этих полиморфизмов на поражение каротидных артерий и формирование предрасположенности к развитию сердечно-сосудистых событий.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, сердечно-сосудистые заболевания, факторы риска, атеросклероз, константные генетические маркеры, rs3025058, rs3918242, rs2438650.

ABSTRACT

In order to study the association of single-nucleotide polymorphisms in the promoter regions of *MMP2*, *MMP3* and *MMP9* genes with cardiovascular risk factors and carotid artery lesions in patients with rheumatoid arthritis (RA) 212 patients with RA (181 women, 31 men; mean age — 58.0 years) with moderate and high disease activity were examined (average DAS28 score — 4.96). The study established traditional and associated with the course of inflammatory arthropathy cardiovascular risk factors; genotyping was carried out with the definition of single-nucleotide polymorphisms *MMP3* 5A-

Поступила 18.02.2019
Принята 24.02.2019

*Автор, ответственный за переписку
Омельченко Виталий Олегович: НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН». 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.
E-mail: v.o.omelchenko@gmail.com

Received 18.02.2019
Accepted 24.02.2019

*Corresponding author
Omelchenko Vitaly Olegovich: Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, 2, Timakova Str, 630117, Novosibirsk, Russia.
E-mail: v.o.omelchenko@gmail.com

1171 6A (rs3025058), *MMP9* C-1562T (rs3918242), *MMP2* C-1306T (rs2438650). Atherosclerotic plaques were detected by ultrasound dopplerography of brachiocephalic arteries.

In patients with the *MMP9* -1562TT genotype atherosclerotic plaques were more common than in carriers of wild-type allele C (71.4 % vs. 26.3 %, $p = 0.022$), and this association remained even after adjustment by age and sex. The *MMP2* -1306TT genotype was found in 18.6 % of patients with AB compared to 7.9 % in patients without plaque ($p = 0.025$), but after correction by age and sex these differences were leveled ($p = 0.14$).

Thus, the differences in the occurrence of different *MMP2* and *MMP9* genotypes depending on the presence of AB in RA patients were revealed, which indicates the possible impact of these polymorphisms on the carotid arteries damage and the formation of a predisposition to the development of cardiovascular diseases.

Keywords: rheumatoid arthritis, cardiovascular diseases, risk factors, atherosclerosis, constant genetic markers, rs3025058, rs3918242, rs2438650.

ВВЕДЕНИЕ

Ревматоидный артрит (РА) — аутоиммунное ревматическое заболевание, характеризующееся хроническим эрозивным артритом (синовитом) и системным поражением внутренних органов. Смертность у больных РА превышает общепопуляционную, что связывают с форсированным течением атеросклероза на фоне хронического воспаления [1]. Развитие как самого РА, так и сердечно-сосудистой патологии происходит на основе интегральных взаимодействий генетических особенностей организма и факторов внешней среды. Однонуклеотидные полиморфизмы (single nucleotide polymorphisms, SNPs) в промоторных регионах генов могут значимо влиять на уровень экспрессии, тем самым формируя наличие предрасположенности к тому или иному ответу на воздействие. В связи с этим поиск константных генетических маркеров остается актуальной задачей превентивной и персонализированной медицины.

Одним из возможных механизмов, лежащих в основе патологического процесса в стенке сосуда, может быть нарушение ремоделирования соединительной ткани, в регуляции которого немаловажную роль играют матриксные металлопротеиназы. Матриксные металлопротеиназы (matrix metalloproteinases, MMPs) — семейство цинк-зависимых эндопептидаз, ответственных за расщепление белков, чаще внеклеточного матрикса [2]. У человека обнаружено 24 гена, кодирующих 23 MMPs. В норме их продукция в покое клетками иммунной системы находится на низком уровне. Подавляющее большинство MMPs продуцируются в виде неактивных ферментов, что предотвращает спонтанное повреждение окружающего матрикса, а их активация осуществляется соответствующими протеазами. Экспрессию, секрецию и активацию MMPs усиливают воспалительные цитокины и хемокины. Даже после перехода в активное состояние MMPs могут быть ингибированы соответствующими инги-

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune rheumatic disease characterized by chronic erosive arthritis (synovitis) and systemic damage to the internal organs. Mortality in patients with RA exceeds the general population, which is associated with forced atherosclerosis on the background of chronic inflammation [1]. The development of both RA and cardiovascular pathology is based on the integral interactions of genetic characteristics of the organism and environmental factors. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the promoter regions of genes can significantly affect the level of expression, thereby forming the presence of a predisposition to a particular response to the impact. In this regard, the search for constant genetic markers remains an urgent task of preventive and personalized medicine.

One of the possible mechanisms underlying the pathological process in the vessel wall may be a violation of connective tissue remodeling, in the regulation of which matrix metalloproteinases play an important role. Matrix metalloproteinases (MMPs) belong to the family of zinc-dependent endopeptidases responsible for the cleavage of proteins, more often than extracellular matrix [2]. In humans, 24 genes encoding 23 MMPs were found. Normally, their production at rest by cells of the immune system is at a low level. The vast majority of MMPs are produced in the form of inactive enzymes, which prevents spontaneous damage to the surrounding matrix, and their activation is carried out by the corresponding proteases. The expression, secretion and activation of MMPs are enhanced by inflammatory cytokines and chemokines. Even after the transition to the active state, MMPs can be inhibited by appropriate inhibitors (tissue inhibitor of metalloproteinases — TIMP), which are actively expressed by unstimulated peripheral blood monocytes, B- and T-cells [3]. On the one hand, MMPs prevent intima thickening at an early stage of atheroscle-

биторами (tissue inhibitor of metalloproteinases – TIMP), которые активно экспрессируются нестимулированными моноцитами периферической крови, В- и Т-клетками [3]. С одной стороны, MMPs препятствуют утолщению интимы на ранней стадии формирования атеросклеротической бляшки (АСБ), а с другой — способствуют разрушению внеклеточного матрикса, что приводит к разрыву бляшки [4].

Матриксная металлопротеиназа – 2 (MMP2, желатиназа А) активна в отношении коллагена IV типа, основного компонента базальных мембран. Основные исследования были направлены на изучение ее участия в инвазии клеток при опухолевых процессах, артрите и атерогенезе, миграции и пролиферации гладкомышечных клеток сосудов. «Нокаутирование» MMP2 у мышей может как уменьшать образование интимы в сосудах, так и защищать от образования аневризм, что характеризует двойные возможности металлопротеиназы в зависимости от микроокружения. Для MMP2 показано, что SNP *MMP2 C-1306T* (rs2438650) приводит к повреждению Sp1-связывающего сайта и снижению транскрипционной активности [5]. В АСБ содержание MMP2 выше, чем в неповрежденном сосудах, при этом ее уровень больше в стабильной бляшке. Также количество MMP2 в крови увеличивается после инфаркта миокарда [4], и уже описано участие MMP2 в течении процесса ишемии-реперфузии [2].

Матриксная металлопротеиназа – 3 (MMP3, стромелизин-1) обладает широким спектром биологической активности. Секреция ее осуществляется преимущественно клетками соединительной ткани. Полиморфизм *MMP3 5A-1171 6A* (rs3025058), заключающийся в инсерции аденозина, приводит к двукратному снижению экспрессии соответствующего продукта [6]. Аллель, связанный с высокой экспрессией, ассоциирован с меньшей встречаемостью ишемической болезни сердца, но с большим числом инфарктов, что может быть обусловлено развитием нестабильных бляшек. Уровень MMP3 в крови является предиктором неблагоприятного исхода после острого инфаркта миокарда. В целом, в связи с корреляцией с уровнем С-реактивного белка, содержание MMP3 в крови может отражать общее провоспалительное состояние [7]. Также ранее были показаны значимые ассоциации генотипа 5A5A с наличием каротидного атеросклероза у мужчин [8].

Матриксная металлопротеиназа – 9 (MMP9, желатиназа В) участвует в деградации коллагена IV типа, наряду с MMP2. В противовес MMP2 данная металлопротеиназа наиболее часто экс-

ротич plaque (AP) formation, and on the other hand, contribute to the destruction of the extracellular matrix, which leads to plaque rupture [4].

Matrix metalloproteinase – 2 (MMP2, gelatinase A) is active against IV type collagen, the main component of the basal membranes. The main studies were aimed at studying its participation in cell invasion in tumor processes, arthritis and atherogenesis, migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. MMP2 “knockout” in mice can both reduce the formation of intima in the vessel, and protect against the formation of aneurysms, which characterizes the dual possibilities of metalloproteinase depending on the microenvironment. For MMP2 was shown that SNP *MMP2 C-1306T* (rs2438650) causes damage to the Sp1-binding site and reduced transcriptional activity [5]. The content of MMP2 in AP is higher than in an intact vessel, while its level is higher in a stable plaque. The amount of MMP2 in the blood also increases after myocardial infarction [4], and the involvement of MMP2 during the ischemia-reperfusion process has been described [2].

Matrix metalloproteinase – 3 (MMP3, stromelysin-1) has a broad spectrum of biological activity. Its secretion is carried out mainly by connective tissue cells. Polymorphism of *MMP3 5A-1171 6A* (rs3025058), consisting in the insertion of adenosine, leads to a twofold decrease in the expression of the corresponding product [6]. Allele associated with high expression is associated with a lower incidence of coronary heart disease, but with a large number of infarctions, which may be due to the development of unstable plaques. MMP3 levels in the blood are a predictor of adverse outcomes after acute myocardial infarction. In general, due to the correlation with the level of C-reactive protein, the MMP3 content in the blood may reflect the general proinflammatory state [7]. Also previously significant association of the 5A5A genotype with the presence of carotid atherosclerosis in men has been shown [8].

Matrix metalloproteinase – 9 (MMP9, gelatinase B) is involved in the degradation of IV type collagen, along with MMP2. In contrast to MMP2, this metalloproteinase is most often expressed by leukocytes and their predecessors. The highest levels of MMP9 were recorded in the field of accumulation of foam cells and “shoulders” of AP. Polymorphism in the *MMP9 C-1562T* (rs3918242) is associated with predisposition to pathology of the coronary vessels and the severity of their lesions. The association of arterial wall stiffness with this polymorphism was

прессуруется лейкоцитами и их предшественниками. Самые высокие уровни MMP9 зарегистрированы в области накопления пенистых клеток и «плечах» АСБ. Полиморфизм *MMP9 C-1562T* (rs3918242) связан с предрасположенностью к патологии коронарных сосудов и с тяжестью их поражения. Также была показана ассоциация жесткости артериальной стенки с указанным полиморфизмом, а у пациентов с гипертонической болезнью с аллелем *T* повышен риск сердечно-сосудистых событий. В целом, согласно литературным данным, носители аллеля *T* демонстрируют увеличение экспрессии MMP9 [7].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить ассоциацию однонуклеотидных полиморфизмов промоторных участков генов *MMP2*, *MMP3* и *MMP9* с факторами сердечно-сосудистого риска и поражением каротидных артерий у больных ревматоидным артритом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 212 больных ревматоидным артритом. Диагноз был поставлен на основании критериев ACR 1987 г. и/или ACR/EULAR 2010 г. Исследование одобрено Комитетом по этике ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» (протокол № 79 от 19.11.2015). Все больные предварительно подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Клиническая характеристика группы больных РА представлена в табл. 1.

Всем пациентам проведена оценка частоты встречаемости традиционных и ассоциированных с воспалительной активностью факторов риска. В качестве суррогатного маркера атеросклероза использовался метод выявления атеросклеротической бляшки с помощью триплексного сканирования (в В-режиме с цветовым доплеровским картированием и импульсно-волновой доплерографией) брахиоцефальных артерий. Исследование выполнялось на ультразвуковом аппарате Vivid 7 Dimension (производитель — General Electric). Применялся линейный датчик с частотой 7–12 МГц. Проводилось измерение толщины комплекса интима — медиа (КИМ) по задней стенке общей сонной артерии. АСБ верифицировалась при наличии локального утолщения КИМ более 1.5 мм. Полиморфизмы *MMP3 5A-1171 6A* (rs3025058), *MMP9 C-1562T* (rs3918242) определяли с помощью анализа длин рестрикционных фрагментов, а *MMP2 C-1306T* (rs2438650) — с использованием метода ПЦР в реальном времени.

also shown, and in patients with hypertension with *T* allele the risk of cardiovascular events was increased. In general, according to the literature data, *T* allele carriers show an increase in MMP9 expression [7].

AIM OF THE RESEARCH

To study the association of single-nucleotide polymorphisms of promoter regions of *MMP2*, *MMP3* and *MMP9* genes with cardiovascular risk factors and carotid artery lesions in patients with rheumatoid arthritis.

MATERIALS AND METHODS

The study involved 212 patients with rheumatoid arthritis. The diagnosis was based on the 1987 ACR and/or ACR/EULAR 2010 criteria. The study was approved by the Ethics Committee of the Novosibirsk State Medical University (Protocol No. 79 from 19.11.2015). All patients previously signed a voluntary informed consent to participate in the study. The clinical characteristics of the group of RA patients are presented in Table 1.

All patients were assessed the frequency of occurrence of traditional and associated with inflammatory activity risk factors. As a surrogate marker of atherosclerosis, the method of detection of atherosclerotic plaques using triplex scanning (in B-mode with color Doppler mapping and pulse wave dopplerography) of brachiocephalic arteries was used. The study was performed on the ultrasound machine Vivid 7 Dimension (manufacturer — “General Electric”). A linear sensor with a frequency of 7-12 MHz was used. Intima — media complex (IMC) thickness was measured along the posterior wall of the common carotid artery. AP was verified in the presence of more than 1.5 mm local IMC thickenings. Polymorphisms *MMP3 5A-1171 6A* (rs3025058), *MMP9 C-1562T* (rs3918242) was determined by analysis of the lengths of restriction fragments, and *MMP2 C-1306T* (rs2438650) — using the PCR method of real-time.

Statistical processing of the data was carried out using the program SPSS Statistics (version 20.0). The nature of the distribution of features in the test using a single-sample Kolmogorov — Smirnov test in most cases did not correspond to the normal, and therefore non-parametric methods of evaluation were used for statistical processing of the data. Data description is presented as median, 25th and 75th quartile intervals. Statistical significance of inter-group differences was assessed using Mann — Whitney criteria for independent samples (for quantita-

Таблица 1. Клиническая характеристика группы обследуемых больных
Table 1. Clinical characteristics of the group of examined patients

Параметры / Characteristics	Значение / Value
Женщины / Women, <i>n</i> (%)	181 (85.4)
Мужчины / Men, <i>n</i> (%)	31 (14.6)
Возраст, лет / Age, years <i>Me</i> [25-й; 75-й перцентили / 25 th ; 75 th percentile]	58.0 [48.3; 65.0]
Возраст дебюта РА, лет / The age of the onset of RA, years <i>Me</i> [25-й; 75-й перцентили / 25 th ; 75 th percentile]	47.0 [33.0; 57.0]
Длительность заболевания РА, лет / The RA disease duration, years <i>Me</i> [25-й; 75-й перцентили / 25 th ; 75 th percentile]	7.0 [3.0; 15.0]
Больные с внесуставными проявлениями РА / Patients with extra-articular manifestations of RA, <i>n</i> (%)	80 (37.7)
Ревматоидные узелки / Rheumatoid nodules, <i>n</i> (%)	39 (18.4)
Серопозитивные по РФ / RF seropositive, <i>n</i> (%)	194 (91.5)
РФ, Ед./мл RF, U/ml	237.0 [50.0; 747.8]
Позитивные по АЦЦП / АССР positive, <i>n</i> (%)	191 (90.1)
АЦЦП, Ед./мл АССР, U/ml	127.0 [38.1; 248.5]
Эрозивный артрит / Erosive arthritis, <i>n</i> (%)	184 (86.8)
Степень активности по DAS28 / The degree of activity according to DAS28 <i>Me</i> [25-й; 75-й перцентили / 25 th ; 75 th percentile]:	4.96 [3.86; 5.85]
ремиссия / remission (DAS28 < 2.6)	8 (3.77)
низкая / low (2.6 ≤ DAS28 < 3.2)	14 (6.60)
умеренная / medium (3.2 ≤ DAS28 ≤ 5.1)	100 (47.17)
высокая / high (DAS28 > 5.1)	90 (42.45)
Функциональный класс (HAQ) / Functional class (HAQ), <i>Me</i> [25-й; 75-й перцентили / 25 th ; 75 th percentile]	1.28 [0.88; 2.00]
Рентгенологическая стадия / Radiological stage, <i>n</i> (%):	
I	12 (5.7)
II	79 (37.3)
III	71 (33.5)
IV	50 (23.6)

Примечание. РФ — ревматоидный фактор; АЦЦП — антитела к циклическому цитруллинированному пептиду.
Note. RF — rheumatoid factor; АССР — cyclic citrullinated peptide antibodies.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы SPSS Statistics (версия 20.0). Характер распределения признаков при проверке с помощью одновыборочного критерия Колмогорова — Смирнова в большинстве случаев не соответствовал нормальному, в связи с чем для статистической обработки полученных данных использовались непараметрические методы оценки. Описание данных представлено в виде медианы, 25-го и 75-го квартильных интервалов. Статистическая значимость межгрупповых отличий оценивалась с помощью критериев Манна — Уитни для независимых выборок (для количественных переменных), теста χ^2 Пирсона. Использована логистическая модель со статистикой включения Вальда для оценки значимости воздействия факторов на значение бинарной переменной. Риск возникновения заболе-

тивных variables), Pearson χ^2 test. Logistic model with the statistics of the Wald inclusion was used for assessing the significance of effects of factors on the value of the binary variable. The risk of the disease was assessed based on the odds ratio (OR). Processing of the results of the genotyping included the calculation of frequencies of alleles and genotypes for the studied polymorphic positions. The frequency of genotypes was calculated by the $f = n/N$ formula, where f is the frequency of genotype in the group of subjects, n is the number of observed genotypes in this group, N is the total number of the group. The frequency of genotypes was analyzed for compliance with the Hardy — Weinberg equilibrium using the online calculator (URL: <https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg/>) based on the calculation of χ^2 criterion. The significance level (p) of dif-

вания оценивали на основании отношения шансов (ОШ). Обработка результатов генотипирования включала расчет частот аллелей и генотипов для исследуемых полиморфных позиций. Вычисление частоты встречаемости генотипов производилось по формуле $f = n/N$, где f — частота встречаемости генотипа в группе обследуемых, n — количество наблюдаемых генотипов в этой группе, N — общая численность группы. Частоты генотипов анализировались на соответствие закону Харди — Вайнберга с использованием онлайн калькулятора (URL: <https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg/>), основанного на расчете критерия хи-квадрат. Вычисление значения уровня значимости (p) различий наблюдаемых и ожидаемых частот генотипов осуществлялось также с помощью онлайн калькулятора (URL: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/pValue1/>). Число степеней свободы рассчитывалось, исходя из разности числа генотипов и аллелей и соответствовало 1 ($df = 3 - 2 = 1$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проверка распределения исследуемых генотипов на соответствие равновесию Харди — Вайнберга (табл. 2) продемонстрировало отклоне-

ния между наблюдаемыми и ожидаемыми частотами генотипов. Проверка распределения исследуемых генотипов на соответствие равновесию Харди — Вайнберга (табл. 2) продемонстрировало отклонение между наблюдаемыми и ожидаемыми частотами генотипов. Проверка распределения исследуемых генотипов на соответствие равновесию Харди — Вайнберга (табл. 2) продемонстрировало отклонение между наблюдаемыми и ожидаемыми частотами генотипов.

RESULTS AND DISCUSSION

Checking the distribution of the studied genotypes for compliance with the Hardy — Weinberg equilibrium (Table 2) demonstrated deviation for polymorphic position *MMP2 C-1306T* ($\chi^2 = 7.637$; $p = 0.006$), which may indicate the presence of disease-related selection. The differences in the frequency of occurrence of genotypes of the *MMP2* and *MMP3* in RA patients compared to healthy were shown previously [9]. The greatest allele polymorphism was observed for another position — *MMP3 5A-1171 6A*, where the observed heterozygosity was 0.4528.

The RA onset age in heterozygotes with genotype *MMP2 -1306CT* was less than in homozygotes, and was 43 years [29; 54] against 48 years [35; 58] ($p = 0.026$), while they were more common rheu-

Таблица 2. Проверка распределения генотипов матричных металлопротеиназ на равновесие Харди — Вайнберга у больных ревматоидным артритом

Table 2. Check of distribution of matrix metalloproteinases genotypes on Hardy — Weinberg equilibrium in patients with rheumatoid arthritis

Полиморфные позиции / Polymorphic positions		N.O.	N.E.	Pgen	Hobs	Hexp	χ^2	p
<i>MMP2 C-1306T</i> ($N = 211$)	C	309	—	0.7322	—	—	—	—
	T	113	—	0.2678	—	—	—	—
	CC	121	113.13	—	0.5735	0.5362	7.637*	0.006
	CT	67	82.74	—	0.3175	0.3921	7.637*	0.006
	TT	23	15.13	—	0.1090	0.0717	7.637*	0.006
<i>MMP3 5A-1171 6A</i> ($N = 212$)	5A	220	—	0.5189	—	—	—	—
	6A	204	—	0.4811	—	—	—	—
	5A5A	62	57.08	—	0.2925	0.2692	1.836	0.175
	5A6A	96	105.85	—	0.4528	0.4993	1.836	0.175
	6A6A	54	49.08	—	0.2547	0.2315	1.836	0.175
<i>MMP9 C-1562T</i> ($N = 212$)	C	355	—	0.8373	—	—	—	—
	T	69	—	0.1627	—	—	—	—
	CC	150	148.61	—	0.7076	0.7010	0.488	0.485
	CT	55	57.77	—	0.2594	0.2725	0.488	0.485
	TT	7	5.61	—	0.0330	0.0265	0.488	0.485

Примечания: N.O. и N.E. — наблюдаемая и ожидаемая численности генотипов; Pgen — частота аллельного варианта гена в долях единицы; Hobs и Hexp — наблюдаемая и ожидаемая частоты генотипов; * $p < 0.01$.

Notes: N.O. and N.E. — observed and expected number of genotypes; Pgen — frequency of allelic variant of gene in fractions of one; Hobs and Hexp — observed and expected frequency of genotypes; * $p < 0.01$.

ние для полиморфной позиции *MMP2 C-1306T* ($\chi^2 = 7.637$; $p = 0.006$), что может свидетельствовать о наличии отбора, связанного с заболеванием. Ранее были показаны различия в частоте встречаемости генотипов *MMP2* и *MMP3* у больных РА по сравнению со здоровыми [9]. Наибольший аллельный полиморфизм отмечался для другой позиции — *MMP3 5A-1171 6A*, где наблюдаемая гетерозиготность составила 0.4528.

Возраст дебюта РА у гетерозигот с генотипом *MMP2 -1306CT* был меньше, чем у гомозигот, и составил 43 года [29; 54] против 48 лет [35; 58] ($p = 0.026$), при этом у них чаще встречались ревматоидные узелки (у 18 (26.9 %) чел. против 21 (14.6 %), $p = 0.032$). Гомозиготы *MMP2 -1306TT* с РА были старше по возрасту (64 года [55; 70] против 57 лет [48; 65], $p = 0.042$), имели более высокие значения общего холестерина (5.53 ммоль/л [5.08; 6.26] против 4.97 ммоль/л [4.22; 5.69], $p = 0.007$), холестерина липопротеинов низкой плотности (3.63 ммоль/л [3.06; 4.08] против 3.05 ммоль/л [2.41; 3.77], $p = 0.019$), скорости оседания эритроцитов (35 мм/ч [27.0; 45.0] против 27.5 мм/ч [16.5; 43.0], $p = 0.047$), чем носители аллеля C.

У больных РА с различными генотипами *MMP3 5A-1171 6A* были отличия по возрасту дебюта заболевания (*MMP3 -1171 5A5A* — 50.5 года [39.0; 60.0], *MMP3 -1171 5A6A* — 44.5 года [33.0; 56.5], *MMP3 -1171 6A6A* — 46.5 года [26.0; 55.0], $p = 0.040$). Более значимые различия были выявлены у пациентов без инсерции A с генотипом *MMP3 -1171 5A5A*: по возрасту дебюта РА они были старше, и различие более значимо (50.5 года [39.0; 60.0] против 45.0 года [31.0; 55.0], $p = 0.012$), при этом внесуставные проявления у них встречались в 27.4 % случаев против 42.0 % в оппозиционной группе ($p = 0.046$). В частности, ревматоидные узелки были выявлены у 6 (9.7 %) больных против 33 (22.0 %) ($p = 0.035$). У больных РА с генотипом *MMP3 -1171 6A6A* реже встречалась артериальная гипертония (у 27 (50 %) против 105 (66.5 %), $p = 0.031$), причем среди этих пациентов было больше мужчин (13 (24.1 %) против 18 (11.4 %), $p = 0.023$). Таким образом, у пациентов с инсерцией отмечалась двойственная ситуация: с одной стороны, возраст дебюта РА был меньше, больше частота внесуставных проявлений, с другой — реже встречаемость АГ.

Поражение каротидных артерий в виде формирования атеросклеротической бляшки было выявлено у 59 больных (27.8 %). Чаще оно обнаруживалось у мужчин ($\chi^2 = 10.23$; $p = 0.001$) и в основном было связано с возрастом — медиана

matoid nodules (18 (26.9 %) against 21 (14.6 %), $p = 0.032$). *MMP2 -1306TT* homozygotes with RA were older in age (64 years [55; 70] vs. 57 years [48; 65], $p = 0.042$), had higher values of total cholesterol (5.53 mmol/l [5.08; 6.26] vs. 4.97 mmol/l [4.22; 5.69], $p = 0.007$), low density lipoprotein cholesterol (3.63 mmol/l [3.06; 4.08] vs. 3.05 mmol/l [2.41; 3.77], $p = 0.019$), erythrocyte sedimentation rate (35 mm/h [27.0; 45.0] vs. 27.5 mm/h [16.5; 43.0], $p = 0.047$), than allele C carriers.

In RA patients with different *MMP3 5A-1171 6A* genotypes there were differences in age of disease onset (*MMP3 -1171 5A5A* — 50.5 years [39.0; 60.0], *MMP3 -1171 5A6A* — 44.5 years [33.0; 56.5], *MMP3 -1171 6A6A* — 46.5 years [26.0; 55.0], $p = 0.040$). More significant differences were found in patients without A insertion with the *MMP3 -1171 5A5A* genotype: they were older in age of the onset of RA and the difference was more significant (50.5 years [39.0; 60.0] vs. 45.0 years [31.0; 55.0], $p = 0.012$), while extra-articular manifestations were found in 27.4 % of cases against 42.0 % in the opposition group ($p = 0.046$). In particular, rheumatoid nodules were found in 6 (9.7 %) patients vs. 33 (22.0 %) ($p = 0.035$). In RA patients with the genotype *MMP3 -1171 6A6A*, arterial hypertension was less common (27 (50 %) vs. 105 (66.5 %), $p = 0.031$), and among these patients there were more men (13 (24.1 %) vs. 18 (11.4 %), $p = 0.023$). Thus, in patients with insertion there was a dual situation: on the one hand, the age of the onset of RA was less, the frequency of extra-articular manifestations was more, on the other — the incidence of hypertension was less.

The lesions of the carotid arteries in the formation of atherosclerotic plaques were detected in 59 patients (27.8 %). It was found more often in men ($\chi^2 = 10.23$; $p = 0.001$) and was mainly associated with age — the median age of patients with the presence of AP was significantly higher than in patients without AP (66 years [59; 73] vs. 55 years [42; 61], $p < 0.001$).

The greatest association with the presence of AP was shown by polymorphism of *MMP-9* gene at the point -1562 (Table 3). AP were detected in 42 (28.0 %) patients with CC genotype, 12 (21.8 %) carriers of CT genotype, 5 (71.4 %) carriers of TT genotype ($p = 0.022$). Interestingly, all 5 plaques in TT genotype carriers formed stenosis of different severity. With the additional inclusion of gender and age in the logistics model, these differences have retained their importance. Thus, after correction by sex and age, a significant association of the *MMP9 -1562TT*

Таблица 3. Встречаемость атеросклеротической бляшки у больных ревматоидным артритом с различными генотипами *MMP2*, *MMP3* и *MMP9***Table 3.** Occurrence of atherosclerotic plaque in patients with rheumatoid arthritis with different genotypes *MMP2*, *MMP3* и *MMP9*

Полиморфные позиции / Polymorphic positions		Отсутствие АСБ / The lack of AP		Наличие АСБ / The presence of AP		p
		n	%	n	%	
<i>MMP2</i> C-1306T (N = 211)	CC	89	58.6	32	54.2	0.074
	CT	51	33.6	16	27.1	0.074
	TT	12	7.9	11	18.6	0.074
<i>MMP3</i> 5A-1171 6A (N = 212)	5A5A	42	27.5	20	33.9	0.65
	5A6A	71	46.4	25	42.4	0.65
	6A6A	40	26.1	14	23.7	0.65
<i>MMP9</i> C-1562T (N = 212)	CC	108	70.6	42	71.2	0.022*
	CT	43	28.1	12	20.3	0.022*
	TT	2	1.3	5	8.5	0.022*

* $p < 0.05$.

возраста больных с наличием АСБ была значимо больше, чем у больных без АСБ (66 лет [59; 73] против 55 лет [42; 61], $p < 0.001$).

Наибольшую ассоциацию с наличием АСБ показал полиморфизм гена *MMP-9* в точке -1562 (табл. 3). АБ выявлялись у 42 (28.0 %) больных с генотипом *CC*, у 12 (21.8 %) носителей генотипа *CT*, у 5 (71.4 %) носителей генотипа *TT* ($p = 0.022$). Интересно, что все 5 бляшек у носителей генотипа *TT* сформировали стеноз различной степени выраженности. При дополнительном включении пола и возраста в логистическую модель указанные отличия сохранили свою значимость. Так, после коррекции по полу и возрасту выявлена значимая ассоциация генотипа *MMP9* -1562*TT* с наличием АСБ (ОШ 8.52; 95% ДИ 1.31–55.49; $p = 0.025$). Эти данные согласуются с исследованиями, демонстрирующими ассоциацию полиморфизма в указанной точке с увеличением уровня артериального давления и предрасположенностью к развитию нестабильности АСБ при наличии мутантного аллеля *T* [10].

Генотип *MMP2* -1306*TT* встречался у 18.6 % больных с АСБ в сравнении с 7.9 % больных без АСБ ($p = 0.025$). После коррекции по возрасту и полу данные различия нивелировались ($p = 0.14$).

Не продемонстрировано взаимосвязи между наличием инсерции *A* в точке -1171 гена *MMP3* и частотой встречаемости АСБ. Эти данные не согласуются с другими исследованиями [8], в которых показана ассоциация каротидного атеросклероза с генотипом 5A5A у мужчин. Это может быть связано с тем, что РА болеют преимущественно женщины, а выборка мужчин недостаточна по

генотипу с наличием АСБ была значимо больше, чем у больных без АСБ (66 лет [59; 73] против 55 лет [42; 61], $p < 0.001$).
genotype with the presence of AP was revealed (OR 8.52; 95 % CI 1.31–55.49; $p = 0.025$). These data are consistent with studies demonstrating the association of polymorphism at this point with an increase in blood pressure and a predisposition to the development of AP instability in the presence of a mutant *T* allele [10].

MMP2 -1306*TT* genotype met in 18.6 % of patients with AP in comparison with 7.9 % of patients without AP ($p = 0.025$). After correction by age and sex, these differences were leveled ($p = 0.14$).

The relationship between the presence of *A* insertion at -1171 point of the *MMP3* gene and the frequency of occurrence of AP was not demonstrated. These data are not consistent with other studies [8], which show association of carotid atherosclerosis with 5A5A genotype in men. This may be due to the fact that the majority of RA patients are women, and the sample of men is insufficient in terms of volume to obtain statistically significant differences.

CONCLUSION

The revealed associations of different polymorphic regions of *MMP2* and *MMP9* genes with the development of carotid artery atherosclerosis and a number of cardiovascular risk factors indicate their possible impact on the frequency of cardiovascular diseases, which can be used for personification of both preventive and therapeutic measures to reduce mortality in patients with rheumatoid arthritis.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

объему для получения статистически значимых различий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленные ассоциации различных полиморфных участков генов *MMP2* и *MMP9* с развитием атеросклероза каротидных артерий и рядом факторов сердечно-сосудистого риска свидетельствуют об их возможном влиянии на частоту

сердечно-сосудистых событий, что может быть использовано для персонификации как профилактических, так и лечебных мероприятий для снижения смертности у больных ревматоидным артритом.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mahmoudi M. et al. New insights to the mechanisms underlying atherosclerosis in rheumatoid arthritis // *Int. J. Rheum. Dis.* 2017. Vol. 20 (3). P. 287–297.
2. DeCoux A., Lindsey M.L., Vilarreal F., Garcia R.A., Shulz R. Myocardial matrix metalloproteinase-2: inside out and upside down // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2014. Vol. 77. P. 64–72.
3. Khokha R., Murthy A., Weiss A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity // *Nat. Rev. Immunol.* 2013. Vol. 13 (9). P. 649–665.
4. Newby A.C. Metalloproteinases promote plaque rupture and myocardial infarction: A persuasive concept waiting for clinical translation // *Matrix Biol.* 2015. Vol. 44–46. P. 157–166.
5. Price S.J., Greaves D.R., Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene. Role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276 (10). P. 7549–7558.
6. Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases // *Matrix Biol.* 2000. Vol. 19 (7). P. 623–629.
7. Bäck M., Ketelhuth D.F.J., Agewall S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis // *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2010. Vol. 52 (5). P. 410–428.
8. Маздорова Е.В., Рябиков А.Н., Максимов В.Н. и др. Связь каротидного атеросклероза с полиморфизмом 5А/6А гена матричной металлопротеиназы-3 // *Бюл. СО РАМН.* 2010. Т. 30, № 6. С. 46–51.
9. Шевченко В.В., Коненков В.И., Королев М.А., Убшаева Ю.Б., Прокофьев В.Ф. Полиморфизм генов матричных металлопротеиназ *MMP2*, *MMP3*, *MMP9* у женщин с ревматоидным артритом // *Терапевт. арх.* 2015. Т. 87, № 12. С. 36–40.
10. Yabluchanskiy A., Ma Y., Lye R.P., Hall M.E. Matrix metalloproteinase-9: many shades of function in cardiovascular disease // *Physiology.* 2013. Vol. 28 (6). P. 391–403.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Омельченко Виталий Олегович — врач-ревматолог, врач-терапевт, младший научный сотрудник лаборатории патологии соединительной ткани, НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск).

REFERENCES

1. Mahmoudi M. et al. (2017). New insights to the mechanisms underlying atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.*, 20, 3, 287–297.
2. DeCoux A., Lindsey M.L., Vilarreal F., Garcia R.A., Shulz R. (2014). Myocardial matrix metalloproteinase-2: inside out and upside down. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 77, 64–72.
3. Khokha R., Murthy A., Weiss A. (2013). Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 13, 9, 649–665.
4. Newby A.C. (2015). Metalloproteinases promote plaque rupture and myocardial infarction: A persuasive concept waiting for clinical translation. *Matrix Biol.*, 44–46, 157–166.
5. Price S.J., Greaves D.R., Watkins H. (2001). Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene. Role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.*, 276, 10, 7549–7558.
6. Ye S. (2000). Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol.*, 19, 7, 623–629.
7. Bäck M., Ketelhuth D.F.J., Agewall S. (2010). Matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 52, 5, 410–428.
8. Mazdorova E.V., Ryabikov A.N., Maksimov V.N. et al. (2010). The relationship of carotid atherosclerosis with polymorphism of the 5A/6A gene of matrix metalloproteinase-3. *Bull. Sib. Branch RAMS*, 30, 6, 46–51. In Russ.
9. Shevchenko V.V., Konenkov V.I., Korolev M.A., Ubshaeva Yu.B., Prokofiev V.F. (2015). Polymorphism of matrix metalloproteinases genes *MMP2*, *MMP3*, *MMP9* in women with rheumatoid arthritis. *Therapeutic Archive*, 87, 12, 36–40.
10. Yabluchanskiy A., Ma Y., Lye R.P., Hall M.E. (2013). Matrix metalloproteinase-9: many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology*, 28, 6, 391–403.

ABOUT THE AUTHORS

Omelchenko Vitaly Olegovich — Rheumatologist, Therapist, Junior Researcher of the Laboratory of Connective Tissue Pathology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk).

Letyagina Elena Alekseevna — Cand. Sci. (Med.), Rheumatologist, Head of the Rheumatology Department, Senior Researcher of the Laboratory of Connec-

Летягина Елена Алексеевна — канд. мед. наук, врач-ревматолог, врач-терапевт, заведующий ревматологическим отделением клиники, старший научный сотрудник лаборатории патологии соединительной ткани НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск).

Шевченко Алла Владимировна — д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск).

Коненков Владимир Иосифович — д-р мед. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск).

Поспелова Татьяна Ивановна — д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой терапии, гематологии и трансфузиологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»; врач-гематолог, руководитель Городского гематологического центра (Новосибирск).

Королев Максим Александрович — канд. мед. наук, заведующий лабораторией патологии соединительной ткани НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск).

Образец цитирования: Омельченко В.О., Летягина Е.А., Шевченко А.В., Коненков В.И., Поспелова Т.И., Королев М.А. Ассоциация полиморфизмов промоторных участков генов *MMP2*, *MMP3* и *MMP9* с факторами сердечно-сосудистого риска у больных ревматоидным артритом // Journal of Siberian Medical Sciences. 2019. № 1. С. 109–118.

tive Tissue Pathology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk).

Shevchenko Alla Vladimirovna — Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher of the Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk).

Konenkov Vladimir Iosifovich — Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Scientific Director, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk).

Pospelova Tatyana Ivanovna — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Therapy, Hematology and Transfusiology, Novosibirsk State Medical University; Hematologist, Head of the City Hematology Center (Novosibirsk).

Korolev Maksim Aleksandrovich — Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Connective Tissue Pathology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novosibirsk).

Citation example: Omelchenko V.O., Letyagina E.A., Shevchenko A.V., Konenkov V.I., Pospelova T.I., Korolev M.A. (2019). Association of polymorphisms in the promoter regions of *MMP2*, *MMP3* and *MMP9* genes with cardiovascular risk factors in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Siberian Medical Sciences*, 1, 109–118.