

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ 3 (ММП-3) В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРА РИСКА РАЗВИТИЯ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ И ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА У НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАРЕЛИЯ

Коломейчук Сергей Николаевич^{1,2}, Корнева Виктория Алексеевна¹, Илюха Владимир Викторович¹, Кузнецова Анастасия Сергеевна¹, Кузнецова Татьяна Юрьевна¹

¹ ФГБОУ ВПО «Петрозаводский Государственный Университет», Петрозаводск, Россия

² Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия

Коломейчук С.Н.
185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11
E-mail: sergey_kolomeychuk@rambler.ru

Аннотация. Артериальная гипертензия является патологическим процессом, ассоциированным с ремоделированием сосудов сердца, который характеризуется качественными и количественными изменениями в содержимом внеклеточного матрикса. Процессы деградации коллагена главным образом регулируются за счет функционирования матриксных металлопротеиназ, обладающих широким спектром биологических функций. Ведущая роль среди последних отводится металлопротеиназе-3 (ММП-3). Ряд генетических и эпидемиологических исследований вариантов гена ММП-3 5А/6А показали, что данный полиморфизм связан с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями в разных этнических группах.

Целью нашего исследования являлось изучение возможности использования полиморфных вариантов гена матриксной металлопротеиназы-3 в качестве маркера риска развития сердечно-сосудистой патологии в норме и при артериальной гипертензии у населения Республики Карелия. В работе использованы образцы крови 174 условно здоровых доноров (без клинических проявлений) и 198 образцов крови больных.

В изученной выборке частоты аллелей 5А и 6А гена ММП-3 достоверно не отличаются в группах здоровых пациентов и больных. При анализе частот генотипов ММП-3 среди мужчин и женщин не было выявлено достоверных различий между больными и группой контроля. При анализе биохимических показателей нами обнаружено, что гомозиготы 5А5А ММП-3 ассоциированы с повышенным содержанием глюкозы, общего холестерина и триглицеридов в группе больных. В контрольной выборке регистрируется достоверное влияние полиморфных вариантов гена ММП-3 на уровни атерогенной фракции липидов (холестерол липопротеинов низкой плотности и общий холестерол) в плазме крови, по сравнению с группой больных.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, сердечно-сосудистые заболевания, матриксные металлопротеиназы, генетический полиморфизм, биомаркеры, липопротеины плазмы крови.

THE STUDY OF POLYMORPHIC VARIANTS OF MATRIX METALLOPROTEINASE (MMP-3) GENE AS A RISK MARKER OF ARTERIAL HYPERTENSION AND ISCHEMIC HEART DISEASE DEVELOPMENT AMONG THE POPULATION OF THE REPUBLIC OF KARELIA

Sergey N. Kolomeychuk^{1,2}, Victoria A. Korneva¹, Vladimir V. Ilukha¹, Anastasia S. Kuznetsova¹, Tatyana Yu. Kuznetsova¹

¹ Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia

² Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia

S.N. Kolomeychuk

11 Pushkinskaya str., Petrozavodsk, Russia 185910

E-mail: sergey_kolomeychuk@rambler.ru

Abstract. Hypertension is a pathological state associated with vascular remodeling characterized by qualitative and quantitative changes in the content of the extracellular matrix. Collagen degradation is mainly governed by the activity of matrix metalloproteinases, enzymes having a wide range of biological functions. The leading role among the latter is given to metalloproteinase-3 (MMP-3). A number of epidemiological studies of MMP-3 5A/6A genetic variants showed that this marker is associated with various cardiovascular diseases in different ethnic groups.

The aim of our study was to investigate the possibility of using of metalloproteinase-3 SNP as a marker of hypertension in the population of Russia/Republic of Karelia. We analyzed blood samples from 174 healthy donors (without clinical manifestations) and 198 blood samples of hypertensive patients.

In our sample 5A and 6A allele frequencies of the SNP marker were not significantly different between control group and patients with hypertension. Analysis of gender ratio in MMP-3 genotype distribution in men and women showed no significant differences between patients and controls. We have found that 5A5A MMP-3 homozygotes are associated with elevated levels of glucose, total cholesterol and triglycerides in hypertensive patients. Significant impact of MMP-3 gene polymorphic variants on atherogenic lipid fraction levels (both LDL and total cholesterol was detected in controls in comparison to the hypertensives.

Keywords: arterial hypertension, cardiovascular diseases, matrix metalloproteinases, genetic polymorphism, biomarkers, plasma lipoproteins.

Введение

Активные меры, предпринимаемые медициной по устранению или уменьшению влияния факторов риска, способствовали снижению смертности от заболеваний сердца и сосудов. Однако смертность населения России от сердечно-сосудистых патологий остается по-прежнему высокой. Артериальная гипертензия (АГ) является патологическим процессом, ассоциированным с ремоделированием сосудов сердца, который характеризуется качественными и количественными изменениями в содержимом внеклеточного матрикса (ВКМ) (Bashey, 1989). При АГ важным аспектом ремоделирования ВКМ является отложение коллагена и других компонентов ВКМ на стенках сосуда с последующим изменением его свойств. На сегодняшний день не вызывает сомнений ведущая роль ренин-ангиотензин-альдостероновой системы в механизме развития АГ. После повреждения сосуда важными факторами, влияющие на обновление ВКМ при ремоделировании ткани в процессе развития атеросклероза или при гипертонической патологии, являются ангиотензин II (АТ II), выступающего в качестве мощного пептида-эффектора ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, а также специфичные протеиназы (Zhou, 2004).

Процессы деградации коллагена главным образом регулируются за счет функционирования матриксных металлопротеиназ (ММП), обладающих широким спектром биологических функций. Они играют ключевую роль в разрушении большинства компонентов ВКМ при различных патогенетических вариантах воспаления, сердечнососудистых заболеваниях, инфекционных, аутоиммунных и аллергических реакций, злокачественной трансформации клеток (Nanni, 2007; Хасигов, 2000). Ведущая роль среди металлопротеиназ отводится металлопротеиназе-3 (ММП-3) (Zhou, 2004). Полиморфизм генов ММП-1, ММП-3, ММП-9 влияет на уровень их транскрипционной активности. Однонуклеотидная замена ММП-3 5А/6А, содержащая 5 или 6 остатков аденозина, находится в промоторной области ММП-3. Ряд генетических эпидемиологических исследований вариантов гена ММП-3 5А/6А показали, что данный полиморфизм связан с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями в разных этнических группах. Целью настоящего исследования являлось изучение возможности использования полиморфных вариантов гена матриксной металлопротеиназы-3 (ММП-3) в качестве маркера риска развития сердечно-сосудистой патологии в норме и при артериальной гипертензии у населения Республики Карелия.

Материалы и методы

В работе использованы образцы крови 174 условно здоровых доноров без клинических проявлений и диагноза АГ, ишемической-болезни сердца (ИБС) (контрольная группа) и 198 образцов крови больных. Заболевание диагностировали согласно IV пересмотру рекомендаций Всероссийского научного общества кардиологов по АГ от 2010 г. Все обследованные пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании. Среди обследованных были только люди русской национальности (по результатам анкетирования). Критерии включения для больных: впервые установленный диагноз АГ (I-II стадии, степень АГ 1-2), отсутствие гипотензивной терапии, установленный диагноз ОИМ (острый инфаркт миокарда); критерии включения в контрольную группу: отсутствие клинических проявлений и установленных диагнозов АГ и ИБС. Критерии исключения, общие для доноров всех изучаемых групп: курение, беременность и лактация, алкогольная зависимость, сахарный диабет, индекс массы тела ≥ 30 кг/м². Критерии исключения из контрольной группы объединяли критерии, установленные для больных АГ и ОИМ.

ДНК выделяли из крови с помощью наборов для выделения ДНК Ахургер (Axugen, США) согласно инструкции производителя. Качество и количество выделенной ДНК оценивали спектрофотометрически (SmartSpec Plus, Bio-Rad, США). Для амплификации

промоторной части гена металлопротеиназы-3 использовали следующие праймеры: прямой 5'-GGTTCCTCCATTCCTTTGATGGGGGAAAGA-3' и обратный 5'-CTTCCTGGAATTCACATCACTGCCACCACT-3'. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе iCycler iQ5 (Bio-Rad, США). Реакционная смесь для ПЦР объемом 30 мкл содержала: 50 нг ДНК исследуемых образцов, 100 пМ обратного и прямого праймеров, 1 ед.а. Taq полимеразы (Силекс, Россия), 0,2 mM dNTP, 2,5 мкл 10xбуфера для Taq полимеразы, согласно инструкции к набору для ПЦР (Силекс, Россия). Условия ПЦР: денатурация – 2 мин при 94С, отжиг – 1 мин при 65С, элонгация – 1 мин при 72С; количество циклов – 35; достраивание фрагментов – 10 мин при 72С. Полученный ПЦР продукт подвергался обработке рестриктазой *TthI* (Сибэнзим, Россия) в течение 3 ч при 65°С для идентификации аллелей 6А (130 п.н.) и 5А (97 п.н.). ПЦР-продукты разделяли в 8%-ном полиакриламидном геле, используя трис-боратный буфер. ПЦР-продукты окрашивали бромистым этидием, визуализировали в проходящем УФ свете и анализировали с помощью программы Kodak 1D.

Липидный спектр определяли на анализаторе COBAS INTEGRA 400 PLUS (Roche Diagnostics GmbH, Германия). Методы определения: общего холестерина (ОХС) и триглицеридов (ТГ) – энзиматический колориметрический; холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП) – энзиматический калориметрический, прямой; холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП) – расчетный, по формуле Фридвальда. Экспериментальные данные обрабатывали с использованием статистических приложений программы Microsoft Excel и Statgraphics2.1 (ANOVA).

Результаты и обсуждение

Анализ результатов генотипирования показал, что в изученной выборке частоты аллелей 5А и 6А гена ММП-3 достоверно не отличаются в группах здоровых пациентов и больных АГ+ИБС (39/61 и 40/60 соответственно, $p=0.75$). Закон Харди-Вайнберга в данном случае соблюдается как в группе здоровых доноров, так и среди больных АГ и ИБС (Таблица 1). Тест на соответствие равновесию Харди-Вайнберга $\chi^2=1.26$ ($p > 0.05$). Частоты генотипов 5А5А, 5А6А и 6А6А в группе АГ составили 13%, 53% и 34%, соответственно, по сравнению с контрольной группой 15%, 47% и 37%, соответственно ($p=0.665$; $N=174$) (Таблица 1).

Таблица 1. Частотное распределение аллелей и генотипов полиморфных вариантов ММП-3 (5А/6А) в контрольной группе и группах больных ЭАГ и ИБС

Генотип/ Аллели	Контроль, N (%)	Больные АГ+ИБС, N (%)	P
5А5А	30(15)	23(13)	0.79
5А6А	94(47)	92(53)	0.92
6А6А	74(37)	58(34)	0.45
5А	77(39)	69(40)	0.83
6А	121(61)	104(60)	0.65

При анализе частот генотипов ММП-3 среди мужчин и женщин не было выявлено достоверных различий между больными и группой контроля. Следует отметить, что между мужчинами и женщинами обнаружено недостоверное различие по распределению частот генотипа 5А5А 18% против 13% для контрольной группы (Рисунок 1). Результаты по частотам генотипов данного маркера ММП-3 для женщин полностью повторяют результаты работы новосибирских исследователей (Маздорова, 2010).

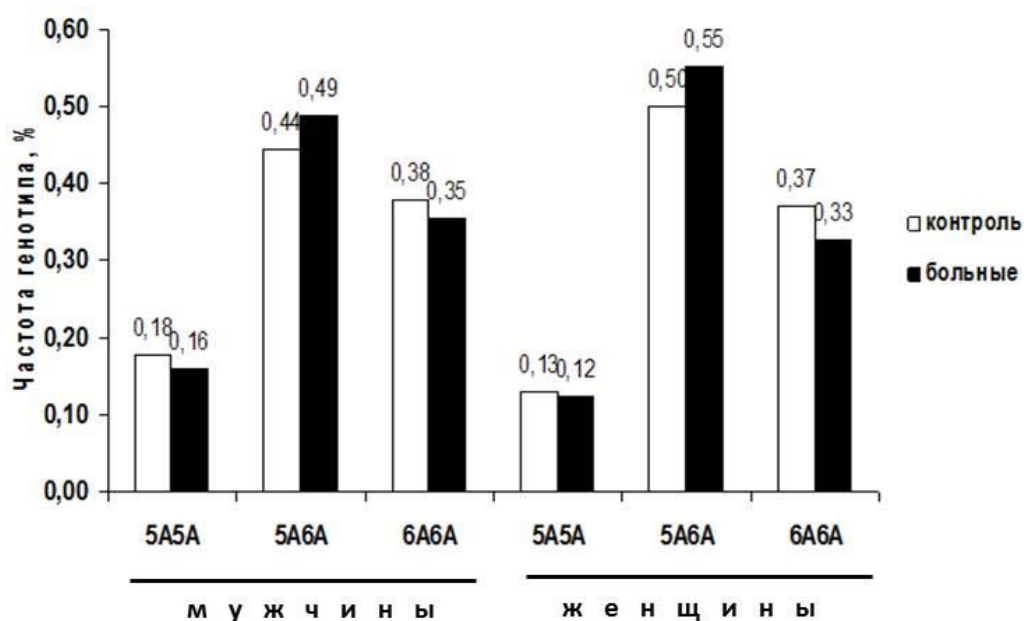


Рисунок 1. Частоты распределения генотипов ММП-3 (5А6А) в зависимости от наличия АГ и ИБС (выборка мужчин и женщин, 18-60 лет, n=174 и n=198, г. Петрозаводск).

Figure 1. Frequencies of MMP-3 genotypes (5A6A) in relation to arterial hypertension + coronary heart disease (sample consisted of men and women of 18-60 years old, n=174 and n=198, Petrozavodsk).

При анализе биохимических показателей нами обнаружено, что гомозиготы в 5А5А ММП-3 ассоциированы с повышенным содержанием глюкозы, ОХС и ТГ в группе больных АГ и ИБС. Кроме того, генотип 5А5А был ассоциирован с пониженными уровнями ОХС, ЛПВП и ЛПНП по сравнению с носителями аллели 6А и гетерозиготами в контрольной группе (Таблица 2).

Таблица 2. Генотипы ММП-3 и биохимические показатели у здоровых и больных

Биохимические показатели	Генотип	Контрольная группа	Группа людей, страдающих АГ+ИБС
ОХС, ммоль/л	5А5А	4.89±0.72	6.35±1.05
	5А6А	5.60±0.89	6.39±0.82
	6А6А	6.17±0.92*	5.49±0.78
ХС-ЛПВП, ммоль/л	5А5А	1.48±0.18	1.37±0.09
	5А6А	1.47±0.07	1.37±0.12
	6А6А	1.53±0.12	1.45±0.09
ХС-ЛПНП, ммоль/л	5А5А	2.82±0.58	3.74±0.42
	5А6А	3.94±0.63	4.17±0.49
	6А6А	4.26±0.44**	3.35±0.54
ТГ, ммоль/л	5А5А	1.31±0.09	2.58±0.68
	5А6А	1.38±0.08	1.93±0.47
	6А6А	1.40±0.07	1.51±0.47
Глюкоза, ммоль/л	5А5А	4.45±0.37	6.52±0.82
	5А6А	4.45±0.29	5.37±0.67
	6А6А	4.38±0.28	4.87±0.79

*- p=0.031(ANOVA); **- p=0.01(ANOVA)

При анализе биохимических показателей у носителей разных генотипов по данному маркеру в группах мужчин и женщин достоверных различий выявлено не было. Далее с помощью дисперсионного анализа была показана достоверная корреляция для ОХС и ЛПНП с генотипами ММП-3 только в группе контроля, расчетное влияние признаков 7.49% и 11.7%, соответственно (Таблица 2).

Ведущая роль в деградации коллагена ВКМ и растворении атеросклеротических бляшек отводится металлопротеиназе-3 (ММП-3) (Bashey, 1989; Nanni, 2007; Zhou, 2004; Хасигов, 2000). Однонуклеотидная замена ММП-3 5А/6А, содержащая 5 или 6 остатков аденозина, находится в промоторной области ММП-3. 6А аллель ассоциирована со снижением экспрессии ММП и ускоренным развитием атеросклероза из-за повышения уровня коллагена во внеклеточном матриксе артерий. В литературе имеются данные о различиях биохимических показателей в плазме крови у носителей разных полиморфных вариантов генов металлопротеиназ. Например, в работе исследователей из Новосибирска обнаружена ассоциация признаков каротидного атеросклероза с гомозиготным генотипом 5А5А гена ММП-3 у мужчин, которая не зависела от возраста и уровня артериального давления (Маздорова, 2010). Полученные нами результаты об отсутствии ассоциации гипертензии с гомозиготным генотипом 5А5А гена ММП-3 у русского населения Республики Карелия не отличаются от данных большинства опубликованных работ, где получены ассоциации данных заболеваний как с аллелью 6А, так и с аллелью 5А, либо отсутствие ассоциаций (Маздорова, 2010; MacNaul, 1990). У женщин Японии была найдена связь инфаркта миокарда с носительством аллели 6А гена ММП-3. (Frisch, 1987). В других работах показана прямая или опосредованная ассоциация генотипа 5А5А с инфарктом миокарда (MacNaul, 1990; Frisch, 1987). Данные о роли 5А аллели поддерживаются результатами недавнего мета-анализа о предполагаемой связи этого аллельного варианта с нестабильностью атеросклеротической бляшки из-за повышенного протеолиза (Yamada, 2006). Это разнообразие оценок может объясняться различиями в этническом составе и объеме обследованных выборок, учетом в анализе ряда дополнительных факторов.

Наличие фракции ЛПНП в плазме крови считается признаком нарушения нормального метаболизма липидов и ассоциируется с развитием ИБС. По данным литературы, среди генов, экспрессия которых регулируется металлопротеиназой-3, оказались гены медиаторов воспаления (интерлейкин-1 β , транскрипционный комплекс NF- κ B). В связи с тем, что большинство генов, кодирующих провоспалительные белки, содержат последовательности для связывания с промоторной областью ММП-3 (Yamada, 2006), можно предположить, что однонуклеотидные замены в гене ММП-3 могут влиять на уровень экспрессии этих генов. Следовательно, один из возможных механизмов различий уровней липопротеинов в плазме крови у носителей разных генотипов гена ММП-3 может представлять собой регуляцию на уровне транскрипции интерлейкинов и других генов-мишеней, вовлеченных в атеросклероз.

В настоящей работе не обнаружено значимых различий в содержании ряда биохимических показателей в плазме крови у носителей разных генотипов по полиморфным маркерам гена ММП-3. Показано, что в контрольной выборке регистрируется достоверное (Таблица 2) влияние полиморфных вариантов гена ММП-3 на уровни атерогенной фракции липидов (ХС-ЛПНП и ОХС) в плазме крови, по сравнению с группой больных. Таким образом, можно заключить, что полиморфные варианты гена ММП-3 в представленной выборке населения Республики Карелия самостоятельно не могут вносить вклад в развитие сердечно-сосудистых патологий.

Выводы

1. Частоты аллелей и генотипов полиморфных вариантов гена ММП-3 (5А/6А) достоверно не отличаются в группах здоровых пациентов и больных АГ.

2. Генотипы ММП-3 достоверно коррелируют с уровнем ОХС и ЛПНП в группе здоровых людей. В группе больных данной взаимосвязи не наблюдается.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Фундаментальные науки - медицине» и Программы стратегического развития ПетрГУ.

Библиография

1. Bashey RI, Cox R, McCann J, Jimenez SA. Changes in collagen biosynthesis, types, and mechanics of aorta in hypertensive rats. *J Lab Clin Med* 1989, 113(5):604-611.
2. Frisch SM, Ruley HE. Transcription of the stromelysin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone. *J Biol Chem* 1987, 262(34):16300-16304.
3. MacNaul KL, Chartrain N, Lark M, Tocci MJ, Hutchinson NI. Discoordinate expression of stromelysin, collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts. Synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α on stromelysin expression. *J Biol Chem* 1990, 265(28):17238-17245.
4. Nanni S, Melandri G, Hanemaaijer R, Cervi V, Tomasi L, Altimari A, Van Lent N, Tricoci P, Bacchi L, Branzi A. Matrix metalloproteinases in premature coronary atherosclerosis: influence of inhibitors, inflammation, and genetic polymorphisms. *Transl Res* 2007, 149(3):137-144.
5. Yamada Y. Identification of genetic factors and development of genetic risk diagnosis systems for cardiovascular diseases and stroke. *Circ J* 2006, 70(10):1240-1248.
6. Zhou X, Huang J, Chen J, Su S, Chen R, Gu D. Haplotype analysis of the matrix metalloproteinase 3 gene and myocardial infarction in a Chinese Han population. The Beijing atherosclerosis study. *Thromb Haemost* 2004, 92(4):867-873.
7. Маздорова Е.В., Рябиков А.Н., Максимов В.Н., Малютина С.К., Воевода М.И., Никитин Ю.П. Связь каротидного атеросклероза с полиморфизмом 5А/6А гена матричной металлопротеиназы-3 // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – Т.30. – №6. – С.46–51.
8. Хасигов П.З., Кзоева С.А., Гагагонова Т.М., Тареева И.Е., Грачев С.В., Березов Т.Т. Роль металлопротеиназ матрикса в развитии диабетической нефропатии // Биохимия. – 2000. – Т.65. – №5. – С.613–619.