

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ПОЛИМОРФИЗМОВ -1612 5A/6A ГЕНА *MMP3* И 2003G>A ГЕНА *MMP9* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА У РУССКИХ ЖИТЕЛЕЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ РОССИИ

© Долженкова Е.М., Барышев А.С., Иванова Н.В., Бушуева О.Ю., Иванов В.П., Полоников А.В.

Кафедра биологии, медицинской генетики и экологии  
Курского государственного медицинского университета, Курск  
E-mail: [olga.bushueva@inbox.ru](mailto:olga.bushueva@inbox.ru)

Известно, что вследствие нарушения процесса протеолиза и изменения метаболизма белков внеклеточного матрикса происходит ремоделирование миокарда сердечной мышцы, что является одним из факторов риска развития ишемической болезни сердца (ИБС). Матриксные металлопротеиназы (MMPs) вовлечены в процесс протеолиза. Вследствие нуклеотидных замен в кодирующих их генах изменяется функциональная активность данных ферментов. Целью исследования было изучение ассоциации полиморфизма -1612 5A/6A гена *MMP3* и полиморфизма 2003G>A гена *MMP9* с предрасположенностью к ИБС у русских жителей Центральной России. Материалом для исследования послужили 504 образца ДНК: 256 пациентов с ИБС и 248 относительно здоровых индивидуумов, сопоставимых по полу и возрасту, без сердечно-сосудистых заболеваний в анамнезе и с нормальным уровнем артериального давления. Генотипирование проводили методом ПЦР в режиме реального времени путем дискриминации аллелей с помощью TaqMan-зондов. При сравнительном анализе частот аллелей и генотипов -1612 5A/6A гена *MMP3* и 2003G>A гена *MMP9* различий между исследуемыми группами обнаружено не было. Таким образом, установлено, что изученные полиморфизмы не оказывают влияния на развитие ИБС у русских жителей Центральной России.

**Ключевые слова:** ишемическая болезнь сердца, наследственная предрасположенность, матриксные металлопротеиназы, ген *MMP3*, ген *MMP9*.

### THE RELATIONSHIP BETWEEN -1612 5A/6A POLYMORPHISM OF *MMP3* GENE AND 2003G>A OF *MMP9* GENE AND CORONARY HEART DISEASE RISK IN POPULATION OF CENTRAL RUSSIA

*Dolzhenkova E.M., Baryshev A.S., Ivanova N.V., Bushueva O.Yu., Ivanov V.P., Polonikov A.V.*

Department of Biology, Medical Genetics and Ecology of Kursk State Medical University, Kursk

It is known that the proteolysis disorder and changes in metabolism of extracellular matrix proteins cause the process of remodeling heart muscle, which is one of the risk factors for coronary heart disease (CHD). Matrix metalloproteinases (MMPs) are responsible for the process of proteolysis. Single nucleotide substitutions in genes encoding MMPs may influence the functional activity of enzymes. The aim of this study was to investigate the association of polymorphisms -1612 5A/6A (rs3025058) of *MMP3* gene and 2003G>A (rs17577) of *MMP9* gene with the risk of CHD in population of Central Russia. We studied DNA samples obtained from 946 subjects, including 256 CHD patients and 248 sex- and age-matched healthy individuals. The polymorphisms were genotyped through a real-time PCR using TaqMan allele-discrimination assays. The comparative analysis showed no difference in allele and genotype frequencies of *MMP3* and *MMP9* polymorphisms between the case and control groups. The study showed that polymorphism -1612 5A/6A of *MMP3* gene and polymorphism 2003G>A of *MMP9* gene are not associated with coronary heart disease in population of Central Russia.

**Keywords:** coronary heart disease, genetic predisposition, matrix metalloproteinases, *MMP3*, *MMP9*.

В структуре смертности по показателям большинства развитых стран лидирующее место занимают заболевания сердечно-сосудистой системы (ССС), доля которых с каждым годом неуклонно растет. При этом стоит отметить, что наиболее частой причиной смертности населения в возрасте до 75 лет является ишемическая болезнь сердца (ИБС). ИБС является мультифакториальным заболеванием, механизм развития которого многогранен и не исследован до конца. На данный момент существуют многочисленные исследования, подтверждающие, что одними из предпосылок развития ИБС являются молекулярно-генетические факторы [16].

Предрасположенность человека к развитию различных заболеваний позволяет оценить молекулярная диагностика, благодаря которой выявлены многие гены-кандидаты или гены предрасположенности, полиморфизм которых в сочетании с неблагоприятными эндо- и экзогенными факторами может быть причиной различных заболеваний [1]. Одним из предположительных механизмов развития ИБС считается ремоделирование ССС благодаря патологическим изменениям синтеза и разрушения матрикса стенок артерий. Матриксные металлопротеиназы (MMPs), представленные в человеческом организме несколькими видами ферментов, отвечают за данные процессы, а также регулируют действие

ростовых факторов: сосудистого эндотелиального фактора роста, рецептора фактора роста фибробластов, эпителиального фактора роста и инсулиноподобного фактора роста [15]. В этой связи гены MMPs рассматриваются как потенциальные гены-кандидаты при тестировании наследственной предрасположенности к ИБС. До сих пор возможная роль MMPs в развитии ИБС остается малоизученной.

Именно поэтому целью данной работы явилось изучение ассоциации полиморфизма -1612 5A/6A (rs3025058) гена *MMP3*, а также полиморфизма 2003G>A (rs17577) гена *MMP9* с риском развития ИБС в популяции русских жителей Центральной России.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования послужили образцы ДНК популяционной выборки русских жителей, проживающих в Курской области. В исследование было вовлечено 256 больных ИБС, находившихся на стационарном лечении в кардиологических отделениях Курской областной клинической больницы и городской больницы скорой медицинской помощи г. Курска в период с 2011-2015 гг., группу сравнения составили 248 практически здоровых добровольцев [6]. Пациенты включались в исследуемую группу после верификации окончательного диагноза заболевания, подтвержденного с помощью клинических и лабораторно-инструментальных методов обследования. Критерием включения индивидов в контрольную группу было отсутствие у них хронических заболеваний. По полу и возрасту больные не отличались от контрольной группы ( $p > 0,05$ ).

У всех пациентов проводился забор венозной крови. Выделение геномной ДНК осуществляли

из размороженной венозной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфизма -1612 5A/6A (rs3025058) гена *MMP3* и полиморфизма 2003G>A (rs17577) гена *MMP9* проводилось методом ПЦР в режиме реального времени путем дискриминации аллелей с помощью TaqMan-зондов на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) с использованием праймеров и зондов, синтезированных компанией «Синтол» (Москва).

Для оценки ассоциаций аллелей и генотипов с риском развития ИБС использовали критерий  $\chi^2$  и отношение шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (CI). Статистическая обработка данных проводилась на персональном компьютере с использованием программных пакетов Statistica 8.0 («StatSoft») и MS Excel 2010.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение частот генотипов полиморфизма -1612 5A/6A (rs3025058) гена *MMP3* и полиморфизма 2003G>A (rs17577) гена *MMP9* соответствовало популяционному равновесию Харди-Вайнберга (РХВ). Исследована ассоциация полиморфизмов -1612 5A/6A (rs3025058) гена *MMP3* и 2003G>A (rs17577) гена *MMP9* с риском развития ИБС в русской популяции. Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов исследуемых полиморфизмов генов *MMP3* и *MMP9* в группах больных ИБС и здоровых индивидумов представлен в таблицах 1 и 2 соответственно.

Как видно из данных таблицы 1 в нашем исследовании мы не обнаружили взаимосвязь полиморфизма -1612 5A/6A (rs3025058) гена *MMP3* с риском развития ИБС.

Таблица 1

Распределение аллелей и генотипов полиморфизма -1612 5A/6A (rs3025058) гена *MMP3* у пациентов с ИБС и здоровых лиц

Аллели, генотипы		Больные МИ (n=247) n (%) <sup>1</sup>	Контрольная группа (n=248) n (%) <sup>1</sup>	$\chi^2$ (p) <sup>2</sup>	OR (95% CI) <sup>3</sup>
Аллели	-1612 5A	0,460	0,496	1,32 (0,25)	1,16 (0,90-1,49)
	-1612 6A	0,540	0,504		
Генотипы	-1612 5A5A	54 (21,9)	59 (23,8)	0,16 (0,69)	1,12 (0,73-1,70)
	-1612 5A6A	119 (48,2)	128 (51,6)	0,45 (0,50)	0,87 (0,61-1,24)
	-1612 6A6A	74(30,0)	61 (24,6)	1,53 (0,22)	1,31 (0,88-1,95)

Примечание: <sup>1</sup> – абсолютное число и процент лиц с исследуемым генотипом; <sup>2</sup> – Хи-квадрат и *p*-уровень значимости (*df*=1); <sup>3</sup> – отношение шансов с 95% доверительными интервалами.

Таблица 2

Распределение аллелей и генотипов полиморфизма 2003G>A (rs17577) гена *MMP9* у пациентов с ИБС и здоровых лиц

Аллели, генотипы		Больные МИ (n=256) n (%) <sup>1</sup>	Контрольная группа (n=240) n (%) <sup>1</sup>	$\chi^2$ (p) <sup>2</sup>	OR (95% CI) <sup>3</sup>
Аллели	2003G	0,832	0,850	0,60 (0,44)	1,14 (0,81-1,61)
	2003A	0,168	0,150		
Генотипы	2003GG	175 (68,4)	175 (72,9)	1,24 (0,27)	1,25 (0,85-1,84)
	2003GA	76 (29,7)	58 (24,2)	1,91 (0,17)	1,32 (0,89-1,97)
	2003AA	5(2,0)	7 (2,9)	0,49 (0,49)	0,66 (0,21-2,12)

Примечание: <sup>1</sup> – абсолютное число и процент лиц с исследуемым генотипом; <sup>2</sup> – Хи-квадрат и *p*-уровень значимости (*df*=1); <sup>3</sup> – отношение шансов с 95% доверительными интервалами.

Далее было проведено исследование ассоциации полиморфизма 2003G>A (rs17577) гена *MMP9* в группах пациентов с ИБС и здоровых лиц. Однако статистически значимых различий в частотах аллелей и генотипов между группой больных и контрольной группой по исследуемому полиморфизму выявлено не было (табл. 2).

На данный момент протеолиз рассматривают как своеобразную систему биологического контроля, позволяющую организму приспосабливаться к изменяющимся условиям [4]. Именно за процесс протеолиза в большей степени отвечают MMPs, представленные в человеческом организме несколькими видами цинк-зависимых эндопептидаз, родственных по структуре и участвующих в деградации базальной мембраны и внеклеточного матрикса [5, 2, 7].

В частности вследствие нарушения процесса адекватного протеолиза и нарушения метаболизма белков внеклеточного матрикса происходит процесс ремоделирования миокарда сердечной мышцы, что способствует различным заболеваниям ССС, в том числе ИБС [8]. Мишенями тканевой перестройки в первую очередь являются кардиомиоциты и элементы стромы, при этом нарушается citoархитектоника как миокарда, так и сосудов вследствие увеличения количества коллагена и соединительной ткани во внеклеточном матриксе [17].

В данном исследовании проведен анализ ассоциации полиморфизма -1612 5A/6A (rs3025058) гена *MMP3*, локализованного на длинном плече хромосомы 11q22.3, а также 2003G>A (rs17577) гена *MMP9*. Оба этих гена отвечают за активность одноименных протеаз. Фермент стромелизин 1 (*MMP3*) относится к классу стромелизинов и представляет собой низкомолекулярный протеин, благодаря которому

происходит деградация различных структур, в том числе фибронектина, ламинина, эластина и коллагена III, IV и V типов, также *MMP3* может влиять на реорганизацию внеклеточного матрикса путем активации проколлагеназы и активации других MMPs [13].

Активность MMPs зависит от уровня экспрессии соответствующих генов. При исследуемом полиморфизме -1612 5A/6A протеиназа, кодируемая геном *MMP3*, секретируется слабоактивной, вследствие этого нарушается процесс протеолиза белков внеклеточного матрикса, результатом чего является уменьшение диаметра просвета коронарных сосудов, подверженность ткани миокарда гипоксии и ишемии, что благоприятствует развитию ИБС на фоне прогрессирования атеросклероза [19, 10, 20].

Одним из наиболее изученных ферментов группы желатиназ является *MMP9*. Благодаря работе данного фермента происходит реорганизация коллагена IV, V, VII и X типа, денатурированного коллагена и ламинина [3, 9]. Активность данного фермента снижается в результате нуклеотидных замен в кодирующем его гене. Как и в случае со стромелизином, снижение функциональной активности желатиназы В напрямую связано с уменьшением просвета сосудов, стенозом и риском развития ИБС.

Проведенный нами анализ ассоциации полиморфизма -1612 5A/6A (rs3025058) гена *MMP3* не позволил установить взаимосвязи данного локуса с риском развития ИБС в популяции русских жителей Центрального Черноземья, что подтверждает результаты, полученные в немецкой популяции W. Koch и соавт. [12]. Аналогичные данные получены и при исследовании полиморфизма 2003G>A (rs17577) гена *MMP9*.

Тем не менее в литературе встречаются данные о взаимосвязи исследованных полиморфизмов с высоким риском развития ИБС. К примеру, исследование, проведенное А. Samnegård и соавт. в популяции жителей Швеции в количестве 387 пациентов с ИБС, а также равного количества относительно здоровых лиц сходных по полу и возрасту, позволило выявить ассоциацию полиморфизма -1612 5A/6A гена *MMP3* с высоким риском развития ИБС [14]. Аналогичные данные получены также N. Wu и соавт., изучавшими данные 1373 больных и 695 здоровых лиц китайской популяции и R.C. Kaplan с соавт., анализирувавшими население Сиэтла [18, 11].

Противоречивость полученных данных обуславливает необходимость дальнейших независимых исследований в различных популяциях мира.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 15-15-10010).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Пальцев М.А. Молекулярная медицина: достижения и перспективы // Молекулярная медицина. – 2004. – № 4. – С. 3-8.
2. Рогова Л.Н., Шестернина Н.В., Замечник Т.В., Фастова И.А. Матриксные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах (обзор) // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – Т. 18, № 2. – С. 86-87.
3. Соловьева Н.И. Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции // Биоорганическая химия. – 1998. – Т. 24, № 4. – С. 245-255.
4. Яровая Г.А. Биорегулирующие функции и патогенетическая роль протеолиза // Лабораторная медицина. – 2003. – № 6. – С. 48-54.
5. Bornstein P., Sage E.H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function // Current opinion in cell biology. – 2002. – Vol. 14, N 5. – P. 608-616.
6. Bushueva O., Solodilova M., Ivanov V., Polonikov A. Gender-specific protective effect of the - 463G>A polymorphism of myeloperoxidase gene against the risk of essential hypertension in Russians // Journal of the American Society of Hypertension. – 2015. – Vol. 9, N 11. – P. 902-906.
7. Corcoran M.L., Hewitt R.E., Kleiner Jr D.E., Stetler-Stevenson W.G. MMP-2: expression, activation and inhibition // Enzyme & protein. – 1995. – Vol. 49, N 1-3. – P. 7-19.
8. Deschamps A.M., Spinale F.G. Disruptions and detours in the myocardial matrix highway and heart failure // Current heart failure reports. – 2005. – Vol. 2, N 1. – P. 10-17.
9. Ennis B.W., Matrisian L.M. Matrix degrading metalloproteinases // Journal of neuro-oncology. – 1993. – Vol. 18, N 2. – P. 105-109.
10. Humphries S.E., Luong L.A., Talmud P.J., Frick M.H., Kesäniemi Y.A., Pasternack A., Taskinen M.-R., Syväne M. The 5A/6A polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (MMP-3) gene predicts progression of angiographically determined coronary artery disease in men in the LOCAT gemfibrozil study // Atherosclerosis. – 1998. – Vol. 139, N 1. – P. 49-56.
11. Kaplan R.C., Smith N.L., Zucker S., Heckbert S.R., Rice K., Psaty B.M. Matrix metalloproteinase-3 (MMP3) and MMP9 genes and risk of myocardial infarction, ischemic stroke, and hemorrhagic stroke // Atherosclerosis. – 2008. – Vol. 201, N 1. – P. 130-137.
12. Koch W., de Waha A., Hoppmann P., Schömig A., Kastrati A. Haplotypes and 5A/6A polymorphism of the matrix metalloproteinase-3 gene in coronary disease: Case-control study and a meta-analysis // Atherosclerosis. – 2010. – Vol. 208, N 1. – P. 171-176.
13. Murphy G., Cockett M.I., Stephens P.E., Smith B.J., Docherty A.J. Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes // Biochem. J. – 1987. – Vol. 248. – P. 265-268.
14. Samnegård A., Silveira A., Lundman P., Boquist S., Odeberg J., Hulthe J., Mcpheat W., Tornvall P., Bergstrand L., Ericsson C.-G., Ericsson P., Hamsten A. Serum matrix metalloproteinase-3 concentration is influenced by MMP-3 – 1612 5A/6A promoter genotype and associated with myocardial infarction // Journal of internal medicine. – 2005. – Vol. 258, N 5. – P. 411-419.
15. Sternlicht M.D., Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior // Annual review of cell and developmental biology. – 2001. – Vol. 17. – P. 463.
16. Townsend N., Wickramasinghe K., Bhatnagar P., Smolina K., Nichols M., Leal J., Rayner M. Coronary heart disease statistics. – 2012 edition. – British Heart Foundation : London, 2012. – P. 107.
17. Wilson E.M., Spinale F.G. Myocardial remodelling and matrix metalloproteinases in heart failure: turmoil within the interstitium // Annals of medicine. – 2001. – Vol. 33, N 9. – P. 623-634.
18. Wu N., Lu X., Hua Y., Song L., Ye J., Li J., Yang Y. Haplotype Analysis of the Stromelysin-1 (MMP3) and Gelatinase B (MMP9) Genes in Relation to Coronary Heart Disease // Annals of human genetics. – 2009. – Vol. 73, N 4. – P. 404-410.
19. Ye S., Eriksson P., Hamsten A., Kurkinen M., Humphries S.E., Henney A.M. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression // Journal of Biological Chemistry. – 1996. – Vol. 271, N 22. – P. 13055-13060.
20. Ye S., Watts G.F., Mandalia S., Humphries S.E., Henney A.M. Preliminary report: genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis // British heart journal. – 1995. – Vol. 73, N 3. – P. 209-215.