

Москаленко М. И.<sup>1</sup>, Миланова С. Н.<sup>1</sup>,  
Пономаренко И. В.<sup>1</sup>, Полоников А. В.<sup>2</sup>, Чурносов М. И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГАОУ ВПО НИУ «БелГУ», 308015, Белгород, ул. Победы, д. 85,

<sup>2</sup> – Курский государственный медицинский университет, 305004, г. Курск, ул. К. Маркса, 3

## ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИЙ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ С РАЗВИТИЕМ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ У МУЖЧИН

Ключевые слова: артериальная гипертензия, матриксные металлопротеиназы (ММП), однонуклеотидный полиморфизм (ОНП)

Ссылка для цитирования: Москаленко М. И., Миланова С. Н., Пономаренко И. В., Полоников А. В., Чурносов М. И. Исследование ассоциаций полиморфизма генов матриксных металлопротеиназ с развитием артериальной гипертензии у мужчин. Кардиология. 2019;59(7S):31–39

### РЕЗЮМЕ

**Цель исследования.** Изучить ассоциации полиморфных локусов матриксных металлопротеиназ (ММП) с развитием артериальной гипертензии (АГ) у мужчин Центрального черноземья России. **Материалы и методы.** Проведено исследование 564 пациентов с АГ и 257 мужчин контрольной группы. Анализ полиморфных локусов металлопротеиназ rs11568818 ММП7, rs1320632 ММП8, rs11225395 ММП8, rs1799750 ММП1, rs3025058 ММП3 осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Изучение ассоциаций однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) и их гаплотипов с развитием артериальной гипертензии проводили с помощью логистического регрессионного анализа в программе PLINK v.2.050. Регуляторный потенциал полиморфных локусов анализировали в программе HaploReg (v.4.1) (<http://archive.broadinstitute.org>). Влияние ОНП на экспрессию генов изучали по данным проекта Genotype-Tissue Expression (<http://www.gtexportal.org>). **Результаты.** Установлены значимые ассоциации гаплотипа G-A-C-1G, включающего rs11568818 ММП7, rs1320632 ММП8, rs11225395 ММП8 и rs1799750 ММП1, с высоким риском возникновения артериальной гипертензии у мужчин (отношение шансов 2,58, p=0,04). Изученные ОНП расположены в регионах ДНК, которые связываются с модифицированными гистонами, маркирующими активные энхансеры и промоторы (в регионах гиперчувствительности к ДНКазе-1), регуляторными белками TBP, CJUN, CFOS, GATA2 и транскрипционными факторами. Кроме этого, исследованные полиморфные варианты оказывают влияние на уровень экспрессии генов ММП7, ММП27 и RP11-817J15.3 (в периферической крови, скелетной мускулатуре, нервной ткани и др.). **Заключение.** Гаплотип G-A-C-1G по полиморфным вариантам rs11568818 ММП7, rs1320632 ММП8, rs11225395 ММП8, rs1799750 ММП1 ассоциирован с развитием АГ у мужчин Центрального черноземья России.

Moskalenko M. I.<sup>1</sup>, Milanova S. N.<sup>1</sup>,  
Ponomarenko I. V.<sup>1</sup>, Polonikov A. V.<sup>2</sup>, Churnosov M. I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – Belgorod National Research University, Pobedy 85, Belgorod 308015,

<sup>2</sup> – Kursk State Medical University (KSMU), K. Marx st. 3, Kursk 305041

## STUDY OF ASSOCIATIONS OF POLYMORPHISM OF MATRIX METALLOPROTEINASES GENES WITH THE DEVELOPMENT OF ARTERIAL HYPERTENSION IN MEN

Keywords: hyperpiesis, matrix metalloproteinases (MMP), single nucleotide polymorphism (SNP)

For citation: Moskalenko M. I., Milanova S. N., Ponomarenko I. V., Polonikov A. V., Churnosov M. I.

Study of associations of polymorphism of matrix metalloproteinases genes with the development of arterial hypertension in men. Kardiologiia. 2019;59(7S):31–39

### SUMMARY

**The aim of research.** To study the association of polymorphic loci of matrix metalloproteinases with the development of essential hypertension (EH) in men of the Central Chernozem Region of Russia. **Materials and methods.** A study of 564 men with EH and 257 control men was performed. Analysis of the polymorphic loci of metalloproteinases rs11568818 MMP7, rs1320632 MMP8, rs11225395 MMP8, rs1799750 MMP1, rs3025058 MMP3 was performed using real-time PCR. The study of associations of SNPs and their haplotypes with the development of arterial hypertension was carried out using logistic regression analysis in the PLINK software (v. 2.050).

The regulatory potential of polymorphic loci was analyzed in the HaploReg software (v. 4.1) (<http://archive.broadinstitute.org>). The effect of SNP on gene expression was studied using the data of the Genotype-Tissue Expression project (<http://www.gtexportal.org/>). *Results.* Haplotype including rs11568818 *MMP7*, rs1320632 *MMP8*, rs11225395 *MMP8* and rs1799750 *MMP1* associated with a high risk of disease in men ( $OR=2,58$ ,  $p=0,04$ ). These polymorphisms located in region of promoter and enhancer histone marks and in the region of hypersensitivity to DNase-1. They located in sites of proteins bound (TBP, CJUN, CFOS and GATA2) and they associated with the level of gene expression *MMP7*, *MMP27* and *RP11-817J15.3* (in peripheral blood, skeletal muscles, nervous tissue and other). *Conclusion.* Haplotype G-A-C-1G for polymorphisms rs11568818 *MMP7*, rs1320632 *MMP8*, rs11225395 *MMP8*, rs1799750 *MMP1* are associated with the development of essential hypertension in men in the Central Chernozem Region of Russia.

**Information about the corresponding author:** Moskalenko M. I., e-mail: mariam31011989@yandex.ru

## Введение

Артериальная гипертензия в современном мире является одной из важнейших медико-социальных проблем в связи с широкой распространенностью и наличием серьезных осложнений [1]. Согласно эпидемиологическим исследованиям, повышенное АД регистрируется у 1,13 млрд взрослого населения, среди которого 597 млн. (52,8%) составляют мужчины [2]. Клиническая практика показывает, что характер течения АГ также определяется половыми особенностями – мужчины с АГ имеют худший прогноз, чем женщины [3].

В доступной литературе имеются данные о важной роли аномального артериального ремоделирования в развитии АГ [4]. Этот сложный процесс сопровождается реорганизацией внеклеточного матрикса, за которую отвечают матриксные металлопротеиназы (ММП), представляющие собой цинк-зависимые ферменты с широкой субстратной специфичностью [5]. Результаты ассоциативных исследований, посвященных анализу связи с АГ полиморфных вариантов ММП, часто противоречивы и отличаются в разных этнических группах [6]. В связи с этим целью настоящего исследования было изучение ассоциации полиморфных локусов rs11568818 *MMP7*, rs1320632 *MMP8*, rs11225395 *MMP8*, rs1799750 *MMP1*, rs3025058 *MMP3* с развитием АГ у мужчин Центрально-черноземья России.

## Материалы и методы

Выборка для исследования формировалась на базе кардиологического и неврологического отделений Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа с 2013 по 2016 г. Проведен анализ результатов обследования 821 мужчины: 564 пациентов с АГ и 257 лиц группы контроля. В исследование включались лица русской национальности, являющиеся уроженцами Центрального черноземья России и не состоящие в родственных связях между собой [7, 8]. АГ была диагностирована согласно диагностическим рекомендациям Всероссийского научного общества кардиологов [9]. Критерии включения в группу больных АГ – САД  $\geq 140$  мм рт. ст. и/или ДАД  $\geq 90$  мм рт. ст.;

критерии исключения из исследуемой выборки – наличие симптоматических и вторичных гипертензий, печеночной и почечной недостаточности, отказ от участия в исследовании. Критерии включения в группу контроля – уровень САД ниже 140 мм рт. ст. и уровень ДАД ниже 90 мм рт. ст.; критерии исключения из контрольной группы – наличие у респондента метаболического синдрома, аутоиммунных расстройств, онкологических заболеваний. Также учитывались следующие характеристики: ИМТ (ИМТ,  $\text{кг}/\text{м}^2$ ), уровни общего ХС, ХС-ЛВП и ХС-ЛНП, ТГ, злоупотребление алкоголем, курение. Уровень АД определялся аускультативным методом по Короткову, исследуемые сидели в спокойной обстановке, не допускались курение, употребление алкоголя, чая или кофе, физические нагрузки в течение не менее 1 часа до физикального осмотра [10]. Образцы крови для биохимического анализа отбирались после 8-часового голодания, анализ проводился в Белгородской областной клинической больнице Святителя Иоасафа. Статус курения определяли, как курение, по крайней мере, одной сигареты в день в течение 1 года и более, потребление алкоголя определяли как потребление 50 г алкоголя в день в течение, как минимум, 1 года [10]. Информированное согласие было получено от всех субъектов. Проведение исследования осуществлялось под контролем этического комитета медицинского института Белгородского государственного национального исследовательского университета. Характеристика обследованных групп представлена в таблице 1. Группы больных АГ и здоровых мужчин значительно отличались по ИМТ, показателям липидного спектра и статусу курения ( $p=0,001$ ), но не отличались по возрасту и статусу употребления алкоголя ( $p>0,05$ ).

## Генетический анализ

Пациентам с АГ и мужчинам группы контроля проводилось генотипирование пяти полиморфных локусов rs11568818 *MMP7*, rs1320632 *MMP8*, rs11225395 *MMP8*, rs1799750 *MMP1*, rs3025058 *MMP3*. Данные SNP отобраны для исследования согласно представленным ранее критериям [11] ввиду их значимого регуляторного потен-

**Таблица 1.** Клинические характеристики больных с АГ и лиц контрольной группы

Показатель	Мужчины с АГ (n=564)	Мужчины без АГ (n=257)	P
Возраст (лет)	57,60±8,36	57,54±9,73	0,86
ИМТ (кг/м <sup>2</sup> )	30,76±4,52	25,04±2,86	0,001
САД (мм.рт.ст)	175,46±23,15	121,64±10,37	0,001
ДАД (мм.рт.ст)	104,72±12,33	79,18±7,02	0,001
ОХС	5,69±1,14	5,12±1,03	0,001
ХС ЛВП	1,31±0,39	1,53±0,44	0,001
ХС ЛНП	3,75±1,07	3,19±0,72	0,001
ТГ	1,82±1,01	1,12±0,66	0,001
Курение	318 (65,58%)	74 (34,96%)	0,001
Злоупотребление алкоголем	52 (9,30%)	13 (2,29%)	0,17

Данные представлены в виде абсолютного числа больных или среднего значения ± стандартное отклонение. ХС ЛВП – ХС липопротеидов высокой плотности, ХС ЛНП – ХС липопротеидов низкой плотности, ТГ – триглицериды.

циала и влияния на экспрессию генов (согласно базе данных HaploReg (v.4.1.) <http://archive.broadinstitute.org>).

Материалом для исследования послужила венозная кровь в объеме 5 мл, взятая из локтевой вены проба в пластиковые пробирки «Vacutainer®» с ЭДТА. Выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови проведено стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Исследование анализируемых полиморфизмов осуществлялось с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием олигонуклеотидных праймеров и зондов, последовательности которых представлены в работах Lieve A. с соавт. (2006) и Pratikshya Pradhan-Palikhe с соавт. (2012) [12, 13]. Из групп больных АГ и лиц контрольной группы были случайно выбраны около 5% образцов и их повторное генотипирование показало 100%-ую воспроизводимость.

### Статистический анализ

Оценку соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга проводили при помощи критерия  $\chi^2$ . Анализ частот аллелей и генотипов в группах больных АГ и в группе контроля проводили в таблицах сопряженности 2x2 с использованием  $\chi^2$ -критерия с поправкой Йетса на непрерывность. Расчеты проводились в программе «STATISTICA for Windows 10.0». Ассоциации полиморфных маркеров с развитием АГ выявляли с помощью логистического регрессионного анализа в доминантной, рецессивной и аддитивной генетических моделях с использованием программы PLINK v.2.050 (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>). В связи

с тем, что изучаемые полиморфные локусы расположены в одной хромосоме (Ch11, на расстоянии 314,3 kb), проведен анализ ассоциаций гаплотипов по данным полиморфизмам с развитием АГ. Расчет частот гаплотипов и оценку их ассоциаций с заболеванием проводили с помощью логистического регрессионного анализа по EM-алгоритму, в анализ включались гаплотипы с частотой >5%. Коррекцию полученных результатов осуществляли проведением адаптивного пермутационного теста с вычислением  $p_{perm}$ , после чего за статистически значимый уровень принимали  $p_{perm} < 0,05$ . Эффекты изучаемых SNP при развитии АГ корректировались с учетом ковариат – ИМТ, уровней общего ХС, ХС ЛВП и ХС ЛНП, ТГ, курения.

### Функциональное значение SNP

Регуляторный потенциал полиморфных локусов изучали с помощью онлайн сервиса HaploReg (v.4.1) (<http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) [14]. Связь референсного (ref) и альтернативного (alt) аллелей SNP с аффинностью мотива ДНК к факторам транскрипции оценивали по разнице между LOD (Logarithm of Odds) scores (показатель, характеризующий степень сродства мотива ДНК и ФТ) этих аллелей (alt – ref). Оценку влияния полиморфизма на экспрессию генов (cis-eQTL) проводили по данным проекта Genotype-Tissue Expression (GTEx) (<http://www.gtexportal.org>). Характер связи аллеля с уровнем транскрипции генов определяли по коэффициенту линейной регрессии ( $\beta$ ), характеризующему изменение нормализованного показателя генной экспрессии на один альтернативный аллель [15]. Учитывались результаты с  $p < 8 \times 10^{-5}$ ,  $pFDR \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Распределение частот аллелей и генотипов в обследованных группах для всех изученных полиморфных маркеров соответствовало равновесию Харди-Вайнберга ( $p > 0,05$ ). Частоты аллелей и генотипов SNP среди больных АГ и в контрольной группе представлены в таблице 2. Выявлены ассоциации полиморфизма rs3025058 MMP3 с развитием АГ.

Установлено, что среди больных АГ частота генотипа 6A/6A rs3025058 в 1,3 раза выше, чем у здоровых мужчин ( $p = 0,04$ ). Данный генотип выступает ФР при развитии АГ (ОШ=1,45; 95% ДИ 1,02–2,05). Согласно данным базы HaploReg (v4.1), полиморфный локус rs3025058 гена MMP3 располагается в регионах ДНК, связывающихся с гистонами, маркирующими энхансеры (модифицированный гистон H3K4me1) в мезенхимальных клетках, и с транскрипционными факторами CIZ и Gfi1b. При этом аллель 6A, входящий в состав «рискового»



Таблица 2. Частоты аллелей и генотипов полиморфных локусов матричных металлопротеиназ у мужчин с АГ и в контрольной группе

Локусы	Аллели, генотипы	Больные (n=564), абс. (%)	Контроль (n=257), абс. (%)	ОШ (ДИ)	p
rs11568818 MMP7	G	465 (41,59%)	214 (42,13%)	0,97 (0,79–1,42)	0,84
	A	653 (58,41%)	294 (57,87%)	1,02 (0,82–1,27)	
	AA	94 (16,81%)	46 (18,11%)	0,91 (0,61–1,37)	0,72
	AG	277 (49,55%)	122 (48,03%)	1,06 (0,93–1,12)	0,74
	GG	188 (33,64%)	86 (33,86%)	0,99 (0,71–1,37)	0,99
rs1320632 MMP8	G	90 (8,04%)	45 (8,86%)	0,90 (0,62–1,31)	0,58
	A	1030 (91,96%)	463 (91,14%)	1,11 (0,75–1,64)	
	AA	476 (85,00%)	212 (83,47%)	1,12 (0,73–1,71)	0,64
	AG	78 (13,93%)	39 (15,35%)	0,89 (0,58–1,38)	0,66
	GG	6 (1,01%)	3 (1,18%)	0,91 (0,20–4,61)	0,99
rs11225395 MMP8	T	506 (45,02%)	248 (48,82%)	0,85 (0,70–1,06)	0,15
	C	618 (54,98%)	260 (51,18%)	1,16 (0,94–1,44)	
	CC	173 (30,78%)	70 (27,56%)	1,17 (0,83–1,65)	0,69
	CT	272 (48,40%)	120 (47,24%)	1,05 (0,77–1,43)	0,82
	TT	117 (20,82%)	64 (25,20%)	0,78 (0,54–1,12)	0,19
rs1799750 MMP1	2G	526 (46,63%)	246 (48,05%)	0,94 (0,77–1,17)	0,59
	1G	602 (53,37%)	266 (51,95%)	1,05 (0,85–1,31)	
	1G/1G	160 (28,37%)	74 (28,91%)	0,97 (0,69–1,37)	0,94
	1G/2G	282 (50,00%)	118 (46,09%)	1,17 (0,86–1,59)	0,33
	2G2G	122 (21,63%)	64 (25,00%)	0,82 (0,58–1,19)	0,33
rs3025058 MMP3	5A	501 (44,49%)	254 (49,42%)	0,82 (0,66–1,01)	0,07
	6A	625 (55,51%)	260 (50,58%)	1,21 (0,98–1,51)	
	5A/5A	118 (20,96%)	60 (23,35%)	0,87 (0,60–1,26)	0,49
	5A/6A	265 (47,07%)	134 (52,14%)	0,82 (0,60–1,11)	0,20
	6A/6A	180 (31,97%)	63 (24,51%)	1,45 (1,02–2,05)	<b>0,04</b>

ОШ – показатель отношения шансов, 95% ДИ – его 95% доверительный интервал, p – уровень значимости (здесь, и далее в таблицах, шрифтом выделены значимые различия).

для развития АГ генотипа, снижает аффинность к транскрипционным факторам CIZ (различие между LOD scores аллелей 6A (alt) и 5A (ref) составляет 1,3) и Gfi1b (различие между LOD scores аллелей 6A (alt) и 5A (ref) составляет 1,7). Выявленные эпигенетические эффекты полиморфного локуса rs3025058 гена MMP3 могут быть медико-биологической основой его вовлеченности в развитие АГ. Согласно данным GeneCards ген MMP3 кодирует протеолитический фермент MMP3 (стромелизин 1), который отвечает за деградацию основных компонентов артериальной стенки – фибронектина, ламинина, протеогликанов, желатинов I–V типа, коллагенов III, IV, IX, X (<http://www.genecards.org>). Стромелизин 1 секретируется многими клетками, в том числе эндотелиоцитами, и участвует в цитокиновой сигнализации, что ведет к активации неспецифического воспаления и развитию АГ. Полученные нами данные согласуются с результатами других ассоциативных исследований: по данным литературы, аллель 6A rs3025058 гена MMP3 характеризуется низкой транскрипционной активностью, а его носительство определяет избыточное накопление внеклеточного

матрикса [16]. Полиморфный локус rs3025058 ассоциирован с высокими показателями АД и повышенной артериальной жесткостью в австралийской популяции [17], а генотип 6A/6A связан с высоким риском развития АГ и ИМ у населения Польши [18].




Далее нами был проведен логистический регрессионный анализ ассоциаций рассматриваемых полиморфных локусов с развитием АГ с учетом ковариат. Полученные данные (табл. 3) были статистически не значимы (p>0,05).

Таким образом, при коррекции на ковариаты ассоциации полиморфного локуса rs3025058 MMP3 становятся незначимыми (p>0,05). Это свидетельствует о том, что генно-средовые взаимодействия оказывают важное модифицирующее влияние при развитии заболевания и могут нивелировать генетический эффект данного локуса на формирование АГ у мужчин.

Нами проведен анализ частот гаплотипов MMP среди мужчин с АГ и здоровых мужчин (табл. 4).

Установлены три гаплотипа, частота которых достоверно отличается в группах больных АГ и контроля: G-A-C (H4), G-A-C-1G (H11) и G-A-C-1G-6A (H17),

## Высокоселективный $\beta_1$ – адреноблокатор с вазодилатирующими свойствами<sup>1</sup>

-  **Эффективное снижение АД<sup>2</sup>**
-  **Хорошая переносимость<sup>2</sup>**
-  **Благоприятное воздействие  
на метаболические показатели<sup>3</sup>**

**Один раз в сутки<sup>1</sup>  
Два механизма действия<sup>1</sup>  
Три показания: АГ,  
ИБС: профилактика приступов  
стенокардии напряжения;  
ХСН (в составе  
комбинированной терапии)<sup>1</sup>**

АГ-артериальная гипертензия, ИБС-ишемическая болезнь сердца, ХСН-хроническая сердечная недостаточность

Краткая инструкция по применению препарата Небилет® МНН: небиволол. Фармакотерапевтическая группа : селективный блокатор  $\beta_1$  – адренорецепторов. Показания к применению: артериальная гипертензия; ИБС: профилактика приступов стенокардии напряжения; хроническая сердечная недостаточность (в составе комбинированной терапии). Способ применения и дозы: внутрь, один раз в сутки, желателен в одно и то же время, независимо от приема пищи, запивая достаточным количеством воды. Средняя суточная доза для лечения АГ и ИБС – 2,5 – 5 мг/сут. Максимальная суточная доза – 10 мг/сут. Препарат Небилет® может применяться как в монотерапии, так и в сочетании с другими антигипертензивными средствами. Лечение ХСН необходимо начинать с медленного увеличения дозы до достижения индивидуальной оптимальной поддерживающей дозы. Начальная доза при этом – 1,25 мг/сут. Далее осуществляется титрование доз до 2,5 – 5 мг/сут, а затем до 10 мг/сут (максимальная суточная доза). Противопоказания: повышенная чувствительность к действующему веществу или к любому компоненту препарата; острая сердечная недостаточность; хроническая сердечная недостаточность в стадии декомпенсации (требующая внутривенного введения препаратов, обладающих положительным инотропным действием); выраженная артериальная гипотензия (САД менее 90 мм рт ст); синдром слабости синусового узла, включая синоаурикулярную блокаду; атриовентрикулярная блокада 2 и 3 степ. (без наличия искусственного водителя ритма); брадикардия (ЧСС менее 60 уд/мин); кардиогенный шок; феохромоцитомы (без одновременного применения альфа-адреноблокаторов); метаболический ацидоз; тяжелые нарушения функции печени; бронхоспазм и бронхиальная астма в анамнезе; тяжелые облитерирующие заболевания периферических сосудов («перемежающая хромота», синдром Рейно); миастения; депрессия; непереносимость лактозы, дефицит лактазы и синдром глюкозо-галактозной мальабсорбции; возраст до 18 лет (эффективность и безопасность не изучены). С осторожностью: почечная недостаточность; сахарный диабет; гиперфункция щитовидной железы; аллергические заболевания в анамнезе; псориаз; ХОБЛ; АВ-блокада 1 степ., стенокардия Принцметала (вазоспастическая); возраст старше 75 лет. Побочные эффекты: (частые; более подробную информацию см. в инструкции препарата): со стороны нервной системы: головная боль, головокружение, повышенная утомляемость, слабость, парестезии. Со стороны ЖКТ: тошнота, запор, диарея. Со стороны ССС: частых нет (нередко: брадикардия, острая сердечная недостаточность, АВ-блокада, ортостатическая гипотензия, синдром Рейно).

Список литературы:

1. Инструкция по медицинскому применению препарата Небилет® П N011417/01 от 03.04.11 с внесенными изменениями от 04.06.12
2. Van Bortel L. M. et al.; Am J Cardiovasc Drugs 2008; 8 (1): 35-44
3. Schmidt A. C. et al.; Clin Drug Invest 2007; 27 (12):841-849



Адрес компании: ООО «Берлин-Хеми/А.Менарини» 123317, г. Москва, Пресненская набережная, д. 10 БЦ «Башня на набережной», блок Б  
Тел.: (495) 785-01-00, факс: (495) 785-01-01 <http://www.berlin-chemie.ru>  
Материал предназначен для специалистов здравоохранения.  
Отпускается по рецепту врача. Подробная информация о препарате содержится в инструкции по медицинскому применению препарата Небилет® П N011417/01 от 03.04.11 с внесенными изменениями от 04.06.12  
Одобрено 01.2018 RU\_Neb\_1\_2018



Таблица 3. Результаты логистического регрессионного анализа вовлеченности генотипов MMP в развитие АГ

Локусы	Модель	ОШ (95% ДИ)	р
rs11568818 MMP7	Доминантная (AG/GG vs AA); Рецессивная (GG vs AG/AA); Аддитивная (AG vs GG vs AA)	0,72 (0,41-1,26); 0,48 (0,25-0,91); 0,68 (0,47-0,99)	0,95; 0,65; 0,84
rs1320632 MMP8	Доминантная (AG/GG vs AA); Рецессивная (GG vs AG/AA); Аддитивная (AG vs GG vs AA)	0,73 (0,36-1,49); 1,15 (0,86-1,55); 0,82 (0,43-1,57)	0,57; 0,89; 0,59
rs11225395 MMP8	Доминантная (CT/TT vs CC); Рецессивная (TT vs CT/CC); Аддитивная (CT vs TT vs CC)	0,86 (0,48-1,53); 0,76 (0,42-1,39) 0,85 (0,60-1,23)	0,35; 0,16; 0,16
rs1799750 MMP1	Доминантная (1G2G/2G2G vs 1G1G); Рецессивная (2G2G vs 1G2G /1G1G); Аддитивная (1G2G vs 2G2G vs 1G1G)	1,11 (0,64-1,94); 1,05 (0,58-1,89); 1,29 (0,75-1,50)	0,87; 0,29; 0,60
rs3025058 MMP3	Доминантная (5A5A/5A6A vs 6A6A); Рецессивная (5A5A vs 5A6A/6A6A); Аддитивная (5A6A vs 6A6A vs 5A5A)	0,86 (0,50-1,49); 1,01 (0,53-1,92); 0,94 (0,65-1,35)	0,33; 0,98; 0,73

Получено методом логистической регрессии с учетом ковариат – ИМТ, ОХС, ХС ЛВП, ХС ЛНП, ТГ, курение.

однако после проведения пермутационного теста различия оставались значимыми только для гаплотипа H11, включающего SNP rs11568818 MMP7, rs1320632 MMP8, rs11225395 MMP8 и rs1799750 MMP1 (p=0,005, prerm=0,04). Данная комбинация является рискованной

в отношении развития заболевания (ОШ=2,58), частота гаплотипа в группе мужчин с АГ в 1,14 раз выше, чем в контрольной группе (15,1 и 13,3% соответственно).

Полиморфные локусы MMP, входящие в состав выявленного гаплотипа, имеют выраженный регуля-

Таблица 4. Гаплотипы матричных металлопротеиназ, ассоциированные с развитием артериальной гипертензии у мужчин

№	Полиморфные локусы					Частота гаплотипа		ОШ	р
	rs11568818 MMP7	rs1320632 MMP8	rs11225395 MMP8	rs1799750 MMP1	rs3025058 MMP3	Больные (n=564), (%)	Контроль (n=257), (%)		
H1	A	A	T			13,37	16,88	0,81	0,39
H2	G	A	T			24,84	25,49	0,95	0,79
H3	A	A	C			22,84	23,74	0,79	0,27
H4	G	A	C			30,38	24,90	1,58	<b>0,03</b>
H5	G	A	T	2G		5,74	7,57	0,76	0,41
H6	A	A	C	2G		13,59	13,97	0,87	0,58
H7	G	A	C	2G		15,59	13,69	1,07	0,82
H8	A	A	T	1G		7,79	9,50	0,68	0,25
H9	G	A	T	1G		15,56	15,41	1,06	0,82
H10	A	A	C	1G		10,23	10,36	0,74	0,40
H11	G	A	C	1G		15,11	13,27	2,58	<b>0,005</b>
H12	G	A	T	1G	5A	10,54	10,34	1,22	0,59
H13	A	A	C	1G	5A	6,89	7,61	0,50	0,17
H14	G	A	C	1G	5A	8,57	7,36	2,05	0,16
H15	G	A	T	2G	6A	7,15	8,21	0,60	0,23
H16	A	A	C	2G	6A	11,17	12,72	0,72	0,30
H17	G	A	C	1G	6A	6,82	4,62	4,29	<b>0,02</b>
H18	G	A	C	2G	6A	12,16	9,82	1,50	0,31

Получено методом логистической регрессии с учетом ковариат – ИМТ, ОХС, ХС ЛВП, ХС ЛНП, ТГ, курение.

торный потенциал (<http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/>). Так, все четыре полиморфных локуса располагаются в регионах ДНК, которые связываются с модифицированными гистонами (H3K4me1 и H3K4me3), маркирующими энхансеры и промоторы (в эндотелиоцитах, клетках периферической крови, гемопоэтических стволовых клетках, клетках головного мозга, предшественниках фибробластов и др.). Данные SNP локализованы в регионах ДНК, гиперчувствительных к DNКазе-1 в 15 различных тканях. Полиморфный локус rs11568818 *MMP7* расположен в сайтах связывания регуляторных белков TBP, CFOS, CJUN и в регионе регуляторных мотивов ДНК, связывающихся с транскрипционными факторами Foxa\_known1, GR\_known4, PLZF и Pou5f1\_known2. Согласно базе данных GeneCards ген *MMP7* кодирует *MMP7* (матрилизин 1), которая разрушает эластин, протеогликаны, фибронектин, казеин и участвует в заживлении ран и костном ремоделировании, а также миграции, пролиферации и апоптозе клеток (<http://www.genecards.org/>). При помощи анализа *in silico* (<http://www.gtexportal.org/>) выявлена связь полиморфного локуса rs11568818 *MMP7* с экспрессией генов (*cis-eQTL*). Так, аллель G, входящий в состав рискованного гаплотипа, ассоциирован с низким уровнем экспрессии гена *MMP7* в легких (коэффициент линейной регрессии  $\beta = -0,351$ ,  $p = 8,1 \cdot 10^{-14}$ ,  $FDR \leq 0,05$ ), поджелудочной железе ( $\beta = -0,312$ ,  $p = 5,1 \cdot 10^{-11}$ ,  $FDR \leq 0,05$ ), печени ( $\beta = -0,459$ ,  $p = 1,2 \cdot 10^{-5}$ ,  $FDR \leq 0,05$ ) и других органах. Анализ вовлеченности полиморфизма rs11568818 гена *MMP7* в развитие АГ и ее осложнений проводился и в других ассоциативных исследованиях. Так, в работе Jormsjö S. с соавт. показано, что у носителей генотипа GG rs11568818 *MMP7* в шведской популяции регистрируется повышенный риск развития сердечно-сосудистой патологии [19]. В индийской популяции, напротив, не установлено ассоциаций данного полиморфного маркера с развитием АГ и ее осложнений [20].

SNP rs1320632 гена *MMP8* расположен в регионе ДНК, который связывается с транскрипционными факторами CAC-binding-protein, Foxc1\_2, GATA\_known13, GCM, MAZ и PRDM1\_known1. Ген *MMP8* кодирует металлопептидазу 8 (коллагеназа нейтрофилов), при этом в результате альтернативного сплайсинга образуется множество активных изоформ данного фермента с различными N-концами. Коллагеназа нейтрофилов отвечает за деградацию интерстициальных коллагенов I–III типов и активацию хемокинов и факторов роста, участвует в клеточной пролиферации, дифференцировке клеток, апоптозе, ангиогенезе и онкогенезе (<http://www.genecards.org/>). Согласно

данным литературы *MMP8* вовлечена в производство вазоактивного АП, а у животных с дефицитом данной протеиназы отмечается снижение уровня АД [21]. При анализе *in silico* получено, что полиморфный вариант G локуса rs1320632 *MMP8* связан с более низким уровнем экспрессии гена *MMP27* в скелетной мускулатуре ( $\beta = -0,467$ ,  $p = 1,2 \cdot 10^{-8}$ ,  $FDR \leq 0,05$ ), нервной ткани ( $\beta = -0,544$ ,  $p = 3,6 \cdot 10^{-8}$ ,  $FDR \leq 0,05$ ) и др. Установлено, что SNP rs11225395 гена *MMP8* влияет на уровень экспрессии генов *MMP27* и *RP11-817J15.3*. Аллель C, входящий в состав «рискованного» в отношении развития АГ гаплотипа, ассоциирован с низким уровнем экспрессии гена *MMP27* в периферической крови ( $\beta = -0,228$ ,  $p = 4,8 \cdot 10^{-9}$ ,  $FDR \leq 0,05$ ), мышцах ( $\beta = -0,218$ ,  $p = 9,2 \cdot 10^{-6}$ ,  $FDR \leq 0,05$ ) и гена *RP11-817J15.3* в крови ( $\beta = -0,187$ ,  $p = 3,8 \cdot 10^{-5}$ ,  $FDR \leq 0,05$ ) и тонком кишечнике ( $\beta = -0,413$ ,  $p = 2,1 \cdot 10^{-5}$ ,  $FDR \leq 0,05$ ). Согласно GeneCards ген *MMP27* кодирует одноименный фермент, субстратом для которого выступают казеин и желатин, а функциональное значение гена *RP11-817J15.3* у млекопитающих в настоящий момент изучено слабо. При изучении сербского населения установлены ассоциации полиморфных локусов rs11225395 и rs1320632 гена *MMP8* с развитием атеросклероза сонных артерий у больных АГ [22], что согласуется с результатами настоящего исследования.

Полиморфный локус rs1799750 гена *MMP1* расположен в регионе ДНК, который связывается с регуляторными белками CFOS и GATA2, а также в регионе регуляторных мотивов ДНК, являющихся сайтами связывания с 21 транскрипционным фактором. Данные The Human Gene Database свидетельствуют, что ген *MMP1* кодирует *MMP1* (коллагеназа 1). Альтернативный сплайсинг приводит к образованию нескольких вариантов транскриптов, кодирующих различные изоформы, которые впоследствии подвергаются протеолизу. Коллагеназа 1 характеризуется гидролитической активностью, сходной с *MMP8*, и задействована в цитокиновой сигнализации, процессах регенерации и ремоделирования (<http://www.genecards.org/>). Полученные в настоящем исследовании результаты согласуются с литературными данными по этому вопросу. У носителей генотипа 1G/1G по локусу rs1799750 регистрируется снижение уровня *MMP1* в плазме крови и избыточное накопление внеклеточного матрикса, что приводит к стенозу артерий и повышению АД [23]. Ранее проведенные исследования также свидетельствуют о вовлеченности rs1799750 *MMP1* в развитие осложнений АГ – ишемического инсульта в китайской популяции [24] и ИМ у населения Бразилии [25].

Итак, полиморфные локусы rs11568818, rs1320632, rs11225395 и rs1799750 генов *MMP* характеризуются выраженными эпигенетическими эффектами – изменяют аффинность регуляторных мотивов ДНК к 31 транскрипционному фактору, располагаются в регионах ДНК, которые связываются с 4 регуляторными белками и гистонами, маркирующими энхансеры и промоторы. Изученные полиморфные маркеры влияют на уровень экспрессии генов, что может лежать в основе выявленных нами ассоциаций этих SNP с развитием АГ. Половые различия в вовлеченности полиморфных локусов *MMP* в развитие сердечно-сосудистой патологии выявлены в исследованиях Djuric T. с соавт. [26] и Giannakos E. с соавт. [27]. Следует отметить, что в ряде работ установлен половой диморфизм в связи генов-кандидатов с развитием инсульта, ИМ, СД и других мультифакториальных заболеваний [28–30].

## Заключение

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о значимой роли полиморфных локусов *MMP* в развитии АГ у мужчин. Гаплотип G-A-C-1G, включающий rs11568818 *MMP7*, rs1320632 *MMP8*, rs11225395 *MMP8* и rs1799750 *MMP1*, ассоциирован с высоким риском развития АГ у мужчин (ОШ=2,58,  $p_{regm}=0,04$ ). Изученные SNP расположены в регионах ДНК, которые связываются с модифицированными гистонами, маркирующими активные энхансеры и промоторы, и регуляторными белками TBP, CJUN, CFOS и GATA2. Кроме этого, исследованные полиморфные варианты оказывают влияние на уровень экспрессии генов *MMP7*, *MMP27* и *RP11-817J15.3* (в периферической крови, скелетной мускулатуре, нервной ткани и др.).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M et al. 2018 Practice Guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension: ESC/ESH Task Force for the Management of Arterial Hypertension. *Journal of Hypertension*. 2018;36(12):2284–309. DOI: 10.1097/HJH.0000000000001961
- Zhou B, Bentham J, Di Cesare M, Bixby H, Danaei G, Cowan MJ et al. Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants. *The Lancet*. 2017;389(10064):37–55. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31919-5
- Quan H, Chen G, Walker RL, Wielgosz A, Dai S, Tu K et al. Incidence, cardiovascular complications and mortality of hypertension by sex and ethnicity. *Heart*. 2013;99(10):715–21. DOI: 10.1136/heartjnl-2012-303152
- Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Matrix Metalloproteinases: Inflammatory Regulators of Cell Behaviors in Vascular Formation and Remodeling. *Mediators of Inflammation*. 2013;2013:1–14. DOI: 10.1155/2013/928315
- Cauwe B, Van den Steen PE, Opdenakker G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2007;42(3):113–85. DOI: 10.1080/10409230701340019
- Moskalenko M.I. The involvement of genes of matrix metalloproteinases in the development of arterial hypertension and its complication (review). *Research Result. Medicine and Pharmacy*. 2018;4(1):53–69. [Russian: Москаленко М.И. Вовлеченность генов матриксных металлопротеиназ в формирование артериальной гипертензии и ее осложнений (обзор). *Научный результат. Медицина и фармация*. 2018;4(1):53–69]. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-1-53-69
- Rudyh N.A., Sirotina S.S. Genetic interrelations of Russian and Ukrainian populations of Belgorod region. *Research Result. Medicine and Pharmacy*. 2015;1 (3):72–9. [Russian: Рудых Н.А., Сиротина С.С. Генетические соотношения русских и украинских популяций Белгородской области. *Научный результат. Медицина и Фармация*. 2015;1(3):72–9]. DOI: 10.18413/2313-8955-2015-1-3-72-9
- Sorokina I.N., Rudykh N.A., Bezmenova I.N., Polyakova I.S. Population genetic characteristics and genetic epidemiological research of candidate genes associations with multifactorial diseases. *Research Results in Biomedicine*. 2018;4(4):20–30. [Russian: Сорокина И.Н., Рудых Н.А., Безменова И.Н., Полякова И.С. Популяционно-генетические характеристики и генетико-эпидемиологическое исследование ассоциаций генов-кандидатов с мультифакториальными заболеваниями. *Научные результаты биомедицинских исследований*. 2018;4(4):20–30]. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-4-0-3
- Britov A. N., Pozdnyakov Yu. M., Volkova E. G., Drapkina O. M., Еганиян Р.А., Кисляк О.А. et al. National recommendations of cardiovascular prevention. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2011;10 (6 S2):2–64. [Russian: Бритов А.Н., Поздняков Ю.М., Волкова Э.Г., Драпкина О.М., Еганиян Р.А., Кисляк О.М. и др. Национальные рекомендации по кардиоваскулярной профилактике. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2011;10(6 S2):2–64]
- Hoepfer MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M et al. Definitions and Diagnosis of Pulmonary Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(25):D42–50. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.10.032
- Ponomarenko I.V. Selection of polymorphic loci for association analysis in genetic-epidemiological studies. *Research Result. Medicine and Pharmacy*. 2018;4(2):40–54. [Russian: Пономаренко И.В. Отбор полиморфных локусов для анализа ассоциаций при генетико-эпидемиологических исследованиях. *Научный результат. Медицина и фармация*. 2018;4(2):40–54]. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-5
- Pradhan-Palikhe P, Pussinen PJ, Vikatmaa P, Palikhe A, Kivimäki AS, Lepäntalo M et al. Single nucleotide polymorphism – 799C/T in matrix metalloproteinase-8 promoter region in arterial disease. *Innate Immunity*. 2012;18(3):511–7. DOI: 10.1177/1753425911423852
- Lièvre A, Milet J, Carayol J, Le Corre D, Milan C, Pariente A et al. Genetic polymorphisms of *MMP1*, *MMP3* and *MMP7* gene promoter and risk of colorectal adenoma. *BMC Cancer*. 2006;6(1):270. DOI: 10.1186/1471-2407-6-270



14. Ward LD, Kellis M. HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(D1):D877–81. DOI: 10.1093/nar/gkv1340
15. GTEx Consortium. Genetic effects on gene expression across human tissues. *Nature*. 2017;550(7675):204–13. DOI: 10.1038/nature24277
16. Hu W, Ye Y, Yin Y, Sang P, Li L, Wang J et al. Association of matrix metalloproteinase 1, 3, and 12 polymorphisms with rheumatic heart disease in a Chinese Han population. *BMC Medical Genetics*. 2018;19(1):27. DOI: 10.1186/s12881-018-0538-4
17. Beilby JP, Chapman CML, Palmer LJ, McQuillan BM, Thompson PL, Hung J. Stromelysin-1 (*MMP3*) gene 5A/6A promoter polymorphism is associated with blood pressure in a community population. *Journal of Hypertension*. 2005;23(3):537–42. PMID: 15716694
18. Sakowicz A, Fendler W, Lelonek M, Sakowicz B, Pietrucha T. Genetic Polymorphisms and the Risk of Myocardial Infarction in Patients Under 45 Years of Age. *Biochemical Genetics*. 2013;51(3–4):230–42. DOI: 10.1007/s10528-012-9558-5
19. Jormsjö S, Whatling C, Walter DH, Zeiher AM, Hamsten A, Eriksson P. Allele-Specific Regulation of Matrix Metalloproteinase-7 Promoter Activity Is Associated with Coronary Artery Luminal Dimensions Among Hypercholesterolemic Patients. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2001;21(11):1834–9. DOI: 10.1161/hq1101.098229
20. Mishra A, Srivastava A, Mittal T, Garg N, Mittal B. Association of matrix metalloproteinases (*MMP2*, *MMP7* and *MMP9*) genetic variants with left ventricular dysfunction in coronary artery disease patients. *Clinica Chimica Acta*. 2012;413(19–20):1668–74. DOI: 10.1016/j.cca.2012.05.012
21. Mallat Z. Matrix Metalloproteinase-8 and the Regulation of Blood Pressure, Vascular Inflammation, and Atherosclerotic Lesion Growth. *Circulation Research*. 2009;105(9):827–9. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.208595
22. Hoseini SM, Kalantari A, Afarideh M, Noshad S, Behdadnia A, Nakhjavani M et al. Evaluation of plasma *MMP8*, *MMP9* and *TIMP1* identifies candidate cardiometabolic risk marker in metabolic syndrome: results from double-blinded nested case-control study. *Metabolism*. 2015;64(4):527–38. DOI: 10.1016/j.metabol.2014.12.009
23. Lin T-H, Yang S-F, Chiu C-C, Su H-M, Wang C-L, Voon W-C et al. Matrix metalloproteinase-1 mitral expression and – 1607 1G/2G gene promoter polymorphism in mitral chordae tendinae rupture. *Translational Research*. 2013;161(5):406–13. DOI: 10.1016/j.trsl.2012.10.002
24. Zhang G, Li W, Guo Y, Li D, Liu Y, Xu S. *MMP* Gene Polymorphisms, *MMP1* -1607 1G/2G, -519 A/G, and *MMP12* -82 A/G, and Ischemic Stroke: A Meta-Analysis. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2018;27(1):140–52. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.08.021
25. Velho FM, Cohen CR, Santos KG, Silvello D, Martinelli N, Biolo A et al. Polymorphisms of Matrix Metalloproteinases in Systolic Heart Failure: Role on Disease Susceptibility, Phenotypic Characteristics, and Prognosis. *Journal of Cardiac Failure*. 2011;17(2):115–21. DOI: 10.1016/j.cardfail.2010.09.017
26. Djurić T, Živković M, Stanković A, Mečanin S, Alavantić D. Endothelial NOS G894 T and *MMP3* 5A/6A gene polymorphisms and hypertension in Serbian population. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2005;19(6):241–6. DOI: 10.1002/jcla.20085
27. Giannakos E, Vardali E, Bartekova M, Fogarassyova M, Barancik M, Radosinska J. Changes in activities of circulating *MMP2* and *MMP9* in patients suffering from heart failure in relation to gender, hypertension and treatment: a cross-sectional study. *Physiological Research*. 2016;65(Suppl 1):S149–152. PMID: 27643937
28. Alehagen U, Olsen RS, Länne T, Matussek A, Wågsäter D. PDGF-D gene polymorphism is associated with increased cardiovascular mortality in elderly men. *BMC Medical Genetics*. 2016;17(1):62. DOI: 10.1186/s12881-016-0325-z
29. Gammelmark A, Nielsen MS, Lundbye-Christensen S, Tjønneland A, Schmidt EB, Overvad K. Common Polymorphisms in the 5-Lipoxygenase Pathway and Risk of Incident Myocardial Infarction: A Danish Case-Cohort Study. *PLOS ONE*. 2016;11(11):e0167217. DOI: 10.1371/journal.pone.0167217
30. Azarova Yu.E., Klyosova E.Yu., Konoplya A.I. The role of polymorphisms of glutamate-cysteine ligase in type 2 diabetes mellitus susceptibility in Kursk population. *Научный Результат. Медицина И Фармация*. 2018;4 (1):39–52. [Russian: Азарова Ю. Э., Клесова Е. Ю., Конопля А. И. Роль полиморфизмов генов глутаматцистеинлигазы в развитии сахарного диабета 2 типа у жителей Курской области. *Научный результат. Медицина и фармация*. 2018;4(1):39–52]. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-1-39-52

Статья поступила 19.07.18 (Received 19.07.18)