

Matrix Metalloproteinase-13 (–77A>G) gene polymorphism is not a susceptibility factor of abdominal aortic aneurysm or aortoiliac occlusive disease in the Polish population

Analiza polimorfizmu genu metaloproteinazy 13 (–77A>G) w polskiej populacji pacjentów z tętniakami aorty brzusznej i z niedrożnością aortalno-biodrową

Aleksandra Korcz¹, Oliwia Zakerska², Katarzyna Pawlaczyk³, Daria Szymura-Ratajczak¹, Marta Molińska-Glura⁴, Grzegorz Oszkiniś⁵, Ryszard Słomski¹, Marcin Gabriel⁵

¹Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland (Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, Poznań)

²The NanoBioMedical Centre, A. Mickiewicz University, Poznan, Poland (Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet A. Mickiewicza, Poznań)

³Department of Hypertension and Vascular and Internal Diseases, Poznan University of Medical Sciences, Poland (Oddział Hipertensjologii, Angiologii i Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu)

⁴Department of Computer Science and Statistics, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland (Katedra Informatyki i Statystyki, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu)

⁵Department of General and Vascular Surgery, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland (Oddział Chirurgii Ogólnej i Naczyń, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu)

Abstract

Abdominal aortic aneurysm (AAA) and aortoiliac occlusive disease (AIOD) are common vascular diseases with both genetic and environmental risk factors involved. Matrix metalloproteinases (MMPs) play a major role in the remodelling of the extracellular matrix of aorta, and their contribution to the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm is unquestionable. The purpose of this study was to examine the role of MMP13 (–77A>G) gene polymorphism in the development of abdominal aortic aneurysm (AAA) or aortoiliac occlusive disease (AIOD) in the Polish population. We investigated 925 individuals in 3 groups: AAA (n = 300), AIOD (n = 312), and control (n = 313). The MMP13 (–77A>G) genotyping analysis was performed by PCR–RFLP methods and gel electrophoresis. The MMP13 (–77A>G) genotype distribution and allele frequencies were consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium. No significant differences in genotype distribution and allele frequencies between patients with the AAA or AIOD and the control group were observed. There were also no significant differences in MMP13 (–77A>G) genotype distribution and allele frequencies between the study groups in regard to gender, hypertension, myocardial infarction, or other risk factors. The results of our study indicate that MMP13 (–77A>G) gene polymorphism is a susceptibility factor neither of abdominal aortic aneurysm nor aortoiliac occlusive disease in the Polish population.

Key words: AAA, abdominal aortic aneurysm, AIOD, aortoiliac occlusive disease, gene polymorphism, MMP13, susceptibility factor

Streszczenie

Tętniak aorty brzusznej (AAA) oraz niedrożność aortalno-biodrowa (AIOD) są częstymi chorobami, których występowanie jest determinowane przez czynniki genetyczne i środowiskowe. Jednoznacznie potwierdzono

Adres do korespondencji:

dr n. przyr. Aleksandra Korcz,
Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk
ul. Strzeszyńska 32, 60–479 Poznań
tel.: 48 61 65 79 239, faks: 48 61 82 33 235
e-mail: olakorcz@man.poznan.pl

udział metaloproteinaz macierzy (MMPs) w patogenezie AAA poprzez udział w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej ściany aorty. Celem badania było określenie roli polimorfizmu genu *MMP13* (-77A>G) w rozwoju tętniaka aorty brzusznej i niedrożności aortalno-biodrowej w populacji polskiej. Badaniu podlegało 925 osób zakwalifikowanych do 3 grup: AAA ($n = 300$), AIOD ($n = 312$) i do grupy kontrolnej ($n = 313$). Analiza genotypowania *MMP13* (-77A>G) została przeprowadzona metodą PCR-RFLP i elektroforezy w żelu. Rozkład genotypów *MMP13* (-77A>G) i częstość występowania alleli były zgodne z prawem Hardy'ego-Weinberga. Nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie genotypów i częstości występowania alleli pomiędzy pacjentami z AAA lub AIOD oraz grupą kontrolną. Nie zaobserwowano istotnych różnic w rozkładzie genotypów *MMP13* (-77A>G) i częstością alleli pomiędzy badanymi grupami w odniesieniu do płci, występowania nadciśnienia tętniczego, zawału serca i innych czynników ryzyka. Wyniki badania autorów wskazują, że polimorfizm genu *MMP13* (-77A>G) nie jest czynnikiem różnicującym występowanie tętniaka aorty brzusznej i niedrożności aortalno-biodrowej w populacji polskiej.

Słowa kluczowe: AAA, tętniak aorty brzusznej, AIOD, niedrożność aortalno-biodrowa, polimorfizm genów, *MMP13*, czynniki ryzyka

Acta Angiol 2012; 18, 4: 148–156

Introduction

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a common vascular disease affecting approximately 2–6% of the population and up to 9% of men over 65 years old in developed countries [1, 2]. Pathogenesis of AAA is a multifactorial degenerative process characterized by histological signs of chronic inflammation, destruction of elastin and collagen in the media and adventitia, smooth muscle cell depletion with thinning of the medial wall, and neovascularization [3]. AAA is considered to be a complex disease with both genetic and environmental risk factors involved [4, 5].

Aortoiliac occlusive disease (AIOD) is a symptom of systemic atherosclerosis localized in the distal segment of the abdominal aorta and frequently extending to the iliac arteries.

Matrix metalloproteinases (MMPs) play a major role in the remodelling of the extracellular matrix of aorta, and their contribution to the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm is unquestionable [6–8]. The expression of MMPs is regulated predominantly at the transcriptional level, and a number of MMP genes contain single nucleotide polymorphisms in a promoter region that appear to affect the respective MMP production in an allele-specific manner [9]. These functional polymorphisms may contribute to interindividual differences in susceptibility to different diseases which are dependent on the activity of MMPs [10]. While the gelatinases MMP2 and MMP9, with their elastolytic activity, seem to play a key role in aneurysm pathogenesis [11], other members of the MMP family are likely also to be involved.

Matrix metalloproteinase-13 (MMP13) was found to be expressed abundantly in both AAAs and athero-

Wstęp

Tętniak aorty brzusznej (AAA, *abdominal aortic aneurysm*) jest częstą chorobą układu naczyniowego, rozpoznawaną u 2–6% populacji. Schorzenie częściej występuje u mężczyzn — dotyczy nawet 9% osób w wieku powyżej 65 lat, żyjących w krajach rozwiniętych [1, 2]. Powstawanie AAA jest determinowane przez wieloczynnikowy proces zwyrodnieniowy z histologicznymi wykładnikami przewlekłego stanu zapalnego, rozpadem włókien sprężystych i kolagenowych w błonie środkowej naczynia i przydancie, spadek liczby komórek mięśni gładkich ze ścieńczeniem błony środkowej oraz neowaskularyzacją [3]. Przypuszcza się, że dynamika powyższych procesów podlega regulacji przez czynniki genetyczne i środowiskowe [4, 5].

Niedrożność aortalno-biodrowa (AIOD, *aortoiliac occlusive disease*) jest jedną z postaci uogólnionej miażdżycy zlokalizowanej w dalszym odcinku aorty brzusznej oraz w tętnicach biodrowych. Podobnie jak tętniaki aorty, AIOD częściej występuje u mężczyzn i jest determinowana przez wiele czynników genetycznych i środowiskowych.

Metaloproteinazy macierzy (MMPs) odgrywają dominującą rolę w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej ściany aorty a ich udział w patogenezie tętniaka aorty brzusznej jest bezsporny [6–8]. Ekspresja MMPs jest regulowana w przeważającej części na poziomie transkrypcji, a pewna liczba genów MMPs zawiera w regionie promotora pojedyncze polimorfizmy nukleotydowe, które wydają się wpływać na syntezę MMPs w sposób allelospecyficzny [9]. Takie funkcjonalne polimorfizmy mogą się przyczyniać do występowania indywidualnych różnic w podatności na wystąpienie róż-

sclerotic lesions but not in normal aortic controls [12]. The elevated RNA expression levels of MMP13 were observed in human AAAs [12, 13], in cultured vascular smooth muscle cells [12], and recently in a rodent model of AAA [14]. The presence of MMP13 protein in the aneurismal wall was demonstrated by Yoon, Tromp, and Cho [13–15]. MMP13 has a wide spectrum of substrate specificity: preferentially hydrolyses type II collagen and is also active on other matrix components such as gelatine, fibronectin, aggrecan, and type IV, IX, X, and XIV collagens [16]. MMP13 activity is controlled *in vivo* by naturally occurring inhibitors such as α_2 -macroglobulins and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). The human MMP13 gene is transcribed into several transcripts, and MMP13 promoter has several binding sites implicated in transcriptional regulation. The *MMP13*(-77A>G) polymorphic site is located within the Ets/PEA-3 binding site (-77 to -83 nt) [16]. Yoon et al. showed that *MMP13*(-77A>G) polymorphism had allele-specific effects on the regulation of the metalloproteinase-13 gene expression and that the -77A alleles had higher promoter activity than the -77G alleles [15].

The aim of the present study was to examine a single nucleotide polymorphism (-77A>G) of the promoter of the *MMP13* gene in Polish patients with abdominal aortic aneurysm and evaluate it as a potential susceptibility factor to developing AAA. We also investigated *MMP-13* (-77A>G) gene polymorphism in patients with aortoiliac occlusive disease to compare the results of abdominal aortic aneurysm with disease involving atherosclerosis located in abdominal aorta.

Materials and methods

Subjects

The study included consecutive patients with either AAA ($n = 300$) or AIOD ($n = 312$) referred to and subjected to surgery in the Department of General and Vascular Surgery of the Poznan University of Medical Sciences in the years 2003–2006 and 2008–2010. AAA was defined as a focal dilation of the abdominal aorta at least 50% larger than the adjacent suprarenal segment. Aneurysms with diameter of ≥ 48 mm were included in the study. Familial AAA cases and patients with aneurysm characterized by inflammation, dissection, or having emerged as a result of trauma were excluded from the study. Aortoiliac occlusive disease was defined as a chronic atherosclerotic occlusion of distal segments of aorta and iliac arteries. The AIOD group included patients with clinical symptoms of ischaemia in degrees III, IV, and V (Rutherford's) diagnosed by both symptomatic and anatomical criteria.

Controls ($n = 313$) comparable for age and sex to patients with aneurysm were recruited from the

nych chorób zależnych od aktywności poszczególnych MMPs [10]. Prawdopodobnie żelatynazy MMP2 i MMP9, z ich aktywnością elastolityczną, odgrywają dominującą rolę w patogenezie tętniaka [11], jednak jest bardzo prawdopodobne, że także inne enzymy z rodziny metaloproteinaz biorą udział w tym procesie.

W dotychczasowych badaniach stwierdzono, że ekspresja macierzowej metaloproteinazy 13 (MMP13) jest zwiększona w przypadku obydwu analizowanych schorzeń, przy niezmiennych wartościach ekspresji w wycinkach ścian aorty pochodzących od osób z grupy kontrolnej [12]. Podwyższone poziomy ekspresji RNA dla MMP13 obserwowano w skrawkach ścian oraz w hodowlach komórek mięśni gładkich pozyskanych ze ścian tętniaków u ludzi, jak również w tętniakach aorty brzusznej wygenerowanych w modelach zwierzęcych u gryzoni [12–15]. MMP13 ma szerokie spektrum aktywności substratowej: chociaż preferencyjnie hydrolizuje typ II kolagenu, wykazuje również aktywność w odniesieniu do innych składowych macierzy, takich jak żelatyna, fibronektyna, agrekan, a także kolageny typu IV, IX, X i XIV [16].

Aktywność MMP13 jest regulowana *in vivo* poprzez naturalnie występujące inhibitory, takie jak α_2 -makroglobuliny i tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMPs). Ludzki gen MMP13 składa się z kilku transkryptów, a promotor MMP13 ma kilka miejsc wiążących, biorących udział w regulacji transkrypcji. Polimorficzne miejsce *MMP13*(-77A>G) jest zlokalizowane w regionie miejsca wiążącego czynniki transkrypcyjne Ets/PEA-3 (pozycja -77 do -83 nt) [16]. Yoon i wsp. wykazali, że polimorfizm *MMP13*(-77A>G) w sposób allelospecyficzny wpływa na regulację ekspresji genu metaloproteinazy 13, co wynika z faktu, że allel -77A ma większą aktywność promotora niż allel -77G [15].

Celem prezentowanego badania było określenie polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (-77A>G) w regionie promotora genu *MMP13* u polskich pacjentów z tętniakiem aorty brzusznej lub niedrożnością aortalno-biodrową oraz przydatności oceny tego polimorfizmu genetycznego jako potencjalnego czynnika podatności dla rozwoju AAA lub zmian miażdżycowych w tej lokalizacji.

Materiał i metody

Pacjenci

Do badania zostało włączonych 300 pacjentów z tętniakiem aorty brzusznej i 312 chorych z niedrożnością aortalno-biodrową, leczonych operacyjnie w Klinice Chirurgii Ogólnej i Naczyń Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Tętniak aorty został zdefiniowany jako miejscowe poszerzenie odcinka dalszego aorty brzusznej

abdominal aortic aneurysm screening studies conducted in the Department of General and Vascular Surgery of the Poznan University of Medical Sciences in 2009 and 2010.

All studied individuals underwent complete clinical examination in order to exclude subjects suffering from connective tissue disorders and malignant or other inflammatory disease. Data concerning medical records, medication history, and smoking habit were collected based on a detailed questionnaire. Lipid fractions were measured after overnight fasting.

All subjects underwent Doppler ultrasound scanning examination. The aortic diameter was measured below the origin of the renal arteries. The measurements were obtained in aorta transverse view, in two planes by applying measurement calipers to the outer surfaces of the walls. Patients with AAA or AIOD were subjected to further examinations by computed tomography angiography (CTA). The subjects were considered as hypertensive when they had diastolic pressure above 90 mm Hg, systolic pressure above 140 mm Hg, or were on antihypertensive therapy.

The research protocol was reviewed and approved by the institutional ethics committee. All individuals enrolled in this study were Polish, living in the Wielkopolska region (western part of Poland).

Detection of *MMP13*(-77A>G) gene polymorphism (rs2252070)

DNA was isolated from 5 ml of peripheral blood samples by standard methods. The genotyping of the *MMP13* (-77A>G) gene polymorphism was performed by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) methods as described previously [15, 17]. The sequence surrounding the single nucleotide polymorphism at position -77 of *MMP-13* gene promoter was amplified with the primers: F 5'-GATACGTTCTTACAGAAGGC-3' (forward primer) and R 5'-GACAAATCATCTTCATCACC-3' (reverse primer). For restriction fragment length polymorphism, the 445 bp PCR-products were digested with BsrI (BseNI) restriction enzyme. Fragments corresponding to allele A (445 bp) and allele G (197 bp 248 bp) were analysed on agarose gel stained with ethidium bromide.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statistica software version 9.0. Demographic and clinical data were expressed as mean \pm SD, median, and range. Genotype and allele frequencies were obtained by direct count. Consistency with the Hardy-Weinberg rule and the differences between the groups were assessed

o co najmniej 50% w stosunku do przyległego podnerkowego odcinka aorty. W badaniu uwzględniono tętniaki o średnicy \geq 48 mm. Przypadki rodzinnego występowania tętniaków aorty brzusznej i pacjenci z tętniakami zapalnymi lub ostrymi, będącymi wynikiem urazu, zostali wyłączeni z badania. Niedrożność aortalno-biodrowa została zdefiniowana jako przewlekła miażdżycowa niedrożność odcinka dalszego aorty i tętnic biodrowych. Grupa z AIOD obejmowała pacjentów z objawami klinicznymi niedokrwienia w III, IV i V stopniu wg klasyfikacji Rutherforda, na podstawie kryteriów objawowych i anatomicznych.

Grupa kontrolna (n = 313), porównywalna pod względem wieku i płci w stosunku do pacjentów z tętniakami, została utworzona podczas badań przesiewowych w kierunku tętniaków aorty brzusznej, przeprowadzonych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Naczyń Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w latach 2009 i 2010.

U wszystkich osób włączonych do badania przeprowadzono pełne badanie kliniczne w celu wykluczenia osób z chorobami tkanki łącznej, nowotworami lub innymi schorzeniami zapalnymi. Dane dotyczące dokumentacji medycznej, zażywanych leków i palenia tytoniu, zostały zebrane na podstawie szczegółowej ankiety. Poszczególne frakcje lipidowe osocza były określane po nocnej przerwie w jedzeniu.

Średnicę aorty brzusznej w odcinku poniżej poziomu odejścia tętnic nerkowych autorzy niniejszej pracy mierzyli w badaniu ultrasonograficznym. Pomiar wykonywano na przekroju poprzecznym aorty, w dwóch płaszczyznach, przykładając znaczniki do powierzchni zewnętrznej ścian. U wszystkich chorych z AAA i AIOD zakwalifikowanych do leczenia zabiegowego wykonano badanie tomograficzne. Nadciśnienie tętnicze rozpoznano u pacjentów z wartościami ciśnienia skurczowego $>$ 140 mm Hg i/lub ciśnienia rozkurczowego $>$ 90 mm Hg oraz u osób przyjmujących leki hipotensyjne.

Protokół badania został sprawdzony i zaakceptowany przez Komisję Etyczną Uniwersytetu Medycznego. Wszystkie osoby włączone do badania były Polakami, zamieszkującymi w Wielkopolsce.

Oznaczenie polimorfizmu genu *MMP13*(-77A>G) (rs2252070)

DNA był izolowany z 5 ml próbek krwi obwodowej, za pomocą standardowych metod. Genotypowanie polimorfizmu genu *MMP13* (-77A>G) było przeprowadzane za pomocą polimerazowej reakcji łańcuchowej, a polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP) przy użyciu metod opisanych wcześniej [15, 17]. Sekwencja otaczająca pojedynczy polimorfizm nukleotydowy w pozycji -77 promotora genu *MMP13* była amplifikowana przy zastosowaniu starterów: F5'-GA-

by two-tailed χ^2 -test with 95% CI. Two models of inheritance: recessive (A/A vs. A/G+G/G) and dominant (A/A+ A/G vs. G/G), were tested. The non-parametric Mann-Whitney test, χ^2 -test, and exact Fisher test were used. The odds ratio (OR) with a 95% CI was determined. A *P*-value < 0.05 was considered to indicate statistical significance. All tests were two-tailed.

Results

Demographic and clinical characteristics of the patients and controls are shown in Table I. The AAA patients and controls were matched by age and gender. The AAA patients were also comparable with controls by risk factors: hypertension and total and LDL-cholesterol. A history of myocardial infarction was the most frequent in the AAA patient group. The frequency of diabetes was comparable in all three studied groups. The percentage of past or present smokers was significantly higher in both groups of patients in comparison with the control group.

Genotyping results were available from 925 individuals: 300 patients with AAA, 312 patients with AIOD, and 313 controls. The *MMP13* genotype distribution and allele frequencies were consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium and are described in Table II. No significant differences in genotype distribution and allele frequencies between patients with the AAA or AIOD and the control group were observed (neither in dominant, nor in recessive model of inheritance). We did not observe any significant differences in *MMP13* (-77A>G) genotype distribution and allele frequencies between the study groups in regard to gender, hypertension, myocardial infarction, or other risk factors (data not shown). The A allele frequency was the highest in the AAA patient group (0.748) in comparison with the control group (0.738) and AIOD (0.713) (Tables II and III). The frequencies of A allele in our Polish study population were higher in comparison with Caucasian data from other authors and the NCBI-SNP Database (Table III). The A allele frequencies were most closed to those reported for Blacks and African-Americans (15, NCBI-SNP Database).

Discussion

Genetic analysis in abdominal aortic aneurysm has been dominated by candidate gene association studies [5, 18, 19]. Based on SNP analysis, a number of susceptibility genes for AAA were postulated, including: methylene-tetra-hydrofolate reductase (MTHFR), angiotensin converting enzyme (ACE), MMP9, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase -1 (TIMP-1), interleukins, and other genes [5, 18–21]. In a whole-genome analysis

-TACGTTCTTACAGAAGGC-3' (starter wiodący) i R 5'-GACAAATCATCTTCATCACC-3' (starter odwrócony). W celu uzyskania polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych produkty PCR o długości 445 pz były hydrolizowane przy użyciu enzymu restrykcyjnego BsrI (BseNI). Fragmenty odpowiednie dla allelu A (445 pz) i allelu G (197 pz i 248 pz) analizowano w żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyyny.

Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została wykonana przy użyciu oprogramowania Statistica wersja 9.0. Dane kliniczne i demograficzne wyrażono jako średnie \pm SD, mediana i zakres. Genotyp oraz częstość występowania alleli określono metodą bezpośredniego liczenia. Zgodność z regułą Hardy'ego-Weinberga i różnice między grupami były oceniane dwustronnym testem χ^2 z przedziałem ufności CI 95%. Testowaniu podlegały dwa modele dziedziczenia — recesywny (A/A vs. A/G+G/G) oraz dominujący (A/A+A/G vs. G/G). Użyto nieparametrycznego testu Manna-Whitneya, testu χ^2 oraz testu dokładności Fishera. Iloraz szans (OD, *odds ratio*) został określony z 95-procentowym przedziałem ufności. O uzyskaniu statystycznej istotności świadczy *p* < 0,05. Wszystkie testy były dwustronne.

Wyniki

Charakterystykę demograficzną i statystyczną pacjentów oraz grupy kontrolnej przedstawiono w tabeli I. Grupa chorych z AAA była porównywalna z grupą kontrolną pod względem wieku i płci oraz występowania czynników ryzyka, takich jak nadciśnienie tętnicze, stężenia cholesterolu całkowitego i frakcji LDL. Dodatni wywiad w kierunku przebytego zawału serca był częstszy w grupie AAA. Częstość cukrzycy była porównywalna we wszystkich trzech badanych grupach. Odsetek byłych i obecnych palaczy tytoniu był znacząco wyższy w obu grupach pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną.

Wyniki badań genetycznych były dostępne w odniesieniu do 925 osób: 300 pacjentów z AAA, 312 pacjentów z AIOD i 313 osób z grupy kontrolnej. Rozkład genotypu *MMP13* i alleli był zgodny z równowagą Hardy-Weinberga i został opisany w tabeli II. Nie zaobserwowano istotnych różnic w rozkładzie genotypów i częstości występowania alleli pomiędzy pacjentami z AAA lub AIOD a grupą kontrolną (zarówno w modelu dziedziczenia dominującego, jak i recesywnego). Autorzy nie zaobserwowali żadnych istotnych różnic w rozkładzie genotypów *MMP13* (-77A>G) ani częstości występowania alleli pomiędzy badanymi grupami, w odniesieniu do płci, nadciśnienia tętniczego, przebytego zawału serca czy innych czynników ryzyka (dane nie zostały przedsta-

Table I. Demographic and clinical characteristics of the study population**Tabela I.** Charakterystyka demograficzna i kliniczna badanej populacji

Variable	AAA n = 300	AIOD n = 312	Control n = 313	p value AAA vs Control AAA vs grupa kontrolna	p value AIOD vs Control AIOD vs grupa kontrolna	p value AAA vs AIOD
Male Mężczyźni	85.6%	73.7%	85.9%	n.s.	0.0001	0.0002
Female Kobiety	14.4%	26.3%	14.1%	n.s.	0.0001	0.0002
Age (y) Wiek (lata)						
Mean ± SD Średnia ± SD	66.9 ± 8.4	60.4 ± 8.3	66.9 ± 7.2	n.s.	< 0.0001	< 0.0001
Median (min–max) Mediana (min.–maks.)	67.0 (33.0–92.0)	60.0 (38.0–86.0)	65.5 (43–89)	n.s.	< 0.0001	< 0.0001
BMI [kg/m²]						
Mean ± SD Średnia ± SD	27.1 ± 3.9	24.6 ± 4.5	28.3 ± 4	0.0007	< 0.0001	< 0.0001
Median (min–max) Mediana (min.–maks.)	27.1 (17.8–45.0)	24.2 (13.0–37.6)	28.1 (16.5–43.7)	0.0007	< 0.0001	< 0.0001
Total cholesterol [mmol/L] Cholesterol całkowity [mmol/l]						
Mean ± SD Średnia ± SD	5.2 ± 1.4	5.3 ± 1.4	5.3 ± 1.1	n.s.	n.s.	n.s.
Median (min–max) Mediana (min.–maks.)	5.0 (1.6–9.7)	5.25 (2.1–11.3)	5.3 (2.6–8.9)	n.s.	n.s.	n.s.
HDL-cholesterol [mmol/L] Cholesterol frakcji HDL [mmol/l]						
Mean ± SD Średnia ± SD	1.2 ± 0.5	1.2 ± 0.4	1.4 ± 0.4	< 0.0001	< 0.0001	n.s.
Median (min–max) Mediana (min.–maks.)	1.1 (0.3–7.1)	1.1 (0.4–4.9)	1.4 (0.7–4.5)	< 0.0001	< 0.0001	n.s.
LDL-cholesterol [mmol/L] Cholesterol frakcji LDL [mmol/l]						
Mean ± SD Średnia ± SD	3.3 ± 1.3	3.3 ± 1.2	3.3 ± 1.0	n.s.	n.s.	n.s.
Median (min–max) Mediana (min.–maks.)	3.1 (0.7–7.7)	3.2 (0.8–6.9)	3.2 (0.9–6.4)	n.s.	n.s.	n.s.
TG [mmol/L] TG [mmol/l]						
Mean ± SD Średnia ± SD	1.7 ± 0.9	1.8 ± 1.3	1.4 ± 0.7	< 0.0001	< 0.0001	n.s.
Median (min–max) Mediana (min.–maks.)	1.42 (0.4–9.9)	1.55 (0.5–19.6)	1.2 (0.3–5.1)	< 0.0001	< 0.0001	n.s.
Myocardial infarction Zawał serca	32.6%	22.2%	17.3%	< 0.0001	n.s.	0.0041
Hypertension Nadciśnienie tętnicze	73.6%	49.0%	67.4%	n.s.	< 0.0001	< 0.0001
Smoking habit Palenie tytoniu	84.0%	82.5%	53.9%	< 0.0001	< 0.0001	n.s.
Diabetes Cukrzyca	11.8%	15.4%	14.4%	n.s.	n.s.	n.s.

AAA — abdominal aortic aneurysm (tętniak aorty brzusznej); AIOD — aortoiliac occlusive disease (niedrożność aortalno-biodrowa); BMI — body mass index (wskaźnik masy ciała); TG — triglycerides (triglicerydy); n.s. — non-significant (nieistotne statystycznie)

Table II. Genotype distribution and allele frequencies of *MMP13* (-77A>G) gene polymorphism [rs2252070] in all studied groups: AAA, AIOD, and control**Tabela II.** Rozkład genotypów i częstość występowania alleli polimorfizmu genu *MMP13* (-77A>G) [rs2252070] we wszystkich grupach badanych: AAA, AIOD i grupie kontrolnej

Genotype Genotyp	Allele Allel	AAA		AIOD		Control Grupa kontrolna		P value Wartość p
		n = 300		n = 312		n = 313		
		n	%	n	%	n	%	n.s
A/A		165	55	159	51.0	172	55.0	n.s.
A/G		119	39.7	127	40.7	118	37.7	n.s.
G/G		16	5.3	26	8.3	23	7.3	n.s.
	A		0.748		0.713		0.738	n.s.
	G		0.252		0.287		0.262	n.s.

n.s. — non-significant both in dominant (A/A + A/G vs. GG) and recessive (A/A vs. A/G + GG) models of inheritance: AAA vs. control; AIOD vs. control; AAA vs. AIOD
 n.s. — nieistotne statystycznie w dominującym (A/A + A/G vs. G/G) i recesywnym (A/A vs. A/G + G/G) modelu dziedziczenia: AAA vs. kontrola; AIOD vs. kontrola; AAA vs. AIOD

AAA — abdominal aortic aneurysm (tętniak aorty brzusznej); AIOD — aortoiliac occlusive disease (niedrożność aortalno-biodrowa)

of familial AAA three different susceptibility loci were identified: 19q13, 4q31 [22], and 9p21 [23]. However, the association of AAA with 19q13 loci was not confirmed in a study of sporadic AAA [24].

Recently, in a genome-wide association approach, a sequence variant on 9q33 that associates with risk of AAA was demonstrated [25].

The present study found no evidence of an association between *MMP13*(-77A>G) gene polymorphism and abdominal aortic aneurysm in the Polish population. So far, one study exploring the association of functional *MMP13* variant (-77A>G) with AAA in Canadians and Belgians was also reported with a negative result [17]. Part of this group reported earlier an increased development of atherosclerotic lesions in aorta in young black males, which was attributed, in part, to the polymorphisms observed in the *MMP13* promoter [15]. However, in our studies we did not observe any association of *MMP13* gene polymorphism with aortoiliac occlusive disease. *MMP13*(-77A>G) gene polymorphism was found to be associated with functional status in rheumatoid arthritis [10] and implicated in endometriosis progression together with *MMP12* (-82A>G) gene polymorphism [26].

We would like to stress our observation of higher frequency of *MMP13*-A allele in the Polish population in

wione). Częstość występowania allelu A była najwyższa u pacjentów z AAA (0,748) w porównaniu z grupą kontrolną (0,738) i pacjentów z AIOD (0,713) (tab. II, III). Częstość występowania allelu A w badaniu autorów była w populacji polskiej większa w porównaniu z danymi dotyczącymi rasy kaukaskiej przedstawionymi przez innych autorów i zawartymi w bazach danych NCBI-SNP (tab. III). Częstość występowania allelu A była bardziej zbliżona do podawanej dla Afroamerykanów (15, baza danych NCBI-SNP).

Omówienie

Analiza genetyczna etiologii tętniaka aorty brzusznej została zdominowana przez badania asocjacji genetycznych genów kandydatów [5, 18, 19]. Na podstawie analizy polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNPs) wytypowanych kilka genów podatności na AAA, takich jak: reduktaza metylenotetrahydrofolianowa (MTHFR), konwertaza angiotensynowa (ACE), MMP9, tkankowy inhibitor metaloproteiny-1 (TIMP-1), interleukiny i inne geny [5, 18–21]. W analizie całego genomu występującego rodzinnie tętniaka aorty brzusznej zidentyfikowano trzy różne loci podatności: 19q13, 4q31 oraz 9p21 [22, 23]. Jednak w odniesieniu do tętniaków występujących sporadycznie asocjacja pomiędzy AAA a loci 19q13 nie została potwierdzona [24].

Table III. Comparison of MMP-13 (-77A>G) [rs2252070] allele frequencies in the current and other studies
Tabela III. Porównanie częstości alleli MMP-13 (-77A>G) [rs2252070] w obecnym i innych badaniach

Allele Allel	Polish population Populacja polska			Other studies Inne badania					
	AAA n = 300	AIOD n = 312	Control Grupa kontrolna n = 313	Caucasians Rasa kaukaska			African-Americans Afroamerykanie		
				Belgians Belgowie [17] n = 269	Canadians Kanadyjczycy [17] n = 156	[15] n = 351	Europeans Europejczycy (NCBI-SNP)	[15] n = 351	NCBI-SNP
A	0.748	0.713	0.738	0.710	0.700	0.650	0.667-0.720	0.710-0.730	0.713-0.761
G	0.252	0.287	0.262	0.290	0.300	0.350	0.333-0.280	0.290-0.270	0.287-0.239

NCBI — The National Center for Biotechnology Information — SNP database; NCBI — Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej — baza danych SNP

comparison with Caucasian data from other references (Table III). Since A allele was found to have an almost two-fold higher transcriptional activity in comparison with minor allele (G) this might be an interesting observation of the genetic background of the Polish population.

The lack of association of MMP13 (-77A>G) gene polymorphism with AAA does not exclude the possibility of other SNPs in this gene that may increase a risk of developing AAA. MMP13 has a central position in MMP activation cascade: MMP13 is activated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), MMP2, and MMP3 whereas MMP2 and MMP9 are activated by MMP13 [27]. Cho et al. reported recently that a decrease in types I and III collagen is accompanied by simultaneous increase of MMP13 in males compared with females in the rodent model of AAA after elastase perfusion [14]. The role of MMP13 in aneurysm pathogenesis is unclear, although these are indications that it may play an important function by activation of other MMPs.

In conclusion, this gene association study shows that MMP13 (-77A>G) gene polymorphism is a susceptibility factor neither of abdominal aortic aneurysm nor aortoiliac occlusive disease in the Polish population.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Miłostawa Zowczak-Drabarczyk for her critical reading of the manuscript. This work was supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education, Project No. N N403 209635.

Ostatnio w badaniach typu GWAS (*Genome Wide Association Studies*) wykazano zależność pomiędzy zmianą sekwencji w 9q33 a ryzykiem rozwoju AAA [25].

Przeprowadzone przez autorów badanie nie wykazało zależności pomiędzy polimorfizmem genu MMP13 (-77A>G) a występowaniem tętniaka aorty brzusznej w populacji polskiej.

Podobny wynik uzyskano w jedynym przeprowadzonym dotychczas badaniu dotyczącym podobnej zależności, uwzględniającym populację Kanadyjczyków i Belgów [17]. Część autorów zaangażowanych w realizację tego projektu pisała wcześniej o przyspieszonym rozwoju zmian miażdżycowych w aorcie u młodych mężczyzn rasy czarnej, co było po części przypisywane polimorfizmowi obserwowanemu w promotorze MMP13 [15]. Jednak w prezentowanym badaniu autorzy nie zaobserwowali żadnego związku polimorfizmu genu MMP13 z niedrożnością aortalno-biodrową.

Inni autorzy stwierdzili powiązanie polimorfizmu genu *MMP13*(-77A>G) ze stanem czynnościowym w reumatoidalnym zapaleniu stawów [10] oraz, łącznie z polimorfizmem genu *MMP12*(-82A>G), w rozwoju endometriozy [26].

Autorzy chcieliby podkreślić własną obserwację dotyczącą częstszego występowania allelu *MMP13*-A w populacji polskiej w porównaniu z rozkładem u osób rasy kaukaskiej, określonego w innych badaniach (tab. III). Ponieważ allel A ma prawie dwukrotnie większą aktywność transkrypcyjną w porównaniu z występującym rzadziej allelem (G), może to być interesująca obserwacja tła genetycznego polskiej populacji.

Brak asocjacji polimorfizmu genu *MMP13* (-77A>G) z AAA, nie wyklucza możliwości innych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNPs) w tym genie, które mogą podwyższać ryzyko rozwoju AAA. *MMP13* ma centralne położenie w kaskadzie aktywacji metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs): *MMP13* jest aktywowana przez typ I błonowej metaloproteinazy macierzy (MT1-MMP), *MMP2* oraz *MMP3*, natomiast *MMP2* i *MMP9* są aktywowane przez *MMP13* [27]. Cho i wsp. donosili niedawno, że spadkowi kolagenu typu I i III towarzyszy równoczesny wzrost *MMP13* u płci męskiej w porównaniu z płcią żeńską na modelach AAA u gryzoni wywołanych poprzez perfuzję elastazą [14]. Rola *MMP13* w patogenezie tętniaków nie jest jasna, jednak powyższe fakty wskazują na to, że może ona odgrywać ważną rolę w aktywacji innych metaloproteinaz istotnych dla powstania tętniaka.

Uzyskane przez autorów wyniki wskazują, że polimorfizm genu *MMP13*(-77A>G) nie jest czynnikiem różnicującym w tętniaku aorty brzusznej i niedrożności aortalno-biodrowej w populacji polskiej.

Podziękowania

Dziękujemy Dr Miłostawie Zowczak-Drabarczyk za krytyczne uwagi dotyczące tego manuskryptu. Praca została dofinansowana przez Polskie Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, projekt nr N N403 209635.

Piśmiennictwo

- Thompson RW, Geraghty PJ, Lee JK (2002) Abdominal Aortic Aneurysms: Basic Mechanisms and Clinical Implications. *Curr Probl Surg*; 39: 93.
- Ailawadi G, Eliason JL, Upchurch GR JR, Arbor A (2003) Basic science Review, Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*; 38: 584.
- Wassef M, Baxter BT, Chisholm RL et al (2001) Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: a multidisciplinary research program supported by the National Heart, Lung and Blood Institute. *J Vasc Surg*; 34: 730.
- Hintersheer I, Tromp G, Kuivaniemi H (2011) Genes and abdominal aortic aneurysm. *Ann Vasc Surg*; 25: 388-412.
- Saratzis A, Abbas AA, Kiskinis D, Melas N, Saratzis N, Kitas GD (2011) Abdominal aortic aneurysm: a review of the genetic basis. *Angiology*; 62: 18-32.
- Tamarina NA, McMillan WD, Shively VP, Pearce WH (1997) Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysm and normal aorta. *Surgery*; 122: 264-271.
- Pearce WH, Shively VP (2006) Abdominal aortic aneurysm as a complex multifactorial disease: interactions of polymorphisms of inflammatory genes, features of autoimmunity, and current status of MMPs. *Ann N Y Acad Sci*; 1085: 117-132.
- McMillan WD, Pearce WH (1999) Increased plasma levels of metalloproteinase-9 are associated with abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*; 29: 122-129.
- Ye S (2000) Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol*; 19: 623-629.
- Ye S (2006) Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. *Cardiovasc Res*; 69: 636-645.
- Loftus IM, Thompson MM (2002) The role of matrix metalloproteinases in vascular disease. *Vasc Med*; 7: 117-133.
- Mao D, Lee JK, VanVickle SJ, Thompson RW (1999) Expression of collagenase-3 (MMP-13) in human abdominal aortic aneurysms and vascular smooth muscle cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun*; 261: 904-910.
- Tromp G, Gatalica Z, Skunca M et al (2004) Elevated expression of matrix metalloproteinase-13 in abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg*; 18: 414-420.
- Cho BS, Roelofs KJ, Ford JW, Henke PK, Upchurch GR JR (2010) Decreased collagen and increased matrix metalloproteinase-13 in experimental abdominal aortic aneurysms in males compared with females. *Surgery*; 147: 258-267.
- Yoon S, Kuivaniemi H, Gatalica Z et al (2002) *MMP13* promoter polymorphism is associated with atherosclerosis in the abdominal aorta of young black males *Matrix Biol*; 21: 487-498.
- Tardif G, Pelletier JP, Dupuis M, Hambor JE, Martel-Pelletier J (1997) Cloning, sequencing and characterization of the 5'-flanking region of the human collagenase-3 gene. *Biochem J*; 323: 13-16.
- Ogata T, Shibamura H, Tromp G et al (2005) Genetic analysis of polymorphisms in biologically relevant candidate genes in patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*; 41: 1036.
- Thompson AR, Drenos F, Hafez H, Humphries SE (2008) Candidate gene association studies in abdominal aortic aneurysm disease: a review and meta-analysis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*; 35: 19-30.
- Krishna SM, Dear AE, Norman PE, Golledge J (2010) Genetic and epigenetic mechanisms and their possible role in abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis*; 212: 16-29.
- Korcz A, Mikołajczyk-Stecyna J, Gabriel M et al (2009) Angiotensin-converting enzyme (ACE, I/D) gene polymorphism and susceptibility to abdominal aortic aneurysm or aortoiliac occlusive disease. *J Surg Res*; 153: 76-82.
- Strauss E, Waliszewski K, Gabriel M, Zapalski S, Pawlak AL (2003) Increased risk of the abdominal aortic aneurysm in carriers of the MTHFR 677T allele. *J Appl Genet*; 44: 85-93.
- Shibamura H, Olson JM, van Vlijmen-van Keulen C et al (2004) Genome scan for familial abdominal aortic aneurysm using sex and family history as covariates suggests genetic heterogeneity and identifies linkage to chromosome 19q13. *Circulation*; 109: 2103-2108.
- Helgadottir A, Thorleifsson G, Magnusson KP et al (2008) The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nature Genet*; 40: 217-224.
- Baas AF, Medic J, van't Slot R et al (2010) Association study of single nucleotide polymorphisms on chromosome 19q13 with abdominal aortic aneurysm. *Angiology*; 61: 243-247.
- Gretarsdottir S, Baas AF, Thorleifsson G et al (2010) Genome-wide association study identifies a sequence variant within the DAB2IP gene conferring susceptibility to abdominal aortic aneurysm. *Nat Genet*; 42: 692-697.
- Borghese B, Chiche JD, Vernerey D et al (2008) Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinase 12 and 13 genes are implicated in endometriosis progression. *Hum Reprod*; 23: 1207-1213.
- Leeman MF, Curran S, Murray GI (2002) The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13. *Crit Rev Biochem Mol Biol*; 37: 149-166.