

Полиморфизм генов эндотелиальной дисфункции, коактиваторов митохондриального биогенеза и плазминоген-плазминовой системы в развитии сердечно-сосудистых осложнений при ревматоидном артрите

Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Королев М.А., Омельченко В.О., Коненков В.И.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии», Новосибирск, Россия 630060 Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Novosibirsk Russia 2, Timakov St., Novosibirsk 630060

Контакты: Алла Владимировна Шевченко; shalla64@mail.ru

Contact: Alla Shevchenko; shalla64@mail.ru

Поступила 03.04.17

Наиболее частой причиной смерти у пациентов с ревматоидным артритом (РА) являются сердечно-сосудистые катастрофы. При этом механизм прогрессирования атеросклеротического поражения сосудистого русла при РА, включая генетические факторы, остается предметом дискуссий.

Цель исследования — анализ ассоциированности полиморфизма генов *NOS3*, *PPARGγ*, *PPARGC1A*, *PPARGC1B* и *PAI1* с наличием высокого/низкого сердечно-сосудистого риска у пациентов с РА.

Материал и методы. В исследование включены 73 пациента с РА. Высокий риск развития сердечно-сосудистых осложнений имели 67,1% из них. В качестве суррогатного маркера сердечно-сосудистого риска использовалось ультразвуковое исследование брахиоцефальных артерий с определением толщины комплекса интима-медиа (ТКИМ). Сравнение проводилось с учетом соответствующих норм. Значение ТКИМ, превышающее указанные показатели, расценивалось как признак высокого сердечно-сосудистого риска. Однонуклеотидный полиморфизм генов *NOS3* (rs2070744), *PPARG2* (rs1801282), *PPARGC1A* (rs8192678), *PPARGC1B* (rs7732671), *PAI1* (rs1799889) исследовали с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I согласно инструкции фирмы-производителя («Литех», Россия).

Результаты и обсуждение. Частоты генотипов *NOS3* - 786TT значимо различались у пациентов с разным риском развития сердечно-сосудистых осложнений. Выявлены сложные генотипы, частота которых превалирует в группе с низким риском развития сердечно-сосудистых событий. При этом в составе всех генотипов присутствует гомозиготный генотип *NOS3* - 786TT и гены, обладающие способностью регулировать его экспрессию. Наибольшие различия между анализируемыми группами представлены в комплексах *NOS3*-786TT:*PPARGC1B* 203AlaAla и *NOS3* - 786TT:*PPARGC1B* 203AlaAla:*PPARG* 12 ProPro.

Выводы. Проанализированные нами полиморфные позиции генов сочетанно могут оказывать влияние на риск сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с РА.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; сердечно-сосудистый риск; *NOS3*; полиморфизм *PPAR*; полиморфизм *PPARGC1A*; полиморфизм *PPARGC1B*; полиморфизм *PAI1*.

Для ссылки: Шевченко АВ, Прокофьев ВФ, Королев МА и др. Полиморфизм генов эндотелиальной дисфункции, коактиваторов митохондриального биогенеза и плазминоген-плазминовой системы в развитии сердечно-сосудистых осложнений при ревматоидном артрите. Научно-практическая ревматология. 2018;56(1):55-59.

GENE POLYMORPHISMS OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION, COACTIVATORS OF MITOCHONDRIAL BIOGENESIS AND PLASMINOGEN/PLASMIN SYSTEM IN THE DEVELOPMENT OF CARDIOVASCULAR EVENTS IN RHEUMATOID ARTHRITIS Shevchenko A.V., Prokofyev V.F., Korolev M.A., Omelchenko V.O., Konenkov V.I.

Cardiovascular catastrophes are the most common cause of death in patients with rheumatoid arthritis (RA). At the same time, the mechanism of progression of atherosclerotic lesions in the vascular bed in RA, including genetic factors, remains a matter of debate.

Objective: to analyze the associativity of polymorphism of the *NOS3*, *PPARGγ*, *PPARGC1A*, *PPARGC1B* and *PAI-1* gene with a high/low cardiovascular risk in patients with RA.

Subjects and methods. The investigation enrolled 73 patients with RA. Of them, 67.1% were at high cardiovascular risk. Ultrasonography of the brachiocephalic arteries with determination of intima-media thickness (IMT) was used as a surrogate marker for cardiovascular risk. A comparison was carried out taking into account the relevant standards. The IMT value exceeding the above parameters was regarded as the sign of a high cardiovascular risk. Single nucleotide polymorphisms in the *NOS3* (rs2070744), *PPARG2* (rs1801282), and *PPARGC1A* (rs8192678), *PPARGC1B* (rs7732671), and *PAI1* (rs1799889) genes were investigated by a real-time polymerase chain reaction assay using the intercalating dye SYBR Green I according to the instructions of the manufacturer («Litech», Russia).

Results and discussion. The frequencies of the *NOS3* - 786TT genotypes significantly differed in patients at different cardiovascular risks. Complex genotypes, the frequency of which was prevalent in the low cardiovascular risk group, were identified. At the same time, all genotypes contained the homozygous *NOS3* - 786TT genotype and the genes that were able to regulate its expression. The greatest differences between the analyzed groups were present in the complexes of *NOS3*-786TT:*PPARGC1B* 203AlaAla and *NOS3* - 786TT:*PPARGC1B* 203AlaAla:12 *PPARG* ProPro.

Conclusion. Our analyzed gene polymorphic positions can concurrently affect cardiovascular risk in patients with RA.
Keywords: rheumatoid arthritis; cardiovascular risk; *NOS3* polymorphism; *PPAR* polymorphism; *PPARGC1A* polymorphism; *PPARGC1B* polymorphism; *PAI1* polymorphism.

For reference: Shevchenko AV, Prokofyev VF, Korolev MA, et al. Gene polymorphisms of endothelial dysfunction, coactivators of mitochondrial biogenesis and plasminogen/plasmin system in the development of cardiovascular events in rheumatoid arthritis. Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice. 2018;56(1):55-59 (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2018-55-59>

Ревматоидный артрит (РА) — системное хроническое воспалительное заболевание, приводящее к прогрессирующей деструкции суставов, ранней инвалидизации и смертности. Наиболее частой причиной смерти у пациентов с РА являются сердечно-сосудистые осложнения (ССО). При этом механизм прогрессирования атеросклеротического поражения сосудистого русла при РА остается предметом дискуссий. Предполагается, что атеросклероз коронарных артерий служит внесуставным проявлением РА, развитию которого могут способствовать хроническое воспаление и медикаментозное лечение [1].

Эндотелиальная дисфункция, сопровождающая хроническое воспаление, наблюдается уже на ранних стадиях РА и входит в число факторов, обуславливающих развитие атеросклеротического поражения сосудов. Важным биологическим медиатором, участвующим в регуляции иммунного ответа и вазодилатации, является оксид азота (NO). Один из механизмов его образования опосредован эндотелиальной NO-синтазой (eNOS) [2]. При наличии сосудистого воспаления уровень экспрессии гена *NOS3*, кодирующего eNOS, снижается, что регулируется в том числе и генетическими факторами. Показано, что однонуклеотидный полиморфизм гена *NOS3* в позиции T-786C ассоциирован с активностью синтеза фермента, причем *NOS3-786C* вариант связывают с понижением уровня экспрессии [3].

Важные факторы регуляции иммунного ответа — ядерные рецепторы PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors). Рецепторы PPAR более эффективно оказывают влияние на хронические воспалительные процессы, чем на острые. Помимо влияния на метаболизм липидов и жирных кислот, они могут ингибировать провоспалительные цитокины и стимулировать противовоспалительные [4]. При атеросклеротическом поражении сосудов, ишемической болезни сердца и других сердечно-сосудистых заболеваниях (ССЗ), в том числе сопровождающихся ожирением или сахарным диабетом 2-го типа, выявляется нарушение функций этих рецепторов, участвующих в регуляции метаболизма сердечной мышцы [5]. С другой стороны, есть данные, указывающие на определенную роль PPAR в патогенезе РА [6]. Идентифицированы три изоформы PPAR: α , γ и δ (β) [альфа, гамма и дельта (бета)]. Все три изоформы участвуют в метаболизме липидов в сердечной мышце и выявлены в клетках в области атеросклеротических изменений (в эндотелиальных клетках, гладкомышечных клетках, макрофагах) [7]. Для генов, кодирующих все типы PPAR, характерен полиморфизм, но его ассоциированность с патологическими процессами, включая развитие ССЗ, остается предметом дискуссий [8].

Слабо исследованной остается и ассоциированность полиморфизма генов ядерных рецепторов — коактиватор-1 PPAR. Гены *PPARGC1A* и *PPARGC1B* кодируют белки PGC1 α и PGC1 β (peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1 α и coactivator 1 β) и являются полиморфными. PGC1 α и PGC1 β экспрессируются в бурой жировой ткани, сердце, скелетных мышцах, почках и коактивируют действие ряда транскрипционных факторов, регулируют митохондриальный биогенез и обмен веществ. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что блокирование PGC1 α способствует нарушению процессов окислительного фосфорилирования в миокарде при сердечной недостаточности и ускоряет ее прогрессирование. Вероятно,

PGC1 α может обладать кардиопротекторным действием. Система PPAR/PGC1 α , контролирующая биогенез митохондрий, обеспечивает возможность приспособления миокарда к внезапно возникающей нагрузке. Экспрессия PPAR/PGC1 α увеличивается при физиологических и уменьшается при патологических формах гипертрофии миокарда, а также при сердечной недостаточности. Считается, что дисфункция регуляторной системы — PPAR/PGC1 α — может быть одним из патогенетических механизмов развития кардиомиопатий [7].

Существенный интерес может также представлять один из основных компонентов тромболитической плазминоген-плазминовой системы PAI1, ингибирующий тканевый и урокиназный активаторы плазминогена. С одной стороны, PAI1 играет важную роль в формировании предрасположенности к ССЗ. Показано, что гомозиготный вариант 4G полиморфизма *PAI1-675 4G/5G* — является фактором риска развития тромбозов и инфаркта миокарда [9]. С другой стороны, PAI1, являясь ключевым регулятором фибринолитической системы, ингибирует фибринолиз и тканевую репарацию и активизирует систему матриксных металлопротеиназ, опосредующих деструктивные процессы в костной ткани при РА [10].

Исходя из вышеизложенного, целью нашего пилотного исследования был анализ связи полиморфизма генов *NOS3*, *PPARG γ* , *PPARGC1A*, *PPARGC1B* и *PAI1* с сердечно-сосудистым риском у пациентов с РА.

Материал и методы

Пациенты. В исследование включены 73 пациента с РА. Среди них было 62 женщины (84,9%). Диагноз РА соответствовал критериям Американской коллегии ревматологов (ACR) 1987 г. В качестве суррогатного маркера кардиоваскулярного риска использовались данные ультразвукового исследования (УЗИ) брахиоцефальных артерий с определением толщины комплекса интима-медиа (ТКИМ). Сравнение проводилось с учетом соответствующих норм: для мужчин младше 40 лет — 0,7 мм, 40–50 лет — 0,8 мм, старше 50 лет — 0,9 мм; для женщин младше 45 лет — 0,7 мм, 45–60 лет — 0,8 мм, старше 60 лет — 0,9 мм. Значение ТКИМ, превышающее указанные показатели, расценивалось как признак высокого кардиоваскулярного риска. Высокий риск развития ССО имели 49 (67,1%) пациентов. Клинико-лабораторное описание группы пациентов с РА представлено в табл. 1. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИКЭЛ. Все пациенты давали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Генотипирование. Однонуклеотидный полиморфизм (SNP — single nucleotide polymorphism) генов *NOS3 T-786C* (rs2070744), *PPARG2 PRO12ALA* (rs1801282), *PPARGC1A GLY482SER* (rs8192678), *PPARGC1B ALA203PRO* (rs7732671), *PAI1-675 4G/5G* (rs1799889) исследовали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I на амплификаторе «ДТ-96» (ООО «НПФ ДНК-Технология», Россия) согласно инструкции фирмы — производителя красителя («Литех», Россия).

Статистическая обработка. При статистическом анализе результатов определяли частоту встречаемости генотипов, отношение шансов (ОШ), 95% доверительный интервал (ДИ). Вычисление ОШ проводили по методу Вульфа–Холдейна. Частоту отдельных генотипов и их

комбинаций определяли как процентное отношение индивидов – носителей генотипа к общему числу обследованных в группе по формуле:

$$f=n/N,$$

где n – число носителей соответствующего генотипа, N – численность обследованных.

Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга. Достоверность различий по частоте

Таблица 1 Клиническая характеристика больных РА (n=73)

Показатель	Значение
Женщины, n (%)	62 (84,9)
Возраст, годы, Me [25-й; 75-й перцентили]	53 [38; 60]
Длительность заболевания, годы, Me [25-й; 75-й перцентили]	8 [5; 12,5]
РФ-позитивные, n (%)	70 (95,9)
АЦП-позитивные, n (%)	70 (95,9)
DAS28, Me [25-й; 75-й перцентили]	5,2 [4,24; 6,4]
HAQ, Me [25-й; 75-й перцентили]	1,4 [0,9; 2,0]
Рентгенологическая стадия, n (%):	
I	1 (1,37)
II	24 (32,88)
III	31 (42,47)
IV	17 (23,29)
ТКИМ, мм, Me [25-й; 75-й перцентили]:	
– мужчины:	
младше 40 лет	0,5 (один пациент)
40–50 лет	0,7 [0,5; 0,9]
старше 50 лет	1,3 [1,1; 1,4]
– женщины	
младше 45 лет	0,6 [0,5; 0,7]
45–60 лет	0,9 [0,75; 1,05]
старше 60 лет	1,0 [0,7; 1,3]
Наличие атеросклеротической бляшки по данным УЗИ БЦА, n (%)	14 (19,2)

Примечание. БЦА – брахиоцефальные артерии.

изучаемых признаков в альтернативных группах определяли по критерию χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность и двустороннему варианту точного метода Фишера для четырехпольных таблиц.

Результаты

Нами исследовался полиморфизм регуляторных регионов генов *NOS3 T-786C* и *PAI1-675 4G/5G*, кодирующих регионов генов *PPARGγ*, *PPARGC1A*, *PPARGC1B* у пациентов с РА с высоким и низким риском развития ССЗ. Частоты генотипов в сопоставляемых группах находятся в равновесии Харди–Вайнберга. Частоты генотипов *NOS3-786TT* значимо различались у пациентов с разным риском развития ССЗ (ОШ=0,26; p=0,0122). Таким образом, частота данного гомозиготного варианта, ассоциированного с более высоким уровнем экспрессии гена, среди пациентов с низкой вероятностью развития ССЗ значительно выше, чем при высокой вероятности ССЗ. Эти данные могут свидетельствовать о патогенетическом значении выявленной ассоциативной связи, а анализируемый биомаркер в перспективе может быть использован в прогностических целях.

Не выявлено достоверных различий при анализе частот отдельных генотипов генов *PPARGγ*, *PPARGC1A*, *PPARGC1B* и *PAI1-675* при высоком и низком риске ССЗ (табл. 2).

Более значимые результаты получены при анализе комплексных генотипов; в нем выявлены сложные генотипы, частота которых превалирует в группе с низким риском развития ССЗ (табл. 3).

При этом в составе всех генотипов закономерно присутствует гомозиготный генотип *NOS3-786TT* и гены, обладающие способностью регулировать его экспрессию. Гены *PPARGγ* и *PPARGC1B* присутствуют в двух комплексах и только в виде гомозиготы дикого типа, *PPARGC1A* представлен гетерозиготным вариантом. Наибольшие различия между анализируемыми группами представлены в комплексах *NOS3-786TT:PPARGC1B 203AlaAla* и *NOS3-786TT:PPARGC1B 203AlaAla:PPARG 12ProPro* (ОШ=0,32, p=0,0368

Таблица 2 Частота генотипов генов *NOS3*, *PPARGγ*, *PPARGC1A* и *PPARGC1B*, *PAI1* у пациенток с РА с различным риском развития ССЗ, n (%)

Полиморфная позиция, генотип	Пациенты с РА с высоким риском ССЗ (n=49)	Пациенты с РА с низким риском ССЗ (n=24)	ОШ	95% ДИ	p
<i>NOS3-786:</i>					
CC	12 (24,49)	2 (8,33)	3,57	0,73–17,45	0,1236
CT	22 (44,90)	7 (29,17)	1,98	0,70–5,63	0,2161
TT	15 (30,61)	15 (62,50)	0,26	0,09–0,74	0,0122
<i>PPARGC1B203:</i>					
AlaAla	40 (81,63)	20 (83,33)	0,89	0,24–3,24	1,0000
AlaPro	9 (18,37)	4 (16,67)	1,13	0,31–4,10	1,0000
<i>PPARG12:</i>					
ProPro	39 (79,59)	19 (79,17)	1,03	0,31–3,43	1,0000
ProAla	9 (18,37)	5 (20,83)	0,86	0,25–2,90	1,0000
AlaAla	1 (2,04)	0	1,52	0,06–38,59	1,0000
<i>PPARGC1A482:</i>					
GlyGly	21 (43,75)	10 (41,67)	1,09	0,40–2,94	1,0000
GlySer	24 (50,00)	12 (50,00)	1,00	0,38–2,66	1,0000
SerSer	3 (6,25)	2 (8,33)	0,73	0,11–4,71	1,0000
<i>PAI1-675:</i>					
5G5G	2 (5,88)	2 (9,09)	0,63	0,08–4,80	0,6416
5G4G	19 (55,88)	12 (54,55)	1,06	0,36–3,10	1,0000
4G4G	13 (38,24)	8 (36,36)	1,08	0,36–3,29	1,0000

Таблица 3 Ассоциированность комплексных генотипов анализируемых генов с риском развития ССЗ у пациенток с РА, n (%)

Полиморфная позиция	Генотип	Пациенты с РА с высоким риском ССЗ (n=49)	Пациенты с РА с низким риском ССЗ (n=24)	ОШ	95% ДИ	p
<i>NOS3:PPARGC1B</i>	TT-AlaAla	12 (24,49)	12 (50,00)	0,32	0,12–0,91	0,0368
<i>NOS3:PPARGC1A</i>	TT-GlySer	5 (10,42)	9 (37,50)	0,19	0,06–0,67	0,0105
<i>NOS3:PPARGC1B:PPARG</i>	TT-AlaAla-ProPro	9 (18,37)	10 (41,67)	0,32	0,11–0,93	0,0472
<i>NOS3:PPARG:PPARGC1A</i>	TT-ProPro-GlySer	3 (6,25)	7 (29,17)	0,16	0,04–0,70	0,0128

и ОШ=0,32, p= 0,0472 соответственно). Позитивно ассоциированных с высоким риском развития ССО комплексов у пациенток с РА выявлено не было.

Обсуждение

Во многих исследованиях показаны высокий риск разнообразных форм ССЗ, более высокая частота атеросклероза и смертности вследствие кардиологических причин среди пациентов с РА. Однако распространенность традиционных факторов риска развития ССЗ, таких как, например, артериальная гипертензия и сахарный диабет, у пациентов с РА и в общей популяции практически не различаются [11]. Анализ косвенных генетических кардио-маркеров, например маркера эндотелиальной дисфункции, генетических маркеров, влияющих на особенности метаболизма липидов, факторов тромбообразования, может быть полезен при выделении групп высокого риска ССЗ среди пациентов с РА. У наших больных частота *NOS3-786TT* генотипа более чем в 2 раза снижена в группе с высоким риском развития ССО. Предполагается, что наличие минорного аллельного варианта гена приводит к уменьшению транскрипционной активности последнего, снижению содержания NO в коронарных артериях и предрасполагает пациентов – носителей минорного аллеля к спазму сосудов и развитию острых коронарных событий [12], однако требуется дальнейшее изучение связи уровня продукции NO с полиморфизмом гена *NOS3*.

Ранее показано, что частота экстраартикулярных проявлений значительно выше у пациентов с РА и *NOS3-786CC* генотипом, притом что частоты генотипов в данной позиции значимо не различались у пациентов с РА и здоровых лиц [13]. В ряде исследований показана ассоциированность *NOS3-786CC* непосредственно с развитием РА [14], однако авторы не учитывали неоднородность групп, в том числе и по характеру кардиоваскулярных изменений.

Существует мнение, что за повышенный риск ССЗ у пациентов с РА несут ответственность сложные взаимодействия нескольких генов. Так, при отсутствии прямой ассоциированности полиморфизма анализируемой позиции с развитием ССЗ у пациентов с РА такая взаимосвязь наблюдается при наличии в геноме HLA-DRB1*0404-аллельного варианта [15]. В нашем исследовании при отсутствии различий по частоте отдельных генотипов *PPARGγ*, *PPARGC1A*, *PPARGC1B* и *PAI1-675 4G/5G* между анализируемыми группами выявлены комплексные генотипы, в состав которых входят полиморфные позиции генов *PPARGγ*, *PPARGC1A*, *PPARGC1B* и *NOS3-786*, частота которых снижена в группе с низким риском развития ССЗ. Есть исследования, показывающие существование взаимодействия продуктов генов *NOS3* и *PPARGγ*. Так, *PPARγ* может регулировать экспрессию eNOS в адипоцитах и эндотелиальных клетках сосудистого эндотелия. Предполагается, что в ос-

нове взаимодействий могут быть как транскрипционные механизмы, так и регуляция, основанная на уровнях экспрессии генов [16]. В нашей группе в состав протективных комплексов, наряду с *NOS3-786 TT* протективным генотипом, входит *PPARGγ ProPro*. По данным ряда исследователей, *PPARγ2 12Ala* полиморфизм может быть фактором риска прогрессирования атеросклеротических изменений сосудов среди кавказоидов, но не среди азиатов [17]. Именно *PPARγ2 12Ala* снижает транскрипционную активность *PPARγ*, что приводит к более низкому уровню транскрипции целевых генов, включая ген фактора некроза опухоли, лептина, резистина, адипонектина, активатора плазминогена (*PAI1*), которые осуществляют важные функции в процессах воспаления и атерогенеза [18]. Нет прямых данных об особенностях полиморфизма гена *PPARGC1B* у пациентов с кардиологической патологией, но показано, что *PGC1β 203Pro*-аллельный вариант гена связан с увеличенным стимулируемым инсулином метаболизмом глюкозы [19], а *PGC1β 203Ala*-аллельный вариант гена, напротив, повышен у пациентов с высоким индексом массы тела [20]. Эти особенности полиморфизма могут косвенно влиять на риск развития ССЗ у пациентов с РА.

Таким образом, несмотря на то что молекулярные механизмы, оказывающие влияние на развитие ССО у пациентов с РА, в настоящий момент не ясны, проанализированные нами полиморфные позиции генов, продукты которых вовлечены в сложный патогенез рассматриваемых болезней, сочетанно могут оказывать влияние на риск ССО у этой группы пациентов. Полученные в настоящем исследовании результаты свидетельствуют о том, что в развитии ССО у части пациентов с РА принимают участие генетические факторы, способствующие развитию у них таких процессов, как эндотелиальная дисфункция, атерогенез, нарушение функций адипоцитов, ожирение и хроническое воспаление. Исследование генетического полиморфизма регуляторных областей генов, образующих генетические сети, может обеспечить информацию, необходимую для создания эффективных алгоритмов ранней доклинической диагностики ССО, разработки соответствующих мероприятий по снижению риска ранней смертности и повышению качества жизни пациентов с РА.

Прозрачность исследования

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Turiel M, Sitia S, Atzeni F, et al. The heart in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2010;9(6):414-8. doi: 10.1016/j.autrev.2009.11.002
2. Guzik T, Korbut R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* 2003;54:469-87.
3. Niu W, Qi Y. An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: three well-characterized polymorphisms with hypertension. *PLoS One.* 2011;9(6):242-66. doi: 10.1371/journal.pone.0024266
4. Yang XY, Wang LH, Farrar WL. A Role for PPAR γ in the Regulation of Cytokines in Immune Cells and Cancer. *PPAR Res.* 2008;2008:961753. doi: 10.1155/2008/961753
5. Chandra M, Miriyala S, Panchatcharam M. PPAR γ and Its Role in Cardiovascular Diseases. *PPAR Res.* 2017;2017:6404638. doi: 10.1155/2017/6404638
6. Palma A, Sainaghi PP, Amoruso A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ expression in monocytes/macrophages from rheumatoid arthritis patients: relation to disease activity and therapy efficacy – a pilot study. *Rheumatology.* 2012;51(11):1942-52. doi: 10.1093/rheumatology/kes177
7. Finck BN. The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease. *Cardiovasc Res.* 2007;73:269-77. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.08.023
8. Gallicchio L, Kalesan B, Huang H-Y, et al. Genetic Polymorphisms of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and the Risk of Cardiovascular Morbidity and Mortality in a Community-Based Cohort in Washington County, Maryland. *PPAR Res.* 2008;2008:276581. doi: 10.1155/2008/276581
9. Parpugga TK, Tatarunas V, Skipskis V, et al. The Effect of PAI-1 4G/5G Polymorphism and Clinical Factors on Coronary Artery Occlusion in Myocardial Infarction. *Dis Markers.* 2015;2015:260101. doi: 10.1155/2015/260101
10. Munoz-Valle JF, Ruiz-Quezada SL, Oregon-Romero E, et al. PAI-1 mRNA expression and plasma level in rheumatoid arthritis: Relationship with 4G/5G PAI-1 polymorphism. *Rheumatol Int.* 2012;32:3951-6. doi: 10.1007/s00296-011-2279-y
11. Rodriguez-Rodriguez L, Lopez-Mejias R, Garcia-Bermudez M, et al. Genetic Markers of Cardiovascular Disease in Rheumatoid Arthritis. Review Article. *Mediat Inflamm.* 2012;2012:574817. doi: 10.1155/2012/574817
12. Ciftci C, Melil S, Cebi Y, et al. Association of endothelial nitric oxide synthase promoter region (T-786C) gene polymorphism with acute coronary syndrome and coronary heart disease. *Lipids Health Dis.* 2008;9(1):102. doi: 10.1016/S1567-5688(08)70410-0
13. Brenol CV, Chies JA, Brenol JC, et al. Endothelial nitric oxide synthase T-786C polymorphism in rheumatoid arthritis: association with extraarticular manifestations. *Clin Rheumatol.* 2009;28(2):201-05. doi: 10.1007/s10067-008-1018-6
14. Melchers I, Blaschke S, Hecker M, Cattaruzza M. The -786C/T single-nucleotide polymorphism in the promoter of the gene for endothelial nitric oxide synthase: insensitivity to physiologic stimuli as a risk factor for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(10):3144-51. doi: 10.1002/art.22147
15. Gonzalez-Gay MA, Llorca J, Palomino-Morales R, et al. Influence of nitric oxide synthase gene polymorphisms on the risk of cardiovascular events in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2009;27(1):116-9.
16. Yamada Y, Eto M, Ito Y, et al. Suppressive Role of PPAR γ -Regulated Endothelial Nitric Oxide Synthase in Adipocyte Lipolysis. *PLoS One.* 2015;10(8):e0136597. doi: 10.1371/journal.pone.0136597
17. Wu Z, Lou Y, Jin W, et al. The Pro12Ala Polymorphism in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma-2 Gene (PPAR γ 2) Is Associated with Increased Risk of Coronary Artery Disease: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2012;7(12):e53105. doi: 10.1371/journal.pone.0053105
18. Montagner A, Rando G, Degueurce G, et al. New insights into the role of PPARs. Prostaglandins. *Leukot Essent Fatty Acids.* 2011;85:235-43. doi: 10.1016/j.plefa.2011.04.016
19. Ling C, Wegner L, Andersen G, et al. Impact of the peroxisome proliferator activated receptor- γ coactivator-1 β (PGC-1 β) Ala203Pro polymorphism on *in vivo* metabolism, PGC-1 β expression and fibre type composition in human skeletal muscle. *Diabetologia.* 2007;50:1615-20. doi: 10.1007/s00125-007-0729-6
20. Andersen G, Wegner L, Yanagisawa K, et al. Evidence of an association between genetic variation of the coactivator PGC-1 β and obesity. *J Med Genet.* 2005;42:402-7. doi: 10.1136/jmg.2004.026278