

УДК 616.14-007.64

**ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ МАТРИКСНЫХ  
МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И VEGF – ПРЕДИКТОРЫ  
ВАРИКОЗНОЙ БОЛЕЗНИ?**

**Шевела А.И., Новак Е.В., Серыпина Ю.В., Морозов В.В., Воронина Е.Н.**

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения  
Российской академии наук, Новосибирск, e-mail: seryapinajv@gmail.com*

Цель работы – исследование ассоциации полиморфных вариантов –1171dupA (5A/6A) гена MMP3 (матриксная металлопротеиназа 3), A-82G гена MMP12 (матриксная металлопротеиназа 12) и G634C гена VEGF (сосудисто-эндотелиальный фактор роста) с развитием варикозной болезни нижних конечностей. Материалы и методы. В основную группу вошли 220 пациентов с варикозной болезнью нижних конечностей клинического класса C1-C6 по CEAP, группу контроля составили 100 человек без венозной патологии. При формировании групп диагноз верифицирован методом дуплексного ультразвукового ангиосканирования. Генетическое исследование образцов ДНК, выделенных из венозной крови, проведено методом Real-Time ПЦР. Результаты. Распределение частот встречаемости аллелей всех исследованных генов соответствовало равновесию Харди – Вайнберга,  $p > 0,05$ . Для полиморфизмов MMP3 и VEGF значимых различий частот встречаемости между группами не обнаружено. Наличие в генотипе аллеля А полиморфного локуса А-82G гена MMP12 является фактором риска развития варикозной болезни нижних конечностей с  $OR = 3,397$  ( $p = 0,00003$ ), причем наибольший риск имеет место при гомозиготном носительстве этого аллеля –  $OR = 11,7$  ( $p = 0,00029$ ). Заключение. Наличие в генотипе полиморфных аллелей матриксной металлопротеиназы MMP-12 может служить маркером наследственной предрасположенности к развитию структурных изменений стенки вен и варикозной болезни нижних конечностей. Исследования по поиску генетических предикторов варикозной болезни являются основополагающими для развития персонализированных подходов во флебологии и представляют огромную ценность для ранней диагностики и первичной профилактики заболеваний вен нижних конечностей. Своевременное выявление и формирование групп риска позволит значительно снизить количество инвалидизирующих форм варикозной болезни, особенно у лиц молодого, трудоспособного возраста.

**Ключевые слова:** варикозная болезнь, матриксные металлопротеиназы, MMP3, MMP12, VEGF, полиморфизм, персонализированная медицина

**WHETHER POLYMORPHISMS IN THE GENES OF MATRIX  
METALLOPROTEINASES AND VEGF PREDICTORS OF VARICOSE DISEASE?**

**Shevela A.I., Novak E.V., Seryapina Y.V., Morozov V.V., Voronina E.N.**

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Siberian branch  
of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, e-mail: seryapinajv@gmail.com*

Purpose – to study the association of polymorphic variants –1171dupA (5A/6A) gene MMP3 (matrix metalloproteinase 3), A-82G gene MMP12 (matrix metalloproteinase 12) and G634C gene VEGF (vascular endothelial growth factor) with the development of varicose disease of the lower extremities. Materials and methods. The study group included 220 patients with varicose veins of the lower extremities of the clinical class C1-C6 by CEAP, control group comprised 100 people without venous pathology. The diagnosis was verified by duplex ultrasound angioscanning. Genetic testing of DNA samples extracted from venous blood by the method of Real-Time PCR. Results. Distribution of allele frequencies of genes under study corresponded to Hardy-Weinberg equilibrium,  $p > 0,05$ . There are no significant differences between the frequencies of occurrence MMP3 polymorphisms and VEGF of the groups. The presence in the genotype allele A polymorphic locus A-82G MMP12 gene is a risk factor for the development of varicose disease of the lower extremities with  $OR = 3,397$  ( $p = 0,00003$ ), and the greatest risk occurs in homozygous carriers of this allele –  $OR = 11,7$  ( $p = 0,00029$ ). Conclusion. The presence of polymorphic alleles in the genotype matrix metalloproteinase MMP-12 may be a marker of genetic susceptibility to the development of structural changes in the walls of veins and varicose disease of the lower extremities. Research to find genetic predictors of varicose disease is fundamental for the development of personalized approaches in Phlebology, and are of great value for early detection and primary prevention of venous disease of the lower extremities. Timely detection and formation of risk groups will significantly reduce the number of disabling forms of varicose disease, especially in young, working-age population.

**Keywords:** varicose veins, matrix metalloproteinases, MMP3, MMP12, VEGF, polymorphism, personalized medicine

Варикозная болезнь нижних конечностей является широко распространенным, наследственно обусловленным заболеванием. По данным международных исследований, клинически значимые изменения подкожных вен регистрируются в среднем у 40% обследованных. В России более 30%

всего населения страдает различными формами варикозной болезни. При этом у 1% всех обследованных выявляются различные формы трофических расстройств, такие как зажившие или активные язвенные дефекты. Ежегодно заболеваемость варикозной болезнью увеличивается в среднем на 3% [1].

В последнее время отмечено повышение количества пациентов с хроническими заболеваниями вен в возрасте до 20 лет. Несмотря на наличие многочисленных исследований причин развития варикозной трансформации венозной стенки, в понимании патогенеза этого патологического состояния до сих пор остается много вопросов.

Согласно современным представлениям, в основе патогенеза варикозной болезни лежит генетическое нарушение в регуляции компонентов внеклеточного матрикса. Дегградация компонентов, формирующих внеклеточный матрикс, происходит в результате воздействия протеолитических ферментов, синтезируемых эндотелиоцитами и макрофагами. Это сериновые протеиназы, пролиназы, цистеиновые и аспаргатовые протеиназы, гликозидазы и матриксные металлопротеиназы (MMPs), которые первоначально выделяются в неактивной форме. Строгое регулирование экспрессии MMP и их деятельности является важнейшей частью гомеостаза внеклеточного матрикса. Согласно исследованиям последних лет, значительная роль в патологических изменениях сосудов при хронических заболеваниях вен отводится факторам роста – полипептидным химическим агентам, продуцируемым *in situ* клетками стенки сосуда (эндотелиоцитами, гладкомышечными клетками) и клетками крови (тромбоцитами, лейкоцитами). Одним из этих факторов является VEGF – сосудисто-эндотелиальный фактор роста. При ХЗВ митогенные факторы, выделяемые эндотелиальными клетками во время гипоксии, такие как фактор роста VEGF и ряд других, увеличивают пролиферативную активность гладкомышечных клеток. Предположение о сочетании воздействия протеолитических ферментов и факторов роста на компоненты венозной стенки легло в основу современной теории патогенеза варикозной болезни нижних конечностей [8].

На сегодняшний день исследований, посвященных изучению роли матриксных металлопротеиназ в развитии заболеваний различных органов и систем достаточно много, однако в структуре научных работ крайне мало материала о связи нарушения активности матриксных металлопротеиназ и развития патологии венозной стенки. Нет данных и по влиянию дефектов генов матриксных металлопротеиназ на клинические проявления варикозной болезни и ее осложнений. Для проведения пилотного исследования в этом направлении нами были выбраны три гена-кандидата: MMP3, MMP12, VEGF. Ранее были описаны полиморфные варианты промоторных районов

матриксных металлопротеиназ – 1171dupA (5A/6A) гена MMP3 и A-82G гена MMP12, которые демонстрировали разный уровень транскрипционной активности как *in vitro*, так и *in vivo* [12]. VEGF является фактором, способствующим ангиогенезу и пролиферации клеток стенки сосудов, изменения в его гене описаны с этой точки зрения при разных патологических процессах [7]. Таким образом, данные полиморфные локусы могут влиять на гомеостаз внеклеточного матрикса эндотелиальной стенки и, предположительно, приводить к развитию варикозной болезни нижних конечностей.

Цель данной работы – исследование ассоциации полиморфных вариантов – 1171dupA (5A/6A) гена MMP3, A-82G гена MMP12 и G634C гена VEGF с варикозной болезнью нижних конечностей.

### Материалы и методы исследования

Первая группа включала пациентов, страдающих варикозной болезнью, у которых были проанализированы амбулаторные карты и консультационные листы. В эту группу вошли 220 человек, в том числе 161 женщина в возрасте от 16 до 75 лет и 59 мужчин в возрасте от 20 до 73 лет.

Критерии включения в группу:

1. Верифицированный диагноз: варикозная болезнь нижних конечностей клинического класса C1-C6 по CEAP.

Критерии исключения из группы:

1. Наличие в анамнезе тромбозов глубоких вен нижних конечностей.

2. Наличие признаков тромбоза глубоких вен любой стадии и/или посттромбофлебитической болезни нижних конечностей по данным ультразвукового доплеровского ангиосканирования.

Вторую, контрольную, группу составили 100 пациентов без патологии сосудов нижних конечностей.

Верификация диагноза проводилась методом дуплексного ангиосканирования. Выделение ДНК для молекулярно-генетического тестирования из цельной венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции по стандартной методике [2]. Определение аллельных вариантов исследуемых генов проводилось методом аллель-специфичной ПЦР в RealTime-формате.

Частоты встречаемости аллелей и генотипов определяли прямым подсчетом. Статистическая обработка данных проводилась с использованием онлайн калькулятора, доступного в сети Интернет [5].

### Результаты исследования и их обсуждение

В процессе выполнения работы проведен генетический анализ 180 образцов ДНК пациентов, страдающих варикозной болезнью, и 90 образцов ДНК контрольной группы. Для всех исследованных полиморфных вариантов распределение частот встречаемости генотипов соответствует равновесию Харди – Вайнберга в контрольной и в основной групп. Данные представлены в таблице.

Частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфных локусов –1171dupA (5A/6A) гена MMP3, A-82G гена MMP12 и G634C гена VEGF в группах пациентов с варикозной болезнью и в контрольной группе

Полиморфный локус	Группа	Частота встречаемости аллеля (n)		Частота встречаемости генотипа (n)			Соответствие распределению Харди – Вайнберга ( $\chi^2$ Пирсона, $df = 1$ ), p
		5A	6A	5A/5A	5A/6A	6A/6A	
MMP3 –1171 dupA							
	Риск	203	157	55	93	32	0,498200
	Контроль	108	72	33	42	15	0,792147
MMP12 A-82G		A	G	A/A	A/G	G/G	
	Риск	52	78	14	24	27	0,062812
	Контроль	21	107	2	17	45	0,800437
VEGF G634C		C	G	C/C	C/G	G/G	
	Риск	269	111	97	75	18	0,530419
	Контроль	134	46	50	34	6	0,946089

Статистически значимых различий в частотах встречаемости аллелей и генотипов полиморфного локуса –1171dupA (5A/6A) гена MMP3 и G634C гена VEGF в исследуемых группах не обнаружено. В то же время аллель А полиморфного локуса А-82G гена MMP12 является аллелем риска развития варикозной болезни нижних конечностей с OR = 3,397 (С.И. = [1,893–6,096],  $\chi^2 = 17,70$ ,  $p = 0,00003$ ). Гетерозиготные носители аллеля А имеют повышенный риск развития варикозной болезни нижних конечностей в 2,4 раза ( $p = 0,03072$ ), а гомозиготы АА – в 11,7 ( $p = 0,00029$ ) выше, чем обладатели генотипа GG.

При варикозной болезни наблюдается увеличение коллагена I типа и уменьшение коллагена III типа в гладкомышечных клетках вен. Коллаген I типа обуславливает повышенную ригидность соединительной ткани с явлением остаточной деформации. Коллаген III типа, напротив, повышает ее эластичность с сохранением исходной формы. Поэтому в варикозных венах происходит истончение и уменьшение эластичности стенок и их деформация [9]. Таким образом, высокая активность MMP-3, обусловленная наличием аллеля 5A, может способствовать истончению стенки вены и образованию вариксов посредством чрезмерной деградации коллагена III. Однако наши данные указывают на отсутствие ассоциации аллелей и генотипов полиморфного локуса –1171dupA (5A/6A) гена MMP3 с развитием варикозной болезни. Это может быть связано с дополнительными компенсаторными возможностями клеток соединительной ткани в регуляции количества коллагена III в стенке вены: либо через усиление его синтеза *de novo*, либо через усиление инактивации MMP3. В таком случае, компенсация

будет эффективна на ранних стадиях развития заболевания, в то время как с прогрессированием патологии сосудистой стенки отрицательные эффекты должны стать преобладающими. В дальнейшем для проверки этой гипотезы и с увеличением количества пациентов мы планируем разделить группу риска на подгруппы с разными клиническими классами варикозной болезни и провести более подробные ассоциативные исследования.

MMP12 (локус 11q22.3) выделяется активированными макрофагами и приводит к разрушению нескольких компонентов внеклеточного матрикса, что позволяет макрофагам проникать в район повреждения тканей [6, 10]. MMP12 может блокировать ангиогенез путем преобразования плазминогена в ангиостатин, мощный ингибитор ангиогенеза. Полиморфный локус А-82G гена MMP12 находится очень близко к сайту связывания транскрипционного фактора AP1, что влияет на эффективность его взаимодействия с промотором. В последнее время показана ассоциация данного полиморфного варианта с развитием ишемической болезни сердца, рака и эндометриоза [4, 11, 12].

Вследствие воспалительной реакции происходит активация и высвобождение свободных радикалов, протеаз, приводящих к деструкции коллагеновых волокон венозной стенки. В свою очередь увеличивается пролиферативная активность гладкомышечных клеток, но новообразованные гладкомышечные клетки синтезируют в большом количестве составляющие межклеточного вещества и резко снижают синтез сократительных элементов. Морфологически это проявляется дезорганизацией соединительной ткани и утолщением *tunica media* венозной стенки, а функционально – уменьшением

каркасной функции и общей сократимости вены, что приводит к патологической перестройке и расширению вен.

В нашем исследовании аллель А полиморфного локуса А-82G гена MMP12 проявил себя как значительный фактор риска развития варикозной болезни нижних конечностей (OR = 3,397). При рассмотрении генотипов как для гетерозиготных, так и для гомозиготных носителей аллеля А риск развития варикозной болезни нижних конечностей увеличивался в 2,4 и в 11,7 раза, чем у обладателей генотипа GG, соответственно. Это указывает на важность хронического воспаления (обусловленного эффектами тканевых макрофагов) при ремоделировании венозной стенки. Возможно, при наличии повреждающих факторов процесс восстановления венозной стенки у носителей аллеля А гена MMP12 затягивается, что приводит к развитию варикозной болезни нижних конечностей.

Сосудисто-эндотелиальный фактор роста VEGF выделяется в повышенных количествах клеточными элементами сосудистой стенки в состоянии гипоксии, сопровождающей хронические воспалительные реакции. Эффекты этого митогена многочисленны – стимуляция ангиогенеза, повышение проницаемости сосудистой стенки, пролиферация эндотелиоцитов. Усиление подобных реакций в перивазальном пространстве уже само по себе может приводить к дезорганизации тканей стенки вены, а также потенцировать изменения на фоне хронического воспаления. Ассоциации с полиморфными вариантами гена VEGF показаны для ряда опухолей, диабетической ретинопатии и других заболеваний [3].

При исследовании влияния полиморфного аллеля G634C гена VEGF на риск развития варикозной болезни нижних конечностей не обнаружено различий с группой здоровых лиц; объяснение тому может содержаться в особенностях микроокружения венозных сосудов, отличных от артерий. Кроме того, необходимо отметить, что увеличение объема выборки может изменить отношение шансов для данного полиморфизма в любую сторону.

Таким образом, наличие полиморфных вариантов гена MMP-12 может служить ранним маркером развития структурных изменений стенки вен и варикозной болезни нижних конечностей. Полученные результаты представляют огромную ценность для ранней диагностики и первичной профилактики заболеваний вен нижних конечностей, что по-

может значительно снизить количество инвалидизирующих форм варикозной болезни, особенно у лиц молодого, трудоспособного возраста.

### Список литературы

1. Феоник О.В., Грязев С.М., Семенов А.Ю., Бубнова Н.А. Патогенетические механизмы трофических расстройств, возникающих на фоне хронической венозной недостаточности нижних конечностей // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2006. – Сер. 11. – Вып. 3. – С. 39–49.
2. Bendeck M. P. Targeting Pericellular Proteolysis in Vascular Disease // *Circ. Res.* – 2002. – Vol. 91. – P. 861–862.
3. Birk D.M., Barbato J., Mureebe L., Chaer R.A. Current insights on the biology and clinical aspects of VEGF regulation // *Vasc Endovascular Surg.* – 2008. – Vol. 42, № 6. – P. 517–530.
4. Borghese B., Chiche J.D., Vernerey D., Chenot C., Mir O., Bijaoui G., Bonaiti-Pellié C., Chapron C. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinase 12 and 13 genes are implicated in endometriosis progression // *Hum Reprod.* – 2008. – № 23. – P. 1207–1213.
5. Hardy-Weinberg equilibrium (2014), Available at: <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> (accessed 9 September 2014).
6. Hollingsworth S.J., Powell G.I., Barker S.G., Cooper D.G. Primary varicose veins: altered transcription of VEGF and its receptors (KDR, flt-1, soluble flt-1) with sapheno-femoral junction incompetence // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* – 2004. – Vol. 27, № 3. – P. 259–268.
7. Jormsjo S., Ye S., Moritz J., Walter D.H., Dimmeler S., Zeiher A.M., Henney A., Hamsten A., Eriksson P. Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-12 gene activity is associated with coronary artery luminal dimensions in diabetic patients with manifest coronary artery disease // *Circ Res.* – 2000. – № 86. – P. 998–1003.
8. Raffetto J.D., Khalil R.A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease // *Biochemical pharmacology.* – 2008. – Vol.2. – № 75. – P. 346–359.
9. Sansilvestri-Morel P., Fioretti F., Rupin A., Senni K., Fabiani J.N., Godea, G., Verbeuren T.J. Comparison of extracellular matrix in skin and saphenous veins from patients with varicose veins: does the skin reflect venous matrix changes? // *Clinical Science* – 2007. – № 112. – P. 229–239.
10. Shapiro S.D., Kobayashi D.K., Ley T.J. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages // *J Biol Chem.* – 1993. – № 268. – P. 23824–23829.
11. Su L., Zhou W., Asomaning K., Lin X., Wain J.C., Lynch T.J., Liu G., Christiani D.C. Genotypes and haplotypes of matrix metalloproteinase 1, 3 and 12 genes and the risk of lung cancer // *Carcinogenesis.* – 2006. – № 27. – P. 1024–1029.
12. Ye S., Eriksson P., Hamsten A., Kurkinen M., Humphries S.E., Henney A.M. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression // *J Biol Chem.* – 1996. – № 271. – P. 13055–13060.

### References

1. Feonik O.V., Gryazev S.M., Semenov A.Y., Bubnova N.A. *Vestnik St. Petersburg University Vestnik of St. Petersburg State University*, 2006, no. 3, pp. 39–49.
2. Bendeck M. P. Targeting Pericellular Proteolysis in Vascular Disease // *Circ. Res.* 2002. Vol. 91. pp. 861–862.
3. Birk D.M., Barbato J., Mureebe L., Chaer R.A. Current insights on the biology and clinical aspects of VEGF regulation // *Vasc Endovascular Surg.* 2008. Vol. 42, no. 6. pp. 517–530.
4. Borghese B., Chiche J.D., Vernerey D., Chenot C., Mir O., Bijaoui G., Bonaiti-Pellié C., Chapron C. Genetic poly-

morphisms of matrix metalloproteinase 12 and 13 genes are implicated in endometriosis progression // *Hum Reprod.* 2008. no. 23. pp. 1207–1213.

5. Hardy-Weinberg equilibrium (2014). Available at: <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> (accessed 9 September 2014).

6. Hollingsworth S.J., Powell G.I., Barker S.G., Cooper D.G. Primary varicose veins: altered transcription of VEGF and its receptors (KDR, flt-1, soluble flt-1) with sapheno-femoral junction incompetence // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004. Vol. 27, no. 3. pp. 259–268.

7. Jormsjo S., Ye S., Moritz J., Walter D.H., Dimmeler S., Zeiher A.M., Henney A., Hamsten A., Eriksson P. Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-12 gene activity is associated with coronary artery luminal dimensions in diabetic patients with manifest coronary artery disease // *Circ Res.* 2000. no. 86. pp. 998–1003.

8. Raffetto J.D., Khalil R.A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease // *Biochemical pharmacology.* 2008. Vol.2. no. 75. pp. 346–359.

9. Sansilvestri-Morel P., Fioretti F., Rupin A., Senni K., Fabiani J.N., Godea, G., Verbeuren T.J. Comparison of extracellular matrix in skin and saphenous veins from patients with varicose veins: does the skin reflect venous matrix changes? // *Clinical Science* 2007. no. 112. pp. 229–239.

10. Shapiro S.D., Kobayashi D.K., Ley T.J. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase pro-

duced by human alveolar macrophages // *J Biol Chem.* 1993. no. 268. pp. 23824–23829.

11. Su L., Zhou W., Asomaning K., Lin X., Wain J.C., Lynch T.J., Liu G., Christiani D.C. Genotypes and haplotypes of matrix metalloproteinase 1, 3 and 12 genes and the risk of lung cancer // *Carcinogenesis.* 2006. no. 27. pp. 1024–1029.

12. Ye S., Eriksson P., Hamsten A., Kurkinen M., Humphries S.E., Henney A.M. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression // *J Biol Chem.* 1996. no. 271. pp. 13055–13060.

**Рецензенты:**

Смагин А.А., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории лимфодетоксикации, Учреждение Российской академии медицинских наук «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск;

Майбородин И.В., д.м.н., профессор, научный консультант АНО «Центр новых медицинских технологий», г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 10.12.2014.