

## **РОЛЬ ЭКСПРЕССИИ РОСТОВЫХ МЕДИАТОРОВ И МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ НА ЛОКАЛЬНОМ УРОВНЕ У ПАЦИЕНТОВ С ВАРИКОЗНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ВЕН НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ КЛИНИЧЕСКИХ КЛАССОВ С4 – С6**

**Михайличенко В.Ю., Хизриев С.М., Самарин С.А., Гавриленко С.П., Безруков О.Ф.**

*ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского» (структурное подразделение) – Институт «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского», Симферополь, e-mail: pancreas1978@mail.ru*

Удовлетворительный результат лечения варикозной болезни нижних конечностей (ВБВ НК) зависит не только от самого выбора метода хирургического лечения и медикаментозного сопровождения, которое повлияет на повышение качества оказания хирургической помощи у данной категории пациентов. Цель – изучить роль экспрессии факторов роста и матриксных протеиназ в стенке варикозно измененной вены нижней конечности. Материал и методы исследования. Методом сплошной выборки в исследование были включены 102 пациента (мужчины – 34 (33,3%), женщины – 68 (66,7%), средний возраст – 47,1 [38,4; 52,3] года), страдающих ВБВ НК клинических классов С4 – С6, которые поступили в плановом порядке для проведения хирургического лечения. Кроме того, в исследование была включена контрольная группа (КГ), паритетная по половозрастным показателям. Контрольную группу составили 98 пациентов (мужчины – 39 (39,8%), женщины – 59 (60,2%), средний возраст – 48,4 [37,2; 54,9] года, которым выполнено аортокоронарное шунтирование. Критерии включения в КГ: возраст от 18 до 80 лет; отсутствие в анамнезе ВБВ НК. У всех пациентов в стенке вены определяли металлопротеиназы, эндотелиальный сосудистый фактор роста и тромбоцитарный фактор роста. Результаты и их обсуждение. Результаты выполненного нами многофакторного логистического регрессионного анализа (стандартизация по половозрастному профилю) связи ростовых медиаторов и MMPs с риском развития ВБВ НК клинических классов С4 – С6. По данным многофакторного РА установлено, что риск развития ВБВ НК клинических классов С4 – С6 оказался ассоциирован с более высокой экспрессией VEGF (ОШ 2,776 при 95% ДИ 2,368 – 3,691,  $p=0,003$ ), PDGF (ОШ 2,308 при 95% ДИ 1,772 – 2,689,  $p=0,006$ ) и MMP-9 (ОШ 2,241 при 95% ДИ 1,964 – 2,634,  $p=0,002$ ). Выводы. Изменения экспрессии ростовых медиаторов и MMHs в ПИВ (патологически измененной вены) при ВБВ НК клинических классов С4 – С6 характеризуются статистически значимым повышением уровней VEGF, PDGF, MMP-2, MMP-9 и пролидазы.

Ключевые слова: варикозная болезнь вен нижних конечностей, ростовые медиаторы, матриксные металлопротеиназы.

## **THE ROLE OF THE EXPRESSION OF GROWTH MEDIATORS AND MATRIX METALLOPROTEINASES AT THE LOCAL LEVEL IN PATIENTS WITH VARICOSE VEINS OF THE LOWER LIMB OF CLINICAL CLASS C4-C6**

**Mykhaylichenko V.Yu., Khizriev S.M., Samarin S.A., Gavrilenko S.P., Bezrukov O.Ph.**

*V.I. Vernadsky Crimean Federal University (structural subdivision) – Institute «Medical Academy named after S.I. Georgievsky» Simferopol, e-mail: pancreas1978@mail.ru*

A satisfactory result in the treatment of lower extremity varicose veins (LVV) depends not only on the choice of the method of surgical treatment and medical support, which will affect the improvement of the quality of surgical care in this category of patients. Objective – to study the role of expression of growth factors and matrix proteinases in the walls of a varicose vein of the lower extremity. Material and research methods. The study included 102 patients (men - 34 (33.3%), women - 68 (66.7%), mean age - 47.1 [38.4; 52.3] years) suffering from SMV of NK of clinical classes C4-C6, which were admitted in a planned manner for surgical treatment. In addition, the study included a control group (CG), parity in terms of sex and age. The control group consisted of 98 patients (men - 39 (39.8%), women - 59 (60.2%), mean age - 48.4 [37.2; 54.9] years who underwent coronary artery bypass grafting. Inclusion criteria in the CG: age from 18 to 80 years, no history of EMV LE In all patients, metalloproteinases, endothelial vascular growth factor and platelet growth factor were determined in the vein walls.) associations of growth mediators and MMPs with the risk of developing LEV of clinical classes C4-C6 . According to multifactorial RA, it was found that the risk of developing LEV of clinical classes C4-C6 was associated with a higher expression of VEGF (OR 2.776 at 95 % CI 2.368–3.691,  $p=0.003$ ), PDGF (OR 2.308, 95% CI 1.772–2.689,  $p=0.006$ ) and MMP-9 (OR 2.241, 95% CI 1.964–2.634,  $p=0.002$ ). expression of growth mediators and MMHs in pathologically altered vein in SPV NC clinical classes C4 - C6 are characterized by a statistically significant increase in the levels of VEGF, PDGF, MMP-2, MMP-9 and prolidase.

Keywords: varicose veins of the lower extremities, growth mediators, matrix metalloproteinases.

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в хирургическом и комбинированном лечении варикозной болезни нижних конечностей (ВБВ НК), остается ряд не решенных вопросов, касающихся патогенеза и неудовлетворительных результатов лечения в позднем послеоперационном периоде [1-3]. В патогенезе ВБВ НК изучено достаточно много факторов, участвующих в нарушении синтеза коллагена, и участие в этом процессе производных арахидоновой кислоты [1]. Эти нарушения приводят к изменению экстрацеллюлярного матрикса, что приводит к необратимому расширению вен и способствует тромбообразованию [4; 5]. Исследования последних лет, указывают на роль металлопротеиназ в патогенезе ВБВ НК, в частности установлено, что они вызывают деградацию компонентов экстрацеллюлярного матрикса [6; 7]. Доказано, что дефектные гены, кодирующие экспрессию матриксных металлопротеиназ (MMPs), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и синтез различных типов коллагена, сопряжены с повышенным риском развития ВБВ НК [8-10]. На основе транскриптомного анализа (качественной и количественной оценки транскриптов РНК) установлены генетические факторы, с большой вероятностью приводящие к возобновлению патологического процесса в вене - к ее рекуррентности после хирургического вмешательства [11; 12]. Среди молекулярных эффектов VEGF описаны интенсификация деградации внеклеточного матрикса (ВКМ), процессов миграции, пролиферации и адгезии эндотелиальных клеток, формирование сосудистых структур, координирование проницаемости сосудистой стенки, инициация продуцирования сериновых протеаз и ингибирование экспрессии MMPs [13]. Открытым и интересным остается вопрос об изменении экспрессии тромбоцитарного фактора роста (PDGF) в стенке ПИВ (патологически измененной вены) и его связи с показателями ОАС при ВБВ НК клинических классов С4 – С6. PDGF признан одним из наиболее функционально высокоактивных и распространенных митогенов для ряда клеток соединительной ткани, включая дермальные фибробласты и ГМК [14; 15].

Цель работы – изучить роль экспрессии факторов роста и матриксных протеиназ в стенке варикозно измененной вены нижней конечности.

**Материал и методы исследования.** Методом сплошной выборки в исследование были включены 102 пациента (мужчины – 34 (33,3%), женщины – 68 (66,7%), средний возраст – 47,1 [38,4; 52,3] года), страдающих ВБВ НК клинических классов С4 – С6, которые поступили в плановом порядке для проведения хирургического лечения. Кроме того, в исследование была включена контрольная группа (КГ), паритетная по половозрастным показателям.

Контрольную группу составили 98 пациентов (мужчины – 39 (39,8%), женщины – 59 (60,2%), средний возраст – 48,4 [37,2;54,9] года, которым выполнено аортокоронарное шунтирование. Критерии включения в КГ: возраст от 18 до 80 лет; отсутствие в анамнезе ВБВ НК.

Оценка экспрессии ростовых медиаторов VEGF на локальном уровне изучена у 102 пациентов с ВБВ НК клинических классов С4 – С6 по СЕАР и 98 лиц КГ1 посредством иммуноферментного анализа «сэндвич-варианта» с использованием готовых коммерческих комплектов реагентов.

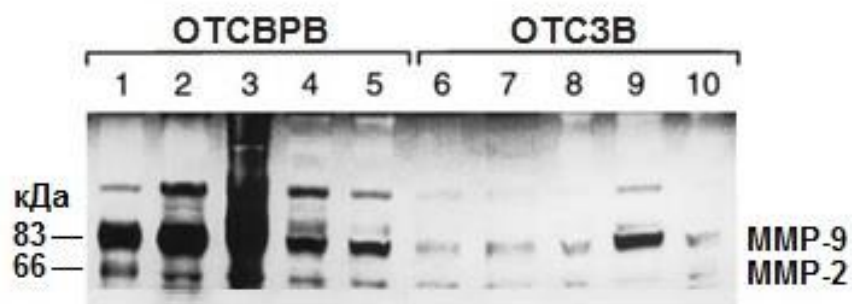
В качестве биологического материала исследования были использованы образцы удаленных во время операции варикозно расширенных БПВ и образцы иссеченных БПВ во время выполнения аортокоронарного шунтирования. Все образцы массой 0,5 г гомогенизировали в 5 мл буферного раствора (0,1 М Трис-НСl pH 7,4) и центрифугировали в течение 15 минут при 3000 об./мин. Приготовленный материал хранили при температуре 70 °С. Оценка экспрессии VEGF проводилась с использованием диагностического комплекта Human VEGF Quantikine Immunoassay (R&D System, Абингтон, Великобритания), PDGF – с использованием коммерческих диагностических комплектов Human PDGF Quantikine Immunoassay (R&D System, Абингтон, Великобритания). Уровень белка в образцах ткани стенки БПВ изучали посредством коммерческого доступного реактива Брэдфорда (BIO-RAD Protein Assay, Геркулес, США). Анализ проведен с использованием термошейкера DTS-4 (ELMI, Калабасас, Северная Америка) и микропланшетного ридера модели 680 (BIO-RAD, Геркулес, США) с программным обеспечением Microplate Manager версии 5.2.1 (BIO-RAD, Геркулес, США). Все измерения выполнены согласно рекомендациям производителей.

Статистический анализ полученных данных проведен с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft. Inc., USA). Проверка соответствия значений показателей нормальности распределения проводилась посредством метода Колмогорова-Смирнова. Количественные показатели представляли в виде медианы и интерквартильного размаха – Me [25-й процентиль; 75-й процентиль] при непараметрическом распределении и в виде среднего значения и стандартного отклонения –  $m \pm \sigma$  при нормальном распределении. Для оценки возможных статистически значимых взаимосвязей между исследуемыми показателями использовали корреляционный анализ Пирсона (r). Для оценки влияния исследуемых показателей на риск развития и прогрессирования ВБВ НК клинических классов С4 – С6 применяли логистический многофакторный регрессионный анализ с вычислением отношения шансов (ОШ) и 95% доверительного интервала (ДИ), при этом использовали процедуру последовательного отбора переменных.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Нами выявлены изменения экспрессии ростовых медиаторов и MMPs (матриксные металлопротеиназы) у пациентов с ВБВ НК

клинических классов С4 – С6 по сравнению с лицами КГ. Средний показатель VEGF в образцах стенки ПИВ составил  $40,1 \pm 6,2$  нг/г белка и был статистически значимо выше – в 1,7 раза по сравнению с аналогичным показателем у лиц КГ ( $23,0 \pm 5,9$  нг/г белка,  $p=0,001$ ). При этом у пациентов с ВБВ НК отмечена обратная корреляция между уровнем VEGF и активностью супероксиддисмутазы в плазме крови и стенке ПИВ ( $r=-0,52$ ;  $p=0,002$  и  $r=-0,59$ ;  $p=0,001$  соответственно).

Средний показатель PDGF в образцах стенки ПИВ составил  $0,17 \pm 0,03$  нг/мг и был статистически значимо выше – в 2,8 раза по сравнению с аналогичным показателем у лиц КГ ( $0,06 \pm 0,01$  нг/мг,  $p=0,040$ ). Активность MMP-2 и MMP-9 регистрировалась как в образцах стенки ПИВ, так и контрольных вен (рис.). При этом средний показатель MMP-2 в образцах стенки ПИВ составил  $25,0 \pm 9,0$  единиц ОП/мг растворимого вещества и был статистически значимо выше – в 2,2 раза по сравнению с аналогичным показателем у лиц КГ 1 ( $11,3 \pm 4,7$  единицы ОП/мг растворимого вещества,  $p=0,022$ ). Средний показатель MMP-9 в образцах стенки ПИВ составил  $23,9 \pm 10,6$  единицы ОП/мг растворимого вещества и был статистически значимо выше – в 2,4 раза по сравнению с аналогичным показателем у лиц КГ ( $10,0 \pm 3,5$  единицы ОП/мг растворимого вещества,  $p=0,012$ ) (рис.). У пациентов с ВБВ НК высокий уровень MMP-9 обратно коррелировал с показателем ТАС в плазме крови и стенке ВРВ ( $r=-0,48$ ;  $p<0,001$  и  $r=-0,52$ ;  $p=0,012$ ).



*Результаты вестерн-блоттинга активности матриксных металлопротеиназ 2 и 9 в образцах стенки патологически измененной большой подкожной вены и контрольной вены*

Примечание: MMP – матриксная металлопротеиназа, ОТСВРВ – образец ткани стенки варикозно расширенной вены, ОТСЗВ – образец ткани стенки здоровой вены.

Средний показатель активности пролидазы в образцах стенки ПИВ составил  $181,6 \pm 34,4$  ЕД/л соответственно и был статистически значимо выше – в 1,3 раза по сравнению с аналогичными показателями у лиц КГ ( $142,2 \pm 35,6$  ЕД/л,  $p<0,001$ ).

Результаты выполненного нами многофакторного логистического РА (стандартизация по половозрастному профилю) связи ростовых медиаторов и MMPs с риском развития ВБВ НК клинических классов С4 – С6 представлены в таблице. По данным многофакторного РА

установлено, что риск развития ВБВ НК клинических классов С4 – С6 оказался ассоциирован с более высокой экспрессией VEGF (ОШ 2,776 при 95% ДИ 2,368 – 3,691,  $p=0,003$ ), PDGF (ОШ 2,308 при 95% ДИ 1,772 – 2,689,  $p=0,006$ ) и MMP-9 (ОШ 2,241 при 95% ДИ 1,964 – 2,634,  $p=0,002$ ).

Результаты логистического регрессионного анализа связи показателей ростовых медиаторов и металлопротеиназ с риском развития ВБВ НК клинических классов С4 – С6

| Показатель | В     | Многофакторный анализ<br>(системный уровень) |               | р     |
|------------|-------|--|---------------|-------|
|            |       | ОШ   | 95% ДИ        |       |
| VEGF       | 0,752 | 2,776  | 2,368 – 3,691 | 0,003 |
| PDGF       | 5,248 | 2,308  | 1,772 – 2,689 | 0,006 |
| MMP-2      | 0,643 | 0,834  | 0,611 – 1,138 | 0,254 |
| MMP-9      | 1,537 | 2,241  | 1,964 – 2,634 | 0,002 |
| Пролидаза  | 0,833 | 0,873  | 0,671 – 1,157 | 0,174 |

Примечание: VEGF – фактор роста эндотелия сосудов, PDGF – тромбоцитарный фактор роста, MMP – матриксная металлопротеиназа, В – бета-коэффициент, р – уровень значимости.

Повышенное венозное давление и дилатация вен в нижних конечностях способствуют развитию сложной сосудистой реакции, приводящей к обструкции и/или рефлюксу - двум основным патогенетическим механизмам, которые способствуют прогрессированию варикозной болезни. Более того, эти изменения обеспечивают создание гипоксической среды [16]. Наблюдаемые у пациентов клинические признаки указывают на развитие воспалительного процесса, вторичного по отношению к венозной гипертензии. Специализированные рецепторы гликокаликса эндотелия воспринимают изменения напряжения сдвига, а экспрессия на его плазмолемме молекул адгезии обеспечивает активацию циркулирующих в крови лейкоцитов, их прикрепление, диапедез и миграцию в венозную стенку/клапаны, что в итоге приводит к повреждению венозной стенки и накоплению воспалительных клеток в интерстиции тканей. Дисбаланс комплекса цитокинов, хемокинов, факторов роста, протеиназ и эндопептидаз, которые продуцируют активированные лейкоциты-мигранты, приводит к хронизации воспаления и появлению клинических признаков варикозного расширения вен, вплоть до тяжелых проявлений в виде изменений кожи и венозных язв [17].

Широко известными  $Zn^{2+}$ -зависимыми эндопептидазами являются матричные металлопротеиназы (ММП), способные расщеплять различные белки внеклеточного матрикса (ВКМ). При варикозной болезни ММП могут играть важную роль в ремоделировании тканей стенки вены, разрушая различные компоненты ВКМ, а также взаимодействовать с биологически активными молекулами на клеточной мембране, связанными с G-белком рецепторы, и регулировать таким образом клеточную сигнализацию [18].

У пациентов с варикозной болезнью вен нижних конечностей обнаружен дисбаланс белковых компонентов ВКМ, обусловленный изменениями содержания коллагена и/или эластина, что было связано с увеличением уровней ММП-1, -2, -3 и -7, причем в большей степени - активности ММП-2 [19]. Однако имеющиеся в литературе сведения о характере изменений коллагена в стенках венозных сосудов противоречивы, поскольку демонстрируют заметные различия - от увеличения до уменьшения или без изменений. В исследовании [20] показано снижение уровней активных форм ММП-1 и ММП-2 у пациентов с варикозной болезнью.

Таким образом, взаимоотношения мощности оксидативного стресса и антиоксидантной системы у пациентов с ВБВ НК сопровождаются постоянной провоспалительной реакцией в стенке вен, что в комбинации с протеолитической активацией матричных металлопротеиназ (ММП-2 и -9) и пролидазы вызывает образование ран при венозных язвах нижних конечностей путем индукции механизмов протеолитической деградации компонентов ВКМ, эндотелиально-гладкомышечной релаксации, фенотипической трансформации гладкомышечных клеток, нарушения структурной целостности венозной стенки.

### **Выводы**

1. Изменения экспрессии ростовых медиаторов и ММНs в ПИВ при ВБВ НК клинических классов С4 – С6 характеризуются статистически значимым повышением уровней VEGF, PDGF, MMP-2, MMP-9 и пролидазы.
2. Высокая концентрация металлопротеиназ и ростовых факторов по сравнению с нормой свидетельствует о высокой пролиферативной активности в стенке варикозно измененной вены и демонстрирует активность патологического процесса.
3. Данный патологический механизм необходимо учитывать у пациентов с тяжелой формой ВБВ НК, особенно при рецидивирующих формах заболевания, и требуется поиск препаратов, влияющих на активность факторов роста, для повышения эффективности комплексного лечения ВБВ НК.

### **Список литературы**

1. Дибиров М.Д., Вавилова Т.П., Минаев А.В. Исследование биохимических показателей в биоптатах стенок вен нижних конечностей при варикозной болезни // Флебология. 2019. Т. 13. № 2. С. 141-145.
2. Кузьменко О.В., Михайличенко В.Ю., Шестопалов Д.В. Дифференцированный подход к выбору методики ЭВЛК при облитерации ствола большой подкожной вены у пациентов с варикозной болезнью класса C2-4 // Таврический медико-биологический вестник. 2014. Т. 17. № 2. С. 79-82.
3. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению хронических заболеваний вен // Флебология. 2018. Т. 12. №. 3. С. 146-240.
4. Студенникова В.В., Севергина Л.О., Синявин Г.В., Рапопорт Л.М., Коровин И.А. Патогенез несостоятельности стенки вены при варикозной болезни // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2019. № 10. С. 69-74.
5. Hesketh M, Sahin K.B., West Z.E., Murray R.Z. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. International Journal of Molecular Sciences. 2017. Vol. 18. no. 7. P. 1545.
6. Студенникова В.В., Севергина Л.О., Цариченко Д.Г., Исмаилов М.Т., Коровин И.А., Рапопорт Л.М., Захаров А.И., Петрухина Ю.В. Современный взгляд на патогенез варикоцеле и проблему развития его рецидивов // Урология. 2018. № 1. С. 150-154.
7. Serra R., Buffone G., Costanzo G. Altered metalloproteinase-9 expression as least common denominator between varicocele, inguinal hernia, and chronic venous disorders. Ann Vasc Surg. 2014. Vol. 28. no. 3. P. 705-709.
8. Bharath V., Kahn S.R., Lazo-Langner A. Genetic polymorphisms of vein wall remodeling in chronic venous disease: a narrative and systematic review. Blood. 2014. vol. 124. no. 8. P. 1242-1250
9. Zagrebina M.A., Ivanova P.V., Bagautdinova P.K., Semerikova A.M. On the issue of chronic venous insufficiency in pregnant women. Актуальные научные исследования в современном мире. 2021. Vol. 80. no. 12-1. P. 25-28.
10. Шевела А.И., Усов С.А., Маркина В.А. Ожирение и хроническая венозная недостаточность: от факторов риска к патогенезу // Флебология. 2019. Т. 13. № 3. С. 220-226.
11. Короленя В.А. Выявление генетических факторов, приводящих к рекуррентности варикозной болезни вен после хирургического вмешательства // МНСК-2020. Медицина: материалы 58-й Международной научной студенческой конференции. 2020. С. 13.
12. Изосимов В.В., Умеров Э.Э., Гривенко С.Г. Особенности репаративных процессов вазотрофических язв при хронической венозной недостаточности нижних конечностей на фоне их комплексного лечения // Таврический медико-биологический вестник. 2017. Т. 20. № 2-1. С. 63-70.

13. Chin B.S., Blann A.D., Gibbs C.R. Prognostic value of inter-leukin-6, plasma viscosity, fibrinogen, von Willebrand factor, tissue factor and vascular endothelial growth factor levels in congestive heart failure. *Eur. J. Clin. Invest.* 2003. no. 33. P. 941–948.
14. Vaziri C., Faller D.V. Repression of platelet-derived growth factor b-receptor expression by mitogenic growth factors and transforming oncogenes in murine 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 1995. no. 15. P. 1244–1253.
15. Винник Ю.С., Карапетян Г.Э., Кочетова Л.В., Пахомова Р.А. Функциональная активность клеток гранулоцитарного звена больных с длительно незаживающими ранами на фоне хронической венозной недостаточности // *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова.* 2019. № 1. С. 37-42.
16. Ortega M. A., Romero B., Asúnsolo Á., Sainz F. et al. Behavior of Smooth Muscle Cells under Hypoxic Conditions: Possible Implications on the Varicose Vein Endothelium. *Biomed. Res. Int.* 2018. Vol. 18. DOI: 10.1155/2018/7156150.
17. Raffetto J.D., Mannello F. Pathophysiology of chronic venous disease. *Int. Angiol.* 2014. Vol. 33. no 3. P. 212-21.
18. Chen Y., Peng W., Raffetto J. D., Khalil R. A. Matrix Metalloproteinases in Remodeling of Lower Extremity Veins and Chronic Venous Disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2017. Vol. 147. P. 267–299.
19. Sansilvestri-Morel P. et al. Comparison of extracellular matrix in skin and saphenous veins from patients with varicose veins: does the skin reflect venous matrix changes? *Clin. Sci. (Lond).* 2007. Vol. 112. no 4. P. 229–239.
20. Ortega M. A., Fraile-Martínez O., García-Montero C. et al. Understanding Chronic Venous Disease: A Critical Overview of Its Pathophysiology and Medical Management. *J. Clin. Med.* 2021. Vol. 10. no 15. P. 3239.