

Исследование взаимосвязи полиморфных вариантов генов *VEGF* и *MUC2* с риском развития эндометриоза

Скуратовская Д.А.¹, Юрова К.А.¹, Куликова Н.В.¹, Афанасьева М.В.³, Седнев О.В.², Цивьян Б.Л.³, Литвинова Л.С.¹

¹ ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Министерства образования и науки Российской Федерации, 236016, Калининград, РФ, e-mail: DariaSK@list.ru

² ГБУЗ Калининградской области «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи» Минздрава России, 236008, Калининград, РФ

³ СПб ГБУЗ «Городская больница №40», Санкт-Петербург, РФ

Целью исследования явился поиск ассоциации полиморфных вариантов +936C/T и +460C/T гена *VEGF* и полиморфных вариантов C(-15161)T (rs10902088) и T(-12150)C (rs10794288) гена *MUC2* с риском развития наружного генитального эндометриоза в славянской популяции Северо-Западного федерального округа. В исследование включено 60 пациенток (средний возраст 32,1 ± 12,4 года) с диагнозом наружный генитальный эндометриоз и 76 здоровых доноров (средний возраст 29,6 ± 9,7 года). Генотипирование проводилось методом ПЦР в режиме реального времени с использованием амплификатора LightCycler 480 Instrument II («Roche», Швейцария) и наборов для определения полиморфных вариантов *VEGF* T(-460)C (rs833061), *VEGF* C936T (rs3025039), *MUC2* C(-15161)T (rs10902088), *MUC2* T(-12150)C (rs10794288) (ЗАО «Синтол»). В проведенном исследовании установлена ассоциация аллеля C (OR = 2,11) и генотипа CC (OR = 2,57) полиморфных вариантов rs833061460 гена *VEGFA* с повышенным риском развития наружного генитального эндометриоза в славянской популяции Северо-Западного федерального округа.

Ключевые слова: наружный генитальный эндометриоз, полиморфный вариант, *MUC2*, *VEGF*.

Авторы не имеют конфликта интересов.

Работа выполнена в рамках субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/6.7» Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Investigation of the interrelation between polymorphisms of *VEGF* and *MUC2* genes with a risk of developing endometriosis

Skuratovskaia D.A.¹, Yurova K.A.¹, Kulikova N.V.¹, Afanasieva M.V.³, Sednev O.V.², Tsivyan B.L.³, Litvinova L.S.¹

¹ Laboratory of Immunology and Cellular Biotechnology IKBFU, 236001, Kaliningrad, Russian Federation e-mail: DariaSK@list.ru

² gynecological department of BSMP, 236008, Kaliningrad, RF

³ St. Petersburg City Clinical Hospital «City Hospital No. 40», 19770, St. Petersburg, Russia

The aim of the study was to search for the association of the polymorphisms +936C/T and +460C/T of the *VEGF* gene and polymorphisms of C(-15161)T (rs10902088) and T(-12150)C (rs10794288) of the *MUC2* gene with the risk of developing genital endometriosis in the Slavic population of the North-Western Federal District. The study included 60 patients (mean age 32.1 ± 12.4 years) with a diagnosis of external genital endometriosis and 76 healthy donors (mean age 29.6 ± 9.7 years). Genotyping was carried out by real-time PCR using the LightCycler 480 Instrument II (Roche, Switzerland) amplifiers and *VEGF* T(-460)C (rs833061), *VEGF* C936T (rs3025039), *MUC2* C(-15161)T (rs10902088), *MUC2* T(-12150)C (rs10794288) (Sintol). The association of C allele (OR = 2.11) and the CC genotype (OR = 2.57) of polymorphism rs833061460 in *VEGFA* gene with an increased risk of developing external genital endometriosis in Slavic population of the North-Western Federal District.

Key words: external genital endometriosis, polymorphism, *MUC2*, *VEGF*.

Введение

Эндометриоз — дисгормональное иммунозависимое заболевание с наследственной предрасположенностью, которое характеризуется доброкачественным разрастанием ткани, сходной по морфологическому строению с эндометрием, но находящейся за пределами полости матки [1]. Согласно современным представлениям, ключевую роль в развитии эндометриоза играют генетические факторы, которыми могут быть обусловлены как аномалии развития, способствующие, например, ретроградным менструациям, так и прямые и опосредованные (через онкогены) нарушения иммунного гомеостаза [2–4].

Повышенные адгезивный и инвазивный потенциалы клеток эндометрия способствуют формированию эндометриоидных гетеротопий, которые требуют активного кровоснабжения [5, 6]. Образование *de novo* кровеносных сосудов регулируется сигнальной последовательностью различных молекул, в том числе сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF). VEGF стимулирует пролиферацию, миграцию, дифференцировку эндотелиальных клеток, увеличивает проницаемость сосудов и индуцирует образование капилляров, способствуя формированию эндометриоидных поражений [6, 7]. В свою очередь, формирование высокомолекулярного вязко-эластического слоя, защищающего слизистые оболочки, происходит за счет секреции гель-образующих муцинов (в частности, MUC2) — высокомолекулярных гликопротеиновых компонентов слизи [8, 9]. Было обнаружено, что экспрессия MUC2 увеличивается во время секреторной фазы менструального цикла, участвуя в защите эпителия [10]. Существуют данные, доказывающие, что нарушение секреции MUC2 может способствовать женскому бесплодию [10].

В связи с этим целью исследования явился поиск ассоциации полиморфных вариантов +936С/Т и +460С/Т гена *VEGF* и полиморфных вариантов С(-15161)Т (rs10902088) и Т(-12150)С (rs10794288) гена *MUC2* с риском развития генитального эндометриоза в славянской популяции Северо-Западного федерального округа.

Материалы и методы

В исследование было включено 60 пациенток (средний возраст $32,1 \pm 12,4$ года) с диагнозом *наружный генитальный эндометриоз* и 76 условно здоровых женщин (средний возраст $29,6 \pm 9,7$ года). Диагноз *наружный генитальный эндометриоз* был верифицирован в результате обследования брюшины на наличие гетеротопических эндометриоидных очагов в ходе лапароскопических манипуляций, и подтвержден путем гистологического исследования.

Большинство пациенток (59,40%) предъявляли жалобы на бесплодие (97,3% — первичное, 2,7% — вторичное), 49,02% — на болевой синдром, 33,33% — на дисменорею, 31,37% — на диспареунию, 19,61% — на наруше-

ние менструального цикла по типу мено- и метроррагии. Наиболее часто во время лапароскопии диагностировались эндометриоидные кисты — в среднем в 83,7% (из них двусторонние — в 30% случаев). Частота ретроцервикального эндометриоза не превышала 16,21%. Чаще встречался умеренно выраженный спаечный процесс органов малого таза: I—II степень составила 35,29%, III степень и IV степень — соответственно 9,81% и 3,92%.

Исследуемые группы были сопоставимы по возрастным характеристикам. Все женщины, принимавшие участие в эксперименте, относились к славянской популяции, всеми было подписано информированное согласие. Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете (протокол №7 заседания Локального этического комитета Инновационного парка БФУ им. И. Канта от 9 декабря 2015).

Из лейкоцитов венозной крови были выделены образцы геномной ДНК с использованием коммерческих наборов «ДНК-Экстран-1», согласно протоколу производителя («Синтол», Россия). Генотипирование проводилось методом ПЦР в режиме реального времени (LightCycler 480 Instrument II, «Roche», Швейцария) и наборов для определения полиморфных вариантов *VEGF* Т(-460)С (rs833061), *VEGF* С936Т (rs3025039), *MUC2* С(-15161)Т (rs10902088), *MUC2* Т(-12150)С (rs10794288) («Синтол», Россия).

Статистическая обработка полученных результатов была осуществлена с использованием программы Statistica 10. Об ассоциации аллелей или генотипов с риском развития наружного генитального эндометриоза судили по величине отношения шансов (OR) ($p < 0,05$). Значения OR рассчитывали с помощью программы «Калькулятор для расчета отношения шансов» (http://gen-exp.ru/calculator_or.php).

Результаты и обсуждение

Повышенная продукция VEGF отмечена в плазме и перитонеальной жидкости брюшной полости у женщин с эндометриозом [11]. В исследованиях на животных моделях показано уменьшение повреждения эндометрия при снижении продукции VEGF [11]. По некоторым данным, заболевание может возникать из-за активации макрофагов и продукции ими повышенных уровней VEGF [7; 12]. Другими авторами выявлена взаимосвязь между уровнями VEGF, продуцируемыми перитонеальными макрофагами при наружном генитальном эндометриозе, со стадией заболевания [13].

При исследовании полиморфных вариантов -460С/Т гена *VEGF* нами было установлено следующее распределение частот аллелей и генотипов (таблица).

В ходе проведенного исследования установлены ассоциации аллеля С и генотипа СС полиморфного варианта 460С/Т гена *VEGF* с повышенным риском развития наружного генитального эндометриоза (OR = 2,11, 95%CI: 1,12-3,98, $p = 0,02$) и (OR = 2,57,

95%CI: 1,03-6,41, $p = 0,002$). Учитывая полученные результаты исследования полиморфных вариантов в гене *VEGF*, полиморфный вариант -460C/T в гене *VEGF* может потенциально модулировать экспрессию фактора, поддерживая тем самым развитие эндометриоидных очагов.

В качестве основного фактора ангиогенеза привлекает внимание VEGF из-за его участия в нарушениях сосудистого развития. Полученные результаты согласуются с экспериментальными данными Szubert с соавт., выявивших повышенные уровни VEGF в плазме крови и перитонеальной жидкости брюшной полости женщин, страдающих эндометриозом [12, 13]. Кроме того, *in vitro* установлен более высокий уровень продукции VEGF клетками эндометрия при добавлении в культуральную среду перитонеальной жидкости больных эндометриозом, по сравнению с интактной клеточной куль-

турой [14]. Полиморфный вариант -460C/T в гене *VEGF* не был связан с нарушениями ангиогенеза, в частности, с риском развития ретинопатии недоношенных [15]. Было показано, что наличие полиморфных вариантов в гене *VEGF* может быть ассоциировано с риском развития эндометриоза. Так, генотип CC полиморфного варианта +405 и гаплотип полиморфных вариантов 460T/405C гена *VEGF* был взаимосвязан с риском развития эндометриоза [16]. Тем не менее, существуют данные об отсутствии взаимосвязи полиморфного варианта -460C/T гена *VEGF* с эндометриозом у иранского населения [17].

Распределение частот аллелей и генотипов другого полиморфного варианта +936 C/T гена *VEGF* представлены в таблице. При исследовании ассоциации полиморфного варианта +936C/T гена *VEGF* связи с риском развития заболевания установлено не было. Данные на-

Таблица

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов -460C/T гена *VEGF*, 936C/T гена *VEGF*, C(-15161)T гена *MUC2* и T(-12150)C (rs10794288) гена *MUC2* в исследуемых группах

Полиморфный вариант -460C/T гена <i>VEGF</i>					
Группы	Распределение частот генотипов (%)			Распределение частот аллелей (%)	
	ТТ	ТС	СС	Т	С
Контроль (n = 76)	31,7%	42,9%	25,4%	53,2%	46,8%
Пациентки с наружным генитальным эндометриозом (n = 60)	16,7%	36,7%	46,7%	35%	65%
	$p = 0,024^*$	$p = 0,42$	$p = 0,002^*$	$p = 0,02^*$	
Полиморфный вариант 936C/T гена <i>VEGF</i>					
Группы	Распределение частот генотипов (%)			Распределение частот аллелей (%)	
	СС	СТ	ТТ	С	Т
Контроль (n = 76)	71,7%	26,7%	1,7%	85%	15%
Пациентки с наружным генитальным эндометриозом (n = 60)	76,7%	23,3%	0%	88,3%	11,7%
	$p = 0,48$	$p = 0,62$	$p = 0,31$	$p = 0,39$	
Полиморфный вариант C(-15161)T (rs10902088) гена <i>MUC2</i>					
Группы	Распределение частот генотипов (%)			Распределение частот аллелей (%)	
	СС	СТ	ТТ	С	Т
Контроль (n = 76)	81,3%	16,7%	2,1%	89,6%	10,4
Пациентки с наружным генитальным эндометриозом (n = 60)	75,6%	19,5%	4,9%	85,4%	14,6%
	$p = 0,51$	$p = 0,72$	$p = 0,4$	$p = 0,39$	
Полиморфный вариант T(-12150)C (rs10794288) гена <i>MUC2</i>					
Группы	Распределение частот генотипов (%)			Распределение частот аллелей (%)	
	ТТ	ТС	СС	Т	С
Контроль (n = 76)	72,3%	19,1%	8,5%	81,9%	18,1%
Пациентки с наружным генитальным эндометриозом (n = 60)	80,5%	19,5%	0%	90,2%	9,8%
	$p = 0,37 \chi^2 = 0,8$	$p = 0,95 \chi^2 = 0,01$	$p = 0,049 \chi^2 = 3,6$	$p = 0,11 \chi^2 = 2,49$	
Примечание. * – $p < 0,05$					

учной периодики, касающиеся ассоциации полиморфного варианта +936C/T гена *VEGF* с риском развития наружного генитального эндометриоза также крайне противоречивы. Так, в корейской популяции не обнаружена связь полиморфного варианта 936C/T с риском развития этой патологии [18], тогда как результаты других исследований, в том числе проведенные метаанализы, обнаруживают исследуемую ассоциацию [19, 20]. Возможным механизмом развития эндометриоза у носителей полиморфного варианта +936C/T может являться повышенная продукция фактора VEGF [19].

Муцины представляют собой высокогликозилированные белки, защищающие и смазывающие эпителиальную поверхность дыхательных, желудочно-кишечных и репродуктивных путей [21]. Предполагается, что члены семейства муциновых белков играют важную роль в развитии эндометриоза и бесплодия [21]. В исследованиях других авторов было показано, что у пациенток с эндометриозом отмечена более низкая частота аллеля С полиморфного варианта rs10794288, аллеля Т полиморфного варианта rs10902088 и аллеля G полиморфного варианта rs7103978 гена *MUC2*. Кроме того, аллель С полиморфного варианта rs10794288 и аллель Т полиморфного варианта rs10902088 гена *MUC2* были также менее распространены у пациенток с бесплодием по сравнению со здоровыми фертильными женщинами [21].

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов C(-15161)T и T(-12150)C гена *MUC2* представлено в таблице. Взаимосвязи аллелей и генотипов полиморфного варианта C(-15161)T гена *MUC2* с риском развития наружного генитального эндометриоза выявлено не было. Полиморфный вариант rs10794288 гена *MUC2* является молчащей заменой, однако наличие полиморфного варианта rs10902088 приводит к аминокислотной замене аспарагина на лизин Asn1149Lys [21, 22]. Несмотря на то, что Asn1149 не является типичным сайтом для N-связанного гликозилирования, замена на положительно заряженный остаток может влиять на процесс гликозилирования нескольких соседних серинов, в том числе Asn1154 [21]. Следовательно, этот полиморфный вариант может изменить статус гликозилирования *MUC2* [21; 22].

Анализ полиморфных вариантов +936C/T и +460C/T гена *VEGF* ($D' = 6$, $r^2 < 0,1$, $p > 0,05$) и полиморфных вариантов C(-15161)T (rs10902088) и T(-12150)C (rs10794288) гена *MUC2* ($D' = 60$, $r^2 < 34$, $p > 0,05$) не выявил значимого неравновесного сцепления (LD).

Таким образом, проведенное исследование позволило выявить полиморфные варианты генов-предикторов эндометриоза. Поиск молекулярно-генетических аспектов развития наружного генитального эндометриоза является важным для разработки новых методов диагностики развития генитального эндометриоза и персонализированных подходов к генетической терапии этого заболевания.

Список литературы

- Zubrzycka A., Zubrzycki M., Janecka A., Zubrzycka M. New Horizons in the Etiopathogenesis and Non-Invasive Diagnosis of Endometriosis. *Curr Mol Med*. 2015; 15(8): 697-713. PMID: 26391550.
- Bulun S.E., Monsivais D., Kakinuma T. et al. Molecular biology of endometriosis: from aromatase to genomic abnormalities. *Semin Reprod Med*. 2015; 33(3): 220-224. PMID: 26036904. DOI: 10.1055/s-0035-1554053.
- Ahn S.H., Khalaj K., Young S.L. et al. Immune-inflammation gene signatures in endometriosis patients. *Fertil Steril*. 2016; 106(6): 1420-1431. PMID: 27475412. DOI: 10.1016 / j.fertnstert.2016.07.005 4.
- Sbracia M., McKinnon B., Scarpellini F. et al. PreImplantation Factor in endometriosis: A potential role in inducing immune privilege for ectopic endometrium. *PLoS One*. 2017; 12(9): e0184399. PMID: 28902871. DOI: 10.1371 / journal.pone.0184399.
- Perini J.A., Cardoso J.V., Berardo P.T. et al. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C>A, -460 T>C, -1154G>A, +405G>C and +936C>T) in endometriosis: a case-control study with Brazilians. *BMC Womens Health*. 2014; 14: 117. PMID: 25255852. DOI: 10.1186 / 1472-6874-14-117.
- Liang S., Huang Y., Fan Y. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and endometriosis risk: a meta-analysis. *Arch. Gynecol. Obstet*. 2012; 286: 139-46. PMID: 2239248. DOI: 10.1007 / s00404-012-2270-1.
- Xu S., Wu W., Sun H. et al. Association of the vascular endothelial growth factor gene polymorphisms (-460C/T, +405G/C and +936T/C) with endometriosis: a meta-analysis. *Ann Hum Genet*. 2012; 76(6): 464-471. PMID: 23061744. DOI: 10.1111 / j.1469-1809.2012.00726.x
- Hebbbar V., Damera G., Sachdev G.P. Differential expression of MUC genes in endometrial and cervical tissues and tumors. *BMC Cancer*. 2005; 5: 124. PMID: 16188033. DOI: 10.1186 / 1471-2407-5-124.
- Alameda F., Mejias-Luque R., Garrido M. et al. Mucin genes (*MUC2*, *MUC4*, *MUC5AC*, and *MUC6*) detection in normal and pathological endometrial tissues. *Int J GynecolPathol*. 2007; 26(1): 61-65. PMID: 17197898. DOI: 10.1097 / 01.pgp.0000225837.32719.c1.
- Yang C.W., Chang C.Y., Lai M.T. et al. Genetic variations of *MUC17* are associated with endometriosis development and related infertility. *BMC Med Genet*. 2015; 16: 60. PMID: 26285705. DOI: 10.1186 / s12881-015-0209-7.
- Szczepanska M., Mostowska A., Wirstlein P. et al. Involvement of vascular endothelial growth factor -460 C/T, +405 G/C and +936 C/T polymorphisms in the development of endometriosis. *Bio-medical Reports*. 2015; 3(2): 220-224. DOI: 10.3892/br.2014.409.
- Young V.J., Ahmad S.F., Brown J.K. et al. Peritoneal VEGF-A expression is regulated by TGF- β 1 through an ID1 pathway in women with endometriosis. *Sci Rep*. 2015; 5: 16859. PMID: 26449623. DOI: 10.1038 / srep16859.
- Szuber M., Suzin J., Duechler M. et al. Evaluation of selected angiogenic and inflammatory markers in endometriosis before and after danazol treatment. *Reprod Fertil Dev*. 2014; 26: 414-420. PMID: 23544741. DOI: 10.1071 / RD12258.
- Pupo-Nogueira A., de Oliveira R.M., Petta C.A. et al. Vascular endothelial growth factor concentrations in the serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet*. 2007; 99: 33-37. PMID: 17602688. DOI: 10.1016 / j.ijgo.2007.04.033.
- Shukla S., Malik M.A., Chandra P. et al. Association between VEGF polymorphisms (-460 T/C and +936 C/T) and retinopathy of prematurity risk: A meta-analysis. *Saudi Journal of Ophthalmology*. 2016; 30(3): 157-162. DOI:10.1016/j.sjopt.2016.06.003.

16. Attar R., Agachan B., Kuran S.B. et al. Genetic variants of vascular endothelial growth factor and risk for the development of endometriosis. *In Vivo*. 2010; 24(3): 297-301.

17. Braza-Boils A., Gilbert-Estelles J., Ramon L.A. et al. Peritoneal fluid reduces angiogenesis-related micro RNA expression in cell cultures of endometrial and endometriotic tissues from women with endometriosis. *PLoS One*. 2013; 8: e62370. PMID: 23620826. DOI: 10.1371/journal.pone.0062370.

18. Emamifar B., Salehi Z., Mehrafza M., Mashayekhi F. The vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphisms and the risk of endometriosis in northern Iran. *GynecolEndocrinol*. 2012; 28: 447-450. PMID: 22128802. DOI: 10,3109 / 09513590.2011.632791.

19. Kim J.G., Kim J.Y., Jee B.C. et al. Association between endometriosis and polymorphisms in endostatin and vascular endothe-

lial growth factor and their serum levels in Korean women. *FertilSteril*. 2008; 89: 243-245. PMID: 17482599. DOI: 10,1016 / j.fertnstert.2007.02.023.

20. Renner W., Kotschan S., Hoffmann C. et al. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res*. 2000; 37: 443-448. PMID: 11146397. DOI: 10,1159 / 000054076.

21. Chang C.Y., Chen Y., Lin W.C. et al. MUC2 polymorphisms are associated with endometriosis development and infertility: acase-control study. *BMC Med Genet*. 2012; 13: 15. PMID: 22417007. DOI: 10,1186 / 1471-2350-13-15.

22. Jankovic Velickovic L., Katic V., Hattori T. et al. Differences in the expression of mucins in various forms of cystitis glandularis. *Pathol Res Pract*. 2007; 203(9): 653-658. PMID: 17659847. DOI: 10,1016 / j.prp.2007.05.003.