

©О.С.Школьник, Г.В.Макух, О.В.Мар'ян

АЛЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ЛОКУСУ 405G/C ГЕНА VEGF (ФАКТОР РОСТУ ЕНДОТЕЛІЮ СУДИН) У ЖІНОК З ПАТОЛОГІЄЮ СИСТЕМИ КРОВООБІГУ*ДУ «Інститут спадкової патології НАМНУ України»*

АЛЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ЛОКУСУ 405G/C ГЕНА VEGF (ФАКТОР РОСТУ ЕНДОТЕЛІЮ СУДИН) У ЖІНОК З ПАТОЛОГІЄЮ СИСТЕМИ КРОВООБІГУ. Метою роботи було вивчення розподілу алелей та генотипів поліморфного локусу 405G/C гена VEGF (фактор росту ендотелію судин) для розробки інформативного маркера, що характеризує процеси включення «ангіогенезу» при різних захворюваннях, а саме у вагітних жінок з патологією системи кровообігу. Молекулярно-генетичне дослідження поліморфного локусу 405G/C гена фактору росту ендотелію судин VEGF проводили за допомогою методу рестрикційного аналізу продуктів ПЛР відповідних послідовностей. Обстежено 20 вагітних жінок з патологією системи кровообігу та 20 вагітних жінок контрольної групи з неускладненим соматичним анамнезом. У жінок дослідної групи значна кількість – 15 (75%) мала гіпертонічну хворобу II ступеня, 2 (10%) жінок – тромбоз флебіт, по 1 жінці (5%) – аневризму сонної артерії, поєднання гіпертонічної хвороби II ст. та варикозної хвороби вен, варикозної хвороби вен та бронхіальної астми. У жінок з патологією системи кровообігу виявлено достовірне збільшення генотипу GG ($P > 0.05$) поліморфного локусу 405G/C гена VEGF у порівнянні з здоровими вагітними жінками та тенденцію до зниження генотипу CC (5%) та GC (40%) гена VEGF у порівнянні з здоровими вагітними жінками (15%, та 60% відповідно). Встановлено, що наявність генотипу G/G поліморфного локусу 405G/C гена VEGF підвищує ризик розвитку патології системи кровообігу у 3.67 рази.

АЛЛЕЛЬНЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ ЛОКУСА 405G / C ГЕНА VEGF (ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ) У ЖЕНЩИН С ПАТОЛОГИЕЙ СИСТЕМЫ КРОВООБРАЩЕНИЯ. Целью работы было изучение распределения аллелей и генотипов полиморфного локуса 405G/C гена VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) для разработки информативного маркера, характеризующего процессы включения «ангиогенеза» при различных заболеваниях, а именно у беременных женщин с патологией системы кровообращения. Молекулярно-генетическое исследование полиморфного локуса 405G/C гена фактора роста эндотелия сосудов VEGF проводили с помощью метода рестрикционного анализа продуктов ПЦР соответствующих последовательностей. Обследовано 20 беременных женщин с патологией системы кровообращения и 20 беременных женщин контрольной группы с неосложненным соматическим анамнезом. У женщин опытной группы значительное количество - 15 (75%) была гипертоническая болезнь II степени, 2 (10%) женщин - тромбоз флебит, по 1 женщине (5%) - аневризма сонной артерии, сочетание гипертонической болезни II ст. и варикозной болезни вен, варикозной болезни вен и бронхиальной астмы. У женщин с патологией системы кровообращения выявлено достоверное увеличение генотипа GG ($P > 0.05$) полиморфного локуса 405G/C гена VEGF по сравнению со здоровыми беременными женщинами и тенденцию к снижению генотипа CC (5%) и GC (40%) гена VEGF по сравнению с здоровыми беременными женщинами (15% и 60% соответственно). Установлено, что наличие генотипа G/G полиморфного локуса 405G/C гена VEGF повышает риск развития патологии системы кровообращения в 3.67 раза.

ALLELIC POLYMORPHISM OF 405G/C LOCUS OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) GENE AMONG WOMEN WITH CIRCULATORY SYSTEM PATHOLOGY. The objective was to study the distribution of alleles and genotypes of polymorphic locus 405G/C gene VEGF (vascular endothelial growth factor) to develop an informative marker characterizing processes incorporating "angiogenesis" for various diseases, namely, for pregnant women with pathological circulation. Molecular genetic studies of the polymorphic locus 405G/C gene of vascular endothelial growth factor VEGF was performed using the restriction analysis of PCR products corresponding sequences. Examined 20 pregnant women with pathology of the circulatory system and 20 in the control group of pregnant women with uncomplicated somatic history. In women, a significant amount of experimental group - 15 (75%) had hypertension Grade II, 2 (10%) of women - thrombophlebitis, 1 woman (5%) - carotid artery aneurysm, the combination of hypertension II Art. and varicose veins, varicose veins and bronchial asthma. In women with the pathology of circulatory system revealed a significant increase in the genotype GG ($P > 0.05$) polymorphic locus 405G/C VEGF gene compared with healthy pregnant women and tends to reduce the genotype CC (5%) and GC (40%) of the VEGF gene in comparison with healthy pregnant women (15% and 60% respectively). Found that the presence of the genotype G/G polymorphic locus 405G/C VEGF gene increases the risk of disease of the circulatory system in 3.67 times.

Ключові слова: вагітність, патологія системи кровообігу, фактор росту ендотелію судин

Ключевые слова: беременность, патология системы кровообращения, фактор роста эндотелия сосудов

Key words: pregnancy, pathology of blood circulation, vascular endothelial growth factor

ВСТУП. В Україні стан соматичного здоров'я жінки має негативний вплив на рівень репродукційного здоров'я і у жінок репродукційного віку (15 - 49 років) характеризується сьогодні розповсюдженістю захворювань системи кровообігу, частота яких суттєво вища, чим в економічно розвинутих країнах [1,2].

Саме тому особливе значення мають наукові дослідження, які спрямовані на допологову охорону плода і розробку заходів, що забезпечують народження

здорової дитини. В зв'язку з цим розробка нових критеріїв для виявлення генетичної схильності до впливу техногенних навантажень оточуючого середовища на виникнення патології вагітності має велике медико-соціальне значення [3]. Екстрагенітальні захворювання вагітних відносяться до мультифакторіальної патології, яка є результатом адитивного ефекту чисельних генетичних локусів та різноманітних зовнішньо-середовищних чинників. Властиво, їх сумар-

ний ефект і визначає схильність конкретної людини до певного захворювання [4,5].

Генетична складова схильності до розвитку екстрагенітальної патології визначається типовим спектром експресії генів в одній або декількох тканинах, так званім «генетичним підписом» (gene signature), унікальним для кожного захворювання або реакції на довкілля.

Саме генетично зумовлена біохімічна унікальність визначає нашу стійкість або навпаки, чутливість до різноманітних зовнішніх впливів, схильність до розвитку мультифакторних захворювань та визначення особливостей її клінічного перебігу. Тому вивчення генів-модифікаторів, а саме - поліморфних варіантів гена VEGF (фактор росту ендотелію судин) у жінок з захворюваннями системи кровообігу, клінічний перебіг екстрагенітальної патології, перебіг та ускладнення вагітності є важливим для профілактики перинатальної патології.

Фактор росту ендотелію судин (VEGF; англ. Vascular endothelial growth factor) - сигнальний білок, що виробляється клітинами для стимулювання васкулогенезу (утворення ембріональної судинної системи) і ангиогенезу (зростання нових судин у вже існуючій судинній системі). В даний час відомо кілька різних чинників даного сімейства (яке, у свою чергу, є підкласом досить обширного на сьогоднішній день класу факторів росту). Білки VEGF служать частиною системи, що відповідає за відновлення подачі кисню до тканин в ситуації, коли циркуляція крові недостатня. Концентрація VEGF в сироватці крові підвищена при бронхіальній астмі та знижена при цукровому діабеті. Основні функції VEGF - створення нових кровоносних судин в ембріональному розвитку або після травми, посилення росту м'язів після фізичних вправ, забезпечення колатерального кровообігу (створення нових судин при блокуванні вже наявних) [6].

За останні 10 років розпочато активне вивчення ролі ангиогенезу в розвитку цілого ряду захворювань. Ангиогенез віднесений до типових процесів, що приводить до утворення нових кровоносних судин від існуючої судинної мережі [7,8]. Він необхідний для нормального росту ембріональних і постнатальних тканин, проліферації ендометрію, дозрівання в яєчнику фолікула і жовтого тіла, загоєння ран, утворення колатеральних судин, стимульованих ішемією [8,9].

В даний час розпочато дослідження концентрації факторів росту в сироватці крові при різних захворюваннях. В останнє десятиліття встановлено, що активація ангиогенезу супроводжує цілий ряд захворювань: ревматоїдний артрит, атеросклеротичне ураження судинного русла та ін. [9,10].

Представлені дані вітчизняної та зарубіжної літератури, є підставою для широкого впровадження кількісного визначення VEGF в сироватці крові в практиці з метою розробки інформативного маркера, що характеризує процеси включення «ангиогенезу» при різних захворюваннях, а саме у вагітних жінок з патологією системи кровообігу.

Метою роботи було вивчення розподілу алелей та генотипів поліморфного локусу 405G/C гена VEGF (фактор росту ендотелію судин) у жінок з патологією системи кровообігу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Проведено молекулярно-генетичне дослідження поліморфного локусу 405G/C гена VEGF (фактор росту ендотелію судин) у жінок з патологією системи кровообігу (дослідна група) та у здорових вагітних жінок (контрольна група), які поступали для родорозв'язання у відділ екстрагенітальної патології вагітності Львівської обласної клінічної лікарні за період 2013 року.

Обстежено 20 жінок з патологією системи кровообігу та 20 жінок контрольної групи (з неускладненим соматичним анамнезом). При виконанні роботи використовувались загальноклінічні, медико-статистичні, інструментальні, лабораторні методи обстеження.

У осіб контрольної та дослідної групи проводили виділення та очищення ДНК з лейкоцитів периферійної крові методом висолування [11] для подальших молекулярно-генетичних досліджень. Молекулярно-генетичне дослідження поліморфного локусу 405G/C гена фактору росту ендотелію судин VEGF проводили за допомогою методу рестрикційного аналізу продуктів ПЛР відповідних послідовностей [12].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. Під спостереженням були 20 жінок з патологією системи кровообігу та 20 жінок контрольної групи (з неускладненим соматичним анамнезом). Аналіз отриманих даних показав, що в обох групах жінок майже однаково кількість була мешканками села і міста (по 50% в дослідній групі та відповідно 45% та 55% - в контрольній). При вивченні соціального статусу жінок обох груп встановлено, що серед обстежених жінок по 65% в обох групах були службовками, 35% - домогосподинями в контрольній групі, 30% - в дослідній. Одна жінка в дослідній групі була інвалідом. Таким чином, за соціальним статусом обидві групи жінок були ідентичними.

При вивченні даних розподілу обстежених жінок за віком встановлено, що вік жінок дослідної групи в 50% був у діапазоні 35-45 років, 25% жінок в дослідній групі були віком 30-34 роки, решта 25% - віком 20-29 років. В контрольній більшості жінок мала вік від 20 до 29 років (85%).

Дослідження паритету вагітності обстежених жінок показав, що у 6 (30.0%) жінок з патологією системи кровообігу дана вагітність була першою за рахунком, у 6 (30.0%) з них - другою, у 4 (20.0%) - третьою. По 2 (10.0%) були вагітними у 4 та 5 рази. В той же час в контрольній групі 9 (45%) жінок були вагітними вперше, 7 (35%) - вдруге, по 2 (10%) жінок були вагітними III та IV рази.

Дані соматичного анамнезу показано в таблиці 1.

Аналіз даних таблиці 1 показав, що серед патології системи кровообігу значна кількість жінок - 15 (75%) мала гіпертонічну хворобу II ступеня, 2 (10%) жінок - тромбофлебіт, по 1 жінці (5%) - аневризму сонної артерії, поєднання гіпертонічної хвороби II ст. та варикозної хвороби вен, варикозної хвороби вен та бронхіальної астми.

Результати молекулярно-генетичного дослідження поліморфного локусу 405G/C гена VEGF (фактор росту ендотелію судин) у жінок з патологією системи кровообігу та здоровими вагітними жінками показано в таблиці 2.

Таблиця 1. Особливості соматичного анамнезу у жінок з патологією системи кровообігу

Показники	Кількість	
	абс.	%
Гіпертонічна хвороба II ст.	15	75
Гіпертонічна хвороба II ст. + варикозна хвороба вен	1	5
Аневризма сонної артерії	1	5
Варикозна хвороба вен + бронхіальна астма	1	5
Тромбофлебіт	2	10
Всього	20	100

Таблиця 2. Розподіл генотипів поліморфного локусу 405G/C гена VEGF (фактор росту ендотелію судин) у жінок з патологією системи кровообігу

Група жінок	Кількість	Варіанти гена VEGF		
		CC	GC	GG
Дослідна (n=20)	Абс.	1	8	11
	%	5	40	55
Контрольна (n=20)	Абс.	3	12	5
	%	15	60	25
Статистичні показники	t			-2.0
	P	<0.05	<0.05	>0.05

При вивченні результатів дослідження поліморфного локусу 405G/C гена VEGF (фактор росту ендотелію судин) у жінок з патологією системи кровообігу у порівнянні з здоровими вагітними жінками виявлено достовірне збільшення генотипу GG (P >0.05) поліморфного варіанту 405G/C гена VEGF у порівнянні з здоровими вагітними жінками та тенденцію до зниження генотипу CC (5%) та GC (40%) у порівнянні з здоровими вагітними жінками (15%, та 60% відповідно).

Нами проаналізовано частоту алелів поліморфного локусу 405G/C гена VEGF (фактор росту ендотелію судин) у вагітних жінок з патологією системи кровообігу та здорових вагітних. Серед вагітних жінок з патологією системи кровообігу наявність алелю G гена VEGF спостерігалось у 75.0% випадків, що значно частіше, ніж серед здорових вагітних - 55,0%, проте ця відмінність не досягнула статистично вірогідного значення (p=0,06), що може бути зумовлено величною вибіркою (табл.3).

Обчислення величини відношення шансів показало зростання ризику розвитку патології системи

кровообігу при наявності алелю G поліморфного локусу +405C/G у порівнянні із алелем C (OR=2,45 при ДІ 0.95 – 6.34).

За характером алельного розподілу C/G - поліморфізму промоторної зони гена VEGF 405G/C серед вагітних дослідної групи переважає несприятливий G-алель (75.0% випадків проти 25.0% носіїв C - алеля). У вагітних жінок контрольної групи спостерігався інший розподіл алелів: несуттєво переважав G-алель - 55,0%, проти 45,0% для C-алеля (табл. 3).

Розподіл генотипів локусу C/G гена VEGF 405G/C (фактор росту ендотелію судин) у вагітних жінок з патологією системи кровообігу показано в таблиці 4.

Як видно з наведених у таблиці 4 даних, гомозиготний генотип C/C серед жінок з патологією системи кровообігу (дослідна група) спостерігався з частотою 5.0%, носіїв генотипу C/G було 40.0%, генотипу G/G – 55,0% .

Статистичне опрацювання результатів з обчисленням критеріїв Пірсона χ^2 для визначення частоти генотипів та відносного ризику успадкування показало

Таблиця 3. Розподіл алелів локусу 405C/G гена VEGF (фактор росту ендотелію судин) у вагітних жінок з патологією системи кровообігу

Алелі	Дослідна група	Контрольна група	χ^2	p	OR	
	n = 20	n = 20			знач.	95% CI
АлельС	0.250	0.450	3.52	0.06	0.41	0.16 – 1.05
АлельG	0.750	0.550			2.45	0.95 – 6.34

Таблиця 4. Розподіл генотипів локусу C/G гена VEGF 405G/C (фактор росту ендотелію судин) у вагітних жінок з патологією системи кровообігу

Генотипи	Дослідна група	Контрольна група	χ^2	p	OR	
	n = 20	n = 20			знач.	95% DI
Генотип C/C	0.050	0.150	4.05	0.13	0.30	0.03 – 3.15
Генотип C/G	0.400	0.600			0.44	0.13 – 1.57
Генотип G/G	0.550	0.250			3.67	0.96 – 14.03

зниження частоти генотипу С/С та С/С та підвищення частоти G/G генотипу у дослідній групі, порівняно з контролем, проте відмінності не досягнули статистично вірогідних значень. Більше того, підрахунок коефіцієнту додаткових шансів (oddsratio – OR) показав, що наявність генотипу G/G поліморфного локусу 405G/G гена VEGF підвищує ризик розвитку патології системи кровообігу у 3.67 рази (OR=3.67, DI: 0.96 – 14.03, p=0.1).

ВИСНОВКИ. 1. Встановлено, що в структурі патології системи кровообігу значна кількість вагітних жінок – 15 (75%) мала гіпертонічну хворобу II ступеня, 2 (10%) жінок – тромбофлебіт, по 1 жінці (5%) – анев-

ризму сонної артерії, поєднання гіпертонічної хвороби II ст. та варикозної хвороби вен, варикозної хвороби вен та бронхіальної астми.

2. Встановлено, що наявність генотипу G/G гена VEGF 405G/G підвищує ризик розвитку патології системи кровообігу у 3.67 рази.

ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.

Планується продовження даних досліджень з метою збільшення кількості спостережень для отримання статистично достовірних значень носійства поліморфного локусу 405G/C гена VEGF (фактор росту ендотелію судин), як можливого маркера схильності до розвитку патології системи кровообігу у жінок.

ЛІТЕРАТУРА

1. Запорожан В.М. Сучасні погляди на діагностику гестаційних ускладнень /В. М. Запорожан, В. П. Міщенко, І. В. Руденко //Збірник наукових праць Асоціації акушерів-гінекологів України. - К.:Інтермед. - 2011. - С. 364-369.
2. Подольський В.В. Особливості репродуктивного здоров'я жінок фертильного віку з шкідливими звичками / В. В. Подольський, В. Л. Дронова, Р. С. Теслюк [та інш.] // Збірник наукових праць Асоціації акушерів-гінекологів України. - К.: Інтермед. - 2011. - С. 686-689.
3. Грищенко В.О. Пути решения проблемы перинатальных потерь / О. В. Грищенко, В. В. Бобрицкая, О. Б. Демченко [та інш.] //Збірник наукових праць Асоціації акушерів-гінекологів України. - К.:Інтермед. - 2011. - С. 205-209.
4. Грузинцева Н.А. Пренатальний моніторинг та аналіз раннього неонатального періоду у новонароджених з породженими вадами розвитку і високим ризиком спадкової патології/Н.А.Грузинцева, О.Я.Сенів //Таврический медико-биологический вестник. -2012.-№2, ч. 1. -С.90 -93.
5. Гнатейко О.З. Екогенетичні аспекти патології людини, спричиненої впливом шкідливих факторів зовнішнього середовища./ О.З. Гнатейко, Н.С.Лук'яненко - "Здоровье ребенка". – 2007. - № 6 (9). – С. 82 – 87.
6. Захарова Н.Б., Дурнов Д.А., Михайлов В.Ю., Понукалин А.Н., Никитина В.В., Занкина О.В., Леонова М.Л. Диагностическое значение исследования фактора роста эндотелия сосудов в сыворотке крови // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 11 (часть 1).стр.215-220;
7. Молекулярно-генетические нарушения в гене VHL и метилирование некоторых генов – супрессоров в спорадических светлоклеточных карциномах почки / Д.С. Михайленко, М.В. Григорьева, В.В. Землякова и др. // Онкоурология. – 2010. – №2. – С. 32–36.
8. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е. С. Биологические маркеры опухолей в клинике – достижения, проблемы, перспективы // Молекулярная медицина. – 2008. – №3. – С. 48–55.
9. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Любимова Н.В. Биологические маркеры опухолей: методические аспекты и клиническое применение // Вестник Московского онкологического общества. – 2007. – №1. – С. 5–7.
10. Amo Y., Masuzawa M., Hamada Y., Katsuoka K. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor-D in angiosarcoma patients // British Journal of Dermatology, 150 (1), 2004. — P. 160–161.
11. Пат. 32044 UA, МПК G01N33/49 (2006.01) Спосіб виділення ДНК з лейкоцитів периферійної крові / Махук Г. В., Заставна Д.В., Тиркус М. Я. [та ін.], заявник ДУ «Інститут спадкової патології АМНУ». – № u200801896; заявл. 14.02.2008; опубл. 25.04.2008, Бюл. №8.
12. Mc. Pherson M. J. PCR a Practical Approach. Oxford University press / Mc M. J. Pherson, P. Quirke, G. R. Taylor. – New York: Oxford University press, 1993. – 253 p. 22
13. Association of the VEGF gene polymorphism with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients / M. Buraczynska, P. Ksiazek, I. Baranowicz-Gaszczyk and L. Jozwiak // Nephrology Dialysis Transplantation. – Vol.22, №3. – P. 827-832.

Отримано 27.12.13