

ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПОВ ГЕНОВ VEGF И PAI-1 НА РАЗВИТИЕ АНГИОПАТИЙ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Сахарный диабет 2 типа (СД2) является гетерогенным заболеванием, что усложняет понимание механизмов развития сосудистых осложнений. Наличие различных компонентов метаболического синдрома и носительство определенных генотипов предрасполагает к развитию ангиопатий. Известно более 35 генов, определяющих риски развития и прогрессирования ССЗ, наиболее значимые – PAI-1 (ингибитор активатора плазминогена-1) и VEGF (эндотелиальный фактор роста сосудов), поскольку они ассоциированы с кардиоваскулярной патологией, хронической почечной недостаточностью (ХПН), а также с ожирением. Целью исследования было проанализировать распределения генотипов генов VEGF и PAI-1 у пациентов с различными компонентами МС в зависимости от наличия или отсутствия у них сосудистых осложнений (ишемической болезни сердца, нарушения функции почек). По результатам исследования установлено, генотип C/C гена VEGF ассоциирован с отсутствием ИБС, генотип G/G гена VEGF препятствует прогрессированию нарушения функции почек, генотип 55 гена PAI-1 ассоциирован с ИБС у пациентов с СД2.

Ключевые слова: сахарный диабет, ишемическая болезнь сердца, нарушение функции почек, VEGF, PAI-1.

О. Н. Shyshko

IMPACT OF GENOTYPES OF VEGF AND PAI-1 GENES ON DEVELOPMENT OF ANGIOPATHIES IN PATIENTS WITH DIFFERENT ELEMENTS OF METABOLIC SYNDROME

Heterogeneity of type 2 diabetes makes it hard to understand mechanisms that predispose to the development of vascular complications. Elements of metabolic syndrome are the cause of vascular complications in these patients as well as carrier status of certain genotype of VEGF and PAI-1 genes. More than 35 genes are known to predispose to development and progression of cardiovascular diseases (CVD) and major are PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1) and VEGF (vascular endothelial growth factor) as far as these genes are associated with CVD, chronic kidney disease and obesity. The aim of our study was to analyze distribution of genotypes of VEGF and PAI-1 genes in patients with different components of metabolic syndrome according to presence of vascular complications (i. e. ischemic heart disease (IHD) and impaired renal function). Based on the research findings it was revealed that genotype C/C VEGF gene is associated with absence of IHD, genotype G/G VEGF gene prevents from impaired renal function and genotype 55 PAI-1 gene is associated with IHD in patients with T2D.

Key words: diabetes, ischemic heart disease, impaired renal function, VEGF, PAI-1.

Сахарный диабет 2 типа (СД2) является гетерогенным заболеванием, что усложняет понимание механизмов развития сосудистых осложнений. Десятилетия посвящены изучению данного вопроса.

Определено, что для снижения риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) необходимо отказаться от курения, соблюдать рациональную диету, заниматься физическими упражнениями, предупреждать увели-

□ Оригинальные научные публикации

чение массы тела, поддерживать нормальный уровень артериального давления и уровень липопротеидов низкой плотности, а для пациентов с СД2 – стремиться к уровню HbA1c < 7%. Также результаты многих исследований указывают на связь между развитием ССЗ и уровнями микроальбуминурии (МАУ), С-реактивного белка, адипонектина, липопротеин-ассоциированной фосфолипазы-A2, толщиной интима-медиа каротидной артерии, наличием хронической болезни почек [1]. О том, что проблема требует дальнейшего изучения, свидетельствуют и результаты крупных исследований: NHANES III (the Third National Health and Nutrition Examination Survey), PHS (Physicians' Health Study) и ARIC (the Atherosclerosis Risk in Communities study) по результатам которых определили, что не все пациенты с диабетом имеют равные риски развития инфаркта миокарда (ИМ) [4–6]. Исследование NHANES III показало, что распространенность ССЗ у пациентов с диабетом, но без метаболического синдрома такая же, как и у пациентов либо без диабета, либо без метаболического синдрома [6]. Закономерным является вопрос, наличие каких дополнительных факторов определяет вероятность развития сосудистых осложнений? Можно предположить, что некоторую ясность вносит исследование генотипа определенных генов, участвующих в разных этапах патологических процессов.

Известно более 35 генов, определяющих риски развития и прогрессирования ССЗ. Наиболее интересными определяют два гена – PAI-1 (ингибитор активатора плазминогена-1) и VEGF (эндотелиальный фактор роста сосудов), поскольку носительство определенного генотипа ассоциировано с кардиоваскулярной патологией, хронической болезнью почек (ХБП), а также с таким компонентом МС как ожирение.

VEGF стимулирует неоангиогенез и способствует выживанию незрелых (сосудистая поддержка), также стимулирует проницаемость мелких кровеносных сосудов. Повышенная проницаемость ведет к «подтеканию» белков плазмы через стенку сосуда и формированию экстравазального фибринового геля, который представляет собой подходящую среду для роста клеток эндотелия. Незрелые кровеносные сосуды существуют преимущественно на этапе развития, а у взрослых индивидуумов – лишь в некоторых ситуациях, напри-

мер, в процессе заживления ран или при заболеваниях, характеризующихся патологическим ангиогенезом, таких как онкологические или ишемические состояния [2]. Таким образом, полиморфизм гена VEGF определяет состояние сосудистого русла и его потенциал с позиций вероятности развития ангиопатий.

Выбор второго объекта исследования – полиморфизма гена PAI-1 обусловлено тем, что ген кодирует такой важный компонент как ингибитор тканевого активатора плазминогена, который усиливает тромбообразование. Также доказано, что избыточная экспрессия PAI-1 в области сосудов приводит к образованию нестабильных атероматозных бляшек и развитию острого коронарного синдрома [10]. В исследованиях определено повышенное содержание PAI-1 при таких состояниях как инфаркт миокарда, стабильная или нестабильная стенокардия напряжения, эндотелиальная дисфункция, ожирение, МС и СД2 [8].

Цель исследования: проанализировать распределение генотипов генов VEGF и PAI-1 у пациентов с различными компонентами МС в зависимости от наличия или отсутствия у них сосудистых осложнений (ишемической болезни сердца, нарушение функции почек).

Материалы и методы

Для определения генотипов, предрасполагающих и защищающих от развития макро- и микроангиопатий проводили анализ ДНК 76 пациентов. В зависимости от наличия компонентов МС выделены 7 групп:

Группа 1 – 8 пациентов с диагнозом нарушением гликемии натощак (НГН);

Группа 2 – 20 пациентов с диагнозом нарушение толерантности к глюкозе (НТГ);

Группа 3 – 9 пациентов с диагнозом СД2;

Группа 4 – 15 пациентов с диагнозом СД2 в сочетании с ишемической болезнью сердца (ИБС);

Группа 5 – 9 пациентов с избыточной массой тела (ИМТ 24,9–29,9 кг/м²);

Группа 6 – 5 пациентов с ожирением (ИМТ 29,9–34,9 кг/м²);

Группа 7 – 10 практически здоровый человек.

Характеристика групп исследования представлена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика групп исследования

| Показатели | Группа 1 | Группа 2 | Группа 3 | Группа 4 | Группа 5 | Группа 6 | Группа 7 |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Возраст, лет | 47 (44; 52) | 49 (41; 52) | 48 (44; 50) | 56 (52; 58) | 42 (33; 45) | 50 (43; 54) | 49 (42; 53) |
| HbA1c, % | 5,50 (5,37; 6,00) | 5,70 (5,48; 5,90) | 6,97 (6,80; 7,13) | 6,55 (6,55; 6,55) | 5,40 (5,10; 5,70) | 5,27 (5,10; 5,30) | 5,17 (5,05; 5,23) |
| ИМТ, кг/м ² | 25,71 (22,77; 29,14) | 27,34 (25,94; 30,97) | 31,87 (28,26; 34,52) | 28,80 (26,35; 33,09) | 27,77 (27,48; 28,41) | 31,25 (30,85; 33,46) | 23,21 (22,25; 24,31) |
| Триглицериды, ммоль/л | 1,70 (1,56; 2,09) | 1,90 (1,64; 2,23) | 1,69 (0,99; 2,16) | 1,73 (1,19; 2,15) | 1,99 (1,16; 2,91) | 2,07 (1,33; 2,27) | 1,92 (1,37; 2,32) |
| ХС ЛПВП, ммоль/л | 4,81 (4,71; 4,96) | 4,82 (4,15; 6,42) | 3,77 (2,92; 5,50) | 2,35 (1,93; 3,83) | 2,62 (2,16; 3,16) | 4,08 (3,08; 4,08) | 4,40 (3,89; 5,47) |
| ХС ЛПНП, ммоль/л | 0,81 (0,71; 0,95) | 0,86 (0,75; 1,02) | 0,77 (0,45; 1,05) | 0,79 (0,54; 0,98) | 0,90 (0,53; 1,32) | 0,94 (0,60; 1,03) | 0,87 (0,62; 1,06) |
| СКФ, мл/мин/1,73 м ² | 101 (89; 132) | 130 (94; 146) | 115 (106; 138) | 94 (83; 96) | 120 (111; 137) | 112 (107; 156) | 100 (93; 107) |

Биологическим материалом для анализа полиморфизма генов VEGF, PAI являлась ДНК, выделенная из сухих пятен крови. Исследование проводилось на базе Института генетики и цитологии НАН Беларуси.

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) применяли систему детекции продуктов ПЦР в реальном времени. В качестве реактивов использовали: 2X буфер Master Mix для qPCR (thermo scientific); праймеры, фланкирующие участок ДНК, содержащий анализируемый полиморфизм; аллель-специфичные TaqMan зонды; бидистиллированная деионизированная вода.

Принадлежность образца к определенному генотипу определяли по флуоресценции красителей в определенном спектре. В результате амплификации флуо-

ресценция красителей возрастает пропорционально росту количества копий участка исследуемого гена.

Расчет скорости клубочковой фильтрации (СКФ) проводили по формуле Кокрофта-Голта (мл/мин/1,73 м²). По уровню СКФ проводили определение функционального состояния почек.

Результаты и обсуждение

Результаты распределения генотипов и аллелей гена VEGF в группах исследования представлены в таблице 2.

Согласно полученным результатам генотип G/C гена VEGF ассоциирован с ИБС у пациентов с СД2, выявлен у 11 из 15 пациентов в группе 4, что составило

Таблица 2. Частота генотипов и аллелей гена VEGF (n/%)

| Генотип, аллели | Группа 1 (n = 8) | Группа 2 (n = 20) | Группа 3 (n = 9) | Группа 4 (n = 15) | Группа 5 (n = 9) | Группа 6 (n = 5) | Группа 7 (n = 10) |
|-----------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|
| G/G | 1 (12,50) | 11 (55,00) | 7 (77,78) | 4 (26,67) | 6 (66,70) | 2 (40,00) | 8 (70,00) |
| G/C | 4 (50,00) | 5 (25,00) | 1 (11,11) | 11 (73,33) | 3 (33,33) | 3 (60,00) | 2 (30,00) |
| C/C | 3 (37,50) | 5 (25,00) | 1 (11,11) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) | 0 (0,00) |
| G | 8 | 26 | 15 | 19 | 15 | 7 | 18 |
| C | 10 | 14 | 3 | 11 | 3 | 3 | 2 |

73,33%, по сравнению с группой контроля, где гетерозиготный вариант зарегистрирован у 3 из 10 пациентов (30%) ($\chi^2 = 4,87$, $p = 0,0277$). Petrovic D. и соавт. в своем исследовании определяли риск развития инфаркта миокарда (ИМ) у пациентов с СД2. Согласно их результатам генотип C/C ассоциирован с развитием ИМ у пациентов с СД2, однако в свое исследование авторы включали пациентов с длительностью диабета более 10 лет [9]. В нашем же исследовании наличие ИМ в анамнезе являлось критерием исключения, поэтому можно предположить, что полиморфизм G/C гена VEGF ассоциирован с защитными функциями у пациентов с СД2 и сопутствующей ИБС в отношении развития ИМ. Moradzadegan и соавт. выявили, что аллель G гена VEGF может являться независимым фактором риска развития ИБС у пациентов с СД2 [7]. Также нами определено, что аллель G реже встречается у пациентов с НГН, по сравнению с практически здоровыми лицами ($\chi^2 = 7,11$, $p = 0,0085$).

Важно было определить, различается ли распределение генотипов у пациентов с ИБС и без. Результаты представлены на диаграмме 1.

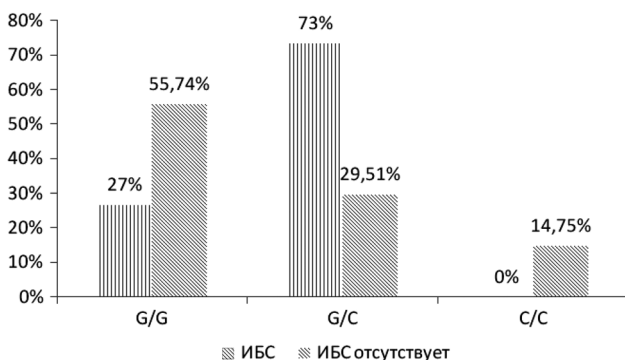


Диаграмма 1. Распределение генотипов гена VEGF у пациентов с учетом наличия и отсутствия ИБС

При объединении пациентов различных групп исследования в группы с ИБС (15 пациентов) и отсутствием ИБС (61 пациент) определили, что у носителей генотипа G/G реже была диагностирована ИБС. Так, данный генотип обнаружен у 34 пациентов из 64 (55,74%), не страдающих ИБС, в то время как у пациентов с ИБС данный генотип зарегистрирован у 4 из 15 (26,67%). Данные различия не являются статистически значимыми, однако имеют клиническое значение и предполагают расширение групп исследования для уточнения результатов. Генотип C/C не зарегистрирован у пациентов с ИБС (0%), и выявлен у 9 пациентов без ИБС (14,75%). Хотя согласно литературным данным генотип C/C ассоциирован с ИБС, однако исследования проводили среди пациентов, перенесших сосудистую катастрофу, в частности, инфаркт миокарда. В то время как в нашем исследовании включали пациентов с ИБС, но ИМ в анамнезе являлся критерием исключения.

Наиболее часто полиморфизм VEGF рассматривается в отношении развития нефропатии. В нашем исследовании у 62 пациентов СКФ соответствовала нормальным значениям и составила 118,50 [99,00; 137,00] мл/мин/1,73 м². У 14 пациентов СКФ была снижена – 81,00 [69,00; 84,00] мл/мин/1,73 м². Распределение пациентов по СКФ в зависимости от генотипа представлено на диаграмме 2.

Как видно из представленных результатов, генотип G/G зарегистрирован у 34 пациентов с нормальной СКФ (89,47%) из 38 с данным полиморфным вариантом, и только у 4 из 14 со сниженной СКФ (10,53%) ($\chi^2 = 16,32$, $p = 0,0006$). Таким образом, можно предположить, что полиморфизма G/G гена VEGF обеспечивает защиту в отношении развития и прогрессирования снижения СКФ. Генотип C/C, как и аллель C, чаще встречаются у пациентов с терминальной ста-

Оригинальные научные публикации

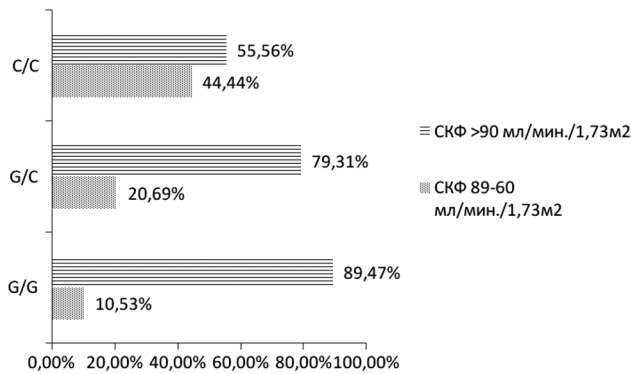


Диаграмма 2. Распределение пациентов по СКФ в зависимости от генотипа VEGF

дией ХБП [1]. В отношении полиморфизмов G/C и C/C статистически значимой разницы между группами не выявлено.

Частота встречаемости аллели G в группе пациентов с нормальными значениями СКФ составила 91,

Таблица 3. Частота генотипов и аллелей гена PAI-1 в группах исследования (n/%)

| Генотип, аллели | Группа 1 (n = 8) | Группа 2 (n = 20) | Группа 3 (n = 9) | Группа 4 (n = 15) | Группа 5 (n = 9) | Группа 6 (n = 5) | Группа 7 (n = 10) |
|-----------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|
| 44 | 3 (37,50) | 9 (45,00) | 4 (44,44) | 3 (20,00) | 2 (22,22) | 2 (40,00) | 3 (30,00) |
| 45 | 3 (37,50) | 9 (45,00) | 4 (44,44) | 5 (33,33) | 7 (77,78) | 1 (20,00) | 4 (40,00) |
| 55 | 2 (25,00) | 2 (10,00) | 1 (11,11) | 7 (46,67) | 0 (0,00) | 2 (40,00) | 3 (30,00) |
| 4 | 9 | 27 | 12 | 11 | 11 | 5 | 10 |
| 5 | 7 | 13 | 6 | 19 | 7 | 5 | 10 |

* Различия статистически значимы, $P < 0,05$.

что составило 46,67% и у 10 из 61 среди пациентов без ИБС (16,39%) ($\chi^2 = 4,73$, $p = 0,0299$). По результатам генотипирования определено, что аллель 4 ассоциирован с отсутствием ИБС ($\chi^2 = 7,34$, $p = 0,0076$). Данная аллель зарегистрирована в 74 случаях при отсутствии ИБС и в 11 – при наличии ИБС, аллель 5 зарегистрирована в 38 случаях при отсутствии ИБС и в 19 – при наличии заболевания. Согласно литературным данным 4G аллель обладает более высокой транскрипционной активностью, по сравнению с 5G аллелью, а у гомозигот 4G/4G более высокий уровень концентрации PAI-1 в плазме.

Анализ распределения генотипов гена PAI-1 в зависимости СКФ не выявил статистически значимой

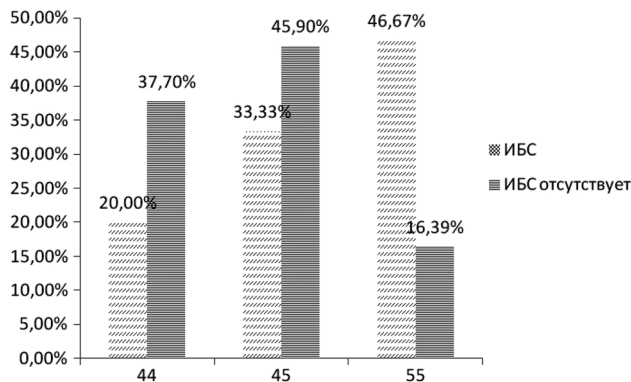


Диаграмма 3. Распределение генотипов гена PAI-1 с учетом наличия и отсутствия ИБС

аллели С – 33. У пациентов со сниженной функцией СКФ распределение было следующим: 14 аллелей G и 14 аллелей С. Результаты анализа показали, что при нормальной фильтрационной функции почек статистически значимо чаще встречается аллель G ($\chi^2 = 4,81$, $p = 0,0287$).

Результаты анализа распределения генотипов гена PAI-1 в группах исследования представлены в таблице 3.

Согласно представленным результатам генотип 55 PAI-1 чаще зарегистрирован у пациентов с СД2 в сочетании с ИБС – у 7 из 15 (46,67%), но различия с другими группами исследования не являлись статистически значимыми.

Далее изучили распределение генотипов гена PAI-1 с учетом наличия или отсутствия ИБС. Результаты представлены на диаграмме 3.

Для пациентов с СД2 в сочетании с ИБС наиболее характерно наличие генотипа 55 гена PAI-1. Данный генотип зарегистрирован у 7 из 15 пациентов с ИБС,

разница между группами исследования, что согласуется с литературными данными об отсутствии связи между 4G/5G полиморфизмом гена PAI-1 и развитием нефропатии. Также в результате исследования не обнаружена статистически значимая разница в распределении генотипов в зависимости от уровня МАУ.

Выводы

1. Согласно полученным результатам генотип C/C гена VEGF чаще зарегистрирован у пациентов без ИБС.
2. Генотип G/G гена VEGF препятствует снижению функции почек.
3. Аллель G гена VEGF ассоциирован с защитными функциями в отношении снижения функции почек.
4. Генотип 55 гена PAI-1 ассоциирован с ИБС у пациентов с СД2.
5. Аллель 4G ассоциирована с отсутствием ИБС.

Литература

1. Doi, K., Noiri E., Nakao A. et al. Functional polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene are associated with development of end-stage renal disease in males // J. Am. Soc. Nephrol. – 2006. – Vol. 17(3). – P. 823–30.
2. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress // Endocrine Reviews. – 2004. – Vol. 25. – P. 581–611.
3. LaDale, St. Clair, Christie M. Ballantyne. Biological Surrogates for Enhancing Cardiovascular Risk Prediction in Type 2 Diabetes Mellitus // The American Journal of Cardiology. – 2007. – Vol. 99 (4A).

4. Lee, C. D., Folsom A. R., Pankow J. S., Brancati F. L. Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. Cardiovascular events in diabetic and nondiabetic adults with or without history of myocardial infarction // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109. – P. 855–860.

5. Lotufo, P. A., Gaziano J. M., Chae C. U. et al. Diabetes and all-cause and coronary heart disease mortality among US male physicians // *Arch Intern Med*. – 2001. – Vol. 161. – P. 242–247.

6. Ninomiya, J. K., L'Italien G., Criqui M. H. et al. Association of the metabolic syndrome with history of myocardial infarction and stroke in the Third National Health and Nutrition Examination Survey // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109. – P. 42–46.

7. Moradzadegan, A., Vaisi-Raygani A., Nikzamir A., Rahimi Z. J. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion (I/D) (rs4646994) and Vegf polymorphism (+405G/C; rs2010963)

Оригинальные научные публикации

in type II diabetic patients: Association with the risk of coronary artery disease // *J. Renin. Angiotensin Aldosterone Syst.* – 2015. – Vol. 16(3). – P. 672–80.

8. Pandolfi, A., Cetrullo D., Polishuck R. et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 is increased in the arterial wall of type II diabetic subjects // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2001. – Vol. 21, № 8. – P. 1378–1382.

9. Petrovic, D., Verhovc R., Globocnik Petrovic M. et al. Association of vascular endothelial growth factor gene polymorphism with myocardial infarction in patients with type 2 diabetes // 2007. – Vol. 107 (4). – P. 291–295.

10. Schneider, D. J., Sobel B. E. PAI-1 and diabetes: a journey from the bench to the bedside // *Diabetes Care*. – 2012. – Vol. 35, № 10. – P. 1961–1967.

Поступила 12.02.2016 г.