

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *VEGFA* И ИШЕМИЧЕСКАЯ БОЛЕЗНЬ СЕРДЦА: ПОЛОВОЙ ДИМОРФИЗМ В АССОЦИАЦИЯХ ГЕНА С ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К БОЛЕЗНИ

© 2020 г. М. В. Медведева^{1, *}, М. А. Солодилова¹, М. А. Быканова^{1, 2},
Н. В. Иванова¹, А. В. Полоников^{1, 2, **}

¹Курский государственный медицинский университет, Курск, 305041 Россия

²Курский государственный медицинский университет, Научно-исследовательский институт
генетической и молекулярной эпидемиологии, Курск, 305041 Россия

*e-mail: medvedevamariakgvm@yandex.ru

**e-mail: polonikov@rambler.ru

Поступила в редакцию 02.02.2020 г.

После доработки 10.03.2020 г.

Принята к публикации 29.03.2020 г.

Полиморфные варианты гена сосудистого эндотелиального фактора роста А (*VEGFA*) представляют собой привлекательные объекты для генетических исследований ишемической болезни сердца (ИБС) в связи с вовлеченностью гена в регуляцию ангиогенеза, миграции и пролиферации эндотелиальных клеток. Изучены ассоциации четырех SNPs rs3025039, rs833061, rs3025000 и rs833068 гена *VEGFA* с риском развития ИБС в Центральной России. Генотипирование SNPs проводилось на генетическом анализаторе MassARRAY Analyzer 4. Установлено, что генотипы С/Т-Т/Т rs3025039, Т/С-Т/Т rs833061 и Т/Т rs3025000 ассоциированы с развитием ИБС только у мужчин ($P \leq 0.05$). Гаплотипы Н3 (rs833061-Т-rs833068-А-rs3025000-Т-rs3025039-С) и Н2 (rs833061-Т-rs833068-Г-rs3025000-С-rs3025039-С) были ассоциированы с пониженным риском развития ИБС у мужчин, $P = 0.01$ и 0.05 соответственно. Напротив, у женщин гаплотип Н4 (rs833061-С-rs833068-Г-rs3025000-С-rs3025039-Т) был ассоциирован с повышенным риском развития ИБС ($P = 0.01$). Анализ неравновесия по сцеплению между SNPs, стратифицированный по полу, позволил установить, что аллель rs833061-Т находится в отрицательном неравновесии по сцеплению (LD) с аллелями rs833068-Г и rs3025000-С у мужчин и положительном LD у женщин ($P = 2.0 \times 10^{-16}$), тогда как SNP rs3025039 находился в слабом положительном LD с SNP rs3025039 у мужчин. Анализ базы данных miRBase позволил установить, что аллель rs3025039-Т образует сайт связывания для микроРНК hsa-miR-591, которая может подавлять трансляцию гена *VEGFA* путем блокирования и деградации ДНК-транскриптов. Анализ геномно-транскриптомных данных портала GTEx показал, что гаплотипы, ассоциированные с ИБС, связаны с изменением экспрессии гена *VEGFA*. Впервые были установлены пол-специфические особенности неравновесия по сцеплению между SNPs гена *VEGFA* и их взаимосвязь с предрасположенностью к ИБС вызывает интерес и требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, генетическая предрасположенность, половой диморфизм, ген сосудистого эндотелиального фактора роста-А (*VEGFA*), однонуклеотидный полиморфизм (SNP).

DOI: 10.31857/S0016675820120103

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) представляет собой заболевание миокарда, которое выражается появлением участков ишемии, развивающейся, как правило, на фоне атеросклероза коронарных артерий и сопровождающейся нарушением систолической и/или диастолической функции сердца [1]. Согласно данным Росстата за период с 2000 по 2016 г. заболеваемость болезнями системы кровообращения в России возросла почти в 2 раза – с 2483 до 4649 тыс. При этом на долю ИБС приходится до 95% всех случаев смертельных ис-

ходов от данной категории болезней [2, 3]. Среди причин, этиологически связанных с развитием ИБС, выделяют неправильное питание, низкую физическую активность, курение, а также генетические факторы [4]. В связи с высокой социальной значимостью ИБС особую важность приобретает ее первичная профилактика, направленная на раннее (доклиническое) выявление заболевания, в том числе с использованием генетического тестирования предрасположенности к болезни в группах высокого риска.

Известно, что ИБС имеет мультифакториальную природу со значительным вкладом генетических факторов в ее развитие [5]. Многочисленными генетическими исследованиями был установлен широкий спектр полиморфных вариантов генов, ассоциированных с развитием ИБС, включающих гены системы свертывания крови, липидного обмена, провоспалительных цитокинов, сосудистого гомеостаза, факторов адгезии и эндотелиальной дисфункции [6–8]. Несмотря на существенный прогресс в открытии генов предрасположенности к коронарному атеросклерозу, еще рано говорить о полном понимании молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе развития заболевания.

Одним из патогенетически значимых для формирования ИБС групп кандидатных генов являются гены семейства сосудистых эндотелиальных факторов роста [9–11]. Данное семейство включает в себя такие факторы роста сосудов как *VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC*, *VEGFD*, *VEGFE* и плацентарный фактор роста (*PLGF*). Наиболее привлекательным объектом для генетических исследований этиологии ИБС стал ген *VEGFA* (сосудистый эндотелиальный фактор роста А), вовлеченный не только в васкулогенез и ангиогенез, но и в регуляцию миграции, пролиферации и дифференцировки клеток эндотелия сосудов [12, 13]. *VEGFA* экспрессируется на поверхности эндотелиоцитов в растущих коллатеральных артериях и усиление его биосинтеза сопровождается повышенной митотической активностью эндотелиальных клеток [11].

Недавно проведенный метаанализ 29 генетико-ассоциативных исследований [13] показал, что отдельные SNPs гена *VEGFA* связаны с развитием ИБС в различных расовых этнических группах. В частности, генотипы А/С rs699947, С/С rs2010963 и Т/Т rs3025039 были ассоциированы с повышенным риском развития ИБС в азиатских популяциях. Более ранний метаанализ [12], основанный на 10 исследованиях, позволил выявить аналогичные результаты в отношении полиморфных вариантов rs699947 и rs3025039 гена *VEGFA*: были ассоциированы с повышенным риском развития ИБС. Еще одним недавно проведенным метаанализом, включающим 24 исследования [14], было установлено, что генотип А/А rs699947 ассоциирован с риском развития ИБС в европейской и азиатской популяциях, в то время как аллель rs1570360-А был ассоциирован с болезнью только у европеоидов, а аллель rs3025039-Т – у азиатов. Также показано, что аллель rs3025039-Т коррелирует с количеством пораженных коронарных артерий, а аллель rs699947-А – с недостатком коллатерального кровоснабжения миокарда у больных ИБС [14]. С одной стороны, обнаружена значительная вариабельность результатов исследований в различных популяциях мира, с другой – недостаточно изученным остается вклад полиморфных вариан-

тов гена *VEGFA* в развитие ИБС в российских популяциях, что обосновывает необходимость выполнения такого исследования в России.

Цель настоящего исследования – изучение ассоциаций четырех частых полиморфных вариантов rs3025039, rs833061, rs3025000 и rs833068 гена сосудистого эндотелиального фактора роста А с риском развития ишемической болезни сердца у жителей Центральной России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Протокол исследования был рассмотрен и утвержден на заседании регионального этического комитета при Курском государственном медицинском университете (КГМУ). От всех пациентов было получено информированное согласие. Материалом для исследования послужили образцы ДНК 1214 неродственных жителей Центральной России славянского происхождения (преимущественно жителей Курской области), являющиеся коллекцией Научно-исследовательского института генетической и молекулярной эпидемиологии КГМУ. Группа больных ИБС включала 555 человек (260 женщин, 47% и 295 мужчин, 53%). Контрольная группа (средний возраст 60.2 ± 7.4 года) была сопоставима с группой больных (средний возраст 59.3 ± 8.6 года) по возрасту ($P > 0.05$) и включала 659 здоровых добровольцев (324 женщины, 49% и 335 мужчин, 51%).

Диагноз ИБС устанавливался согласно критериям ВОЗ квалифицированными врачами-кардиологами. Обследование пациентов проводилось на базах лечебно-профилактических учреждений г. Курска, а именно в кардиологическом отделении, отделении сосудистой хирургии и рентгенохирургических методов диагностики областной клинической больницы, кардиологическом отделении больницы скорой медицинской помощи в рамках выполнения генетико-эпидемиологических исследований сердечно-сосудистых заболеваний в Курской области в период с 2011 по 2015 г. [15–19].

Выделение ДНК проводили из цельной венозной крови пациентов стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции и преципитации концентрированным этанолом. Для генотипирования с использованием описанных ранее критериев [20] было отобрано четыре полиморфных варианта гена *VEGFA*, из которых один SNP rs833061 (chr6:43769749) локализован на расстоянии 2 тпн от сайта инициации транскрипции, два SNPs rs833068 (chr6:43774790) и rs3025000 (chr6:43778432) – в интронах и один SNP rs3025039 (chr6:43784799) – в 3'-нетранслируемой области гена. В частности, при отборе SNPs учитывали гаплотипическую структуру гена (отбор tagSNPs, $r^2 \geq 0.8$), частоту минорного аллеля

(MAF > 5%), функциональность SNP, а также информацию о ранее выявленных ассоциациях SNPs с ИБС. Генотипирование SNPs проводилось методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с дискриминацией аллелей с помощью TaqMan-зондов на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США) с использованием коммерческих наборов Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколами производителя. Контроль качества результатов генотипирования осуществляли путем случайного “слепого” отбора 96 пациентов и повторного генотипирования отобранных образцов ДНК по исследуемым полиморфным вариантам гена *VEGFA* методом ПЦР-РВ (по 1-й ПЦР-плашке для каждого SNP). Сопоставление данных первичного и “контрольного” генотипирования показало 100%-ную воспроизводимость результатов.

Статистическую обработку осуществляли с помощью программы SNPstats [21]. Учитывая половой диморфизм ИБС, ассоциации SNPs гена *VEGFA* с риском развития болезни оценивали методом множественной логистической регрессии отдельно у мужчин и женщин посредством расчета отношения шансов (OR) и границ доверительного интервала (95% CI) с поправкой на возраст. Тестировались следующие генетические модели влияния SNPs на риск развития ИБС: кодоминирование, доминирование, рецессивная модель, сверхдоминирование и log-аддитивная модель. Наилучшую модель отбирали по наименьшему показателю AIC. Для выяснения природы выявленных ассоциаций между полиморфными вариантами гена *VEGFA* и риском развития ИБС проводили функциональное аннотирование SNPs с помощью различных биоинформатических инструментов и интернет-ресурсов. Для оценки влияния SNPs на уровень экспрессии гена *VEGFA* в различных тканях нами использовались базы данных: eQTLGen (<https://www.eqtlgen.org/cis-eqtls.html>), GTEx portal (<https://www.gtexportal.org>) и QTLbase (<http://mulinlab.tmu.edu.cn/qtlbase/index.html>). Для оценки связывающей способности SNP с микроРНК использовали базу данных miRBase (<http://www.mirbase.org>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение частот генотипов в обеих группах — больных ИБС и относительно здоровых индивидов соответствовало равновесию Харди–Вайнберга (РХВ) кроме SNP rs3025039, для которого установлено статистически значимое отклонение от РХВ вследствие более высокого уровня наблюдаемой, чем ожидаемой, гетерозиготности как в группе больных, так и в группе здоровых пациентов ($P < 0.01$). Частоты минорных аллелей (MAF) rs3025039-Т, rs833061-С, rs3025000-Т и rs833068-А в исследованной популяции жителей Центральной России были сопоставимы с MAF в других

европейских популяциях (данные проекта Нар-Map): 0.13, 0.49, 0.26, 0.27 и 0.12, 0.50, 0.29, 0.31 соответственно. В табл. 1 представлены результаты анализа полиморфных вариантов гена *VEGFA* с риском развития ИБС отдельно у мужчин и женщин. Генотипы С/Т-Т/Т rs3025039 были ассоциированы с повышенным риском развития ИБС у мужчин (доминантный эффект SNP, $P = 0.049$), тогда как у женщин ассоциация генотипов данного SNP не наблюдалась. Генотипы Т/С-С/С rs833061 были ассоциированы с повышенным риском развития ИБС у мужчин на пограничном уровне значимости (доминантный эффект SNP, $P = 0.05$). Генотип Т/Т rs3025000 был ассоциирован с пониженным риском развития ИБС также у мужчин (рецессивный эффект SNP, $P = 0.048$). У женщин статистически значимых ассоциаций генотипов SNPs rs833061 и rs3025000 с развитием болезни не установлено.

В табл. 2 представлены частоты гаплотипов и их сравнение между группами больных ИБС и здоровых индивидов, стратифицированных по полу. Как у мужчин, так и у женщин было выявлено семь гаплотипов с частотой не менее 1%. Наиболее частыми (>17%) гаплотипами были H1, H2 и H3. В группе мужчин установлено статистически значимое различие в распределении частот гаплотипов между больными ИБС и контролем ($P_H = 0.04$). Гаплотипы H2 и H3 встречались чаще среди здоровых мужчин, чем среди больных ИБС: $P = 0.05$ и 0.01 соответственно.

Среди женщин, несмотря на то что не было выявлено статистически значимых различий в распределении частот гаплотипов между группами больных ИБС и здоровых ($P_H = 0.08$), наблюдались различия в частотах отдельных гаплотипов, а именно H2 и суммарной частоты редких (<1%) гаплотипов: $P = 0.01$ и 0.02 соответственно. Данные гаплотипы были ассоциированы с повышенным риском развития ИБС у женщин.

В табл. 3 представлены показатели неравновесия по сцеплению (LD, linkage disequilibrium) между полиморфными вариантами гена *VEGFA* в объединенных группах больных ИБС и здоровых индивидов, но разделенных по полу. Как видно из представленных данных, у мужчин и женщин обнаружены разнонаправленные значения неравновесия LD между отдельными ДНК-маркерами. В частности, аллель rs833061-Т находится в отрицательном неравновесии по сцеплению с аллелями rs833068-Г и rs3025000-С у мужчин и положительном LD у женщин ($P = 2.0 \times 10^{-16}$), в то время как SNP rs3025039 находился в слабом положительном LD с SNP rs3025039 только у мужчин, а у женщин эти SNPs не были сцеплены друг с другом.

Таблица 1. Анализ ассоциации полиморфных вариантов гена *VEGFA* с риском развития ИБС

Генотип/ аллель	Контроль ¹	ИБС ¹	OR (95%CI) ²	<i>p</i> ³
rs3025039 C>T				
Мужчины				
C/C	253 (79.1)	212 (71.9)	1.00	0.049
C/T-T/T	67 (20.9)	83 (28.1)	1.47 (1.00–2.14)	
Женщины				
C/C	239 (75.4)	183 (70.4)	1.00	0.13
C/T-T/T	78 (24.6)	77 (29.6)	1.37 (0.91–2.06)	
rs833061 T>C				
Мужчины				
T/T	100 (29.9)	67 (22.7)	1.00	0.05
T/C-C/C	235 (70.2)	228 (77.3)	1.45 (1.00–2.12)	
Женщины				
T/T	66 (20.4)	56 (21.5)	1.00	0.51
T/C-C/C	258 (79.6)	204 (78.5)	0.93 (0.62–1.39)	
rs3025000 C>T				
Мужчины				
C/C-T/C	300 (89.8)	279 (94.6)	1.00	0.048
T/T	34 (10.2)	16 (5.4)	0.53 (0.28–1.01)	
Женщины				
C/C-T/C	299 (93.2)	242 (93.1)	1.00	0.54
T/T	22 (6.8)	18 (6.9)	1.26 (0.61–2.58)	
rs833068 G>A				
Мужчины				
G/G-G/A	300 (89.5)	275 (93.2)	1.00	0.15
A/A	35 (10.4)	20 (6.8)	0.65 (0.36–1.17)	
Женщины				
G/G-G/A	299 (92.3)	235 (90.4)	1.00	0.10
A/A	25 (7.7)	25 (9.6)	1.72 (0.90–3.29)	

¹ Абсолютное число и процент лиц с исследуемым генотипом.

² Отношение шансов и 95%-ные доверительные интервалы с поправкой на возраст.

³ Уровень значимости различий в частотах генотипов между группами. Полужирным шрифтом обозначены статистически значимые ассоциации.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании впервые были изучены ассоциации полиморфных вариантов rs3025039, rs833061, rs3025000 и rs833068 гена *VEGFA* с риском развития ИБС у жителей Центральной России. Фактически это первое исследование по оценке вовлеченности сразу четырех полиморфных вариантов гена *VEGFA* в развитие ИБС в российской популяции, выполненное на большой выборке па-

циентов ($N = 1214$). В результате установлено, что полиморфные варианты rs3025039, rs3025000 и rs833061 гена *VEGFA* являются значимыми факторами риска развития ИБС, хотя и проявляли половые различия в ассоциации с предрасположенностью к болезни. Следует отметить, что связь SNP rs3025000 гена *VEGFA* с риском развития ишемической болезни сердца была выявлена впервые, тогда как известная связь полиморфизма rs3025039 с

Таблица 2. Распределение и анализ ассоциаций гаплотипов *VEGFA* с риском развития ИБС

Галотип	rs833061	rs833068	rs3025000	rs3025039	Контроль	ИБС	OR (95%CI) ¹	P
Мужчины ($P_H = 0.04$)								
H1	C	G	C	C	0.3893	0.4515	1.00	—
H2	T	G	C	C	0.2449	0.1876	0.72 (0.53–1.00)	0.05
H3	T	A	T	C	0.2385	0.1937	0.66 (0.47–0.92)	0.01
H4	C	G	C	T	0.0690	0.0658	0.82 (0.44–1.53)	0.54
H5	T	A	T	T	0.0175	0.0435	2.34 (0.81–6.74)	0.12
H6	T	G	C	T	0.0147	0.0323	2.30 (0.79–6.69)	0.13
H7	T	A	C	C	0.0121	0.0124	1.13 (0.38–3.35)	0.82
Редкие	*	*	*	*	0.0140	0.0132	0.93 (0.28–3.11)	0.91
Женщины ($P_H = 0.08$)								
H1	C	G	C	C	0.4722	0.4045	1.00	—
H2	T	G	C	C	0.1799	0.2051	1.33 (0.87–2.04)	0.19
H3	T	A	T	C	0.2035	0.1975	1.27 (0.87–1.85)	0.21
H4	C	G	C	T	0.0515	0.0943	2.25 (1.16–4.39)	0.01
H5	T	A	T	T	0.0475	0.0446	1.27 (0.57–2.85)	0.56
H6	T	G	C	T	0.0216	0.0114	1.06 (0.25–4.51)	0.94
H7	T	A	C	C	0.0147	0.0239	2.27 (0.84–6.17)	0.11
Редкие	*	*	*	*	0.0091	0.0187	4.04 (1.18–13.79)	0.02

Примечание. P_H – уровень значимости ассоциации одновременно всех гаплотипов. Порядок SNPs в гаплотипах представлен в направлении от 5' до 3' нуклеотидной последовательности гена *VEGFA*. ¹ OR и 95%CI с поправкой на возраст.

болезнью была впервые подтверждена в российской популяции.

Для патофизиологической интерпретации выявленных ассоциаций, и в первую очередь полспецифических ассоциаций гаплотипов с развитием ИБС, следует проанализировать геномно-транскриптомные базы данных, такие как GTEx portal (<https://www.gtexportal.org>), eQTLGen (<https://www.eqtlgen.org/cis-eqtl.html>) и QTLbase (<http://mulinlab.tmu.edu.cn/qtlbase/index.html>). Мы обнаружили, что исследованные SNPs являются функционально значимыми вариантами, оказывающими влияние на экспрессию гена в различных тканях, в том числе в сердце и артериях. Так, аллели rs833061-T, rs833068-A и rs3025000-T ассоциировались с увеличением экспрессии гена *VEGFA* в различных тканях, в том числе в миокарде, артериях и крови ($P < 0.01$). Фенотипический эффект SNP rs3025039 не ассоциирован с изменением экспрессии гена *VEGFA*. Учитывая, что SNP rs3025039 локализован в 3'-нетранслируемой области гена *VEGFA*, мы проверили, не попадает ли ДНК-мотив в области данного полиморфного локуса в участок связывания для микроРНК с использованием базы данных miRBase (<http://www.mirbase.org>). В результате было обнаружено, что аллель rs3025039-T формирует сайт связывания для микроРНК hsa-mir-591 (сайт узнавания CA[Т]GGTC). Как было

показано выше, аллели rs833061-T, rs833068-A и rs3025000-T были связаны с увеличением экспрессии гена *VEGFA* в различных тканях, а аллель rs3025039-T – со снижением уровня *VEGFA* вследствие блокирования трансляции гена микроРНК hsa-mir-591. Неудивительно, что у мужчин частый гаплотип H3 (rs833061-T–rs833068-A–rs3025000-T–rs3025039-C), включающий все четыре функционально активных аллеля, был ассоциирован с

Таблица 3. Неравновесие по сцеплению (D) между полиморфными вариантами гена сосудистого эндотелиального фактора роста

SNP ID	rs833068	rs3025000	rs3025039
rs833061	-0.126	-0.119	0.010*
	0.135	0.127	—
rs833068		0.183	
		0.182	
rs3025000			

Примечание. D – нестандартизированный показатель неравновесия по сцеплению между SNPs: верхние ячейки – D у мужчин, нижние – D у женщин. Полужирным шрифтом выделены статистически значимые показатели D ($P = 2.0 \times 10^{-16}$, * $P = 0.04$). Жирными ячейками выделены SNPs, различающиеся по D у мужчин и женщин.

пониженным риском ИБС. У женщин данный гаплотип был нейтральным в отношении риска развития болезни. В то же время гаплотип H4 (rs833061-C–rs833068-G–rs3025000-C–rs3025039-T), который включал все четыре функционально неполноценных аллеля, был ассоциирован с повышенным риском ИБС у женщин.

Половые различия в распределении частот гаплотипов *VEGFA* и особенности неравновесия по сцеплению между SNPs, различающиеся у мужчин и женщин, стали неожиданными находками, так как ранее подобных результатов нами в литературе не обнаружено. Предположительно феномен полового диморфизма аутосомных локусов, какими и являются SNPs гена *VEGFA*, можно объяснить существованием в геноме так называемых горячих точек рекомбинаций ДНК [22]. Примечательно, что высокие уровни рекомбинаций ДНК (особенно у женщин) обнаружены в областях генома с высокой плотностью химических модификаций гистонов, в частности участка H3K4me3 [23]. Интересен и тот факт, что согласно данным проекта ENCODE [24] полиморфный вариант rs833061 расположен в регуляторной области модификации гистона H3K4me3 именно в коронарных артериях (данные CHIP-Seq 59-летней женщины, $Z = 4.52$, $P < 0.00001$), благодаря чему может усиливаться транскрипционная активность гена *VEGFA*.

Известно, что аллель rs3025039-C связан с повышенным уровнем *VEGFA* в плазме крови [25]. Согласно данным ресурса miRBase [26] аллель rs3025039-T образует участок связывания для микроРНК hsa-miR-591, которая может образовывать дуплексы с транскриптом *VEGFA* и подавлять трансляцию гена путем блокирования и деградации мРНК до начала процесса трансляции [27]. Потенциальная возможность такого влияния была продемонстрирована на кардиомиоцитах человека, когда на фоне снижения уровня hsa-miR-591 в миокарде снижалась активность апоптоза клеток, по всей видимости, в результате уменьшения связывания данной микроРНК с 3'-нетранслируемой областью гена *VEGFA* [28]. Исходя из этого, можно заключить, что повышенный риск развития ИБС у носителей аллеля rs3025039-T (гаплотип H4 у женщин) может быть обусловлен низкой продукцией *VEGFA*, приводящей к снижению активности коронарного ангиогенеза и роста коллатералей.

В связи с тем, что функционально активные аллели гена *VEGFA* проявляют свой защитный эффект в отношении развития болезни, влияние исследованных полиморфных вариантов на риск развития ИБС может реализовываться через регуляцию ангиогенеза, рост коллатералей и пролиферативную активность эндотелия [10, 29]. Ключевым

результатом настоящего исследования стало выявление полового диморфизма во взаимосвязях полиморфных вариантов гена *VEGFA* с развитием ишемической болезни сердца. Половые особенности ассоциаций гена *VEGFA* с ИБС могут быть связаны с анатомо-физиологическими особенностями организации коронарного кровотока, наличием более разветвленной сети коллатералей у женщин, чем у мужчин [30]. Также известно, что степень стенозирования коронарных артерий у женщин значительно ниже, чем у мужчин, при наличии сходных анамнестических данных [31]. Считается, что благоприятное действие эстрогена связано с его сдерживающим влиянием на прогрессирование атеросклероза, расширением сосудов, снижением артериального давления, а также с его антиоксидантным и противовоспалительным свойствами [32]. Экспериментальные исследования на мышах показали, что *VEGFA* является мишенью для рецептора эстрогена (ER), который способен модулировать экспрессию гена *VEGFA* и активировать ангиогенез [33, 34], в том числе в эндотелиальных клетках артерий [27, 35]. Установлено, что эстрогены способствуют усилению ангиогенной активности эндотелиальных клеток пупочной вены человека *in vitro* и *in vivo* у мышей [36]. Опыты на мышах также показали, что эстроген защищает поврежденные сосуды, способствует восстановлению поврежденных участков эндотелия, подавляет пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов, тем самым ослабляя прогрессирование атеросклеротической бляшки [37, 38].

Для понимания природы выявленного полового диморфизма также интересен тот факт, что микроРНК hsa-miR-591 способна блокировать EP300 [26] – кофактор эстрогенового рецептора, который является ферментом гистонацетилтрансферазой, регулирующей транскрипцию генов посредством ремоделирования хроматина, позволяя гистоновым белкам менее плотно скручивать ДНК. Анализ генных онтологий показывает (<http://geneontology.org/>), что EP300 вместе с *VEGFA* вовлечены в положительную регуляцию транскрипции генов с области промотора РНК-полимеразы II в ответ на химические стрессоры (GO:1901522, FDR = 0.005) и гипоксию (GO:0061418, FDR = 0.03), тем самым демонстрируя зависимость транскрипционной активности *VEGFA* от действия факторов, обладающих данными свойствами (курение и ишемия миокарда), имеющих этиопатогенетическое отношение к коронарному атеросклерозу.

Таким образом, в рамках настоящего исследования показано, что генотипы трех полиморфных вариантов гена сосудистого эндотелиального фактора роста А С/Т-Т/Т rs3025039, Т/С-Т/Т rs833061 и Т/Т rs3025000 ассоциированы с предрасположенностью к ишемической болезни сердца у жителей

Центральной России. Впервые выявлен половой диморфизм в ассоциациях исследуемых полиморфных локусов с предрасположенностью к ИБС. Так, у мужчин установлены два протективных в отношении развития ИБС гаплотипа (H2 и H3), ассоциированных с повышением транскрипционной активности *VEGFA*, в то время как у женщин редкие гаплотипы и частый гаплотип H4, связанные со снижением экспрессии гена *VEGFA*, наоборот, увеличивали риск развития болезни. Выявленные ассоциации, несомненно, потребуют подтверждения независимыми исследованиями. В особенности это касается ассоциации ИБС и SNP rs3025039, для которого установлено отклонение частот генотипов от равновесия Харди–Вайнберга в группах больных и контроля. Выявленный феномен пол-специфических особенностей неравновесия по сцеплению вызывает интерес и требует дальнейшего изучения.

Работа была выполнена за счет бюджетных средств федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Курский государственный медицинский университет” Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крюков Н.Н., Николаевский Е.Н., Поляков В.П. Ишемическая болезнь сердца (современные аспекты клиники, диагностики, лечения, профилактики, медицинской реабилитации, экспертизы). Самара, 2010. 651 с.
2. Go A.S., Mozaffarian D., Roger V.L. et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics-2014 update: a report from the American Heart Association // *Circulation*. 2014. V. 129. № 3. P. 399–410. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000442015.53336.12>
3. Mozaffarian D., Benjamin E.J., Go A.S. et al. Heart disease and stroke statistics-2016 update: A report from the American Heart Association // *Circulation*. 2016. V. 133. № 4. P. e38–360. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000350>
4. Матвеева С.А. Своевременная оценка факторов риска ишемической болезни сердца – основа профилактики ее осложнений // *Клин. медицина*. 2012. Т. 90. № 11. С. 19–23.
5. Poulter N. Coronary heart disease is a multifactorial disease // *Am. J. Hypertens*. 1999. V. 12. № 10. Pt. 2. P. 92S–95S. [https://doi.org/10.1016/s0895-7061\(99\)00163-6](https://doi.org/10.1016/s0895-7061(99)00163-6)
6. Brown B.D., Nsengimana J., Barrett J.H. et al. An evaluation of inflammatory gene polymorphisms in sibships discordant for premature coronary artery disease: the GRACE-IMMUNE study // *BMC Med*. 2010. V. 8. P. 5. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-8-5>
7. Tu Y.C., Ding H., Wang X.J. et al. Exploring epistatic relationships of NO biosynthesis pathway genes in susceptibility to CHD // *Acta Pharmacol. Sin*. 2010. V. 31. № 7. P. 874–880. <https://doi.org/10.1038/aps.2010.68>
8. Khera A.V., Kathiresan S. Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation // *Nat. Rev. Genet*. 2017. V. 18. № 6. P. 331–344. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.160>
9. Гавриленко Т.И., Рыжкова Н.А., Пархоменко А.Н. Сосудистый эндотелиальный фактор роста в клинике внутренних заболеваний и его патогенетическое значение // *Укр. кардиол. журн*. 2011. Т. 4. С. 87–95.
10. Старостин И.В. Клинико-лабораторные, генетические и ангиографические факторы, ассоциированные с особенностями коллатерального кровотока у больных ишемической болезнью сердца: Дис. ... канд. мед. наук. М.: РКНПК, 2015. 166 с.
11. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress // *Endocr. Rev*. 2004. V. 25. № 4. P. 581–611. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0027>
12. Wang Y., Huang Q., Liu J. et al. Vascular endothelial growth factor A polymorphisms are associated with increased risk of coronary heart disease: a meta-analysis // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 18. P. 30539–30551. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15546>
13. Ma W.Q., Wang Y., Han X.Q. et al. Association of genetic polymorphisms in vascular endothelial growth factor with susceptibility to coronary artery disease: a meta-analysis // *BMC Med. Genet*. 2018. V. 19. № 1. P. 108. <https://doi.org/10.1186/s12881-018-0628-3>
14. Zhao X., Meng L., Jiang J., Wu X. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis // *Growth Factors*. 2018. V. 36. № 3–4. P. 153–163. <https://doi.org/10.1080/08977194.2018.1477141>
15. Полоников А.В., Ушачев Д.В., Шестаков А.М. и др. Полиморфизм Gly460Trp гена α -аддуктина и предрасположенность к гипертонической болезни: значение генно-средовых взаимодействий для возникновения заболевания в русской популяции // *Кардиология*. 2011. Т. 51. № 10. С. 33–38.
16. Полоников А.В., Солодилова М.А., Иванов В.П. и др. Защитный эффект полиморфизма GLY272SER ге-

- на *GNB3* в развитии гипертонической болезни и его взаимосвязь со средовыми факторами риска развития заболевания // *Терапевтич. архив*. 2011. Т. 83. № 4. С. 55–60.
17. *Полоников А.В., Иванов В.П., Солодилова М.А.* Промоторный полиморфизм – 1293G>C гена *CYP2E1* увеличивает риск развития гипертонической болезни у мужчин, злоупотребляющих алкоголем // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2013. Т. 155. № 6. С. 695–698. <https://doi.org/10.1007/s10517-013-2239-5>
 18. *Бушуева О.Ю., Булгакова И.В., Иванов В.П., Полоников А.В.* Ассоциация полиморфизма E158K гена флавиновой монооксигеназы 3 с риском развития ишемической болезни сердца // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2015. Т. 159. № 6. С. 754–757. <https://doi.org/10.1007/s10517-015-3073-8>
 19. *Чурилин М.И., Кононов С.И., Лунева Ю.В. и др.* Полиморфные варианты генов внутриклеточных транспортеров холестерина: связь с уровнем липидов крови, толщиной интима-медиа и развитием ишемической болезни сердца // *Генетика*. 2020. Т. 56. № 2. С. 225–233.
 20. *Пономаренко И.В.* Отбор полиморфных локусов для анализа ассоциаций при генетико-эпидемиологических исследованиях // *Науч. результат. Медицина и фармация*. 2018. Т. 4. С. 40–54. <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-5>
 21. *Solé X., Guinó E., Valls J. et al.* SNPStats: a web tool for the analysis of association studies // *Bioinformatics*. 2006. V. 22. № 15. P. 1928–1929. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl268>
 22. *Jeffreys A.J., Kauppi L., Neumann R.* Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex // *Nat. Genet.* 2001. V. 29. № 2. P. 217–222. <https://doi.org/10.1038/ng1001-217>
 23. *Bhérier C., Campbell C.L., Auton A.* Refined genetic maps reveal sexual dimorphism in human meiotic recombination at multiple scales // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 14994. <https://doi.org/10.1038/ncomms14994>
 24. *Davis C.A., Hitz B.C., Sloan C.A. et al.* The Encyclopedia of DNA elements (ENCODE): data portal update // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. D1. P. D794–D801. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1081>
 25. *Al-Habboubi H.H., Sater M.S., Almawi A.W. et al.* Contribution of VEGF polymorphisms to variation in VEGF serum levels in a healthy population // *Eur. Cytokine Netw.* 2011. V. 22. № 3. P. 154–158. <https://doi.org/10.1684/ecn.2011.0289>
 26. *Griffiths-Jones S., Grocock R.J., van Dongen S. et al.* miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 140–144. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj112>
 27. *Liu H., Tao Y., Chen M. et al.* 17 β -Estradiol promotes angiogenesis of rat cardiac microvascular endothelial cells *in vitro* // *Med. Sci. Monit.* 2018. V. 24. P. 2489–2496. <https://doi.org/10.12659/msm.903344>
 28. *Sucharov C.C., Kao D.P., Port J.D. et al.* Myocardial microRNAs associated with reverse remodeling in human heart failure // *JCI Insight*. 2017. V. 2. № 2. e89169. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89169>
 29. *Gerhardt H., Golding M., Fruttiger M. et al.* VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia // *J. Cell. Biol.* 2003. V. 161. № 6. P. 1163–1177. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302047>
 30. *Lawton J.S.* Sex and gender differences in coronary artery disease // *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2011. V. 23. № 2. P. 126–130. <https://doi.org/10.1053/j.semtcvs.2011.07.006>
 31. *Бахшалиев А.Б.* Оптимизация терапии гипертонической болезни с помощью диагностических тестов и дифференцированного применения фармакологических и нефармакологических методов лечения: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М.: 1-й Моск. мед. ин-т им. И.М. Сеченова, 1990. 35 с.
 32. *Mendelsohn M.E., Karas R.H.* Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences // *Science*. 2005. V. 308. P. 1583–1587. <https://doi.org/10.1126/science.1112062>
 33. *Applanat M.P., Buteau-Lozano H., Herve M.A., Corpet A.* Vascular endothelial growth factor is a target gene for estrogen receptor and contributes to breast cancer progression // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008. V. 617. P. 437–444. https://doi.org/10.1007/978-0-387-69080-3_42
 34. *Dadiani M., Seger D., Kreizman T. et al.* Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer *in vitro* and *in vivo*: the role of estrogen receptor alpha and c-Myc // *Endocr. Relat. Cancer*. 2009. V. 16. № 3. P. 819–834. <https://doi.org/10.1677/ERC-08-0249>
 35. *Jesmin S., Sakuma I., Hattori Y., Kitabatake A.* Regulatory molecules for coronary expressions of VEGF and its angiogenic receptor KDR in hypoestrogenic middle-aged female rats // *Mol. Cell. Biochem.* 2004. V. 259. № 1–2. P. 189–196. <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000021372.99727.b3>
 36. *Morales D.E., McGowan K.A., Grant D.S. et al.* Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells *in vitro* and in a murine model // *Circulation*. 1995. V. 91. № 3. P. 755–763. <https://doi.org/10.1161/01.cir.91.3.755>
 37. *Pare G., Krust A., Karas R.H. et al.* Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury // *Circ. Res.* 2002. V. 90. № 10. P. 1087–1092. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000021114.92282.fa>
 38. *Peña J.M., Min J.K.* Coronary artery disease: Sex-related differences in CAD and plaque characteristics // *Nat. Rev. Cardiol.* 2016. V. 13. № 6. P. 318–319. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.75>

Polymorphism of the *VEGFA* Gene and Coronary Artery Disease: Sex Dimorphism in Relationship between the Gene and Disease Predisposition

M. V. Medvedeva^{a,*}, M. A. Solodilova^a, M. A. Bykanova^{a,b}, N. V. Ivanova^a, and A. V. Polonikov^{a,b,**}

^aKursk State Medical University, Department of Biology, Medical Genetics and Ecology, Kursk, 305041 Russia

^bKursk State Medical University, Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology, Kursk, 305041 Russia

*e-mail: medvedevamariakgavm@yandex.ru

**e-mail: polonikov@rambler.ru

Polymorphisms of vascular endothelial growth factor A (*VEGFA*) gene represent attractive markers for genetic studies of coronary artery disease (CAD). The aim of the study was to investigate relationship between four single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs3025039, rs833061, rs3025000 and rs833068 of the *VEGFA* gene and the risk of CAD in the Central Russia. SNP genotyping SNPs was done using the MassARRAY-4 system. SNPs rs3025039, rs833061 and rs3025000 were associated with CAD risk solely in men ($P = 0.05$). Haplotypes H3 (rs833061-T–rs833068-A–rs3025000-T–rs3025039-C) and H2 (rs833061-T–rs833068-G–rs3025000-C–rs3025039-C) were associated with decreased risk of CAD in men, $P = 0.01$ and $P = 0.05$, respectively. In contrast, in women, the H4 haplotype (rs833061-C–rs833068-G–rs3025000-C–rs3025039-T) was associated with an increased risk of CAD ($P = 0.01$). Linkage disequilibrium (LD) analysis between SNPs stratified by sex revealed that the rs833061-T allele was in negative LD with the rs833068-G and rs3025000-C alleles in men and positive LD in women ($P = 2.0 \times 10^{-16}$), whereas SNP rs3025039 was in a weak positive LD with SNP rs3025039 in men. The miRBase database allowed identifying that the rs3025039-T allele creates a binding site for miRNA hsa-mir-591, which can inhibit the translation of the *VEGFA* gene by blocking and degrading its DNA transcripts. An analysis of the GTEx portal data showed that haplotypes associated with CAD may affect the expression of the *VEGFA* gene. For the first time, sex-specific features of linkage disequilibrium between SNPs of *VEGFA* and their link with coronary artery disease is a subject of interest and require further investigations.

Keywords: coronary heart disease, genetic predisposition, sex dimorphism, vascular endothelial growth factor-A gene (*VEGFA*), single nucleotide polymorphism (SNP).