



Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) egynukleotidos polimorfizmusának meghatározása HELLP szindrómával szövődött terhességekben

NAGY BÁLINT DR., MOLVAREC ATTILA DR., HUPUCZI PETRONELLA DR., RIGÓ JÁNOS JR. DR.

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika
(igazgató: Rigó János dr. jr., egyetemi tanár)

Összefoglalás: A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) fontos szerepet játszik a vaszkulogenezisben és a vaszkuláris permeabilitásban. A VEGF génen eddig legalább 30 egynukleotidos polimorfizmust (SNP) írtak le. Ezek közül a *G+405C*, *C-2578A* és a *C-460T* is kapcsolatba hozható a VEGF termelődésével.

A szerzők DNS-t izoláltak 93 egészséges várandós nő és 71 HELLP-szindrómás beteg vérmintáiból szilika adszorpció módszerrel. A három VEGF egynukleotidos polimorfizmusát kvantitatív valósídejű PCR és olvadási görbe analízis módszerrel határozták meg.

Szignifikáns különbség mutatkozott az allél és a genotípus előfordulási gyakoriságokban a *C-460T* SNP esetében. A *T* allél jelen volt 71,1%-ban HELLP-szindrómás csoportban, míg a kontroll csoportban csak 53,8%-ban ($p=0,0014$). A *TT* genotípus 45,1% volt kimutatható a HELLP-szindrómás csoportban és 21,5%-ban a kontrollokban ($p=0,0011$). Ez a genotípus logisztikai regressziós analízis során független rizikófaktornak mutatkozott az életkorra és a primiparitásra korrigálva ($p=0,002$).

Habár a *VEGF G+405C* allél és genotípus eloszlás nem különbözött lényegesen, a *CC* genotípus szintén független rizikó faktornak mutatkozott ($p=0,041$). Viszont a *VEGF C-2578A* egynukleotidos polimorfizmusa nem hozható összefüggésbe a HELLP szindróma kialakulásával.

A *T-460T* és a *C+405C* genotípusok megléte esetén a HELLP-szindróma nagyobb valószínűséggel fejlődik ki, más genetikai és környezeti faktorokkal együtt hatva, szerepet játszhatnak a HELLP-szindróma kialakulásában.

Kulcsszavak: VEGF, egynukleotidos polimorfizmus (SNP), HELLP-szindróma, valósídejű PCR

Nagy B, Molvarec A, Hupuczi P, Rigó J jr.: Determination of the vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphism in patients with HELLP syndrome.

Summary: The vascular endothelial growth factor polymorphism plays an important role in the vasculogenesis and vascular permeability. There are at least 30 SNP polymorphism on the VEGF gene. From these the *G+405C*, *C-2578A* and *C+460T* has effect on the protein production.

The authors have isolated DNA from the blood of 93 healthy pregnant and 71 HELLP syndrome patients with silica adsorption method. They determined the three SNP polymorphism with quantitative real-time PCR and melting curve analyses method.

There were significant differences in the allele and genotype frequencies of VEGF *C-460T* SNP between the two study groups. The *T* allele was present in 71.1% in the HELLP group, while in 53.8% in the controls ($p=0.0014$). The *TT* genotype occurred significantly more frequently in the HELLP group than in the control group (45.1% vs. 21.5%; $p=0.0011$). The *TT* genotype carriers had an increased risk of HELLP syndrome, which was independent of maternal age and primiparity ($p=0.002$). Although the VEGF *G+405C* allele and genotype distributions did not differ significantly between the two groups, the *CC* genotype carriers were also found to have an increased risk for HELLP syndrome after adjustment for maternal age and primiparity ($p=0.041$). The VEGF *C-2578A* SNP was not associated with HELLP syndrome.

The authors found that the VEGF -460TT and +405CC genotype carriers have an increased risk of HELLP syndrome. As these two SNPs were previously observed to be related to production of the VEGF protein, we suppose that these VEGF polymorphisms – interacting with other genetic and environmental factors – could play a role in the development of HELLP syndrome.

Keywords: VEGF, SNP HELLP syndrome, polimorphism, real-time PCR

A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) az egyik fő angiogén faktor, amely az endotél sejtek proliferációjának elsődleges szabályozója [1,2,3]. Fontos szerepe van a vaszkulogenezisben és a vaszkuláris permeabilitásban [1]. A VEGF gén egy 14 kb nagyságú molekula, amely magába foglal 8 exont és 7 intront [4]. A VEGF-et számos sejt termeli, többek között a citotrofoblasztok. A VEGF termelődése hypoxiával is előidézhető. Bár a hypoxia-indukálta faktor (HIF) – von Hippel-Lindau (VHL) fehérjerendszernek van a legfontosabb szerepe a VEGF-expresszió szabályozásában, az onkogének szintén fokozhatják a VEGF termelődését, ideértve az aktivált epidermális növekedési faktor receptort (EGFR), a RAS-t és az erbB-2/Her2-t [5].

A várandósság során a VEGF-nek fontos szerepe van a trofoblasztok proliferációjában, az embrió vaszkularizációjában. Szövettani tanulmányok a normálistól eltérő angiogenezist írtak le préeklampsziában (PE) és HELLP (Hemolysis, Elevated Liver enzymes, and Low Platelet count) -szindrómában szenvedő betegek placentáiban.

A lepényi iszkémia, az oxidatív stressz és az anyai-magzati immun-maladaptáció egyaránt szerepet játszik a PE kifejlődésében [3]. A sekély endovaszkuláris trofoblaszt invázió a spirális artériákba és az általános endoteliális sejt diszfunkció a PE kifejlődésének két kulcsfontosságú tényezője [6]. Ezért került a kutatások fókuszába a VEGF molekula, valamint annak SNP polimorfizmusainak vizsgálata annak tanulmányozására, hogy milyen szerepe van a vaszkularizációban, ill. egyes betegségek kialakulásában. Papazoglou és mtsai tanulmányozták a VEGF C-2578A, a G-634C és a C+936T, míg Bányász és mtsai a C-2578A és a G-405C egynukleotidos polimorfizmusokat (SNP) határozták meg PE-ban szenvedő betegek csoportjában [7,8].

A VEGF egynukleotidos polimorfizmusát eddig nem vizsgálták HELLP -szindrómában, amely betegség a PE speciális, súlyos formája. Három olyan SNP előfordulási gyakoriságát vizsgáltuk meg, amelyek szerepet játszanak a VEGF termelődésében és a vaszkulogenezisben.

Beteganyag és módszer

Betegek: A vizsgálatokba bevont betegeket két csoportba soroltuk: egészséges várandósok (n=93) és HELLP-szindrómában szenvedők (n=71). A besorolás az Amerikai Szülészeti és Nőgyógyászati Kollégium ajánlása szerint történt. A HELLP-szindróma diagnózisát a jellemző laboratóriumi eltérések alapján állítottuk fel. Ezek a következők voltak: 1. A hemolysis (microangiopathiás haemolyticus anaemia) igazolásának feltétele volt az emelkedett laktát dehidrogenáz (LDH) szint > 600 IU/L. 2. Emelkedett májenzim értékek (az aszpartát aminosztransferáz (AST) és az alanin aminosztransferáz (ALT) szérumszintje meghaladta a >70 IU/L-t), valamint a trombocitopénia jelenléte (a trombocitaszám kevesebb volt, mint 150.000 mikroliterenként).

A Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte a vizsgálatokat, a betegeket tájékoztattuk és ők beleegyező nyilatkozatot írtak alá.

DNS izolálás: A betegektől 3 ml EDTA-s vér levétele után 200 µl vérből DNS izoláltunk szilika adszorpciós módszerrel, a gyártó utasításai szerint (High Pure PCR Template Preparation kit, Roche, Mannheim, Németország).

A VEGF C-2578A, C-460T, G+405C polimorfizmus meghatározása: A VEGF SNP-k meghatározására valósídejű PCR és olvadási görbe analízis módszert dolgoztunk ki. A három SNP meghatározásához használt primerek és próbák szekvenciáit a II. sz. táblázat mutatja. A PCR keverék tartalmazott

A VEGF egynukleotidos polimorfizmusának meghatározására alkalmazott primer és próba szekvenciák
VEGF C-460T (rs 833061)
Forward 5'-AgA Cgg CAg TCA CTA g-3'
Reverse 5'-AAT ATT gAA ggg ggC Ag-3'
Probe1 5'-LC640-AgC ggg gAg AAg gCC Agg g-3'
Probe2 5'-TgT ggg g TT gAg ggC gTT-FL
VEGF C-2578A (rs699947)
Forward 5'-AgC TgT Agg TCA AgA CCC T-3'
Reverse 5'-AAA ATT CCT AgC Tgg TTT CT-3'
Probe1 5'-LC640-ATC CAC CCA gAT CTT gCC Agg-3'
Probe2 5'-gTg ggA AgA gTg ggA CCA gTC AgT CTg A-FL
VEGF G+405C (rs2010963)
Forward 5'-CCA gAA ACC TgA AAT gAA gg-3'
Reverse 5'-ggg CTC ggT gAT TTA gC-3'
Probe1 5'-LC640-Tgg AAT Tgg ATT CgC CAT TTT ATT TTT CTT gC-3'
Probe2 5'-gAC CCA gCA Cgg TCC CTC-FL

II. táblázat

Megbeszélés

Elsőként alkalmaztuk a valósídejű PCR és olvadási görbe analízis módszert a VEGF *C-460T*, *C-2578A* és *G+405C* egynukleotidos polimorfizmusok meghatározására. Kimutattuk az allélok és a genotípusok előfordulási gyakoriságát HELLP-szindrómában szenvedő betegek csoportjában és összehasonlítottuk az egészséges kontroll populációval.

Az eredményeink azt mutatják, hogy a VEGF gén *C-460T* és a *G+405C*

egynukleotidos polimorfizmusa kapcsolatba hozható a HELLP-szindróma kialakulásával. Azt találtuk, hogy a VEGF *T-460T* és a *C+405C* genotípusok nagyobb rizikót jelentenek a HELLP-szindróma kialakulására.

Eddig csak néhány VEGF SNP-t tanulmányoztak a PE kialakulásával kapcsolatban, ezek a *G+405C*, a *C-2578A* és a *C-460T* [6,7,9]. Meghatározták a VEGF termelését is ezekkel összefüggésben, és a legmagasabb plazma szintekkel a *G+405G* és *C-2578A*, a legalacsonyabbakkal a *C-405C* és *A-2578A* genotípusok jártak együtt. A *C-460T* szintén befolyásolja a VEGF koncentrációját [2,11,12,13,14,15]. A vizsgálataink során magas arányban fordult elő a *C+405C* genotípus a HELLP-szindrómás csoportban, amely feltehetőleg alacsony VEGF-szintekkel jár együtt.

Az irodalomban a PE előfordulásával kapcsolatban vizsgálták már a VEGF egynukleotidos polimorfizmusait. A kutatók ellentmondásos eredményekről számolnak be, egyesek alacsony, míg mások magas VEGF-szinteket írtak le PE-ban [16,17]. Ezen ellentmondások okát még nem sikerült kideríteni. A VEGF génen eddig 30 SNP-t írtak le, ami a fenotípusok nagy variációját eredményezheti, ez is magyarázhatja, hogy nehezen határozható meg a pontos hatás.

Eddig csak néhány polimorfizmust esetében figyeltek meg összefüggést a VEGF termelésével kapcsolatban [8]. Három tanulmány talált összefüggést a PE kialakulását illetően [7,8,10]. Papazoglou és mtsai a *C-2578A*, a *G-634C* és a *C+936T* SNP-k előfordulási gyakoriságát vizsgálták, és összefüggést találtak ezen egynukleotidos polimorfizmusok, valamint a PE kialakulásával kapcsolatban, ennek ellenére arra a következtetésre jutottak, hogy nem

valószínű, hogy az általuk vizsgált polimorfizmusok a leglényegesebb faktort képezik a kórkép kialakulásában [6]. Bányász és mtsai szerint a *+405G* allél hordozók esetében alacsonyabb a PE előfordulási gyakorisága, valamint a betegség progresszióját a *-2578A* allél befolyásolhatja [8]. Eredményeik összhangban vannak az általunk találtakkal. Shim és mtsai a *+936T* allél előfordulása és a PE kialakulása között talált összefüggést [10].

A PE kialakulása a placenta kóros fejlődésével hozható összefüggésbe, és a patogenézisének egyik kulcs eleme. Egy microarray tanulmány kimutatta, hogy az oldékony Fms-like tirozin kináz (sFlt-1) alul expresszált PE-ban [17]. E molekula membránhoz kapcsolódott variánsa a VEGF receptora, míg a keringésben lévő variánsa a VEGF és a placentáris növekedési faktor antagonistája (PlGF). Néhány tanulmány magas sFlt-1 és alacsony szabad VEGF és PlGF szinteket talált PE-ban [18,19]. Zhou és mtsai a VEGF családdhoz tartozó molekulák alacsony expresszióját mutatták ki PE és HELLP-szindrómás betegekből származó citotrofoblasztokban [20]. PE esetén a túltermelődött Flt-1 variáns a keringésben lévő VEGF és PlGF-hez kapcsolódik, ezzel megakadályozza, hogy ezek a membránhoz kapcsolódjanak. Ez endoteliális diszfunkciót okoz és olyan prokoaguláns proteinek termelését idézi elő, mint a von Willebrand faktor, az endotelin, a fibronectin és trombomodulin [21,22,23,24,25]. Ezekben a folyamatokban a VEGF egynukleotidos polimorfizmusának is lehet szerepe, ami tisztázásra vár.

Összegezve, elsőként vezettük be a VEGF *C-460T*, a *C-2578A* és a *G+405C* egynukleotidos polimorfizmusainak meghatározására alkalmas valósídejű PCR és olvadási görbe analízis módszert. Meghatároztuk ezen SNP-k előfordulási gyakoriságát HELLP szindrómás és egészséges kontroll csoportokban. Azt találtuk, hogy a *T-460T* és a *C+405C* genotípusok megléte esetén a HELLP-szindróma nagyobb valószínűséggel fejlődik ki. Mivel ezeket már előzőleg is kapcsolatba hozták a VEGF fehérje termelésével, úgy gondoljuk, hogy más genetikai és környezeti faktorokkal együtt hatva, szerepet játszhatnak a HELLP-szindróma kialakulásában.

Irodalom

- [1]. Gargett CE, Rogers PA: Human endometrial angiogenesis. *Reproduction*, 2001; 121: 181–186.
- [2]. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE: Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine*, 2000; 12: 1232–1235.
- [3]. Galazios G, Papazoglou D, Tsikouras P, Kolios G: Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and pregnancy. *J Mat-Fet Neonat Med*, 2009; 22: 371-378.
- [4]. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G: Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*, 1996; 93: 1493–1495.

- [5]. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 2003; 9: 669–766.
- [6]. Dekker GA, Sibai BM: Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am J Obstet Gynecol*, 1998; 179: 1359–1375.
- [7]. Papazoglou D, Galazios G, Koukourakis IM, Kontomanolis EN, Maltezos E: Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and preeclampsia. *Mol Hum Reprod*, 2004; 5: 321–324.
- [8]. Bányász I, Szabó S, Bokodi G, Vannay A, Vászárhelyi B, Szabó A, Tulassay T, Rigó J Jr: Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe preeclampsia. *Mol Hum Reprod*, 2006; 4: 233–236.
- [9]. Nagy B, Savli H, Molvarec A, Várkonyi T, Rigó B, Hupuczi P, Rigó J jr: Vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphisms in HELLP syndrome patients determined by quantitative real-time PCR and melting curve analyses. *Clin Chim Acta*, 2008; 389: 126–131.
- [10]. Shim JY, Jun JK, Jung BK, Kim SH, Won HS, Lee PR, Kim A: Vascular endothelial growth factor gene +936 C/T polymorphism is associated with preeclampsia in Korean women. *Am J Obstet Gynecol*, 2007; 197: e1–4271.
- [11]. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, Harden PN: Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*, 2002; 13: 260–264.
- [12]. Stevens A, Soden J, Brenchley PE, Ralph S, Ray DW: Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter. *Cancer Res*, 2003; 63: 812–816.
- [13]. Brogan IJ, Khan N, Isaac K: Novel polymorphisms in the promoter and 5'UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol*, 1999; 60: 1245–1249.
- [14]. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, Inoue I, Katayama S: A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes*, 2002; 51: 1635–1639.
- [15]. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E: 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.
- [16]. Lyall F, Greer IA, Boswell F, Fleming R: Suppression of serum vascular endothelial growth factor immunoreactivity in normal pregnancy and preeclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*, 1997; 104: 223–228.
- [17]. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA: Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*, 2003; 111: 649–658.
- [18]. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA: Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*, 2004; 350: 672–683.
- [19]. Hertig A, Berkane N, Lefevre G, Toumi K, Marti HP, Capeau J, Uzan S, Rondeau E: Maternal serum sFlt1 concentration is an early and reliable predictive marker of preeclampsia. *Clin Chem*, 2004; 50: 1702–1703.
- [20]. Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, Fisher SJ: Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol*, 2002; 160: 1405–1423.
- [21]. Baumwell S, Karumanchi SA: Pre-eclampsia: clinical manifestations and molecular mechanisms. *Nephron Clin Pract*, 2007; 106: c72–81.
- [22]. Karumanchi AS, Masnard SE, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP: Preeclampsia: a renal perspective. *Kindney Internat*, 2005; 67: 2101–2113.
- [23]. Baker PN, Krasnow J, Roberts JM, Yeo KT: Elevated serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 1995; 86: 815–821.
- [24]. Kupferminc MJ, Daniel Y, Englender T, Baram A, Many A, Jaffa AJ, Gull I, Lessing JB: Vascular endothelial growth factor is increased in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*, 1997; 38: 302–306.
- [25]. Hunter A, Aitkenhead M, Caldwell C, McCracken G, Wilson D, McClure N: Serum levels of vascular endothelial growth factor in preeclamptic and normotensive pregnancy. *Hypertension*, 2000; 36: 965–969.

Levezés

Nagy Bálint dr.

Semmelweis Egyetem

I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika

1088 Budapest, Baross u 27.

e-mail: nagy.balint@noi1.sote.hu