



Gdański Uniwersytet Medyczny

Anna Małkiewicz

Polimorfizmy genu VEGF w nadciśnieniu tętniczym

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Gdańsk 2016

Wydano za zgodą
Dziekana Wydziału Lekarskiego

Pracę zrealizowano w Zakładzie Immunologii Katedry Immunologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor:
prof. dr hab. med. Jolanta Myśliwska

*Składam serdeczne podziękowania wszystkim,
dzięki którym niniejsza praca mogła powstać.*

*Promotorowi, Profesor Jolancie Myśliwskiej
za opiekę merytoryczną, za cenne uwagi i sugestie.*

*Koleżankom i kolegom z Zakładu Immunologii
za pomoc w badaniach laboratoryjnych, za cenne wskazówki
i za miłą atmosferę pracy.*

*Szczególne podziękowania składam Rodzicom,
za wsparcie i nieustającą wiarę w moje możliwości.*

*Dziękuję Pawłowi,
za ciepłe słowo zawsze motywujące mnie do pracy
oraz za cierpliwość i wyrozumiałość.*

SPIS TREŚCI

SKRÓTY	6
Wprowadzenie.....	8
Cele pracy	10
Metodyka i materiał do badań.....	10
Wyniki	11
Polimorfizm genu VEGF w pozycji -460 T/C (rs833061)	11
Polimorfizm genu VEGF w pozycji -152 G/A (rs13207351).....	12
Polimorfizm genu VEGF w pozycji -1154 G/A (rs1570360).....	12
Wnioski.....	13
ABSTRACT	14
BIBLIOGRAFIA.....	20
ZAŁĄCZONE PRACE	22

SKRÓTY

A	(ang. adenine) adenina
ACEI	(ang. angiotensin-converting-enzyme inhibitors) inhibitory konwertazy angiotensyny
ARB	(ang. angiotensin receptor blockers) bloker receptora angiotensynowego
BMI	(ang. body mass index) indeks masy ciała
BUN	(ang. blood urea nitrogen) azot mocznikowy we krwi
C	(ang. cytosine) cytozyna
CD	(ang. cluster of differentiation) antygen różnicowania komórkowego
CI	(ang. confidence intervals) przedziały nieufności
CKD	ang. chronic kidney disease
CRP	(ang. C-reactive protein) białko C-reaktywne
DBP	(ang. diastolic blood pressure) rozkurczowe ciśnienie krwi
DNA	(ang. deoxyribonucleic acid) kwas dezoksyrybonukleinowy
EDTA	(ang. ethylenediaminetetraacetic acid) wersenian dwusodowy etylenodiaminy
eGFR	(ang. estimated glomerular filtration rate) szacunkowy współczynnik filtracji kłębuszkowej
ELISA	(ang. enzyme-linked immunosorbent assay) test immunoenzymatyczny
eNOS	(ang. endothelial nitric oxide syntase) śródbłonkowa syntaza tlenu azotu
EPCs	(ang. endothelial progenitor cells) komórki progenitorowe śródbłonka
G	(ang. guanine) guanina
HRM	(ang. high resolution melting) wysokorozdzielcza analiza temperatury topnienia
ICAM-1	(ang. intercellular adhesion molecule 1) cząsteczka adhezji międzykomórkowej
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
OD	(ang. odds ratio) iloraz szans
PBS	(ang. phosphate buffered saline) zbuforowany roztwór soli
PChN	przewlekła choroba nerek

PCR	(ang. polymerase chain reaction) łańcuchowa reakcja polimeryzacji
POChP	przewlekła obturacyjna choroba płuc
Real-Time PCR	(ang. real-time polymerase chain reaction) PCR w czasie rzeczywistym
SBP	(ang. systolic blood pressure) skurczowe ciśnienie krwi
SNP	(ang. single nucleotide polymorphism) polimorfizm pojedynczego nukleotydu
sVCAM	(ang. vascular cell adhesion molecule) naczyniowa cząsteczka adhezyjna
T	(ang. thymine) tymina
VEGF	(ang. vascular endothelial growth factor) czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
vWf	(ang. von Willebrand factor) czynnik von Willebranda

Wprowadzenie

Nadciśnienie tętnicze jest istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego. Zgodnie z wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego (ang. European Society of Hypertension) za prawidłowe ciśnienie skurczowe przyjmuje się wartość ≤ 140 mmHg, natomiast rozkurczowe ≤ 90 mmHg [1]. U dorosłych powyżej 25 roku życia nadciśnienie stwierdza się u ok. 30-45% populacji ogólnej, a częstość jego występowania rośnie wraz z wiekiem. Wyróżnia się nadciśnienie o charakterze pierwotnym oraz wtórnym. Ponad 90% przypadków stanowi nadciśnienie pierwotne [2]. Pomimo wielu badań patogeneza nadciśnienia pierwotnego nie została do tej pory w pełni opisana. Wiadomo, iż w jej etiologię zaangażowane są zarówno czynniki środowiskowe jak i genetyczne [3].

Na poziomie mikrokrążenia, u pacjentów z nadciśnieniem pierwotnym częściej obserwuje się redukcję gęstości sieci naczyń włosowatych i tętniczek, niż zmniejszenie ich średnicy. Zmiany te są wynikiem zaburzonej angiogenezy, nie zaś destrukcji istniejących naczyń [4]. Nieprawidłowy wzrost naczyń w przypadku nadciśnienia może być konsekwencją zaburzenia homeostazy czynników pro- i antyangiogennych. Jednym z najważniejszych czynników regulujących proces angiogenezy jest czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego – VEGF (ang. Vascular Endothelial Growth Factor) [5]. VEGF to homodimeryczna glikoproteina indukująca proliferację, wzrost, migrację komórek progenitorowych śródbłonka oraz ich organizację przestrzenną podczas angiogenezy. Zwiększa również przepuszczalność naczyń, m.in. poprzez aktywację śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS). W nadciśnieniu tętniczym obserwuje się zahamowaną aktywność VEGF, która może prowadzić do zmniejszenia produkcji eNOS przez komórki progenitorowe śródbłonka oraz upośledzonej angiogenezy, co wiąże się z redukcją gęstości sieci naczyń włosowatych. Konsekwencją tego jest zwiększenie obwodowego oporu naczyniowego, a tym samym wzrost ciśnienia tętniczego krwi [6].

Ekspresję VEGF w nerkach stwierdza się w podocytach oraz komórkach nabłonka kanalików dystalnych i zbiorczych. Zmiany w ekspresji białka VEGF obserwowane są w różnych stanach chorobowych, m.in. w nefropatii cukrzycowej i błoniastej [7]. Nadciśnienie może być konsekwencją choroby nerek lub może prowadzić do przewlekłej choroby nerek (PChN) [2]. Zgodnie z wytycznymi zawartymi w dokumencie KDIGO 2012 wyróżniono pięć stadiów zaawansowania PChN, które określa się na podstawie wartości szacunkowego współczynnika filtracji kłębuszkowej (eGFR). Pacjentów kwalifikuje się do

kategorii G1, gdy wartość eGFR jest ≥ 90 ml/min/1,73 m², co wiąże się z prawidłową funkcją nerek. Natomiast PChN definiuje się jako obniżenie eGFR poniżej wartości 60 ml/min/1,73 m², która odnosi się do kategorii G3a-G5. G3a charakteryzują wartości eGFR = 45-59 ml/min/1,73 m² [8].

Gen kodujący ludzki VEGF jest zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 6 (6p21.3) i składa się z 8 egzonów oraz 7 intronów. Ponadto występuje w wielu wariantach polimorficznych, z których przynajmniej 25 zostało opisanych. Są to polimorfizmy typu SNP (ang. Single-Nucleotide Polymorphism) [9]. A wśród nich wyróżnia się polimorfizmy regionu promotorowego: -460 T/C (rs833061), -152 G/A (rs13207351) i -1154 G/A (rs1570360), które wielokrotnie opisywano w literaturze wykazując ich związek z różnymi jednostkami chorobowymi, w tym z nadciśnieniem tętniczym [10-15].

Komórki progenitorowe śródbłonna – EPCs (ang. Endothelial Progenitor Cells) to populacja komórek wywodzących się ze szpiku, które uczestniczą w procesach regeneracji warstwy śródbłonna i angiogenezie. W przewlekłym stanie zapalnym, np. u osób cierpiących na choroby układu naczyniowego, fizjologia oraz liczba tych komórek ulega zmianie. Sugeruje się, iż potencjalna wartość EPCs może stanowić marker dysfunkcji śródbłonna [16]. Najmniej dojrzałe EPCs identyfikuje się poprzez obecność antygeny CD133 a brak cząsteczki powierzchniowej CD34, zatem ich fenotyp to CD34⁻CD133⁺. Następnie komórki te nabywają molekułę CD34, tym samym różnicując się w komórki CD34⁺CD133⁺. W toku ich dalszego dojrzewania wzrasta ekspresja dla receptora VEGF, określanego jako VEGFR2 (CD309). Po utracie antygeny CD133, EPCs różnicują się w komórki bardziej dojrzałe o fenotypie CD34⁺CD309⁺CD133⁻ [17-18]. Wnikliwa analiza literatury o podobnej tematyce badawczej wykazała, iż dotychczas nie opisano EPCs w kontekście wariantów polimorficznych genu VEGF.

Ze względu na fakt, iż nadciśnienie rozpatruje się także w kontekście upośledzonej angiogenezy, u pacjentów należy spodziewać się zaburzonej produkcji czynników angiogennych, takich jak VEGF, angiogenina czy endostatyna. Endostatyna stanowi naturalny inhibitor aktywności VEGF, poprzez bezpośrednie wiązanie się do jego receptora - VEGFR2 [19]. Ponadto konsekwencją zapalnego charakteru nadciśnienia jest aktywacja komórek śródbłonna do produkcji białek VCAM-1, E-selektyny i sCD54, które są odpowiedzialne za procesy adhezji [20]. Uszkodzenie śródbłonna mierzy się również zawartością w surowicy lub plazmie czynnika von Willebranda (vWf). U pacjentów z nadciśnieniem tętniczym obserwuje się zawyżone wartości tego białka [21].

Cele pracy

Celem niniejszej pracy było określenie związku pomiędzy:

- występowaniem polimorfizmów genu VEGF: -460 T/C, -152 G/A, a aktywnością i dojrzałością progenitorowych komórek śródbłonka, zaangażowanych w proces angiogenezy,
- występowaniem polimorfizmów genu VEGF: -152 G/A, -1154 G/A, a stopniem uszkodzenia śródbłonnów naczyniowych, mierzonym poziomem surowiczych białek wydzielanych z uszkodzonych komórek śródbłonka,
- występowaniem polimorfizmów genu VEGF: -460 T/C, -152 G/A, -1154 G/A, a zaawansowaniem PChN.

Metodyka i materiał do badań

Badania objęły populację 275 osób. Grupę badawczą stanowiły 134 osoby z pierwotnym, długotrwałym nadciśnieniem tętniczym (średni wiek 62 lata), a grupę kontrolną 141 wolontariuszy normotensyjnych (średni wiek 52 lata). Ciśnienie kwalifikujące pacjentów do projektu było $\geq 140/90$ mmHg. Natomiast średni czas trwania choroby u pacjentów wynosił 9 lat. Kryteria wyłączenia, zarówno dla grupy kontrolnej jak i badanej, stanowiły: przebyty udar mózgu i zawał serca, POChP (przewlekła obturacyjna choroba płuc), nowotwory, choroby o podłożu autoimmunologicznym, ciężka niewydolność serca i wątroby. Materiałem do badań była krew żylna. W badaniach oznaczono polimorfizm VEGF -460 T/C z wykorzystaniem techniki Real-Time PCR z techniką HRM (ang. High Resolution Melting). Pozostałe polimorfizmy identyfikowane były na drodze reakcji sekwencjonowania. Poziom białek uszkodzenia śródbłonka: angiogenina, endostatyna, CRP, VEGF, E-selektyna, VCAM-1, vWf, sCD54, określono za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA. Współczynnik eGFR wyznaczono zgodnie ze wzorem MDRD (The Modification of Diet in Renal Disease Study) [22]. Odsetek subpopulacji komórek CD34⁺ we krwi obwodowej zbadano metodą cytometrii przepływowowej. W celu identyfikacji komórek progenitorowych śródbłonka zastosowano następujące markery powierzchniowe: CD34, CD133, CD45^{dim}, CD309. Komórki wykazujące ekspresję badanych molekuł oznaczono w bramce limfocytarnej.

Analizę statystyczną danych przeprowadzono z wykorzystaniem programu STATISTICA v. 10.0 (Statsoft, Inc.). Test χ^2 zastosowano w celu porównania zmiennych

jakościowych. Zmienne spełniające kryteria rozkładu normalnego analizowano za pomocą testu ANOVA. Natomiast test ANOVA rang Kruskala-Wallisa zastosowano dla zmiennych statystycznych nie spełniających założeń rozkładu normalnego. Do sprawdzenia zależności między wybranymi zmiennymi wykorzystano współczynnik korelacji rang Spearmana. W analizie statystycznej ważną rolę odegrała również regresja logistyczna. Jako znamiennej statystycznie przyjęty został poziom istotności $p < 0,05$.

W każdym z analizowanych poniżej polimorfizmów genu VEGF stwierdzono, że frekwencja genotypów zarówno w grupie kontrolnej, jak i badanej była zgodna z rozkładem wynikającym z prawa Hardy'ego-Weinberga.

Wyniki

Polimorfizm genu VEGF w pozycji -460 T/C (rs833061)

Analiza cytometryczna wykazała, że w obrębie polimorfizmu genu VEGF w pozycji -460 T/C pacjenci z genotypem TT mieli znacząco wyższą liczbę bezwzględną i odsetek komórek stanowiących największą populację, a więc komórek CD34⁺, a także CD34⁺ z ekspresją charakterystycznego dla leukocytów markera CD45^{dim} oraz komórek najmniej dojrzałych o fenotypie CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺. Różnice istotne statystycznie wykazano analizując zarówno wszystkie trzy genotypy: CT, CC i TT w grupie pacjentów, jak i porównując liczbę komórek progenitorowych śródbłonna pomiędzy osobami zdrowymi, a chorymi z genotypem TT.

Zasadniczą częścią niniejszych badań była ocena parametrów nerkowych, ponieważ wiadomo, iż jednym z pierwszych powikłań nadciśnienia tętniczego jest zaburzenie funkcji nerek prowadzące do PChN. Analizując ten sam polimorfizm wykazano, że pacjenci z genotypem TT charakteryzuje istotnie statystycznie niższy poziom eGFR oraz wyższy kreatyniny i azotu mocznika (BUN). Zaobserwowano, że największa liczba pacjentów z genotypem TT odznacza się wartością eGFR < 60 ml/min/1,73 m², natomiast najmniejsza wartością eGFR > 60 ml/min/1,73 m². Zatem u pacjentów posiadających genotyp TT stwierdzono najbardziej zaawansowaną PChN. W przypadku grupy kontrolnej nie odnotowano żadnych różnic istotnych statystycznie.

Polimorfizm genu VEGF w pozycji -152 G/A (rs13207351)

Reakcja sekwencjonowania pozwoliła na oznaczenie polimorfizmu w pozycji -152 ze zmianą G na A. Analiza genotypów AA, AG i GG w grupie pacjentów wykazała znacząco wyższą liczbę bezwzględna i odsetek niedojrzałych komórek progenitorowych śródbłonna o fenotypie CD34⁺CD133⁺ i CD34⁺CD133⁻ w przypadku genotypu GG. Analiza cytometryczna grupy kontrolnej nie wskazała różnic istotnych statystycznie w obrębie badanego polimorfizmu genu VEGF.

Porównując wszystkie trzy genotypy, u pacjentów o genotypie GG obserwowano również najbardziej zaawansowaną PChN, o czym świadczyły znacząco wyższe wartości kreatyniny i BUN oraz niższe eGFR. Genotyp GG scharakteryzowano z największą liczbą pacjentów z eGFR < 60 ml/min/1,73 m² a najmniejszą z eGFR > 60 ml/min/1,73 m². Korelacja rang Spearmana potwierdziła wcześniej już znaną zależność - pacjenci z wyższym poziomem eGFR mieli niższy poziom czynnika vWf i endostatyny a wyższy VEGF.

Analiza parametrów klinicznych pozwoliła także na sprawdzenie markerów uszkodzenia śródbłonna, które towarzyszą nadciśnieniu tętniczemu. Potwierdzono, że u tych samych pacjentów z genotypem GG ich poziom jest najwyższy. Znamienne wyższe okazały się wartości białka angiogeniny, endostatyny, czynnika vWf oraz CRP. Warto podkreślić, iż genotyp GG odznaczało również znacząco wyższe ciśnienie rozkurczowe krwi. W grupie kontrolnej parametry kliniczne nie różniły się w sposób istotny statystycznie.

Ponadto analizowano, czy znacząco gorsze parametry kliniczne pacjentów z genotypem GG są konsekwencją przyjmowanej przez nich politerapii. Analiza statystyczna wykazała, że podobny procent pacjentów z genotypem GG i AG poddawany był mono- i politerapii. Natomiast genotyp AA odznaczał znacząco wyższy procent pacjentów przyjmujących politerapię. W badaniach zaznaczono również, że niezależnie od posiadanego genotypu, zbliżony procent pacjentów stosował leki takie jak: ARB, β-blokery, diuretyki, ACEI, Ca-blokery. Zatem gorsze parametry kliniczne pacjentów z genotypem GG nie były konsekwencją przyjmowanej przez nich politerapii.

Polimorfizm genu VEGF w pozycji -1154 G/A (rs1570360)

Na drodze sekwencjonowania zidentyfikowano również polimorfizm genu VEGF w pozycji -1154 G/A. Analiza statystyczna wykazała znamienne różnice w częstości występowania genotypu GA pomiędzy grupą kontrolną a grupą chorych. Frekwencja

genotypu GA była istotnie mniejsza w grupie pacjentów, o ok. 20%. Dalsza analiza, oparta o regresję logistyczną, dowiodła że prawdopodobieństwo zachorowania na nadciśnienie tętnicze jest o połowę mniejsze u pacjentów z genotypem GA.

Powyższe obserwacje zostały potwierdzone parametrami klinicznymi. Pacjentów posiadających genotyp GA scharakteryzowano jako z najmniej zaawansowaną PChN, ze względu na znamienne wyższy poziom eGFR, a niższy kreatyniny i BUN. U największej liczby pacjentów z genotypem GA zdefiniowano kategorię G1 i G2 PChN. W porównaniu z genotypami AA i GG, genotyp GA wyróżniał także istotnie statystycznie niższy poziom białek uszkodzenia śródbłonka: angiogeniny, endostatyny i czynnika vWf. W grupie kontrolnej nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie.

Wnioski

Wobec powyższych wyników wzmożona mobilizacja niedojrzałych komórek progenitorowych śródbłonka, którą zaobserwowano u pacjentów z genotypem TT (-460 T/C) oraz GG (-152 G/A), może sygnalizować rozwój PChN zależnej od nadciśnienia tętniczego.

Natomiast polimorfizm genu VEGF w pozycji -1154 G/A może stanowić czynnik ochronny przed nadciśnieniem tętniczym oraz jest związany z mniej zaostrozonym przebiegiem PChN u pacjentów z genotypem GA.

ABSTRACT

Introduction

Arterial hypertension is a risk factor for cardiovascular disease. In accordance with the hypertension classification set out by European Society of Hypertension the systolic blood pressure (SBP) is less than or equal to 140 mmHg and the diastolic blood pressure (DBP) is less than or equal to 90 mmHg [1]. Thirty to forty five percent population over 25 years old is affected by hypertension and, what is known, the disease is more likely to develop in older adults. There is distinguished a primary and secondary hypertension. The primary hypertension makes up 90% of cases [2]. The genetic and epigenetic factors underline the development of this disease [3]. Nevertheless, till date, the pathogenesis of arterial hypertension is poorly understood.

In primary hypertensive patients, the impressive changes have been found in the microcirculation. The hypertension is associated with the lower density of arterioles and capillaries in relation to normotensive healthy group. This process is referred to as "rarefaction" and is most probably as a result of defective angiogenesis rather than overactive vessel destruction [4]. The impaired regeneration of blood vessels in hypertension may be due to abnormal secretion of the pro- and anti-angiogenic factors. One of the most pivotal factors, that positively regulates the process of angiogenesis, is vascular endothelial growth factor (VEGF) [5]. The VEGF, a glycoprotein homodimer, is a highly specific mitogen with angiogenic and vascular permeability activities for endothelial cells. The inhibition of VEGF activity reduces the secretion of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and as a result the peripheral vascular resistance increases, leading to elevation of blood pressure [6].

In human kidney the expression of VEGF is observed in podocytes and epithelial cells of distal and collecting tubules. The VEGF expression is upregulated in many glomerular diseases such as membranous and diabetic nephropathy [7]. Hypertension may be a consequence of kidney disease and, on the other hand, may cause chronic kidney disease (CKD) [2]. Five stages of CKD are highlighted in KDIGO 2012 Clinical Practice Guidelines. Hypertensive patients were classified into G1-G5 stage depending on value of the estimated glomerular filtration rate (eGFR). Thus patients were classified into G1 stage with a value of $eGFR \geq 90 \text{ ml/min/1.73 m}^2$, G2 with a value of $eGFR = 60-89 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ and G3a with a value of $eGFR = 45-59 \text{ ml/min/1.73 m}^2$. The CKD is defined with the value of $eGFR < 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ (G3a-G5 stage) [8].

The gene coding for the human VEGF is located at chromosome 6p21.3 and is made up of 8 exons separated by 7 introns. Furthermore, the VEGF gene occurs in various genetic polymorphisms and at least 25 single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been described [9]. Three of them, localized in the promoter region: -460 T/C (rs833061), -152 G/A (rs13207351) and -1154 G/A (rs1570360) are associated with different diseases including hypertension [10-15].

The Endothelial Progenitor Cells (EPCs) are a population of bone marrow-derived cells, which contribute to the endothelial regeneration and angiogenesis process. The number and physiology of EPCs may be changed during chronic inflammatory processes, e.g. in patients suffering from cardiovascular diseases. The potential value of EPCs is suggested to be a marker of endothelial dysfunction [16]. The detailed studies basing on the colony formation assay and flow cytometric analysis have revealed that the earliest endothelial precursors are distinguished by the CD133 molecule expression. During their development, cells with phenotype of $CD34^-CD133^+$ acquire the CD34 molecule. Thus the $CD34^-CD133^+$ progenitors differentiate into $CD34^+CD133^+$ forms. Along with their further maturation expression of VEGF receptor 2 (CD309) increases. After losing expression of the CD133 molecule the EPCs differentiate into more mature but less proliferative forms with the phenotype of $CD34^+CD309^+CD133^-$ [17-18]. Till date there are no papers describing EPCs in the context of VEGF genetic polymorphism.

Due to the fact that hypertension is considered as a condition of impaired angiogenesis, patients are characterized by defective production of angiogenic factors, such as VEGF, angiogenin and endostatin as well. The endostatin is a natural inhibitor of VEGF activity. It blocks VEGF action through its direct binding to the VEGF receptor 2 [19]. Moreover, as a consequence of inflammatory response, cells adhesion molecule (VCAM-1, E-selectin and sCD54) are produced by endothelial cells [20]. In addition, the von Willebrandt factor (vWf) is released into the circulation because of vascular injury and may be measured in plasma or serum of the patients. A significantly increased level of vWf has been observed in patients with hypertension [21].

Purposes

The purpose of presented study was to:

- characterize the number and maturation of EPCs within respective genotypes of the: -460 T/C and -152 G/A VEGF polymorphisms

- investigate whether the endothelial dysfunction markers are associated with the -152 G/A and -1154 G/A VEGF polymorphisms
- investigate whether the -460 T/C, -152 G/A, -1154 G/A VEGF polymorphisms predispose to hypertension-related CKD.

Materials and methods

The presented studies enrolled population of 275 subjects. The hypertensive group was constituted by 134 patients with primary, long-lasting arterial hypertension (mean age 62) and as a control group 141 healthy volunteers were recruited (mean age 52). The SBP was characterized by equal to or exceeding than 140 mmHg and the DBP by equal to or exceeding than 90 mmHg. What is more, the duration of hypertension was 9 years. The exclusion criteria for contribution in both hypertensive and control groups concerned: stroke, heart attack, chronic obstructive pulmonary disease, cancers, autoimmune diseases, hypertensive retinopathy, kidney and liver failure. As a research material venous blood was used. The VEGF -460 T/C polymorphism was analyzed by Real-Time PCR with HRM technique (High Resolution Melting). Both the VEGF -152 G/A and VEGF -1154 G/A polymorphisms were genotyped by Sanger sequencing method. Immunoenzymatic ELISA method let to determine level of endothelial damage markers: angiogenin, endostatin, CRP, VEGF, E-selectin, VCAM-1, vWf as well as sCD54. The eGFR was calculated according to MDRD (Modification of Diet in Renal Disease study recommendations) [22]. The percentage of CD34⁺ subpopulation cells, isolated from whole blood, was analyzed by using flow cytometry. In order to identify EPCs the following surface markers were used: CD34, CD133, CD45^{dim}, CD309. The percentage of cells, expressing molecules examined, was calculated in the lymphocyte's gate.

The results were analyzed using Statistica 10.0 (StatSoft, Inc USA). To determine the conformation of the allelic frequencies according to Hardy-Weinberg equilibrium, the χ^2 test was applied. Normally distributed variables were analyzed by ANOVA test. The non-parametric approach was used to variables that showed a non-normal distribution (Kruskal-Wallis ANOVA test). The correlations between the variables were evaluated by the Spearman's test. What is more, the logistic regression analysis has calculated odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI) in order to determine the connection between VEGF polymorphism and hypertension occurrence. The P values less than 0.05 were regarded as statistically significant.

When analyzing all three VEGF polymorphisms, it has been found that in both healthy and hypertensive groups frequencies of genotypes conformed to the Hardy-Weinberg equilibrium.

Results

VEGF -460 T/C polymorphism (rs833061)

The cytometric analyses revealed that the hypertensive patients bearing the TT genotype had the highest levels of immature EPCs with the following phenotypes: CD34⁺ (comprising the largest population), CD34⁺CD45^{dim}, CD34⁺CD133⁺CD45^{dim} (regarded as the least mature). The differences were statistically significant in hypertensive group when all three genotypes (CT, CC and TT) were taken into account. Moreover, when comparing number of EPCs between healthy and patients both bearing TT genotype, the significance was achieved.

It is known that hypertension is one of the most important risk factors for progression of CKD and thereby the analysis of kidney parameters was another key part of presented study. When analyzing all the three VEGF gene variants, the eGFR values were significantly lower and those of creatinine and BUN parameters higher among the TT hypertensive patients. In the case of TT genotype the lowest number of patients with eGFR > 60 ml/min/1.73 m² and highest with eGFR < 60 ml/min/1.73 m² was observed. Therefore, TT genotype carriers develop CKD more vigorously as those of other genotypes. In case of control group no differences were found.

VEGF -152 G/A polymorphism (rs13207351)

The Sanger sequencing reaction let to indicate the polymorphism at position -152 of VEGF gene. The statistical analysis of AA, AG and GG genotypes revealed the highest absolute number and percentage of progenitors with the CD34⁺CD133⁺ and CD34⁺CD133⁻ phenotype in case of GG patients. In control group above cells were in similar range of values in all three genotypes.

Furthermore, despite the same duration of hypertension, the GG carriers were characterized by the poorest values of kidney function parameters. In the GG genotype patients with significantly lower values of eGFR and higher of BUN and creatinine were found. The GG genotype was characterized by the highest number of patients with eGFR < 60 ml/min/1.73 m² and lowest with eGFR > 60 ml/min/1.73 m².

The analysis of clinical parameters found the GG hypertensive carriers having significantly highest values of markers of endothelial damage such as endostatin, angiogenin, CRP and vWf. These patients had also the highest values of DBP. Moreover, patients with higher eGFR level had lower those of vWf and endostatin values, and higher of VEGF. No differences were found in the healthy group.

In addition, the analysis of anti-hypertensive drugs received by the GG patients revealed that their worse conditions were not a consequence of medical treatment. The analysis of drugs, grouped into four categories, disclosed that the GG hypertensive carriers were treated in similar proportions with anti-hypertensive drugs classes as well as patients with other genotypes.

VEGF -1154 G/A polymorphism (rs1570360)

The statistical analysis revealed that the frequency of VEGF gene -1154 GA genotype was almost up to 20% higher among healthy volunteers. Thus in comparison to control group the incidence of GA genotype was significantly decreased in the hypertension. Additionally, on the basis of logistic regression analysis a significantly decreased risk of hypertension was found in the case of VEGF -1154 GA genotype.

It is noteworthy that above observations were confirmed by the clinical parameters. All hypertensive patients had similar duration of the disease. Nevertheless, the GA hypertensive carriers have been found to present the best kidney parameters i.e. the highest values of eGFR and the lowest for BUN and creatinine. Thus the highest number of the GA patients was characterized by the G1 and G2 stage of CKD.

There were also significantly lowest values of endostatin, angiogenin and vWf observed in the GA hypertensive carriers. This finding highlights the protective role of the GA genotype in hypertension-associated CKD.

In case of the healthy individuals associations between the change at position -1154 of the VEGF gene and clinical characteristics were not found.

Conclusions

It is undoubtedly evident that the highest mobilization of EPCs from bone marrow, observed among both patients with TT genotype (-460 T/C) and GG genotype (-152 G/A), may signalize more severe renal hypertension-related complications.

Whereas the GA genotype of VEGF polymorphism localized at -1154 position may be a genetic protective factor for development arterial hypertension and is associated with less progressed CKD.

BIBLIOGRAFIA

1. Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, Albus C, Benlian P, Boysen G, Cifkova R, Deaton C, Ebrahim S, Fisher M, Germanò G, Hobbs R, Hoes A, Karadeniz S, Mezzani A, Prescott E, Ryden L, Scherer M, Syvanne M, Scholte Op Reimer WJM, Vrints C, Wood D, Zamorano JL and Zannad F. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by re. Eur Heart J 2012; 33: 1635–701.
2. Małyszko, J. (2009). Nadciśnienie tętnicze nerkopochodne. In Forum Nefrologiczne (Vol. 2, No. 2, pp. 120-129). 7
3. Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation* 2000; 101: 329–335.
4. Levy BI, Ambrosio G, Pries a. R, Struijker-Boudier H a. J. Microcirculation in Hypertension: A New Target for Treatment? *Circulation* 2001; 104: 735–740.
5. 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: 1232–5.
6. Horowitz JR, Rivard A, van der Zee R, Hariawala M, Sheriff DD, Esakof DD et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor produces nitric oxide-dependent hypotension. Evidence for a maintenance role in quiescent adult endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2793–800.
7. Shulman K, Rosen S, Tognazzi K, Manseau EJ, Brown LF. Expression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) is altered in many glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 661–6.
8. Eknoyan G, Lameire N. "KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease." *Kidney Int* 3 (2013): 5-14.
9. Allanore Y, Borderie D, Airo P, Guiducci S, Czirják L, Nasonov EL et al. Lack of association between three vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and systemic sclerosis: results from a multicenter EUSTAR study of European Caucasian patients. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 257–9.
10. Qi M, Huang X, Zhou L, Zhang J. Four polymorphisms of VEGF (+405C>G, -460T>C, -2578C>A, and -1154G>A) in susceptibility to psoriasis: a meta-analysis. *DNA Cell Biol* 2014; 33: 234–44.
11. Hansen TF, Spindler K-LG, Lorentzen KA, Olsen DA, Andersen RF, Lindebjerg J et al. The importance of -460 C/T and +405 G/C single nucleotide polymorphisms to the function of vascular endothelial growth factor A in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 751–8.

12. Han X, Liu L, Niu J, Yang J, Zhang Z, Zhang Z. Association between VEGF polymorphisms (936c/t, -460t/c and -634g/c) with haplotypes and coronary heart disease susceptibility. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 922–7.
13. Palmirotta R, Ferroni P, Ludovici G, Martini F, Savonarola A, D'Alessandro R, Raparelli V, Proietti M, Scarno A, Riondino S, Basili S, and Guadagni F, “VEGF-A gene promoter polymorphisms and microvascular complications in patients with essential hypertension.” *Clin. Biochem.*, vol. 43, no. 13–14, pp. 1090–5, Sep. 2010.
14. Kim YR and Hong S-H, “The Protective Effects of the VEGF -2578C>A and -1154G>A Polymorphisms Against Hypertension Susceptibility.” *Genet. Test. Mol. Biomarkers*, vol. 19, no. 9, pp. 476–80, Sep. 2015.
15. Hamedian AA, Esteghamati A, Noshad S, Mozafari M, Moin-Tavakkoli H, Nakhjavani M, Mahmoudi T, Nikzamir M, Safary R, and Nikzamir A, “Vascular endothelial growth factor (VEGF) +405 C/G polymorphism is associated with essential hypertension in a population from Tehran of Iran.” *Mol. Biol. Rep.*, vol. 39, no. 5, pp. 6213–8, May 2012.
16. Van Zonneveld AJ., J. Rabelink T.” Endothelial progenitor cells: biology and therapeutic potential in hypertension;” *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*; 15:167–172; 2006;
17. Khakoo AY, Finkel T. Endothelial progenitor cells. *Annu Rev Med* 2005; 56: 79–101.
18. Shantsila E, Watson T, Tse H-F, Lip GYH. New insights on endothelial progenitor cell subpopulations and their angiogenic properties. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 669–71.
19. Hajitou A, Grignet C, Devy L, Berndt S, Blacher S, Deroanne CF, Bajou K, Fong T, Chiang Y, Foidart J-M, and Noël A, “The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells.” *FASEB J.*, vol. 16, no. 13, pp. 1802–4, Nov. 2002.
20. DeSouza C., Dengel D., Macko R., Cox K., Seals D.; Elevated Levels of Circulating Cell Adhesion Molecules in Uncomplicated Essential Hypertension; *American Journal of Hypertension*; 10:1335–1341; 1997;
21. Coban E, Timurağaoğlu A, and Ozdoğan M, “Endothelial dysfunction in patients with white coat hypertension.” *J. Hum. Hypertens.*, vol. 18, no. 1, pp. 71–2, Jan. 2004.
22. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130: 461–70.

ZAŁĄCZONE PRACE

1. **Małkiewicz A**, Myśliwska J, Skrzypkowska M, Słomiński B, Siebert J, Gutknecht P. [Vascular endothelial growth factor polymorphism \(-460 T/C\) is related to hypertension-associated chronic kidney disease.](#) *Clin Exp Hypertens.* 2016;38(5):469-75. DOI: 10.3109/10641963.2016.1148158.
IF: 1.307/ MNiSW: 15,000
2. **Małkiewicz A**, Skrzypkowska M, Słomiński B, Siebert J, Gutknecht P, Myśliwska J. [The GG genotype of the -152 G/A vascular endothelial growth factor \(VEGF\) polymorphism predisposes to hypertension-related chronic kidney disease.](#) *Mol Biol Rep.* 2016 Sep;43(9):967-75. DOI: 10.1007/s11033-016-4035-6.
IF: 1.698/ MNiSW: 20,000
3. **Małkiewicz A**, Słomiński B, Skrzypkowska M, Siebert J, Gutknecht P, Myśliwska J. [The GA genotype of the -1154 G/A vascular endothelial growth factor \(VEGF\) is protective against hypertension-related chronic kidney disease incidence.](#) *Mol Cell Biochem.* 2016 Jul;418(1-2):159-65. DOI: 10.1007/s11010-016-2741-y.
IF: 2.613/ MNiSW: 20,000

Sumarycznie: **IF: 5.618/ MNiSW: 55.0**

Badania były finansowane z grantu Narodowego Centrum Nauki o Nr 2011/01/B/NZ5/00345