© Коллектив авторов, 2020

Шевченко А.В., Коненков В.И., Прокофьев В.Ф., Королев М.А.,
Омельченко В.О.

Комбинации полиморфизмов гена фактора роста сосудистого эндотелия и генов его рецепторов (*VEGF/VEGFR*) в оценке сердечно-сосудистого риска у пациентов с ревматоидным артритом

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», 630060, г. Новосибирск, Российская Федерация

Резюме

Введение. Риск развития сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с ревматоидным артритом (РА) значительно повышен. Основные факторы развития сердечно-сосудистого риска (ССР) данный феномен полностью объяснить не могут, поэтому анализируются и особенности системных воспалительных процессов, характерных для РА. Один из важных факторов иммунопатогенеза РА – нарушение синовиального ангиогенеза, которому могут способствовать особенности ангиогенной передачи сигналов, в том числе между фактором роста эндотелия сосудов VEGF и системой его рецепторов VEGFR.

Цель исследования – анализ однонуклеотидных полиморфизмов гена *VEGF* (rs699947, rs3025039), его рецепторов – *KDR* (rs10020464, rs11133360), *NRP-2* (rs849530, rs849563, rs16837641) – и их комбинированной ассоциированности с повышенным ССР у пациентов с РА.

Материал и методы. Обследованы 135 пациентов с РА (медиана возраста – 55 лет, длительности заболевания – 7 лет). Увеличение ССР выявлено у 45,2 % пациентов. Генотипирование осуществляли с использованием методов рестриктивного анализа продуктов амплификации и полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием TaqMan-зондов.

Результаты. Выявлены комплексные генотипы, частота которых повышена в группе пациентов с увеличением ССР относительно пациентов с РА с низким ССР. Наибольшая вероятность формирования высокого ССР выявлена у носителей комплекса *KDR 14011TT:NRP2 13581TT:VEGF-2578CC*, а раннего проявления высокого ССР – у пациентов с генетическим комплексом *KDR 17693CC:KDR 14011TC:NRP2 13581TT:VEGF-2578CA: VEGF+936CC*. Выявлены и протективные генотипы у пациентов, которые обладают низким ССР даже при длительном течении РА.

Заключение. Полиморфные позиции генов медиаторов ангиогенеза синергично могут быть ассоциированы с определенным ССР у пациентов с РА.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; сердечно-сосудистые риски; полиморфизм гена *VEGF*; гены *VEGFR*; полиморфизм *KDR*; полиморфизм *NRP2*

Статья поступила 24.03.2020. Принята в печать 16.04.2020.

Для цитирования: Шевченко А.В., Коненков В.И., Прокофьев В.Ф., Королев М.А., Омельченко В.О. Комбинации полиморфизмов гена фактора роста сосудистого эндотелия и генов его рецепторов (*VEGF/VEGFR*) в оценке сердечно-сосудистого риска у пациентов с ревматоидным артритом. Иммунология. 2020; 41 (3): 206–214. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-206-214

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Иммунология ■ Том 41 ■ № 3 ■ 2020

Для корреспонденции
Шевченко Алла Владимировна –
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории
клинической иммуногенетики
ИЦиГ СО РАН,
Новосибирск, Российская Федерация
E-mail: shalla64@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0001-5898-950X>

Shevchenko A.V., Konenkov V.I., Prokof'ev V.F., Korolev M.A., Omelchenko V.O.

Combinations of polymorphisms in vascular endothelial growth factor gene and genes of its receptors (*VEGF/VEGFR*) at development of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis patients

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630060, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract

Introduction. Cardiovascular risk (CR) development in rheumatoid arthritis patients (RA) is considerably increased. Major factors of CR cannot explain the given phenomenon completely, therefore features of system inflammatory processes which it is characteristic for RA are analyzed. The considered of synovium angiogenesis and of angiogenic signaling pathways, including mediated by vascular endothelial growth factor VEGF and its receptors system VEGFR is one of the important factors of RA immunopathogenesis.

Aim. Analysis of single-nucleotide polymorphisms of *VEGF* (rs699947, rs3025039), its receptors *KDR* (rs10020464, rs11133360), *NRP-2* (rs849530, rs849563, rs16837641) genes and associations of their combinations with CR development at RA patients.

Material and methods. 135 RA patients (median age is 55 years, duration of disease is 7 years) are surveyed. The increase of CR is revealed at 45.2 % of patients. Genotyping was carried out with restriction analysis of fragment length polymorphism (RFLP) and Real-time PCR (RT-PCR) with TaqMan.

Results. The complex genotypes which frequency are increased in group of high cardiovascular risk patients concerning RA patients with low cardiovascular risk were revealed. The highest relations of chances of high CR development at carriers of complex *KDR 14011TT:NRP2 13581TT:VEGF-2578CC*, and early relations high CR at patients with *KDR 17693CC:KDR 14011TC:NRP2 13581TT:VEGF-2578CA: VEGF+936CC*. Protective genotypes, patients with which are steady against high CR development even at long current RA, are revealed also.

Conclusion. Polymorphic positions of angiogenesis mediators genes can in common influence change of certain CR at patients with RA.

Keywords: rheumatoid arthritis; cardiovascular risk; *VEGF* gene polymorphism; *VEGFR* genes; *KDR* polymorphism; *NRP2* polymorphism

For correspondence

Alla V. Shevchenko –
Dr.Sci., PhD

Leading Researcher,
Laboratory

of Clinical Immunogenetics,
Research Institute of Clinical
and Experimental Lymphology –

Branch of the Institute
of Cytology and Genetics,

Siberian Branch

of Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russian Federation

E-mail: shalla64@mail.ru

<http://orcid.org/0000-0001-5898-950X>

Received 24.03.2020. Accepted 16.04.2020.

For citation: Shevchenko A.V., Konenkov V.I., Prokof'ev V.F., Korolev M.A., Omelchenko V.O. Combinations of polymorphism in vascular endothelial growth factor gene and genes of its receptors (*VEGF/VEGFR*) at development of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis patients. *Immunologiya*. 2019; 41 (3): 206–14. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-206-214 (in Russian)

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Введение

Одним из самых распространенных и прогностически неблагоприятных аутоиммунных заболеваний в мире признан ревматоидный артрит (РА) [1]. При этом установлено, что риск развития сердечно-сосудистых осложнений в этой группе пациентов значительно повышен [2]. Показано, что в течение первых 10–15 лет от начала заболевания РА сердечно-сосудистая патология регистрируется более чем у 30 % пациентов, являясь основной причиной неблагоприятных исходов [3, 4]. В метаанализе, проведенном в 2012 г. [5], включавшем дан-

ные 14 обсервационных исследований с участием 41 490 пациентов, установлено, что наличие РА увеличивает общий риск сердечно-сосудистой патологии на 48 %, а риск инфаркта миокарда и инсульта повышается на 68 и 41 % соответственно. Наличие РА также способствует более раннему формированию хронической сердечной недостаточности [6].

В настоящее время среди исследователей нет четкого понимания особенностей механизмов, обуславливающих высокий сердечно-сосудистый риск (ССР) при РА. Традиционные факторы риска, такие как курение,

возраст, высокий индекс массы тела, уровни сахара и холестерина и др., в полной мере не объясняют развитие повышенного ССР у пациентов с патологией суставов. Поэтому анализируются и характерные для РА особенности системных воспалительных процессов [7, 8].

Одним из важных факторов иммунопатогенеза РА может считаться нарушение синовиального ангиогенеза, влияющего на степень васкуляризации синовиальной оболочки и внеклеточного матрикса. При этом важно, что эндотелиальная дисфункция, наблюдающаяся при патологическом ангиогенезе у пациентов с РА, играет значимую роль и при развитии сердечно-сосудистых нарушений [9, 10]. Одним из основных медиаторов регуляции ангиогенеза, играющих ангиогенную, воспалительную и деструктивную роль как при РА, так и при развитии сердечно-сосудистой патологии, признан фактор роста эндотелия сосудов (VEGF – Vascular endothelial growth factor) [10, 11]. Двойственная активность VEGF как стимулятора пролиферации, дифференцировки и функциональной активности эндотелиальных клеток и модулятора изменений проницаемости сосудов оказывает свое воздействие на отдельные звенья патогенеза РА. Уровни VEGF заметно выше в сыворотке и в синовиальной жидкости пациентов с РА, чем в популяционном контроле. При этом сывороточные концентрации VEGF у пациентов с РА коррелируют с уровнями С-реактивного белка, маркера воспаления и активности заболевания [12]. При кардиопатологии VEGF может действовать как на эндотелиальные клетки и быть основным регулятором миокардиального и коронарного ангиогенеза, так и оказывать цитопротективное, антиоксидантное и антиапоптотическое действие на кардиомиоциты [13]. Ряд клинических и доклинических данных свидетельствует о том, что патологическому ангиогенезу могут способствовать не только чрезмерный рост сосудов из-за неадекватного высвобождения ангиогенных факторов роста из кардиомиоцитов, тромбоцитов и воспалительных клеток, но и нарушение ангиогенной передачи сигналов, в том числе вследствие изменений структуры сигнальных молекул, ведущее к нарушению физиологического взаимодействия модуляторов ангиогенеза [13, 14]. Основные сигнальные пути опосредуются взаимодействием фактора роста эндотелия сосудов и его рецепторов (VEGF/VEGFR). Известны три тирозинкиназных рецептора на поверхности эндотелиальных клеток – VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR), VEGFR-3 (Flt-4) и два нетирозинкиназных трансмембранных рецептора, усиливающих активационный сигнал, но не обладающих способностью проводить его в клетку – нейропилины NRP-1 и NRP-2, причем NRP являются корецепторами VEGFR. VEGF А связывается с рецепторами VEGFR-1, VEGFR-2, а также с рецепторами NRP, но основные сосудистые и внесосудистые эффекты VEGF/VEGFR осуществляются в результате взаимодействия VEGF/VEGFR-2. Активизация VEGFR-2 ведет к увеличению пролиферации, миграции и дифференциации эндотелиальных клеток, повышению сосудистой проницаемости и мобилизации

предшественников эндотелиальных клеток из костного мозга. VEGFR-2 – основной медиатор ангиогенных и митогенных функций VEGF, уровень которого регулируется гипоксией. Он же является основным индуктором VEGF-транскрипции, но при этом может модулировать сигналы и изолировать белок VEGF, действуя как негативный регулятор ангиогенеза [14]. Показано, что нейропилины NRP-1 и NRP-2, функционируя как рецепторы некоторых гепарин-связанных форм VEGF, могут играть роль в сердечно-сосудистой биологии [15, 16]. Кроме того, NRP-2 может связываться с VEGFA в тримерных комплексах с VEGFR-2-рецептором, предположительно кооперативно взаимодействуя в эндотелиальных клетках [16, 17].

VEGF кодируется геном, расположенным на хромосоме 6p21.3 и состоящим из 8 экзонов. Его рецептор VEGFR-2 кодируется геном *KDR*, расположенным на хромосоме 4q11-q12, состоящим из 30 экзонов, NRP-2 – геном на хромосоме 2q33.3, состоящим из 20 экзонов. Гены являются полиморфными, вследствие чего может меняться активность и экспрессия их белковых продуктов, сила взаимодействия белков, что по ряду исследований существенно при развитии патологий [18–21].

Информация о влиянии полиморфизма генов сигнальной цепи *VEGF/VEGFR* на развитие сердечно-сосудистой патологии при РА представлена преимущественно для азиатских популяций и достаточно неоднозначна. Кроме того, данные о совместной ассоциированности нескольких полиморфных позиций анализируемых генов представлены единично. Рассматривая потенциально значимую роль полиморфизма *VEGF*, *KDR* и *NRP-2* в развитии ССР у пациентов с РА, мы исследовали ассоциацию 7 однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs): *VEGF* (rs699947, rs3025039), *KDR* (rs10020464, rs11133360), *NRP2* (rs849530, rs849563, rs16837641) генов, а также их комбинированную ассоциированность с определенным ССР у пациентов с РА.

Материал и методы

Пациенты. В исследование включены 135 пациентов с РА, находившихся на лечении в ревматологическом отделении клиники НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН. Все пациенты являлись жителями Новосибирской области, длительное время проживающими на территории Сибирского федерального округа, европеоидной внешности, идентифицирующих себя и своих родителей как русских. Диагноз РА соответствовал критериям ACR/EULAR 2010 г. Медиана возраста составила 55 лет [42; 61], длительности заболевания – 7 лет [4; 14]. Преобладали пациенты женского пола с умеренной и высокой активностью заболевания и продвинутыми рентгенологическими изменениями. Большинство пациентов были позитивными по ревматоидному фактору (РФ) и антителам к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП) (табл. 1).

Критерии исключения: наличие активного и латентного туберкулеза в анамнезе и на момент скрининга; вирусные гепатиты В и С в стадии умеренной и высокой

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов с ревматоидным артритом

Параметр	Значение
Возраст, <i>n</i> (%)	55 [42; 61]
Пол, <i>n</i> (%)	
мужской	18 (13,3)
женский	117 (86,7)
Длительность заболевания, годы	7 [4; 14]
СОЭ, мм/ч	26 [16; 42]
С-реактивный белок, мг/л	12,5 [4,66; 32,1]
Disease Activity Score по СОЭ (DAS28-СОЭ)	4,9 [3,7; 5,9]
Позитивность по РФ, <i>n</i> (%)	125 (92,6)
Позитивность по АЦЦП, <i>n</i> (%)	125 (92,6)
Встречаемость внесуставных проявлений, <i>n</i> (%)	60 (44,4)
Встречаемость ревматоидных узелков, <i>n</i> (%)	36 (26,7)
Рентген-стадия, <i>n</i> (%)	
I	8 (5,9)
II	51 (37,8)
III	46 (34,1)
IV	30 (22,2)
Встречаемость атеросклеротической бляшки, <i>n</i> (%)	32 (23,7)
Увеличение сердечно-сосудистого риска, <i>n</i> (%)	61 (45,2)

Примечание. СОЭ – скорость оседания эритроцитов; РФ – ревматоидный фактор; АЦЦП – антитела к циклическому цитруллинированному пептиду.

степени активности; текущее онкологическое заболевание; РА как исход ювенильного хронического артрита с возрастом дебюта до 16 лет; обострение любого другого хронического заболевания помимо РА. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом НИИКЭЛ. Пациенты подписывали добровольное информированное согласие перед включением в исследование. Всем пациентам выполнялось ультразвуковое исследование брахиоцефальных артерий (УЗИ БЦА) с применением триплексного сканирования: В-режим с цветовым доплеровским картированием (ЦДК) и импульсно-волновая доплерография на аппарате Vivid 7 Dimension (General Electric) с применением линейного датчика (7–12 МГц). Верификация наличия атеросклеротической бляшки (АСБ) проводилась при локальном утолщении комплекса «интима–медиа» более 1,5 мм. Увеличение сердечно-сосудистого риска регистрировалось при наличии АСБ по УЗИ БЦА и при высоком/очень высоком риске по шкале SCORE с модифицирующим коэффициентом $\times 1,5$. Увеличение сердечно-сосудистого риска выявлено у 45,2 % пациентов, а атеросклеротическое поражение БЦА – у 23,7 %.

Генотипирование. Генотипирование полиморфизма промоторного региона гена *VEGF-2578 C→A* (rs699947) осуществляли методом рестриктивного анализа продуктов амплификации (ПДРФ-анализ) с использованием специфичных праймеров: прямой 5'-GGGCCTTAGGACACCATACC-3' и обратный 5'-TGCCCCAGGGAACAAAGT-3'. Полученный амплификат 267 п. н. гидролизировали эндонуклеазой рестрикции *BglII* (СибЭнзим, Новосибирск). Электрофорез проводили в 2,5 % агарозном геле. Полученные фрагменты 208 и 60 п. н. соответствовали аллельному варианту

VEGF-2578 A. SNP-полиморфизмы генов *VEGF+936 C→T*, (rs3025039), *NRP2 13581 T→G* (rs849530), *NRP2 68279 A→C* (rs849563), *NRP2 92646 G→A* (rs16837641), *KDR 17693 C→T* (rs10020464) и *KDR 14011 T→C* (rs11133360) анализировали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием коммерческих тест-систем методом TaqMan-зондов (Синтол, Россия) на амплификаторе «ДТ-96» (ДНК-Технология), согласно инструкции фирмы-производителя.

Статистическая обработка. При статистическом анализе результатов исследований использовали такие показатели, как частота встречаемости генотипов, отношение шансов (ОШ) с расчетом 95 % доверительного интервала (95 % ДИ). Расчет величины ОШ проводили по методу Вульфа–Холдейна. Частоту встречаемости отдельных генотипов определяли как процентное отношение индивидов, несущих генотип, к общему числу обследованных в группе по формуле:

$$f = n/N,$$

где *n* – кратность встречаемости генотипа, *N* – число обследованных. Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга. Достоверность различий частот распределения изучаемых признаков в альтернативных группах определяли по двустороннему варианту точного метода Фишера для четырехпольных таблиц.

Результаты

Проанализированы особенности однонуклеотидного полиморфизма генов регуляции ангиогенеза *VEGF*

(rs699947, rs3025039), *KDR* (rs10020464, rs11133360), *NRP2* (rs849530, rs849563, rs16837641) у пациентов с РА при наличии или отсутствии высокого ССР. Частоты генотипов анализируемых генов в группах соответствовали равновесию Харди–Вайнберга. Распределение генотипов проанализированных единичных полиморфных позиций значимо не отличалось между группами.

Учитывая возможное синергетическое влияние нескольких полиморфных позиций одного гена на изменение уровня его активности и то, что при образовании трехмерных комплексов медиаторов VEGF/VEGFR-2/NRP-2 полиморфная структура кодирующих их генов может отражаться на эффективности взаимодействий белковых продуктов, мы проанализировали частоту встречаемости комплекса полиморфных вариантов генов, выявляемых в геноме обследованных пациентов (табл. 2).

Из программно проанализированного огромного количества возможных комбинаций анализируемых полиморфных позиций выявлено три комплексных генотипа, частота которых значительно повышена в группе пациентов с наличием высоких ССР. Один из них – *NRP2 13581GT:NRP2 92646GA:NRP2 68279AA* – объединяет все исследуемые позиции тирозинкиназного рецептора *NRP-2*, еще один – три аналогичные предыдущему комплексу позиции рецептора *NRP-2* и одну из позиций тирозинкиназного рецептора *KDR*: *KDR 17693CC:NRP2 13581GT:NRP2 92646GA:NRP2 68279AA*. Наиболее высокое соотношение шансов у обследованных пациентов с высоким ССР выявлено в комплексе *KDR 14011TT:NRP2 13581TT:VEGF-2578CC* (ОШ = 9,38; $P = 0,0074$). Два выявленных нами генотипа, напротив, являются протективными в отношении риска развития сосудистых осложнений.

Учитывая, что длительность РА влияет на развитие ССР, мы предположили, что полиморфизм генетической структуры ангиогенных медиаторов может быть ассоциирован с определенными ССР в зависимости от стажа РА, и выделили группы пациентов с длитель-

ностью РА менее 15 лет при наличии высоких ССР и аналогичную группу с низким ССР (табл. 3). С повышением ССР при небольшом стаже РА оказались ассоциированы шесть сложных генетических комплексов, один из которых – *KDR 17693CC : NRP2 13581GT : NRP2 92646GA : NRP2 68279AA* – непосредственно является фактором высокого ССР у пациентов с РА. Наибольшее значение шанса формирования высокого ССР при небольшом стаже РА у пациентов с генетическим комплексом *KDR 17693CC : KDR 14011TC : NRP2 13581TT : VEGF-2578CA : VEGF+936CC* (ОШ = 8,70; $P = 0,0137$), включающим обе анализируемые позиции гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF*. Данный генотип выявлен только у пациентов с увеличением ССР с частотой более 11 %, при этом он ни разу не встретился в группе с низким ССР. Примечательно, что в состав всех комплексов входит полиморфный генотип *KDR 17693CC*, а в состав пяти комплексов – комбинация генотипов этого гена *KDR 17693CC : KDR 14011TC*.

Выявлены также протективные простые и сложные генотипы, пациенты с их наличием имеют низкий ССР даже при длительном течении РА (табл. 4). При этом данные генотипы встречаются в группе с течением РА более 15 лет с достаточно высокой частотой (18,75–31,25 %) и чрезвычайно редки у пациентов с высоким уровнем ССР при небольшом стаже РА (0–9 %).

Обсуждение

Повышение риска развития сердечно-сосудистых заболеваний является доказанным осложнением, выявляемым у пациентов с патологией суставов. Данный феномен не может быть однозначно объяснен влиянием традиционных факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, поэтому есть мнения, что это может быть проявлением системных особенностей развития РА. Показано, что многие ключевые патогенетические медиаторы РА являются и важнейшими факторами, способствующими развитию дисфункции эндотелия и прогрессированию сердечно-сосудистого поражения. Имеющиеся экспериментальные и клиничес-

Таблица 2. Особенность распределения частот генотипов генов *VEGF* и его рецепторов *KDR* и *NRP2* у пациентов с ревматоидным артритом (РА) и наличием/отсутствием увеличения сердечно-сосудистого риска (ССР)

Полиморфная позиция	Генотип	Пациенты с РА и высоким ССР (n = 61)	Пациенты с РА и низким ССР (n = 74)	ОШ	ОШ 95 % ДИ	P_TMF2
Сложные генотипы, позитивно ассоциированные с высоким ССР						
<i>KDR 14011:NRP2 13581:VEGF-2578</i>	TT-TT-CC	6 (9,84)	0 (0,00)	9,38	1,12–78,40	0,0074
<i>NRP2 13581:NRP2 92646:NRP2 68279</i>	GT-GA-AA	17 (27,87)	9 (12,16)	2,79	1,14–6,82	0,0281
<i>KDR 17693:NRP2 13581:NRP2 92646:NRP2 68279</i>	CC-GT-GA-AA	13 (21,31)	6 (8,22)	3,02	1,07–8,52	0,0452
Сложные генотипы, негативно ассоциированные с высоким ССР						
<i>NRP2 13581:NRP2 92646</i>	GT-GG	9 (14,75)	22 (29,73)	0,41	0,17–0,97	0,0427
<i>NRP2 13581:NRP2 92646:VEGF+936</i>	GT-GG-CT	1 (1,64)	10 (13,51)	0,11	0,01–0,86	0,0123

Примечание. Здесь и в табл. 2–4: N – число обследованных пациентов; ОШ – отношение шансов; ОШ 95 % ДИ – 95 % доверительный интервал для ОШ; P_TMF2 – значимость различий по 2-стороннему варианту точного метода Фишера.

Таблица 3. Особенности распределения частот генотипов генов *VEGF* и его рецепторов *KDR* и *NRP2* у пациентов с ревматоидным артритом (РА) длительностью менее 15 лет в зависимости от уровня сердечно-сосудистого риска (ССР)

Полиморфная позиция	Генотип	Пациенты с РА <15 лет и высоким ССР <i>n</i> = 44 (%)	Пациенты с РА <15 лет и низким ССР <i>n</i> = 58 (%)	ОШ	ОШ 95 % ДИ	P_TMF2
KDR 17693:KDR 14011: VEGF-2578	CC-TC-CA	12 (27,27)	6 (10,53)	3,19	1,09–9,34	0,0372
KDR 17693:KDR 14011: NRP2 13581:VEGF+936	CC-TC-TT-CC	7 (15,91)	2 (3,51)	5,20	1,02–26,44	0,0388
KDR 17693:KDR 14011: NRP2 92646:VEGF-2578	CC-TC-GA-CA	9 (20,45)	3 (5,26)	4,63	1,17–18,29	0,0285
KDR 17693:KDR 14011: NRP2 68279:VEGF-2578	CC-TC-AA-CA	11 (25,00)	5 (8,77)	3,47	1,10–10,88	0,0316
KDR 17693:NRP2 13581: NRP2 92646:NRP2 68279	CC-GT-GA-AA	11 (25,00)	5 (8,77)	3,47	1,10–10,88	0,0316
KDR 17693:KDR 14011: NRP2 13581:VEGF-2578: VEGF+936	CC-TC-TT-CA-CC	5 (11,36)	0 (0,00)	8,70	1,01–75,06	0,0137

кие данные позволяют считать, что связующим звеном между эндотелиальной дисфункцией и ускорением процессов атерогенеза, наблюдаемыми при РА, являются в том числе особенности ангиогенеза и ремоделирования сосудистой стенки. Важное значение фактора роста эндотелия сосудов и системы его рецепторов, а также значимость нарушения регуляции сигнального пути *VEGF/VEGFR* показаны как при патогенезе РА, так и при развитии сердечно-сосудистых заболеваний [9, 22].

Экспрессия генов *VEGF*, *KDR* и *NRP*, а также активность соответствующих белков могут быть следствием полиморфизма кодирующих и некодирующих регионов генов. SNPs промоторного региона и 3'-некодирующего региона гена влияют на потенциальные регуляторные элементы и способствуют вариативности продукции *VEGF* в тканях и концентрации плазматического запаса белка. SNPs, расположенные в экзонах генов *KDR* и *NRP*, определяют эффективность связывания *VEGF* с его рецепторами. Функция полиморфизма интронов на сегодняшний день не полностью ясна. Например,

в одном из исследований показано, что некорректное полиаденилирование в интронном сайте polyA (PAS), которое в норме является неотъемлемой частью процессинга мРНК и необходимо для обеспечения эффективного экспорта, трансляции и стабильности мРНК-транскриптов, приводит к образованию укороченных зрелых мРНК и изоформам белка. Эти варианты стабильны и хорошо экспрессируются, но поскольку усечение может приводить к тому, что белкам станет не хватать необходимых С-концевых доменов, функция этих изоформ часто резко отличается от их полноразмерных аналогов. Это очевидно в процессинге трансмембранных белков, таких, как рецепторные тирозинкиназы, где использование восходящей интронной PAS может генерировать растворимые изоформы, лишенные якорного трансмембранного домена и функции внутриклеточной киназы. Такие растворимые изоформы могут сохранять связывание лиганда с высокой аффинностью и действовать как доминантно-негативные регуляторы сигнального пути [23]. Кроме того, интронные SNP могут способствовать ошибкам сплайсинга, приводя к не-

Таблица 4. Особенности распределения частот генотипов генов *VEGF* и его рецепторов *KDR* и *NRP2* у пациентов с РА длительностью менее 15 лет и наличием высокого ССР против группы пациентов с длительным течением РА и низким уровнем ССР

Полиморфная позиция	Генотип	Пациенты с РА < 15 лет и высоким ССР <i>n</i> = 44 (%)	Пациенты с РА ≥ 15 лет и низким ССР <i>n</i> = 16 (%)	ОШ	ОШ 95 % ДИ	P_TMF2
NRP2 13581	GG	4 (9,09)	5 (31,25)	0,22	0,05–0,96	0,0481
KDR 17693 : NRP2 13581	CT-GG	0 (0,00)	3 (18,75)	0,08	0,01–0,75	0,0164
KDR 14011 : NRP2 68279	CC-AC	0 (0,00)	3 (18,75)	0,08	0,01–0,75	0,0164
NRP2 13581 : NRP2 68279	GG-AA	2 (4,55)	4 (25,00)	0,14	0,02–0,88	0,0384
NRP2 68279 : VEGF-2578	AC-AA	0 (0,00)	3 (18,75)	0,08	0,01–0,75	0,0164
KDR 14011 : NRP2 13581 : NRP2 68279	TT-GG-AA	0 (0,00)	3 (18,75)	0,08	0,01–0,75	0,0164
NRP2 13581 : NRP2 68279:VEGF + 936	GG-AA-CT	0 (0,00)	3 (18,75)	0,08	0,01–0,75	0,0164

правильному удалению интрона и вызывая изменения открытой рамки считывания. Исследования последних лет подчеркнули обилие и важность сплайсинговых мутаций в этиологии наследственных и мультифакторных заболеваний [24, 25]. Ассоциированность с патологиями на сегодняшний день выявляется для различных полиморфных локусов генов [18]. В нашем исследовании мы не обнаружили разницы в частотах распределения единичных генотипов в анализируемых позициях между группами пациентов с РА с высоким и низким ССР. Только *NRP2 13581GG*-генотип являлся протективным в отношении развития сердечно-сосудистых осложнений при длительном течении РА. Результаты некоторых исследований указывают на возможную роль полиморфизмов rs699947 и rs3025039 регуляторных регионов *VEGF* в развитии сердечно-сосудистых осложнений, но преимущественно в азиатских популяциях [26, 27].

Предполагается, что *KDR* играет важную роль в развитии и формировании сетей кровеносных сосудов. Именно после связывания VEGF с VEGFR-2 активизируются ранние каскады передачи сигналов в эндотелиальных клетках [28]. Обе полиморфные позиции гена *KDR*, проанализированные нами, являются интронными: *KDR* rs11133360 – в третьем, *KDR* rs10020464 – в седьмом интроне гена (по данным базы NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Значимость полиморфизма этих позиций показана для ряда заболеваний, особенностей их течения или эффективности лечения. Некоторыми авторами выявлен синергический эффект нескольких полиморфных позиций в гаплотипах или генотипах [29–31]. Показана ассоциированность с повреждениями коронарных артерий у пациентов с РА для полиморфного сайта rs11133360 гена *KDR* [32] и негативная корреляция между уровнем экспрессии гена и минорным аллелем *C* в данной полиморфной позиции [30].

Трансмембранный нетирозинкиназный гликопротеин NRP-2 принимает участие в различных физиологических процессах, в том числе в ангиогенезе [33]. Связь с различными патологиями показана для всех анализируемых нами полиморфных позиций гена, из которых, по данным базы NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>, rs16837641 и rs849530 являются интронными, а rs849563 расположен в кодирующем регионе гена *NRP2* и является синонимичной (молчащей) мутацией, при которой SNPs не приводят к изменению аминокислотной последовательности кодируемого белка,

что является результатом вырожденности кода (при замене *NRP 168279C* кодируется Pro 558) [34–36]. Хотя большинство синонимичных SNPs не изменяют функцию белков, первичная последовательность и структура мРНК влияют на аффинность мРНК-связывающих факторов и синонимичные кодоны могут влиять на формирование вторичной структуры мРНК и характер последующих комплексов [37]. На сегодняшний день нет понимания основных молекулярных механизмов, с помощью которых синонимичные SNPs могут способствовать развитию заболеваний, однако появляется все больше данных, указывающих на связь синонимичных мутаций с патологиями [38–41].

Несомненно, важными являются и мультивариантные взаимодействия между генами, проанализированные нами, поскольку сведения о геномных отношениях дают основу для большой области сетевых медицинских исследований, освещающей многофакторную природу болезней. Кроме того, при низком вкладе отдельных геномных изменений именно комплексные генетические особенности как на уровне одного гена, так и между функционально-интегрированными генами дают более полную картину их связи с патогенезом заболевания. В последние годы именно сетевые подходы предлагаются для изучения как связей между заболеваниями человека и отношениями между их эффекторными генами, так и выявлению общих генетических изменений для различных заболеваний [42–44].

Заключение

Полученные нами данные являются приоритетными в плане представления полиморфизма комплекса *VEGF/VEGFR* при РА и в оценке ССР при РА для популяций европеоидного происхождения и для пациентов русской национальности. Кроме того, обращает на себя внимание и практически десятикратное превышение частоты встречаемости комбинированного генетического признака «*KDR 14011:NRP2 13581:VEGF-2578*» в группе пациентов с РА с высоким ССР, что может быть использовано в качестве дополнительного критерия персонализированного прогноза раннего развития этого варианта течения клинически полиморфного РА. Перспективными для дальнейших исследований можно считать и полученные достоверные данные об увеличении распространения ряда комбинированных генетических признаков у пациентов с ранним увеличением ССР.

Литература

1. Hodkinson B., Tikly M., Adebajo A. Rheumatoid arthritis in the developing world: stepping up to the challenge. *Clin. Rheumatol.* 2014; 33 (9): 1195–6. DOI: 10.1007/s10067-014-2690-3.
2. Radner H., Lesperance T., Accortt N., Solomon D. Incidence and prevalence of cardiovascular risk factors among patients with rheumatoid arthritis, psoriasis, or psoriatic arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2017; 69 (10): 1510–8. DOI: 10.1002/acr.23171.
3. Насонов Е.Л., Каратеев Д.Е., Сатыбалдыев А.М. Ревматоидный артрит в Российской Федерации по данным Российского регистра больных артритом (сообщение I). *Научно-практическая ревматология*. 2015; 5: 472–84. DOI: 10.14412/1995-4484-2016-50-62.
4. Mulumba C., Lebughe P., Mbuyi-Muamba J.-M., Makulo J.-R., Lepira F., Mukaya J. et al. Prevalence and associated factors of subclinical athero-

sclerosis in rheumatoid arthritis at the university hospital of Kinshasa. *BMC Rheum.* 2019; 3: 37. DOI: 10.1186/s41927-019-0085-4.

5. Avina-Zubieta J.A., Thomas J., Sadatsafavi M., Lehman A.J., Lacaille D. Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum. Dis.* 2012; 71 (9): 1524–9. DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-200726.

6. Garza-García C., Rocio S.S., Orea-Tejeda A., Castillo-Martínez L., Eduardo C., López-Campos J.L. et al. Risk factors for asymptomatic ventricular dysfunction in rheumatoid arthritis patients. *ISRN Cardiol.* 2013; 2013: 635439. DOI: 10.1155/2013/635439.

7. Jagpal A., Navarro-Millán I. Cardiovascular co-morbidity in patients with rheumatoid arthritis: a narrative review of risk factors, cardiovascular risk assessment and treatment. *BMC Rheum.* 2018; 2: 10. DOI: 10.1186/s41927-018-0014-y.

8. Skeoch S., Bruce I.N. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: is it all about inflammation? *Nat. Rev. Rheumatol.* 2015; 11 (7): 390–400. DOI: 10.1038/nrrheum.2015.40.
9. Sarli B., Baktir A.O., Cebicci M., Dogan Y., Demirbas M., Kurtul S. et al. Predictors of endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. *Angiology.* 2014; 65 (9): 778–82. DOI: 10.1177/0003319713504485.
10. Moraga A., Lao K.H., Zeng L. Angiogenesis and Cardiovascular Diseases: The Emerging Role of HDACs, Physiologic and Pathologic Angiogenesis – Signaling Mechanisms and Targeted Therapy. Dan Simionescu and Agneta Simionescu. IntechOpen. 2017. DOI: 10.5772/66409. URL: <https://www.intechopen.com/books/physiologic-and-pathologic-angiogenesis-signaling-mechanisms-and-targeted-therapy/angiogenesis-and-cardiovascular-diseases-the-emerging-role-of-hdacs>.
11. Paradowska-Gorycka A., Pawlik A., Romanowska-Prochnicka K., Haladyj E., Malinowski D., Stypinska B. et al. Relationship between VEGF gene polymorphisms and serum VEGF protein levels in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2016; 11 (8): e0160769. DOI: 10.1371/journal.pone.0160769.
12. Elshabrawy H.A., Chen Z., Volin M.V., Ravella S., Virupannavar S., Shahrara S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Review Paper. Angiogenesis.* 2015; 18: 433–48. DOI: 10.1007/s10456-015-9477-2.
13. Gogiraju R., Bochenek M.L., Schäfer K. Angiogenic endothelial cell signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Review article. Front. Cardiovasc. Med.* 2019; 6: 20. DOI: 10.3389/fcvm.2019.00020.
14. Azizi G., Boghiozian R., Mirshafiey A. The potential role of angiogenic factors in rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* 2014; 17: 369–83. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/1756-185X.12280>.
15. Gluzman-Poltorak Z., Cohen T., Shibuya M., Neufeld G. Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes. *J. Biol. Chem.* 2001; 276 (22): 18 688–94. DOI: 10.1074/jbc.M006909200.
16. Tsai Y.C., Fotinou C., Rana R., Yelland T., Frankel P., Zachary I. et al. Structural studies of neuropilin-2 reveal a zinc ion binding site remote from the vascular endothelial growth factor binding pocket. *FEBS J.* 2016; 283 (10): 1921–34. DOI: 10.1111/febs.13711.
17. De Rosa L., Di Stasi R., D'Andrea L.D. Pro-angiogenic peptides in biomedicine. *Arch. Biochem. Biophys.* 2018; 660 (15): 72–86. DOI: 10.1016/j.ab.2018.10.010.
18. Cardoso J.V., Machado D.E., Ferrari R., Silva M.C., Berardo P.T., Perini J.A. Polymorphisms in VEGF and KDR genes in the development of endometriosis: a systematic review. *Rev. Bras. Saude Mater. Infant.* 2016; 16 (3): 219–32. DOI: 10.1590/1806-93042016000300002.
19. Yap R.W.K., Lin M.H., Shidoji Y., Yap W.S. Association of stress, mental health, and VEGFR-2 gene polymorphisms with cardiometabolic risk in Chinese Malaysian adults. *Nutrients.* 2019; 11 (5): 1140. DOI: 10.3390/nu11051140.
20. Li L., Pan Y., Dai L., Liu B., Zhang D. Association of genetic polymorphisms on vascular endothelial growth factor and its receptor genes with susceptibility to coronary heart disease. *Med. Sci. Monit.* 2016; 22: 31–40. DOI: 10.12659/MSM.895163.
21. Luo Y., Luo J., Peng H. Associations between genetic polymorphisms in the VEGFA, ACE, and SOD2 genes and susceptibility to diabetic nephropathy in the Han Chinese. *Genet. Test Mol. Biomarkers.* 2019; 23 (9): 644–51. DOI: 10.1089/gtmb.2018.0320.
22. Szekecz Z., Koch A.E. Vascular involvement in rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 2008; 10 (5): 224. DOI: 10.1186/ar2515.
23. Vorlova S., Rocco G., LeFave C.V., Jodelka F.M., Hess K., Hastings M.L. et al. Induction of antagonistic soluble decoy receptor tyrosine kinases by intronic polyA activation. *Mol. Cell.* 2011; 43: 927–39. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.08.009.
24. Vaz-Drago R., Custódio N., Carmo-Fonseca M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum. Genet.* 2017; 136 (9): 1093–111. DOI: 10.1007/s00439-017-1809-4.
25. Abramowicz A., Gos M. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J. Appl. Genet.* 2018; 59: 253–68. DOI: 10.1007/s13353-018-0444-7.
26. 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; 36 (3–4): 153–63. DOI: 10.1080/08977194.2018.1477141.
27. Ma W., Wang Y., Han X., Zhu Y., Liu N.-F. Association of genetic polymorphisms in vascular endothelial growth factor with susceptibility to coronary artery disease: a meta-analysis. *BMC Med. Genet.* 2018; 19: 108. DOI: 10.1186/s12881-018-0628-3.
28. Wang Y., Zheng Y., Zhang W., Yu H., Lou K., Zhang Y. et al. Polymorphisms of KDR gene are associated with coronary heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 50 (8): 760–7. DOI: 10.1016/j.jacc.2007.04.074.
29. Slattey M.L., Lundgreen A., Wolff R.K. VEGFA, FLT1, KDR and colorectal cancer: assessment of disease risk, tumor molecular phenotype, and survival. *Mol. Carcinog.* 2014; 53 (1): E140–50. DOI: 10.1002/mc.22058.
30. Dai X., Chen X., Hakizimana O., Mei Y. Genetic interactions between ANLN and KDR are prognostic for breast cancer survival. *Oncol. Rep.* 2019; 42 (6): 2255–66. DOI: 10.3892/or.2019.7332.
31. Allegrini G., Coltelli L., Orlandi P., Fontana A., Camerini A., Ferro A. et al. Pharmacogenetic interaction analysis of VEGFR-2 and IL-8 polymorphisms in advanced breast cancer patients treated with paclitaxel and bevacizumab. *Pharmacogenomics.* 2014; 15 (16): 1985–99. DOI: 10.2217/pgs.14.140.
32. Breunis W.B., Davila S., Shimizu C., Oharaseki T., Takahashi K., van Houdt M. et al. Disruption of vascular homeostasis in patients with Kawasaki disease. Involvement of vascular endothelial growth factor and angiopoietins. *Arthritis Rheum.* 2012; 64 (1): 306–15. DOI: 10.1002/art.33316.
33. Guo H.-F., Kooi C.W.V. Neuropilin functions as an essential cell surface receptor. *J. Biol. Chem.* 2015; 290: 29 120–6. DOI: 10.1074/jbc.R115.687327.
34. Leung G., Baggott C., West C., Elboim C., Paul S.M., Cooper B.A. et al. Cytokine candidate genes predict the development of secondary lymphedema following breast cancer surgery. *Lymphat. Res. Biol.* 2014; 12 (1): 10–22. DOI: 10.1089/lrb.2013.0024.
35. Miaskowski C., Dodd M., Paul S.M., West C., Hamolsky D., Abrams G. et al. Lymphatic and angiogenic candidate genes predict the development of secondary lymphedema following breast cancer surgery. *PLoS One.* 2013; 8 (4): e60164. DOI: 10.1371/journal.pone.0060164.
36. Hosseinpour M., Mashayekhi F., Bidabadi E., Salehi Z. Neuropilin-2 rs849563 gene variations and susceptibility to autism in Iranian population: a case-control study. *Metab. Brain Dis.* 2017; 32 (5): 1471–4. DOI: 10.1007/s11011-017-0024-2.
37. Mitchell S.F., Parker R. Principles and properties of eukaryotic mRNPs. *Mol. Cell.* 2014; 54 (4): 547–58. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.04.033.
38. Sharma Y., Miladi M., Dukare S., Boulay K., Caudron-Herger M., Groß M. et al. A pan-cancer analysis of synonymous mutations. *Nat. Commun.* 2019; 10: 2569. DOI: 10.1038/s41467-019-10489-2.
39. Chu D., Wei L. Nonsynonymous, synonymous and nonsense mutations in human cancer-related genes undergo stronger purifying selections than expectation. *BMC Cancer.* 2019; 19: 359. DOI: 10.1186/s12885-019-5572-x.
40. Borrás N., Orriols G., Batlle J., Pérez-Rodríguez A., Fidalgo T., Martinho P. et al. Unraveling the effect of silent, intronic and missense mutations on vwf splicing: contribution of next generation sequencing in the study of mRNA. *Haematologica.* 2019; 104: 587–98. DOI: 10.3324/haematol.2018.203166.
41. Dhamijaa S., Menon M.B. Non-coding transcript variants of protein-coding genes – what are they good for? *Review. RNA Biol.* 2018; 15 (8): 1025–31. DOI: 10.1080/15476286.2018.1511675.
42. Dozmorov M. Disease classification: from phenotypic similarity to integrative genomics and beyond. *Brief. Bioinform.* 2019; 20 (5): 1769–80. DOI: 10.1093/bib/bby049.
43. Kontou P.I., Pavlopoulou A., Dimou N.L., Pavlopoulos G.A., Bagos P.G. Network analysis of genes and their association with diseases. *Gene.* 2016; 590 (1): 68–78. DOI: 10.1016/j.gene.2016.05.044.
44. Mi Z., Guo B., Yin Z., Li J., Zheng Z. Disease classification via gene network integrating modules and pathways. *R. Soc. Open Sci.* 2019; 6 (7): 190214. DOI: 10.1098/rsos.190214.

■ References

1. Hodkinson B., Tikly M., Adebajo A. Rheumatoid arthritis in the developing world: stepping up to the challenge. *Clin. Rheumatol.* 2014; 33 (9): 1195–6. DOI: 10.1007/s10067-014-2690-3.
2. Radner H., Lesperance T., Accortt N., Solomon D. Incidence and prevalence of cardiovascular risk factors among patients with rheumatoid arthritis, psoriasis, or psoriatic arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2017; 69 (10): 1510–8. DOI: 10.1002/acr.23171.
3. Nasonov E.L., Karateev D.E., Satybaldyev A.M. Rheumatoid arthritis in Russian Federation according to the Russian register of patients with arthritis (message 1). *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya.* 2015; 5: 472–84. DOI: 10.14412/1995-4484-2016-50-62. (in Russian)
4. Mulumba C., Lebughe P., Mbuyi-Muamba J.-M., Makulo J.-R., Lepira F., Mukaya J., et al. Prevalence and associated factors of subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis at the university hospital of Kinshasa. *BMC Rheum.* 2019; 3: 37. DOI: 10.1186/s41927-019-0085-4.
5. Avina-Zubieta J.A., Thomas J., Sadatsafavi M., Lehman A.J., Lacaille D. Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann. Rheum. Dis.* 2012; 71 (9): 1524–9. DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-200726.
6. Garza-García C., Rocio S.S., Orea-Tejeda A., Castillo-Martínez L., Eduardo C., López-Campos J.L., et al. Risk factors for asymptomatic ventricular dysfunction in rheumatoid arthritis patients. *ISRN Cardiol.* 2013; 2013: 635439. DOI: 10.1155/2013/635439.

7. Jagpal A., Navarro-Millán I. Cardiovascular co-morbidity in patients with rheumatoid arthritis: a narrative review of risk factors, cardiovascular risk assessment and treatment. *BMC Rheum.* 2018;2: 10. DOI: 10.1186/s41927-018-0014-y.
8. Skeoch S., Bruce I.N. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: is it all about inflammation? *Nat. Rev. Rheumatol.* 2015; 11 (7): 390–400. DOI: 10.1038/nrrheum.2015.40.
9. Sarli B., Baktir A.O., Cebicci M., Dogan Y., Demirbas M., Kurtul S., et al. Predictors of endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. *Angiology.* 2014; 65 (9): 778–82. DOI: 10.1177/0003319713504485.
10. Moraga A., Lao K.H., Zeng L. Angiogenesis and Cardiovascular Diseases: The Emerging Role of HDACs, Physiologic and Pathologic Angiogenesis – Signaling Mechanisms and Targeted Therapy. Dan Simionescu and Agneta Simionescu. *IntechOpen.* 2017. DOI: 10.5772/66409. URL: <https://www.intechopen.com/books/physiologic-and-pathologic-angiogenesis-signaling-mechanisms-and-targeted-therapy/angiogenesis-and-cardiovascular-diseases-the-emerging-role-of-hdacs>.
11. Paradowska-Gorycka A., Pawlik A., Romanowska-Prochnicka K., Haladyj E., Malinowski D., Stypinska B., et al. Relationship between VEGF gene polymorphisms and serum VEGF protein levels in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2016; 11 (8): e0160769. DOI: 10.1371/journal.pone.0160769.
12. Elshabrawy H.A., Chen Z., Volin M.V., Ravella S., Virupannavar S., Shahara S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Review Paper. Angiogenesis.* 2015; 18: 433–48. DOI: 10.1007/s10456-015-9477-2.
13. Gogiraju R., Bochenek M.L., Schäfer K. Angiogenic endothelial cell signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Review article. Front. Cardiovasc. Med.* 2019; 6: 20. DOI: 10.3389/fcvm.2019.00020.
14. Azizi G., Boghazian R., Mirshafiey A. The potential role of angiogenic factors in rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* 2014; 17: 369–83. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/1756-185X.12280>.
15. Gluzman-Poltorak Z., Cohen T., Shibuya M., Neufeld G. Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes. *J. Biol. Chem.* 2001; 276 (22): 18 688–94. DOI: 10.1074/jbc.M006909200.
16. Tsai Y.C., Fotinou C., Rana R., Yelland T., Frankel P., Zachary I., et al. Structural studies of neuropilin-2 reveal a zinc ion binding site remote from the vascular endothelial growth factor binding pocket. *FEBS J.* 2016; 283 (10): 1921–34. DOI: 10.1111/febs.13711.
17. De Rosa L., Di Stasi R., D'Andrea L.D. Pro-angiogenic peptides in biomedicine. *Arch. Biochem. Biophys.* 2018; 660 (15): 72–86. DOI: 10.1016/j.abb.2018.10.010.
18. Cardoso J.V., Machado D.E., Ferrari R., Silva M.C., Berardo P.T., Perini J.A. Polymorphisms in VEGF and KDR genes in the development of endometriosis: a systematic review. *Rev. Bras. Saude Mater. Infant.* 2016; 16 (3): 219–32. DOI: 10.1590/1806-93042016000300002.
19. Yap R.W. K., Lin M.H., Shidoji Y., Yap W.S. Association of stress, mental health, and VEGFR-2 gene polymorphisms with cardiometabolic risk in Chinese Malaysian adults. *Nutrients.* 2019; 11 (5): 1140. DOI: 10.3390/nu11051140.
20. Li L., Pan Y., Dai L., Liu B., Zhang D. Association of genetic polymorphisms on vascular endothelial growth factor and its receptor genes with susceptibility to coronary heart disease. *Med. Sci. Monit.* 2016; 22: 31–40. DOI: 10.12659/MSM.895163.
21. Luo Y., Luo J., Peng H. Associations between genetic polymorphisms in the VEGFA, ACE, and SOD2 genes and susceptibility to diabetic nephropathy in the Han Chinese. *Genet. Test Mol. Biomarkers.* 2019; 23 (9): 644–51. DOI: 10.1089/gtmb.2018.0320.
22. Szekanecz Z., Koch A.E. Vascular involvement in rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 2008; 10 (5): 224. DOI: 10.1186/ar2515.
23. Vorlova S., Rocco G., LeFave C.V., Jodelka F.M., Hess K., Hastings M.L., et al. Induction of antagonistic soluble decoy receptor tyrosine kinases by intronic polyA activation. *Mol. Cell.* 2011; 43: 927–39. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.08.009.
24. Vaz-Drago R., Custódio N., Carmo-Fonseca M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum. Genet.* 2017; 136 (9): 1093–111. DOI: 10.1007/s00439-017-1809-4.
25. Abramowicz A., Gos M. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J. Appl. Genet.* 2018; 59: 253–68. DOI: 10.1007/s13353-018-0444-7.
26. 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; 36 (3–4): 153–63. DOI: 10.1080/08977194.2018.1477141.
27. Ma W., Wang Y., Han X., Zhu Y., Liu N.-F. Association of genetic polymorphisms in vascular endothelial growth factor with susceptibility to coronary artery disease: a meta-analysis. *BMC Med. Genet.* 2018; 19: 108. DOI: 10.1186/s12881-018-0628-3.
28. Wang Y., Zheng Y., Zhang W., Yu H., Lou K., Zhang Y., et al. Polymorphisms of KDR gene are associated with coronary heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 50 (8): 760–7. DOI: 10.1016/j.jacc.2007.04.074.
29. Slaterry M.L., Lundgreen A., Wolff R.K. VEGFA, FLT1, KDR and colorectal cancer: assessment of disease risk, tumor molecular phenotype, and survival. *Mol. Carcinog.* 2014; 53 (1): E140–50. DOI: 10.1002/mc.22058.
30. Dai X., Chen X., Hakizimana O., Mei Y. Genetic interactions between ANLN and KDR are prognostic for breast cancer survival. *Oncol. Rep.* 2019; 42 (6): 2255–66. DOI: 10.3892/or.2019.7332.
31. Allegrini G., Coltelli L., Orlandi P., Fontana A., Camerini A., Ferro A., et al. Pharmacogenetic interaction analysis of VEGFR-2 and IL-8 polymorphisms in advanced breast cancer patients treated with paclitaxel and bevacizumab. *Pharmacogenomics.* 2014; 15 (16): 1985–99. DOI: 10.2217/pgs.14.140.
32. Breunis W.B., Davila S., Shimizu C., Oharaseki T., Takahashi K., van Houdt M., et al. Disruption of vascular homeostasis in patients with Kawasaki disease. Involvement of vascular endothelial growth factor and angiopoietins. *Arthritis Rheum.* 2012; 64 (1): 306–15. DOI: 10.1002/art.33316.
33. Guo H.-F., Kooi C.W.V. Neuropilin functions as an essential cell surface receptor. *J. Biol. Chem.* 2015; 290: 29 120–6. DOI: 10.1074/jbc.R115.687327.
34. Leung G., Baggott C., West C., Elboim C., Paul S.M., Cooper B.A., et al. Cytokine candidate genes predict the development of secondary lymphedema following breast cancer surgery. *Lymphat. Res. Biol.* 2014; 12 (1): 10–22. DOI: 10.1089/lrb.2013.0024.
35. Miaskowski C., Dodd M., Paul S.M., West C., Hamolsky D., Abrams G., et al. Lymphatic and angiogenic candidate genes predict the development of secondary lymphedema following breast cancer surgery. *PLoS One.* 2013; 8 (4): e60164. DOI: 10.1371/journal.pone.0060164.
36. Hosseinpour M., Mashayekhi F., Bidabadi E., Salehi Z. Neuropilin-2 rs849563 gene variations and susceptibility to autism in Iranian population: a case-control study. *Metab. Brain Dis.* 2017; 32 (5): 1471–4. DOI: 10.1007/s11011-017-0024-2.
37. Mitchell S.F., Parker R. Principles and properties of eukaryotic mRNPs. *Mol. Cell.* 2014; 54 (4): 547–58. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.04.033.
38. Sharma Y., Miladi M., Dukare S., Boulay K., Caudron-Herger M., Groß M., et al. A pan-cancer analysis of synonymous mutations. *Nat. Commun.* 2019; 10: 2569. DOI: 10.1038/s41467-019-10489-2.
39. Chu D., Wei L. Nonsynonymous, synonymous and nonsense mutations in human cancer-related genes undergo stronger purifying selections than expectation. *BMC Cancer.* 2019; 19: 359. DOI: 10.1186/s12885-019-5572-x.
40. Borrás N., Orriols G., Batlle J., Pérez-Rodríguez A., Fidalgo T., Martinho P., et al. Unraveling the effect of silent, intronic and missense mutations on vwf splicing: contribution of next generation sequencing in the study of mRNA. *Haematologica.* 2019; 104: 587–98. DOI: 10.3324/haematol.2018.203166.
41. Dhamijaa S., Menon M.B. Non-coding transcript variants of protein-coding genes – what are they good for? *Review. RNA Biol.* 2018; 15 (8): 1025–31. DOI: 10.1080/15476286.2018.1511675.
42. Dozmorov M. Disease classification: from phenotypic similarity to integrative genomics and beyond. *Brief. Bioinform.* 2019; 20 (5): 1769–80. DOI: 10.1093/bib/bby049.
43. Kontou P.I., Pavlopoulou A., Dimou N.L., Pavlopoulos G.A., Bagos P.G. Network analysis of genes and their association with diseases. *Gene.* 2016; 590 (1): 68–78. DOI: 10.1016/j.gene.2016.05.044.
44. Mi Z., Guo B., Yin Z., Li J., Zheng Z. Disease classification via gene network integrating modules and pathways. *R. Soc. Open Sci.* 2019; 6 (7): 190214. DOI: 10.1098/rsos.190214.