

© О.Ф.Сибирева, Е.Ю.Хитринская, И.И.Иванчук, В.В.Калюжин, Л.И.Зибницкая, Л.М.Ткалич, Е.В.Калюжина, 2008
УДК 616.611-002-036.12:616.155.295]-02:575

*О.Ф. Сибирева¹, Е.Ю. Хитринская¹, И.И. Иванчук¹, В.В. Калюжин¹,
Л.И. Зибницкая¹, Л.М. Ткалич¹, Е.В. Калюжина¹*

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕРМИНИРОВАННОСТЬ ПОВЫШЕНИЯ ТРОМБОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ

*O.F. Simbirtseva, E.Yu. Khitrinskaya, I.I. Ivanchuk, V.V. Kalyuzhin,
L.I. Zibnitskaya, L.M. Tklich, E.V. Kalyuzhina*

GENETICALLY DETERMINED ELEVATION OF THROMBOGENIC POTENTIAL OF BLOOD IN PATIENTS WITH CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS

¹Кафедра госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины Сибирского государственного медицинского университета, г.Томск, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Изучение у больных хроническим гломерулонефритом частоты встречаемости и клинко-патогенетического значения протромботических генотипов, имеющих среди гематогенных тромбофилий наибольшую клиническую и прогностическую значимость. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Обследовали 180 больных хроническим гломерулонефритом (средний возраст 22,3±0,8 года). Наряду с полным клиническим и инструментальным обследованием, принятым в специализированной нефрологической клинике, с помощью метода полимеразной цепной реакции выполнена диагностика однонуклеотидной замены С677Т в гене метилентетрагидрофолатредуктазы, точечной мутации гена фактора V свертывания крови, а также мутации G20210А в 3'-нетранслируемой области гена фактора II свертывания крови (образцы геномной ДНК получали из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции). В контрольную группу вошло 100 здоровых лиц со сходными демографическими характеристиками. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Установлено, что изучаемые протромбогенные мутации встречаются у больных хроническим гломерулонефритом с большей частотой, чем среди здоровых лиц. Эти нуклеотидные замены ассоциированы с развитием у больных хроническим гломерулонефритом гиперкоагуляционного синдрома и повышением риска почечной недостаточности. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что по меньшей мере у части больных хроническим гломерулонефритом повышение тромбогенного потенциала крови генетически детерминировано.

Ключевые слова: хронический гломерулонефрит, протромботические генотипы, распространенность.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to study the occurrence and clinico-pathogenetic value of prothrombotic genotypes which are of the greatest clinical and prognostic value among hematogenic thrombophilias. **PATIENTS AND METHODS.** Examination was performed in 180 patients with chronic glomerulonephritis (mean age 22.3±0.8 years). In addition to complete clinical and instrumental examination used at the specialized nephrological clinic, with the help of polymerase chain reaction the diagnosis of a single nucleotide change of C677T in the gene of methylenetetrahydrofolate reductase, punctuated gene mutation of V factor of blood coagulation, and G20210A mutation in 3' nontranslated area of gene of II factor of blood coagulation (samples of genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes by the method of phenol-chloroform extraction). The control group included 100 healthy subjects with similar demographic characteristics. **RESULTS.** It was found that prothrombotic mutations under study can be found in patients with chronic glomerulonephritis more often than among healthy subjects. These nucleotide changes are associated with the development of hypercoagulation syndrome and high risk of renal failure in patients with chronic glomerulonephritis. **CONCLUSION.** The results of this investigation show that at least part of the patients with chronic glomerulonephritis have genetically determined elevation of thrombogenic potential of blood.

Key words: chronic glomerulonephritis, prothrombotic genotypes, occurrence.

ВВЕДЕНИЕ

По современным представлениям, в развитии хронического гломерулонефрита (ХГН) нарушения в системе гемостаза по значимости мало уступают иммунному патологическому процессу. От ха-

рактера и выраженности локальной и системной внутрисосудистой гиперкоагуляции, тесно связанной со сдвигами состояния гуморального и клеточно-опосредованного иммунитета, во многом зависят активность нефрита и скорость прогрессирования нефросклероза [1-4]. Однако, несмотря на то, что ХГН традиционно рассматривают как генетически детерминированное заболевание (в пер-

Калюжин В.В. Томск, ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет», тел.: (388-2) 64-66-83; E-mail: kalyuzhinvv@mail.ru

вую очередь имеют в виду иммунопатогенез), вопрос о наследственной предрасположенности к тромбообразованию у пациентов с иммунокомплексным нефритом остается открытым.

Целью настоящего исследования явилось изучение у больных хроническим гломерулонефритом частоты встречаемости и клинико-патогенетического значения протромботических генотипов, имеющих среди гематогенных тромбофилий наибольшую клиническую и прогностическую значимость.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В настоящей работе использованы данные, полученные при обследовании 180 больных ХГН (средний возраст $22,3 \pm 0,8$ года), среди которых преобладали мужчины (62,7%). В 1-ю группу вошло 90 больных без снижения (у всех более 80 мл/мин) скорости клубочковой фильтрации (СКФ), в том числе 30 – с изолированным мочевым синдромом, 45 – с гипертонической формой гломерулонефрита и 15 – с нефротическим синдромом. У 90 пациентов (2-я группа) диагностировали консервативную стадию хронической почечной недостаточности (депрессия СКФ до 40 мл/мин). За счет дизайна исследования («случай – контроль») удалось избежать статистически значимых различий между пациентами двух групп по основным демографическим и клиническим показателям. Так, продолжительность заболевания у пациентов 1-й и 2-й групп была идентичной (медиана 5 лет).

Для суждения о нормальных параметрах изучаемых показателей обследовано 100 здоровых лиц (контрольная группа) со сходными демографическими характеристиками.

Протоколом исследования (одобрен этическим комитетом ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава) предусматривались клинические и параклинические тесты, принятые в специализированной нефрологической клинике, которые включали методы оценки функционального состояния почек, коагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, нефровизуализации, а также закрытую пункционную биопсию почек.

Материалом для изучения частоты встречаемости однонуклеотидной замены С677Т в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (МТНFR), точечной мутации гена фактора V свертывания крови, получившей название FV Leiden (лейденская мутация), а также мутации G20210A в 3'-нетранслируемой области гена фактора II (FII) свертывания крови послужили образцы геномной ДНК, полученной из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции. Для выявления полиморфизма гена FII и FV Leiden, а

также для генотипирования варианта С677Т в гене МТНFR использовали метод полимеразной цепной реакции, с последующим рестрикционным анализом. Продукты амплификации и рестрикции разделяли с помощью электрофореза соответственно в 2%-ном агарозном и 7%-ном полиакриламидном гелях, окрашивая бромистым этидием.

Для статистической обработки данных применяли пакет программ БИОСТАТИСТИКА 4.03. Нулевую гипотезу о равенстве долей проверяли с помощью критериев χ^2 и Z. Статистическую значимость различий между количественными переменными определяли, используя критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони на количество анализируемых групп.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты анализа показателей, характеризующих состояние коагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, продемонстрировали, как и следовало ожидать, активацию механизмов гемокоагуляции и адгезивно-агрегационной функции тромбоцитов у больных ХГН, особенно у пациентов с нефротической формой заболевания. При этом большая частота встречаемости протромботических генотипов у больных ХГН, чем у лиц контрольной группы, по-видимому, может быть одним из объяснений межгрупповых различий в оценке показателей гемостаза (таблица).

Как видно из представленных в таблице данных, у пациентов 2-й группы установлена более высокая, чем у здоровых, частота нуклеотидных замен в гене МТНFR, которые, как известно [5, 6], ассоциированы с нарушением распределения фолатов в эритроцитах с накоплением формильных полиглутаматов, тетраглутамата, метилированных дериватов тетрагидрофолата и развитием гипергомоцистеинемии. Важно отметить, что гетерозиготный вариант полиморфизма С677Т гена МТНFR встречался наиболее часто у больных ХГН с нефротическим синдромом (у 9 из 15 пациентов).

Синдром гиперкоагуляции у больных ХГН с полиморфизмом С677Т гена МТНFR характеризовался изменением значений каолинового времени и протромбинового отношения. В.А. Добронравов и Р.В. Голубев [7] обозначили связанную с гипергомоцистеинемией тромбофилию у диализных больных как независимый фактор риска сердечно-сосудистых осложнений.

Вероятно, гетеро- и гомозиготный варианты полиморфизма С677Т гена МТНFR у пациентов с ХГН можно рассматривать в качестве предикторов неблагоприятного исхода заболевания. Так, по данным М. Fodinger и соавт. [8], носительство му-

тантного аллеля 677Т у больных ХГН сопряжено с высоким темпом утраты функционирующих нефронов, быстрым развитием терминальной стадии почечной недостаточности, требующей заместительной терапии. С учетом того, что основным органом выделения гомоцистеина являются почки, на конечном этапе развития хронической болезни почек концентрация этой содержащей серу аминокислоты в сыворотке крови становится еще выше (порочный круг) [9].

При анализе полиморфизма гена FV у пациентов 1-й и 2-й групп установлена большая, чем в контрольной группе, частота встречаемости аллеля 1691А, носительство которого предрасполагает к развитию тромбозов, связанных с врожденной резистентностью к активированному протеину С [9]. При этом гомозигот по мутантному аллелю гена FV ни в одном случае обнаружить не удалось. Лейденская мутация у больных ХГН, у которых наблюдались прокоагулянтные сдвиги состояния системы гемостаза (количество и агрегационная функция тромбоцитов, концентрация фибриногена, протромбиновое отношение, каолиновое время), была ассоциирована с высоким риском развития почечной недостаточности (отношение шансов – 5,71; доверительный интервал – 4,59; 7,28).

Распространение аллеля 20210А, при котором наблюдается повышенное образование протромбина, у больных 1-й и 2-й группы выше, чем у лиц контрольной группы. При этом как у больных ХГН, так и у здоровых встречался лишь гетерозиготный (G/A) вариант мутации гена фактора II свертывания крови. У пациентов с нефротической формой ХГН встречаемость мутации G20210А в 3'-нетранслируемой области гена FII достигала максимального уровня (у 9 из 15 пациентов).

Характерной сопряженности морфологической формы нефрита с каким-либо изучаемым вариантом генетической предрасположенности к гиперкоагуляции выявить не удалось.

При анализе генетической предрасположенности к гиперкоагуляции важно исключить, что обнаруживаемые протромбогенные аллели находятся в неравновесном сцеплении с другими генами [10]. Выявленное распределение изучаемых генотипов и частот мутантных аллелей у пациентов 1-й и 2-й групп и у здоровых соответствовало распределению, прогнозируемому с учетом закона равновесия Харди–Вайнберга.

ОБСУЖДЕНИЕ

Эпидемиология, патофизиология, клиническое и прогностическое значение генетически детерминированных гематогенных тромбофилий у больных

хронической болезнью почек в последние годы неоднократно становились предметом серьезных научных исследований. Однако результаты последних подчас противоречивы (клиническое и прогностическое значение генетической предрасположенности к гиперкоагуляции у пациентов с хронической нефропатией подтверждается далеко не всегда) [11,12] и, к сожалению, не позволяют ответить на все вопросы, которые интересуют нефрологов. Причин тому несколько.

Во-первых, материалом в большинстве исследований являлись пациенты с конечной стадией хронической болезни почек, получающие лечение хроническим программным гемодиализом или перенесшие трансплантацию почки [13–18], в то время как больным с нормальной скоростью клубочковой фильтрации внимания уделялось меньше [19]. В таких работах удалось убедительно показать связь между протромботическими генотипами и лабораторными признаками гиперкоагуляции, с одной стороны, а также риском развития венозных и артериальных тромбозов (в том числе в сосудах трансплантата и фистулы) – с другой, однако, по понятным причинам, нельзя получить оценку указанных нуклеотидных замен как предикторов развития хронической почечной недостаточности в популяции пациентов с доазотемической стадией нефрита. В настоящем исследовании сравнение частоты встречаемости Лейденской мутации в группах больных ХГН, сформированных в зависимости от функционального состояния почек, позволило определить отношение шансов того, что депрессия скорости клубочковой фильтрации разовьется в течение первых 10 лет заболевания у больных нефритом с генетическим дефектом, к таковым в группе пациентов, не имеющих замены гуанина на аденин в положении 1691. Нижняя граница доверительного интервала для отношения шан-

Полиморфизм генов в трех изученных локусах у больных 1-й, 2-й групп и здоровых лиц

Полиморфизм		Здоровые (n=100)	1-я группа (n=90)	2-я группа (n=90)
MTHFR C677T	C/C	63 (63%)	45 (50%)	39 (43%)*
	C/T	31 (31%)	39 (43%)	48 (53%)*
	T/T	6 (6%)	6 (7%)	3 (4%)
FV G1691A	G/G	94 (94%)	63 (70%)*	75 (83%)*
	G/A	6 (6%)	27 (30%)*	15 (17%)*
	A/A	–	–	–
FII G20210A	G/G	94 (94%)	69 (77%)*	75 (83%)*
	G/A	6 (6%)	21 (23%)*	15 (17%)*
	A/A	–	–	–

Примечание. Указано число обследованных с наличием изучаемого признака, в скобках – их доля (%) в выборочной совокупности. * – статистическая значимость ($p < 0,05$) различий со здоровыми лицами.

сов, превышающая единицу, свидетельствует о том, что вероятность развития почечной недостаточности у носителей Лейденской мутации статистически значимо выше.

Во-вторых, как правило, анализу подлежали данные о частоте встречаемости аллелей в каком-то одном локусе [11,12,20], между тем, с учетом достаточно высокой распространенности мутаций генов, определяющих состояние плазменных элементов системы гемостаза (см. таблицу), последние нередко сочетаются у одного пациента, что ассоциируется с амплификацией риска тромботических событий [21].

Наконец, следует принимать во внимание неодинаковую распространенность обозначенных выше протромботических генотипов, имеющих этнические и географические особенности, затрудняющих прямое сравнение данных о клиническом и прогностическом значении генетической предрасположенности к гиперкоагуляции у жителей разных регионов [22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мутации в генах (C677T в гене метилентетрагидрофолатредуктазы, G1691A в гене фактора V свертывания крови и G20210A в гене фактора II свертывания крови), связанных с состоянием коагуляционного потенциала крови, встречаются у больных хроническим гломерулонефритом с большей частотой, чем среди здоровых лиц.

Носительство мутаций генов факторов II и V свертывания крови, а также метилентетрагидрофолатредуктазы сопряжено с развитием у больных хроническим гломерулонефритом гиперкоагуляционного синдрома и повышением риска почечной недостаточности.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Тареева ИЕ, Мухин НА. Механизмы прогрессирования нефрита. В: Тареева ИЕ, ред. *Нефрология: руководство для врачей*. Том. 2. Медицина, М., 2000; 20-28
2. Рябов СИ. *Нефрология: руководство для врачей*. СпецЛит, СПб., 2000; 672
3. Шулутоко БИ. *Нефрология 2002. Современное состояние проблемы*. Ренкор, СПб., 2002; 780
4. Глессок РД, Бреннер БМ. Иммунопатогенетические механизмы повреждения почек. В: Браунвальд Е, Иссельбахер КДж, Петерсдорф РГ, ред. *Внутренние болезни*. Книга. 6. Медицина, М., 1995; 282-289
5. Спиридонова МГ, Степанов ВА, Пузырев ВП. О роли полиморфных вариантов гена 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. *Клин мед* 2001; (2): 10-16
6. Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y et al. The Frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism

is associated with a common haplotype in whites, japanese, and africans. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 758-762

7. Добронравов ВА, Голубев ПВ. Гипергомоцистеинемия – фактор риска сердечно-сосудистых поражений у диализных больных и в общей популяции. *Нефрология* 2004; (2): 44-49
8. Fodinger M, Mannhalter C, Wolf G et al. Mutation (677 C to T) in the methyltetrahydrofolate reductase gene aggravates hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1997; 52: 517-523
9. Момот АП. *Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики*. Форма Т, СПб., 2006; 208
10. Насонов ЕЛ. *Антифосфолипидный синдром*. Литтерра, М., 2004; 440
11. Irish A. The factor V Leiden mutation and risk of renal vein thrombosis in patients with nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 1680-1683
12. Aucella F, Margaglione M, Grandone E et al. On behalf of The Genetic Polymorphisms in Dialysis Study Group. The C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation does not influence cardiovascular risk in the dialysis population: results of a multicentre prospective study. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 20 (2): 382-386
13. Haviv YS, Shpichinetsky V, Goldschmidt N et al. The common mutations C677T and A1298C in the human methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Nephron* 2002; 92: 120-126
14. Morimoto K, Haneda T, Okamoto K et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism, hyperhomocysteinemia, and cardiovascular diseases in chronic hemodialysis patients. *Nephron* 2002; 90: 43-50
15. Quintana LF, Cofan F, Reverte JC et al. Renal cortical necrosis after kidney transplantation associated with the prothrombin 20210A mutation. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21 (5): 1455-1456
16. Irish A. Hypercoagulability in renal transplant recipients. Identifying patients at risk of renal allograft thrombosis and evaluating strategies for prevention. *Am J Cardiovasc Drugs* 2004; 4: 139-149
17. Heidenreich S, Junker R, Wolters H et al. Outcome of kidney transplantation in patients with inherited thrombophilia: data of a prospective study. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 234-239
18. Heidenreich S, Junker R, Wolters H. Outcome of kidney transplantation in patients with inherited thrombophilia: data of a prospective study. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14 (1): 234-239
19. Zychma MJ, Gumprecht J, Grzeszczak W, Zukowska-Szczzechowska E. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism, plasma homocysteine and folate in end-stage renal disease dialysis and non-dialysis patients. *Nephron* 2002; 92: 235-239
20. Winkelmayr WC, Kramar R, Sunder-Plassmann G, Fudinger M. Effects of single-nucleotide polymorphisms in MTHFR and MTRR on mortality and allograft loss in kidney transplant recipients. *Kidney Int* 2005; 68: 2857-2862
21. Kim RJ, Becker RC. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies. *Am Heart J* 2003; 146: 948-957
22. Kabukcu S. The frequency of factor V Leiden and concomitance of factor V Leiden with prothrombin G20210A mutation and methylene tetrahydrofolate reductase C677T gene mutation in healthy population of denizli. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2007; 13 (2): 166-171

Поступила в редакцию 12.02.2008 г.

Принята в печать 17.04.2008 г.