

УДК 616.61-002.2-039.36-005.1-08.-056.7

О. Ф. Сибирева, канд. мед. наук,  
О. И. Уразова, д-р мед. наук, проф.,  
В. В. Калюжин, д-р мед. наук, проф.,  
М. И. Калюжина, д-р мед. наук, проф.

## АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ СВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ КРОВИ С РАЗВИТИЕМ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

*Областное государственное учреждение здравоохранения «Томская областная клиническая больница», Томск, Россия*

УДК 616.61-002.2-039.36-005.1-08.-056.7

О. Ф. Сибирева, О. И. Уразова, В. В. Калюжин, М. И. Калюжина  
АССОЦІАЦІЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ ЗГОРТАЛЬНОЇ СИСТЕМИ КРОВІ З РОЗВИТКОМ  
ХРОНІЧНОЇ ХВОРОБИ НИРОК

*Обласна державна установа охорони здоров'я «Томська обласна клінічна лікарня», Томськ, Росія*

Поліморфізм у генах згортання крові відіграє велику роль у розвитку ниркової недостатності у хворих із хронічним гломерулонефритом.

**Ключові слова:** мутації системи згортання крові, протромботичні генотипи, хронічна ниркова недостатність.

UDC 616.61-002.2-039.36-005.1-08.-056.7

O. F. Sybyreva, O. I. Urasova, V. V. Kalyuzhin, M. I. Kalyuzhina  
ASSOCIATION OF GENE POLYMPRHISM OF BLOOD CLOTTING SYSTEM  
WITH DEVELOPMENT OF RENAL CHRONIC DISEASE

*The Regional State Institution of Health Protection "The Tomsk Regional Clinic", Tomsk, Russia*

Polymorphisms in genes of the blood coagulation system plays a major role in the development of renal failure in patients with chronic glomerulonephritis.

**Key words:** mutations of the blood coagulation system, prothrombotic genotypes, chronic renal failure.

К наиболее острым в клинической нефрологии относится проблема эффективности лечения пациентов с начальными стадиями хронической болезни почек (ХБП). В основе ее решения должно лежать понимание механизмов прогрессирования ХБП, число которых продолжает постоянно увеличиваться, но вопрос об относительной значимости какого-либо из них пока остается открытым. В настоящее время получены отдельные экспериментальные и клинические данные, показывающие, что важным механизмом прогрессирования ХБП могут быть нарушения гемокоагуляции как местно в почках, так и распространено, с захватом микроциркулярного русла других органов. Изучение вклада генетических факторов, в частности, мутации факторов свертывания, имеет немало важное значение [1].

### Материалы и методы исследования

В данной работе представлены результаты обследования 213 пациентов с первичным хроническим гломерулонефритом (ХГН). В группу ХГН вошли 142 больных (86 мужчин и 56 женщин, средний возраст — 38,04 (23,5; 51,5) лет) с сохраненной функцией почек и 71 больной

(41 мужчина и 30 женщин, средний возраст — 48,0 (40,0; 53,0) лет) с азотемической стадией болезни, длительность заболевания — 11,00 (6,0; 18,0) лет. Больные получали терапию программным гемодиализом (бикарбонатный диализ) на аппаратах «искусственная почка» “4008S” фирмы Fresenius (Германия) [4].

В качестве материала использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов периферической крови человека [2]. Клеточную массу разводили RCLB буфером, затем центрифугировали образец, отбирали супернатант. Оставляли осадок, добавляли 60 мкл 10 % додецил сульфат натрия (SDS) и 5–10 мкл протеиназы К (10 мг/мл). Раствор перемешивали и инкубировали при 55 °С в течение 1–2 ч, добавляли 200 мкл фенола и 200 мкл хлороформа, центрифугировали, переносили верхнюю фазу в пробирку. Затем добавляли 400 мкл хлороформа, перемешивали и центрифугировали. В верхнюю фазу добавляли 10 мкл ЛПААГ, 40 мкл 3 М АсНа рН 5,4 и 0,4 мл изопропанола или 0,8 мл этанола, инкубировали. Раствор центрифугировали, удаляли супернатант, осадок промывали 200 мкл 75 % этанола. Содержимое пробирок сушили, осадок растворяли при 65 °С в 200 мкл воды [5; 6].

Проводили ПЦР в конечном объеме 12 мкл, содержащем 650 мМ трис-НСl, 20–100 нг ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы. Реакцию проводили для праймеров Leiden V, Prothrombin и МТНFR на амплификаторе “Eppendorff” с начальной денатурацией при 95 °С 3 мин, далее — в течение 40 циклов с денатурацией 10 с при 95 °С, отжигом 10 с при 64 °С и синтезом 15 с при 72 °С, финальная элонгация — 2,5 мин при 72 °С [3].

Для проведения ПДРФ-анализа к амплификационной смеси добавляли буфер для рестрикции и эндонуклеазу рестрикции (1–3 ед. акт. фермента) и инкубировали 4 ч при 65 °С. Фермент инактивировали добавлением 1 мкл 0,5 М ЭДТА. При обработке ампликонов МТНFR эндонуклеазой рестрикции Taq I были получены два фрагмента ДНК с длинами 106 и 79 п. н., что соответствует наличию мутантного аллеля Т. При наличии аллеля С локуса С677Т фрагмент 106 п. н. не подвергается дополнительному гидролизу. О наличии генотипа ТТ свидетельствует одиночный фрагмент на уровне 79 п. н. Амплификационный фрагмент гена Prothrombin длиной 320 п. н. содержит дополнительный непалиморфный сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции Taq I, в результате чего данный фрагмент разрезается на фрагменты 299 и 274 п. н., что служило внутренним контролем полноты прохождения реакции рестрикции.

При наличии аллеля G полиморфного локуса G20210A Prothrombin визуализируется фрагмент 274 п. н. При наличии аллеля А фрагмент 320 п. н. разрезается на фрагменты с длинами 299 и 274 п. н. При наличии аллеля G полиморфного локуса G1691A Leiden V визуализируется амплификационный фрагмент 185 п. н. При наличии аллеля А фрагмент 233 п. н. разрезается на фрагменты с длинами 208 и 185 п. н. Анализ продуктов гидролиза проводили в 7 % ПААГ, гель окрашивали бромистым этидием. Визуализацию ДНК осуществляли УФ-светом [7].

**Цель:** определение возможной ассоциации между носительством полиморфных генов системы свертывания крови и развитием ХБП.

### Результаты исследования и их обсуждение

Существует несколько аллельных вариантов гена *МТГФР*, продуцирующих дефектные формы фермента. Наибольшее внимание уделяется замене цитозина на тимидин в позиции 677 гена *МТГФР*, в результате которой синтезируется термоллабильный энзим, характеризующийся вдвое меньшей активностью. Показано, что высокий уровень гомоцистеина (ГЦ), образующегося из метионина путем реметилирования с

помощью *МТГФР*, ассоциирован с повышенной свертываемостью и развитием тромбозов.

Исследование полиморфизма *С677Т* проводилось в двух группах больных — с сохраненной функцией почек и больных хронической почечной недостаточностью (ХПН). Результаты генотипирования локуса *С677Т* в группах больных и в контроле представлены в табл. 1.

Генотип *СС* чаще встречался в контрольной группе (63 %) и у больных ХГН (50 %). В группе больных ХПН генотип *СС* встречался в 42 % случаев. Напротив, количество носителей гетерозиготного генотипа *СТ* в контроле оказалось минимальным (31 %) в сравнении с группами больных, где частота гетерозигот варьировала от 43 % (ХГН) до 54 % (ХПН). Достоверной разницы в распределении частот генотипа *ТТ* в группе здоровых лиц (6 %), в группе больных ХГН (7 %) и в группе ХПН (4 %) не было. Различия в распределении частот генотипа достигли статистической значимости только в случае сравнения группы ХПН с контролем по генотипу *СТ* ( $p < 0,005$ ).

Согласно данным литературы, гетерозиготное носительство мутированного гена протромбина повышает риск венозного тромбообразования в 2–3 раза. Как видно из табл. 2, количество гомозигот с генотипом *GG* в контрольной группе составляет 94 %, в группе больных ХГН и ХПН несколько ниже — 71 и 83 % соответственно. Напротив, количество гетерозигот с генотипом *GA* в контрольной группе

Таблица 1  
Частота генотипов *СС*, *СТ* и *ТТ* в группах исследования

Группа	Частота генотипов, n (%)		
	<i>СС</i>	<i>СТ</i>	<i>ТТ</i>
Здоровые, n=100	63 (63)	31 (31)	6 (6)
Хронический гломерулонефрит, n=142	71 (50)	61 (43)	10 (7)
Хроническая почечная недостаточность, n=71	30 (42) $p < 0,005$	38 (54) $p < 0,005$	3 (4)

Таблица 2  
Частота генотипов *GG*, *GA* и *AA* в группах исследования

Группа	Частота генотипов, n (%)		
	<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>
Здоровые, n=100	94 (94)	6 (6)	—
Хронический гломерулонефрит, n=142	101 (71) $p < 0,005$	41 (29) $p < 0,005$	—
Хроническая почечная недостаточность, n=71	59 (83) $p < 0,005$	12 (17) $p < 0,005$	—

Таблица 3

**Частота мутаций Лейден V  
в группах исследования**

Группа	Частота генотипов, n (%)		
	GG	GA	AA
Здоровые, n=100	94 (94)	6 (6)	—
Хронический гломерулонефрит, n=142	93 (65) p<0,005	49 (35) p<0,005	—
Хроническая почечная недостаточность, n=71	59 (83)	12 (17) p<0,005	—

незначительно (6 %), в то время как в группе пациентов наблюдается высокий процент встречаемости. Максимальная частота аллеля *A* была выявлена в группе больных ХГН (29 %), в группе больных ХПН частота аллеля *A* была незначительно снижена (17 %) по сравнению с группой ХГН, но существенно превышала (в 2,8 раза) аналогичный показатель в группе контроля (p<0,005).

Точечная замена аргинина на глутамин в позиции 506 гена фактора V свертывания крови приводит к патологической устойчивости к действию протеина С. Фактор V Лейден считается наиболее распространенным протромботическим дефектом.

Меньше всего носителей мутации Лейден оказалось у здоровых лиц — 6 % (табл. 3). У больных ХГН наибольшая частота распределения аллеля *A* была зарегистрирована у 49 (35 %) пациентов. В группе больных ХПН этот показатель составил 17 %. Парное сравнение групп больных с контролем показало статистически значимые различия не только с донорами, но и между группами.

В своем исследовании мы определяли частоту распределения генов в группах больных ХГН и ХПН. Результаты генотипирования показали статистически значимое преобладание аллеля *T* при мутации фермента *МТГФР* у больных ХПН, что может отражать влияние гипергомоцистеинового состояния на развитие ХПН. Вероятно, гетеро- и гомозиготные варианты полиморфизма *C677T* гена *МТГФР* у пациентов с ХПН можно рассматривать в качестве предикторов неблагоприятного исхода заболевания. Так, по данным М. Fodinger и соавт., носительство мутантного аллеля *C677T* 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, то на стадии ХПН концентрация его в крови становится очень большой.

В группе больных ХГН, напротив, преимущественно наблюдаются мутации протромбина и Лейдена. Результаты наблюдения за больными ХГН с мутацией гена протромбина позволили отметить связь этой мутации со скоростью депрессии функции почек. Лейденская мутация у больных ХГН, у которых наблюдались прокоагулянтные сдвиги в системе гемостаза, была ассоциирована с высоким риском развития почечной недостаточности. При подсчете относительного риска (ОР) развития ХПН у больных ХГН при наличии одной мутации гена *C677T* составляет 0,92, а при имеющихся трех мутациях ОР = 1,2.

### Выводы

Мутации в генах *МТГФР*, фактора V свертывания крови и протромбине встречаются у больных ХБП значительно чаще, чем у здоровых лиц, что связано с развитием у этих больных ГКС и хронической стадии ДВС-синдрома.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Бочков В. Н. Молекулярно-генетическая диагностика // Клиническая биохимия / под ред. В. А. Ткачука. – М. : ГЭОТАР-МЕД, 2004. – С. 423–477.
2. Распределение частот генотипов и аллелей в генах 2, 5 факторов свертывания крови и метилентетрагидрофолат-редуктазы среди населения г. Томска / О. Ф. Сибирева, Е. Ю. Хитринская, И. И. Иванчук [и др.] // Медицинская генетика. – 2008. – № 71 (5). – С. 35–37.
3. 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* / S. Kabukcu // Hemostasis. – 2007. – Vol. 13 (2). – P. 166–171.
4. Генетическая гипергомоцистеинемия как причина артериальных и венозных тромбозов у больного хроническим гломерулонефритом / Е. И. Баранникова, Н. Л. Козловская, О. Н. Понкина, Н. А. Семенченко // Нефрология и диализ. – 2008. – Т. 10, № 3. – С. 254–258.
5. Гипергомоцистеинемия усугубляет повреждения нефрона при экспериментальной хронической почечной недостаточности / А. В. Смирнов, В. А. Добронравов, А. И. Неворотин [и др.] // Нефрология. – 2005. – Т. 9, № 4. – С. 67–74.
6. Каттаньи М. Гипергомоцистеинемия, сосудистые заболевания и тромбозы / М. Каттаньи // Лабораторная медицина. – 1999. – № 2. – С. 33–42.
7. Козловская Н. Л. ДВС-синдром при заболеваниях почек / Н. Л. Козловская // РМЖ. – 2000. – Т. 8, № 1. – С. 57–59.