

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.

## СООТНОСИМОСТЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ МЕТИЛЕНТЕТРАГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ (C677T), ФАКТОРОВ II (G20210A) И V (G1691A) С ИЗМЕНЕНИЯМИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ КРОВИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 И 2 ТИПА

\* Областное государственное учреждение здравоохранения

«Томская областная клиническая больница», Томск,

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Сибирский государственный медицинский университет

Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», Томск, Россия

Клиницистам (в первую очередь, эндокринологам, кардиологам, нефрологам и акушерам-гинекологам) хорошо известно о высокой распространенности у больных сахарным диабетом (СД) тромбофилий [6; 7; 9; 12; 13; 16]. Термином «тромбофилии» обозначаются все нарушения в системе гемостаза, которым свойственна повышенная склонность к развитию тромбозов (нередко рецидивирующих), облитерации кровеносных сосудов, ишемии и инфарктов [1; 10; 11]. Сложность полного распознавания тромбофилии в конкретном клиническом случае состоит в том, что с помощью лабораторных методов диагностики необходимо не только предугадать развитие тромбоза по увеличению содержания в крови маркеров активации коагуляционного и/или сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, но и выявить причину тромбофилии [3; 14; 15].

В соответствии с рабочей классификацией основных видов тромбофилий, утвержденной Пленумом президиума РАМН в 1996 г. [1], выделяют наследственные и приобретенные (вторичные, симптоматические) тромбофилии. При этом тромбофилии при СД относят к

группе «Метаболические формы», внутри которой генетически детерминированные формы не выделяются. Это связано с тем, что гемокоагуляционные и реологические нарушения у пациентов с СД обосновано рассматриваются как следствие характерных для этого заболевания метаболических нарушений и оксидативного стресса [4], в то время как сопряженность патологии гемостаза с генетической конституцией изучена недостаточно.

**Цель** нашего исследования — изучение связи патологии гемостаза у больных СД с протромботическими генотипами, господствующими в структуре врожденных тромбофилий.

### Материалы и методы исследования

В настоящей работе использованы данные, полученные при обследовании в стационарных условиях (показаниями к госпитализации являлись выраженная декомпенсация углеводного обмена или прогрессирование сосудистых осложнений) 90 больных с диабетической нефропатией, из них 54 пациента — с СД 1 типа (средний возраст — 31,5 (25,7; 47,3) года, длительность заболевания — 12,2

(7,2; 11,6) года) и 36 — с СД 2 типа (средний возраст — 60,0 (54,1; 68,2) лет, длительность заболевания — 13,6 (8,3; 13,9) года). Программа включала рутинные клинические и лабораторные тесты, принятые в эндокринологической и нефрологической клиниках.

Проводили исследования гемостаза: ортофенантролиновый тест (ОФТ), протромбиновое отношение (ПО), общий фибриноген (ОФ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время (ТВ), каолиновое время (КВ). Также измеряли степень, скорость, время агрегации и количество тромбоцитов на анализаторе агрегации тромбоцитов AP2110.

Материалом для изучения частоты встречаемости однонуклеотидной замены C677T в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR), точечной мутации (G1691A) в гене фактора V свертывания крови, получившей название FV Leiden (лейденская мутация), а также мутации G20210A в 3'-нетранслируемой области гена фактора II свертывания крови (FII) послужили образцы геномной ДНК, полученной из лейкоцитов периферической крови по

методу фенол-хлороформной экстракции. Для выявления полиморфизма в гене *FII* и *FV Leiden*, а также для генотипирования варианта *C677T* в гене *MTHFR* использовали метод полимеразной цепной реакции с последующим рестрикционным анализом [2]. Продукты амплификации и рестрикции разделяли с помощью электрофореза соответственно в 2%-м агарозном и 7%-м полиакриламидном гелях, окрашивая бромистым этидием. В работе использованы комплекты реагентов, включающие специфические праймеры и рестриктирующие эндонуклеазы.

Для суждения о нормальных параметрах изучаемых показателей обследовано 100 здоровых лиц (контрольная группа) с демографическими характеристиками, сходными с таковыми у больных СД 1 типа [5].

При статистической обработке данных применяли пакет программ БИОСТАТИСТИКА 4.03. Количественные результаты представлены в виде медианы, 25 и 75 перцентилей (Me [LQ; UQ]), качественные — в виде  $n$ , % (число больных с данным признаком, процент от их количества в группе) или десятичной доли единицы. Нулевую гипотезу о равенстве долей (в том числе, соответствие эмпирического распределения частот генотипов по всем изученным локусам теоретически ожидаемому, рассчитанному по формуле Харди — Вайнберга) проверяли с помощью критериев  $\chi^2$  и  $Z$ . Статистическую значимость различий между двумя

независимыми количественными переменными оценивали, используя  $U$ -критерий Манна — Уитни. Для бинарных признаков по четырехпольной таблице вычисляли отношение шансов (OR) с 95 % доверительным интервалом (95 % ДИ).

### Результаты исследования и их обсуждение

Распределение изучаемых генотипов во всех группах хорошо описывалось законом равновесия Харди — Вайнберга. Частота генотипа *C/C* гена *MTHFR* в группе здоровых лиц составляет 0,63, в то время как в группе пациентов с СД 2 типа была статистически значимо ( $p < 0,05$ ) ниже — 0,42. У больных СД 2 типа выявлены также статистически значимые различия ( $p < 0,01$ ) со здоровыми лицами по частоте встречаемости гетерозиготного варианта полиморфизма *C677T* в гене *MTHFR*, составляющей 58 %, в то время как у больных СД 1 типа частота встречаемости аллеля *T* была равна 50 %.

Встречаемость мутации *G1691A* (мутация *FV Leiden*), носительство которого предрасполагает к развитию тромбозов, связанных с врожденной резистентностью к активированному протеину С, у больных СД 1 типа была выше, чем в группе здоровых лиц, и составила 33 %, а у больных СД 2 типа — всего 8 % ( $p < 0,01$ ). При оценке относительного риска выявлена ассоциация полиморфизма *G1691A* в гене *FV* с СД 1 типа (OR — 7,83; 95 % ДИ (2,87; 21,46)). Так же, как S. F. Wakim-Ghorayeb et al., [17], нам не уда-

лось выявить различий между больными СД 2 типа и здоровыми лицами по полиморфизму в гене *FV*.

Частота мутантного аллеля *G* гена *FII* в контрольной группе составляла 3 %, что соответствует верхнему уровню распространенности мутантного аллеля в Европе (1,8–3,5 %) [8]. У обследованных нами больных СД 2 типа генотип *G/A* встречался чаще (25 %), чем в контрольной группе (6 %;  $p < 0,01$ ) и у больных СД 1 типа (11 %). Протромботический генотип *G/A*, при котором наблюдается повышенное образование протромбина, ассоциировался с СД 2 типа (OR — 5,97; 95 % ДИ (3,12; 18,23)), что противоречит результатам недавно опубликованной работы, в которой показано отсутствие ассоциации полиморфизма *G20210A* гена *FII* с СД 2 типа [17].

Как видно из представленных в табл. 1 данных исследования состояния коагуляционного гемостаза, статистически значимых различий между группами пациентов с СД 1 и 2 типов по изучаемым показателям не выявлено ( $p > 0,05$ ). Однако сравнение значений результатов коагуляционного звена системы гемостаза (в первую очередь, ОФТ, ПО, КВ), установленных у больных СД 1 и 2 типов, с таковыми у лиц контрольной группы позволяет сделать вывод об активации свертывающей системы крови у пациентов с СД вне зависимости от его типа.

Показатели тромбоцитарного гемостаза у больных СД 1 и

Таблица 1

Показатели коагуляционного гемостаза у здоровых доноров и больных сахарным диабетом

Группа	ОФТ, мг/100 мл	ПО	ОФ, г/л	АЧТВ, с	ТВ, с	КВ, с
Здоровые, n=100	2,91 (2,01; 3,52)	1,14 (1,06; 1,21)	2,99 (2,4; 3,31)	38,11 (32,1; 44,6)	10,42 (9,4; 11,4)	99,43 (68,6; 117,5)
СД 1 типа, n=54	5,91** (4,4; 5,2)	0,99* (0,91; 1,15)	3,64 (2,8; 4,3)	34,33 (35,3; 49,7)	10,62 (9,9; 10,9)	84,61* (79,8; 109,1)
СД 2 типа, n=36	4,13** (3,9; 5,0)	0,94* (0,90; 1,04)	3,72 (3,0; 4,0)	37,74 (35,8; 39,2)	10,72 (9,8; 11,0)	89,92 (63,6; 114,3)

Примечание. В табл. 1–3: данные представлены в виде Me (LQ; UQ); статистическая значимость различий с контрольной группой: \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ .

Показатели тромбоцитарного гемостаза  
у здоровых доноров и больных сахарным диабетом

Группа	Показатель			
	Степень агрегации, %	Скорость агрегации, %/мин	Время агрегации, мин	Количество тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$
Здоровые, n=100	77,3 (70,9; 84,9)	12,4 (7,2; 16,2)	8,6 (8,1; 9,3)	304,3 (260,1; 353,3)
СД 1 типа, n=54	90,4* (66,3; 99,3)	20,3** (15,3; 22,6)	7,3* (7,0; 9,5)	192,4** (173,7; 216,8)
СД 2 типа, n=36	89,6* (70,4; 95,5)	16,0* (9,7; 20,2)	7,5* (7,1; 9,4)	243,5* (199,8; 259,7)

Таблица 3

Показатели тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза  
в группах больных сахарным диабетом с наличием и отсутствием  
полиморфизма генов *MTHFR*, *FV* и *FII*

Показатель	Наличие полиморфизма, n=63	Отсутствие полиморфизма, n=27
Степень агрегации, %	109,6** (75,2; 119,2)	89,9*^ (72,6; 107,6)
Скорость агрегации, %/мин	20,6** (15,2; 26,2)	18,2* (10,0; 22,3)
Время агрегации, мин	5,6** (5,0; 9,5)	7,6 (6,1; 9,3)
Количество тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	197,4** (177,9; 226,8)	298,7^ (199,3; 301,2)
РФМК, мг/100 мл	12,4** (6,0; 17,0)	5,9***^ (4,3; 12,5)
Протромбиновое отношение	0,94* (0,91; 1,0)	0,96* (0,93; 1,0)
Общий фибриноген, г/л	4,3** (2,6; 4,6)	3,7*^ (2,7; 4,2)
Активированное частичное тромбопластиновое время, с	28,7** (25,0; 40,0)	34,2*^ (33,5; 39,5)
Тромбиновое время, с	8,8* (7,1; 11,5)	9,1* (8,7; 11,6)
Каолиновое время, с	61,4** (57,0; 69,0)	69,8*^ (60,0; 78,0)

Примечание. Статистическая значимость различий с группой А: ^ —  $p < 0,05$ ; ^^ —  $p < 0,001$ .

2 типов (межгрупповые различия не достигали уровня статистической значимости) отличаются от результатов у здоровых лиц по количеству тромбоцитов, времени, степени и скорости агрегации, они свидетельствуют о повышении агрегационной способности тромбоцитов (табл. 2).

Для уточнения роли генетической составляющей в нарушении равновесия системы гемостаза были сопоставлены значения показателей коагуляционного и тромбоцитарного звеньев гемостаза, зарегистрированные в подгруппах больных СД, выделенных с учетом

наличия (А; n=63) или отсутствия (Б; n=27) у них изучаемых полиморфизмов. В обеих подгруппах установлена гиперкоагуляция — значения показателей ОФТ, ПО, КВ, ОФ, ТВ, АЧТВ, МНО статистически значимо отличались от таковых в группе здоровых лиц. Однако в группе больных СД с наличием полиморфизма генов *MTHFR*, *FV* и *FII* степень выраженности гиперкоагуляционного синдрома (ОФТ, ОФ, АЧТВ, КВ) была большей (табл. 3). Для больных СД с протромботическими генотипами характерна также гиперактивация тромбоцитов.

## Выводы

Мутации в генах (*C677T* в гене метилентетрагидрофолатредуктазы, *G1691A* в гене фактора V свертывания крови и *G20210A* в гене фактора II свертывания крови) встречаются у больных сахарным диабетом с большей частотой, чем у здоровых лиц. Эти мутации ассоциированы с повышением коагуляционного потенциала крови и гиперактивацией тромбоцитов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З. С. Предтромботические состояния и тромбофилии / З. С. Баркаган ; под ред. И. А. Воробьева // Руководство по гематологии. — М. : НЬЮДИАМЕД, 2007. — С. 628–642.
2. Бочков В. Н. Молекулярно-генетическая диагностика / В. Н. Бочков // Клиническая биохимия ; под ред. В. А. Ткачук. — М. : GEOTAR-MED, 2004. — С. 423–477.
3. Момот А. П. Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики / А. П. Момот. — СПб. : Формат, 2006. — 208 с.
4. Нелаева А. А. Роль гемостаза / А. А. Нелаева, Ю. В. Хасанова // Сахарный диабет и хроническая болезнь почек ; под ред. М. В. Шестакова, И. И. Дедова. — М. : ООО «Медицинское информационное агентство», 2009. — С. 118–126.
5. Распределение частот генотипов и аллелей в генах 2, 5 факторов свертывания крови и метилентетрагидрофолатредуктазы среди населения г. Томска / О. Ф. Сибирева, Е. Ю. Хитринская, И. И. Иванчук [и др.] // Медицинская генетика. — 2008. — № 71 (5). — С. 35–37.
6. Angiolillo D. J. Antiplatelet therapy in diabetes: efficacy and limitations of current treatment strategies and future directions / D. J. Angiolillo // Diabetes Care. — 2009. — Vol. 32 (4). — P. 531–540.
7. Correlation between albuminuria and spontaneous platelet microaggregate formation in type 2 diabetic patients / S. Araki, H. Matsuno, M. Haneda [et al.] // Diabetes Care. — 2009. — Vol. 32 (11). — P. 2062–2067.
8. 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 / S. Kabukcu // Clinical and Applied Thrombosis / Hemostasis. — 2007. — Vol. 13 (2). — P. 166–171.

9. *Accumulation of gene polymorphisms related to plaque disruption and thrombosis is associated with cerebral infarction in subjects with type 2 diabetes* / N. Katakami, T. Mitsuyoshi, H. Kaneto [et al.] // *Diabetes Care*. – 2010. – Vol. 33 (2). – P. 390–395.

10. *Makris M. Thrombophilia: grading the risk* / M. Makris // *Blood*. – 2009. – Vol. 113 (21). – P. 5314.

11. *Goldenberg N. A. Thrombophilia states and markers of coagulation activation in the prediction of pediatric venous thromboembolic outcomes: a comparative analysis with respect to adult evidence* / N. A. Goldenberg // *Hematology*. – 2008. – Vol. 2008. – P. 236–244.

12. *Hyperinsulinemia, hyperglycemia, and impaired hemostasis: The Framingham Offspring Study* / J. B. Meigs, M. A. Mittleman, D. M. Nathan [et al.] // *JAMA*. – 2000. – Vol. 283. – P. 221–228.

13. *Hyperglycemia stimulates coagulation, whereas hyperinsulinemia impairs fibrinolysis in healthy humans* / M. E. Stegenga, S. N. van der Crabben, M. Levi [et al.] // *Diabetes*. – 2006. – Vol. 55 (6). – P. 1807–1812.

14. *Thachil J. Who should request and interpret tests for heritable thrombophilia?* / J. Thachil // *J. Clin. Pathol.* – 2008. – Vol. 61. – P. 783–784.

15. *Raffini L. Thrombophilia in children: who to test, how, when, and why?* / L. Raffini // *Hematology*. – 2008. – Vol. 2008. – P. 228–235.

16. *Hyperglycemia is associated with enhanced thrombin formation, platelet activation, and fibrin clot resistance to lysis in patients with acute coronary syndrome* / A. Undas, I. Wiek, E. Stepien [et al.] // *Diabetes Care*. – 2008. – Vol. 31. – P. 1590–1595.

17. *Factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A single-nucleotide polymorphisms in type 2 diabetes mellitus* / S. F. Wakim-Ghorayeb, S. H. Keshian, G. Timson [et al.] // *Am. J. Hematol.* – 2005. – Vol. 80 (1). – P. 84–86.

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

О. Ф. Сибирева, О. И. Уразова, В. В. Калюжин, М. И. Калюжина

**СООТНОСИМОСТЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ МЕТИЛЕНТЕТРАГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ (C677T), ФАКТОРОВ II (G20210A) И V (G1691A) С ИЗМЕНЕНИЯМИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ КРОВИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 И 2 ТИПА**

Предрасположенность к возникновению тромботических осложнений у больных сахарным диабетом связана с мутационными дефектами в свертывающей системе, в частности, в генах метилентетрагидрофолатредуктазы (C677T), фактора V свертывания крови (G1691A) и фактора II (G20210A) свертывания крови. Эти мутации ассоциированы с повышением коагуляционного потенциала крови и гиперактивацией тромбоцитов.

**Ключевые слова:** мутации системы свертывания крови, протромботические генотипы, сосудисто-тромбоцитарный, коагуляционный гемостаз, тромбозы, сахарный диабет.

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

O. F. Sibiryova, O. I. Urazova, V. V. Kalyuzhin, M. I. Kalyuzhina

**POLIMORPHISM OF GENES CORRELATED IN THE METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE GENE (S677T) IN THE GENE FOR FACTOR V CLOTTING (G1691A) AND THE GENE FACTOR II (G20210A) WITH CHANGES IN THE COAGULATION SYSTEM IN DIABETIC PATIENTS**

Predisposition to the appearance of thrombotic complications in diabetic patients is associated with mutational defects in the coagulation system, particularly in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (S677T) in the gene for factor V clotting (G1691A) and the gene factor II (G20210A) of blood coagulation. These mutations are associated with an increase in blood coagulation potential, as well as hyperactivation of platelets.

**Key words:** mutations in the blood coagulation system, a prothrombotic genotype, vascular-platelet, coagulation hemostasis, thrombosis, diabetes.

УДК 616.36-089.844:617-089.5-08

Е. Л. Буланова

## НАРУШЕНИЯ ГЕМОСТАЗА У БОЛЬНЫХ С ПОРАЖЕНИЯМИ ПЕЧЕНИ

*Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва, Россия*

Вопросы патогенеза, диагностики и коррекции нарушений системы гемостаза все больше привлекают внимание специалистов из различных областей медицины. В немалой степени это касается врачей, сталкивающихся в своей практике с печеночной патологией.

Процессы, происходящие в организме, постоянно находятся в динамическом равновесии друг с другом. Нарушение этого равновесия приводит к дис-

балансу и нарушению гомеостаза. Регуляция функций биологических систем носит агонист-антагонистический характер. Это необходимо для стабилизации системы и ее адаптации к изменяющимся условиям. Если система истощена воздействием патогенного фактора, ее равновесие нарушается. Регуляция функции гемостаза имеет аналогичный принцип взаимоотношений [8]. Поддержание крови в жидком состоянии и со-

хранность ее в рамках сосудистого русла в норме также определяются равновесием систем, с одной стороны, отвечающих за тромбообразование, с другой — за текучесть крови. Это равновесие поддерживается посредством взаимодействия пяти основных компонентов системы гемостаза: с одной стороны — коагуляционного каскада (система свертывания), тромбоцитов, сосудистой стенки, с другой — противосвертывающих