Полиморфизм генов II, V факторов свертывания крови и метилентетрагидрофолатредуктазы у больных с диабетической нефропатией: распространенность, клиническое и прогностическое значение

Сибирева О.Ф., Хитринская Е.Ю., Калюжин В.В., Сазонов А.Э., Иванчук И.И., Гранкина В.Ю.

ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск (ректор – академик РАМН В.В. Новицкий)

Цель. *Изучение распространенности, клинического и прогностического значения у больных диабетической нефропатией (ДН) протромботических генотипов, господствующих в структуре врожденных тромбофилий.*
Материалы и методы. *Обследовано 90 пациентов с ДН, осложняющей в 54 случаях сахарный диабет 1 типа (СД1) и в 36 – сахарный диабет 2 типа (СД2). Контрольную группу составили 100 здоровых лиц. Для диагностики однонуклеотидной замены С677Т в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR), точечной мутации гена фактора V свертывания крови (FV), а также мутации G20210A гена фактора II свертывания крови (FII) использовали метод полимеразной цепной реакции.*
Результаты. *Вероятность ДН у больных СД1 выше при наличии лейденской мутации, а у пациентов, больных СД2, она повышается в связи с однонуклеотидной заменой С677Т в гене MTHFR и G20210A в 3'-нетранслируемой области гена FII.*
Заключение. *Изучаемые мутации, связанные с состоянием коагуляционного потенциала крови, встречаются у больных ДН с большей частотой, чем среди здоровых лиц.*
Ключевые слова: *сахарный диабет, диабетическая нефропатия, полиморфизм генов, метилентетрагидрофолатредуктаза*

Coagulation factors II,V and methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphism in patients with diabetic nephropathy: prevalence, clinical and prognostic implications

Sibireva O.F., Khitrinskaya E.Yu., Kalyuzhin V.V., Sazonov A.E., Ivanchuk I.I., Grankina V.Yu.
Siberian State Medical University, Tomsk

Aim. *To study prevalence, clinical and prognostic significance of prothrombotic genotypes pre-dominant in inborn thrombophilia in patients with diabetic nephropathy (DN).*
Materials and methods. *A total of 90 patients with DN were examined; 54 and 36 cases suffered DM1 and DM2 respectively. Control group comprised 100 healthy subjects. PCR was used to iden-tify single nucleotide substitution (C677T) in the methylene tetrahydrofolate reductase gene (MTHFR), point mutation in coagulation factor V gene (FV), and G202210A mutation in factor II gene (FII).*
Results. *The probability of DN in patients with DM1 increases in the presence of Leiden mutation and in DM2 patients in the presence of single nucleotide substitu-tion (C677T) in MTHFR gene and G202210A mutation in the 3'-untranslated region of FII.*
Conclusion. *The prevalence of the above mutations associated with blood coagulation potential in DN patients is higher than in healthy subjects.*
Key words: *diabetes mellitus, diabetic nephropathy, gene polymorphism, methylenetetrahydrofolate reductase*

Диабетическую нефропатию (ДН), являющуюся следствием специфического (микроангиопатия) поражения почек при сахарном диабете (СД), относят к острейшим медико-социальным проблемам и приоритетам национальных систем здравоохранения большинства стран мира из-за ее распространенности (страдает по меньшей мере 30–40% больных СД 1 типа (СД1) и 20–30% – СД 2 типа (СД2)), а также практически облигатного прогрессирования, ведущего к развитию гломерулосклероза и хронической почечной недостаточности (ХПН) [1–3].

В настоящее время ДН – самая частая причина ХПН. В гемодиализных центрах развитых стран больные СД (35–40%) вытеснили на вторую-третью позицию пациентов с такими первичными заболеваниями почек, как гломерулонефрит, пиелонефрит и поликистоз [4–6]. Впечатляющие успехи клинической эндокринологии, достигнутые в последние десятилетия, обнажили парадоксальную ситуацию, которая складывается таким образом, что чем лучше мы лечим пациентов с СД, тем большее их число доживает до пожилого возраста и той стадии развития болезни, при которой высока вероятность развития ХПН. Ближайшее будущее сулит лишь усугубление проблемы – распространенность диабетического гломерулосклероза возрастет, и, по-видимому, необходимо быть готовыми к тому, что через 10-20 лет каждый второй, нуждающийся в заместительной почечной терапии, будет пациентом с ДН. В связи с этим становится понятной высокая потребность в фундаментальных и прикладных исследованиях, направленных на разработку вопросов патогенеза, диагностики, профилактики и лечения ДН.

В патогенезе ДН тесно переплетены метаболические, гемодинамические, гемостатические, иммунные и другие факторы, многие из которых генетически детерминированы. Однако, если о генетической предрасположенности к развитию определенного типа СД, его формы (например, моногенные формы или MODY-типы СД, митохондриальный диабет, а также его специфические формы, связанные с генетическими дефектами в действии инсулина) хорошо известно, то роль генетической конституции в подверженности (или, наоборот, защищенности) к реализации варианта заболевания с поражением почек изучена в значительно меньшей степени [7–10]. В частности, остается открытым вопрос о частоте встречаемости у больных ДН генетически обусловленных гематогенных тромбофилий, а также их клиническом и прогностическом значении.

Целью настоящего исследования явилось изучение распространенности, клинического и прогностического значения у больных ДН протромботических генотипов, господствующих в структуре врожденных тромбофилий.

Таблица 1

Клиническая характеристика обследованных больных

Показатель	Пациенты с СД1 (n=54)	Пациенты с СД2 (n=36)
Возраст, годы	31,5 (25; 47)	60,0 (54; 68)
Мужчины /женщины, n (%)	28 (52) / 26 (48)	10 (28) / 26 (72)
Длительность СД, годы	12,0 (7; 19)	13,0 (7; 20)
Степень тяжести СД, n (%) Средней степени Тяжелое течение	 18 (33) 36 (67)	 10 (28) 26 (72)
Стадия ДН, n (%) III IV	 16 (30) 38 (70)	 8 (22) 28 (78)
Индекс массы тела, кг/м^2	23,1 (20; 27)	29,0 (25; 33)
Скорость клубочковой фильтрации, мл/мин	82,0 (76; 89)	83,0 (76; 90)

Материалы и методы

В настоящей работе использованы данные, полученные при обследовании в стационарных условиях (показаниями к госпитализации являлись выраженная декомпенсация углеводного обмена или прогрессирование сосудистых осложнений) 90 пациентов с ДН, осложняющей в 54 случаях СД1 и в 36 – СД2. Программа исследования включала рутинные клинические и лабораторные тесты, принятые в эндокринологической и нефрологической клиниках. Клиническая характеристика обследованных больных представлена в таблице 1.

Для суждения о нормальных параметрах изучаемых показателей обследовано 100 здоровых лиц (контрольная группа) с демографическими характеристиками, сходными с таковыми у больных СД1 [11].

Материалом для изучения частоты встречаемости однонуклеотидной замены *C677T* в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), точечной мутации (*G1691A*) гена фактора V свертывания крови (*FV*), 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 методом фенол-хлороформной экстракции. Для выявления полиморфизма гена *FII* и *FV Leiden*, а также для генотипирования варианта *C677T* в гене *MTHFR* использовали метод полимеразной цепной реакции с последующим рестрикционным анализом. Продукты амплификации и рестрикции разделяли с помощью электрофореза соответственно в 2-процентном агарозном и 7-процентном полиакриламидном гелях, окрашивая бромистым этидием. В работе были использованы комплекты реагентов, включающие специфические праймеры и рестриктирующие эндонуклеазы, любезно предоставленные сотрудниками группы фармакогеномики (руководитель – М.Л. Филлипенко) Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск. При статистической обработке данных применяли пакет программ «Биостатистика» 4.03. Количественные данные представлены в виде медианы – 25 и 75 процентилей (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 χ^2 и Z. Анализ повторных измерений проводили с помощью критерия Вилкоксона. Силу связи между изучаемыми количественными показателями и ее направленность выражали через коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для бинарных признаков по четырехпольной таблице вычисляли отношение шансов (OR) с 95-процентным доверительным интервалом (95% ДИ).

Результаты и их обсуждение

Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов позволил выявить в проанализированных образцах геномной ДНК три генотипа полиморфного локуса *MTHFR* (табл. 2). При этом установленное распределение генотипов и частоты мутантного аллеля гена *MTHFR* во всех группах соответствовало ожидаемому с учетом равновесия Харди-Вайнберга. Гетерозиготный вариант однонуклеотидной замены – цитозина на тимин, приводящей к аминокислотной замене аланина на валин, в положении 677 (*C677T*) у пациентов с ДН обнаруживался чаще, чем у здоровых. При этом у больных СД2 различие с контрольной группой по встречаемости данного протромботического генотипа достигало уровня статистической значимости.

Как известно, полиморфизм *C677T* в гене *MTHFR* наследуется по аутосомно-рецессивному типу и сопряжен с нарушением реметилирования гомоцистеина и, как следствие, – с развитием гипергомоцистеинемии – одного из ключевых факторов риска гиперкоагуляционного синдрома и ангиопатии [12]. У больных хроническим гломерулонефритом гетерозиготный генотип *C677T* ассоциируется с высоким темпом утраты функционирующих нефронов и быстрым развитием терминальной стадии почечной недостаточности [13–14].

Результаты настоящего исследования позволяют обсуждать связь гетерозиготного варианта полиморфизма *C677T* гена *MTHFR* у больных СД2 с формированием патологического фенотипа заболевания с поражением почек, так как у пациентов с однонуклеотидной заменой в гене *MTHFR* чаще (χ^2=5,8; p=0,016) диагностировали IV стадию ДН по классификации Mogensen C.E. и соавт. (1983), а 95% ДИ (1,29; 6,06) OR (2,84), располагающийся справа от единицы, указывает на то, что шанс развития ДН статистически значимо выше у пациентов с генетическим дефектом. Уровень гомоцистеина в крови больных СД с точечной мутацией в гене *MTHFR* превышал 15,0 ммоль/л и был взаимосвязан

Таблица 2

Распределение частот генотипов и аллелей *C677T* гена *MTHFR* у здоровых и больных с ДН

Группа обследованных	Генотипы			Частоты аллелей	
	C/C	*C/T*	*T/T*	*C*	*T*
Контрольная (n=100)	63 (63%)	31 (31%)	6 (6%)	0,79	0,21
ДН (n=90), в том числе у больных: • СД1 (n=54) • СД2 (n=36)	42 (47%)* 27 (50%) 15 (42%)*	45 (50%)** 24 (40%) 21 (58%)**	3 (3%) 3 (10%) –	0,72 0,72 0,71	0,28 0,23 0,29

Примечание: здесь и в таблицах 3-4* – статистическая значимость различий с контрольной группой (*– p<0,05; ** – p<0,01).

Таблица 3

Распределение частот генотипов и аллелей *G1691A* гена *FV* у здоровых и больных с ДН

Группа обследованных	Генотипы			Частоты аллелей	
	G/G	*G/A*	*A/A*	*G*	*A*
Контрольная (n=100)	94 (94%)	6 (6%)	–	0,97	0,03
ДН (n=90), в том числе у больных:	69 (77%)**	21 (23%)**	–	0,88	0,12
• СД1 (n=54)	36 (67%)**	18 (33%)**	–	0,83	0,17
• СД2 (n=36)	33 (92%)	3 (8%)	–	0,96	0,04

Таблица 4

Распределение частот генотипов и аллелей *G20210A* гена *FII* у здоровых и больных с ДН

Группа обследованных	Генотипы			Частоты аллелей	
	G/G	*G/A*	*A/A*	*G*	*A*
Контрольная (n=100)	94 (94%)	6 (6%)	–	0,97	0,03
ДН (n=90), в том числе у больных:	75 (83%)**	15 (17%)**	–	0,92	0,08
• СД1 (n=54)	48 (89%)	6 (11%)	–	0,94	0,06
• СД2 (n=36)	27 (75%)**	9 (25%)**	–	0,87	0,13

с повышением агрегации тромбоцитов, а также со снижением потенциала системы естественных антикоагулянтов (активность антитромбина III), что согласуется с данными литературы [12, 15–16]. В указанных работах убедительно показано, что концентрация гомоцистеина в крови пациентов с ДН обратно пропорционально связана с величиной клубочковой фильтрации и прямо пропорционально – с уровнем микроальбуминурии, однако нарушение метаболизма метионина с развитием гипергомоцистеинемии при ДН может не иметь связи с генетическим дефектом, а являться результатом нарушения почечной экскреции этой содержащей серу аминокислоты, т.е. быть не причиной, а следствием нефропатии.

При анализе полиморфизма гена *FV* распределение частот генотипов у больных ДН и лиц контрольной группы соответствовало распределению, прогнозируемому с учетом закона равновесия Харди-Вайнберга (табл. 3). Встречаемость аллеля 1691A (мутация *FV Leiden*), носительство которого предрасполагает к развитию тромбозов, связанных с врожденной резистентностью к активированному протеину С, у больных ДН, осложняющей СД1, была выше, чем в группе здоровых лиц. При этом гомозигот по мутантному аллелю гена *FV* ни в одном случае обнаружить не удалось. Мутация *FV Leiden*, при которой наблюдались прокоагулянтные сдвиги в состоянии системы гемостаза (количество и агрегационная функция тромбоцитов, концентрация фибриногена, протромбиновое отношение, каолиновое время), была ассоциирована с повышением вероятности развития у больных СД1 поражения почек (OR – 7,83, 95% ДИ – 2,87; 21,46). Так же как Wakim-Ghorayeb S.F. и соавт. [17], нам не удалось выявить различий между больными СД2 и здоровыми лицами по полиморфизму гена *FV*.

Результаты исследования полиморфизма *G20210A* гена *FII* представлены в таблице 4. Распределение этих генотипов во всех группах хорошо описывалось законом равновесия Харди-Вайнберга. Частота мутантного аллеля A20210 гена *FII* в контрольной группе составляла 3%, что соответствует верхнему уровню распространенности мутантного аллеля в Европе (1,8-3,5%) [18]. У обследованных нами больных СД2 генотип G/A встречался чаще, чем в контрольной группе ($p<0,01$). Протромботический генотип G/A, при котором наблюдается повышенное образование протромбина, ассоциировался с пятикратным повышением вероятности развития у больных СД2 поражения почек (95% ДИ OR – 3,12; 18,23), что противоречит результатам недавно опубликованного исследования, в котором показано отсутствие ассоциации полиморфизма *G20210A* гена *FII* с СД2 [17]. Однако прямому сравнению с указанным исследованием препятствует тот факт, что в него включались и пациенты без ДН.

У больных ДН риск образования микротромбов в капиллярах почек в 4 раза выше, чем у здоровых, поэтому высокая нефропротективная эффективность дезагрегантов и антикоагулянтов у пациентов с СД, по-видимому, связана не только со способностью наиболее часто назначаемых препаратов ингибировать реакцию неферментативного гликозилирования структурных белков базальной мембраны клубочков (аспирин) и восстанавливать зарядоселективность почечного фильтра (сулодексид) [2, 4, 19], но и с их антитромботической активностью.

Предварительные результаты трехлетнего наблюдения за 45 пациентами с ДН позволяют отметить связь протромботических генотипов со скоростью депрессии функции почек. Так, изменение концентрации креатинина крови у больных СД с наличием изучаемых мутаций (n=30) составило 27,5 (20; 39) мкмоль/л, а динамика скорости клубочковой фильтрации была равной -10 (-33; 13) мл/мин ($p<0,05$ для всех сравнений), в то время как результаты анализа повторных измерений у пациентов без генетической аномалии (n=15) не были статистически и клинически значимыми.

Выводы

1. 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 ДН с большей частотой, чем среди здоровых лиц.

2. Вероятность ДН у больных СД1 выше при наличии лейденской мутации (*G1691A FV*), а у пациентов с СД2 – повышается в связи с однонуклеотидной заменой *C677T* в гене *MTHFR* и *G20210A* в 3′-нетранслируемой области гена *FII*.

3. Полиморфизмы генов *FII* (*20210G/A*), *FV* (*1691G/A*) и *MTHFR* (*677C/T*) у больных ДН ассоциированы с ускорением темпа прогрессирования почечной недостаточности.

Литература

1. Дедов И.И., Шестакова М.В. Диабетическая нефропатия. Руководство для врачей. – М., 2000. – 240 с.
2. Дедов И.И., Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская. В.М., Чазова Т.Е. Сахарный диабет: патогенез, классификация, диагностика и лечение. Пособие для врачей. – М., 2003. – 171 с.
3. Villar E., Labeeuw M. Relative mortality risk in chronic kidney disease and end-stage renal disease: the effect of age, sex and diabetes // Nephrol. Dial. Trans-plant. – 2008. – 23 . – P. 1770–1771.
4. Нефрология: учебное пособие для послевузовского образования / Под ред. Е.М. Шилова. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 696 с.
5. Panzetta G., Basile C., Santoro A., Ancarani E., Costantini S., Guarnieri F., Verzetti G. Diabetics on dialysis in Italy: a nationwide epidemiological study // Nephrol. Dial. Transplant. – 2008. – 23 . – P. 3988–3995.
6. Calderon-Margalit R., Gordon E.-S., Hoshen M., Kark J.D., Rotem A., Haklai Z. Dialysis in Israel, 1989–2005 – time trends and international comparisons // Nephrol. Dial. Transplant. – 2008. – 23. – P. 659–664.
7. Gong Y., Ma Z., Patel V. et al. HNF-1β regulates transcription of the PKD modi-fier gene Kif12 // J. Am. Soc. Nephrol. – 2009. – 20. – P. 41–47.
8. Ng D.P.K., Nurbaya S., Choo S. et al. Genetic variation at the SLC12A3 locus is unlikely to explain risk for advanced diabetic nephropathy in Caucasians with type 2 diabetes // Nephrol. Dial. Transplant. – 2008. – 23. – P. 2260–2264.
9. Cambien F., Marre M., Forsblom C. et al. European rational approach for the genetics of diabetic complications – EURAGEDIC: patient populations and strategy // Nephrol. Dial. Transplant. – 2008. – 23. – P. 161–168.
10. Huang Y., Border W.A., Yu L. et al. A PAI-1 mutant, PAI-1R, slows progression of diabetic nephropathy // J. Am. Soc. Nephrol. – 2008. – 19. – P. 329–338.
11. Сибирева О.Ф., Хитринская Е.Ю., Иванчук И.И., Сазонов А.Э., Калюжин В.В. Распределение частот генотипов и аллелей в генах 2, 5 факторов свертывания крови и метилентетрагидрофолат редуктазы среди населения г. Томска // Медицинская генетика. – 2008. – 71(5). – P. 35–37.
12. Момот А.П. Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики. – СПб.: ФормаТ. – 2006. – 208 с.
13. Fodinger M., Mannhalter C., Wolfl G. Pabinger I., Müller E., Schmid R., Hörl W.H., Sunder-Plassmann G. Mutation (677 C to T) in the methyltetrahydrofolate reductase gene aggravates hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients // Kidney International. – 1997. – 52. – P. 517–523.
14. Сибирева О.Ф., Хитринская Е.Ю., Иванчук И.И., Калюжин В.В., Зибницкая Л.И., Ткалич Л.М., Калюжина Е.В. Генетическая детерминированность повышения тромбогенного потенциала крови у больных хроническим гломерулонефритом // Нефрология. – 2008. – 12(2). – С. 52–55.
15. Ksiazek P., Bednarek-Skublewska A., Buraczynska M. The C677T ethylenetetra-hydrofolate reductase gene mutation and nephropathy in type 2 diabetes mellitus // Med. Sci. Monit. – 2004. – 10(2). – P. 47–51.
16. Moczulski. D., Fojcik H., Zukowska-Szczechowska E., Szydlowska I., Grzesz-czak W. Effects of the C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene on the genetic predisposition for diabetic nephropathy // Nephrol. Dial. Trans-plant. – 2003. – 18. – P. 1535–1540.
17. Wakim-Ghorayeb S.F., Keleshian S.H., Timson G., Finan R.R., Najm P., Irani-Hakime N., Almawi W.Y. Factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A single-nucleotide polymorphisms in type 2 diabetes mellitus // Am. J. Hematol. – 2005. – 80(1). – P. 84–86.
18. Kabukcu S. The frequency of factor V Leiden and concomitance of factor V Lei-den with prothrombin G20210A mutation and methylene tetrahydrofolate reduc-tase C677T gene mutation in healthy population of denizli // Clinical and Ap-plied Thrombosis/Hemostasis. – 2007. – 13(2). – P. 166–171.
19. Heerspink H.L., Greene T., Lewis J.B., Raz I., Rohde R.D., Hunsicker L.G., Schwartz S.L., Aronoff S., Katz M.A., Eisner G.M., Mersey J.H., Wiegmann T.B. Effects of sulodexide in patients with type 2 diabetes and persistent albu-minuria // Nephrol. Dial. Transplant. – 2008. – 23. – P. 1946–1954.

Сибирева Ольга Филипповна	к.м.н., зав. клинической лабораторией, ОГУЗ Томская областная клиническая больница, Томск
Хитринская Екатерина Юрьевна	аспирант, ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск
Калюжин Вадим Витальевич	д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины, ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск **E-mail: kalyuzhinvv@mail.ru**
Сазонов Алексей Эдуардович	д.м.н., профессор, зам. зав. центральной научно-исследовательской лаборатории, ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск
Иванчук Игорь Иванович	д.м.н., старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории, ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск
Гранкина Виктория Юрьевна	врач-гематолог, ОГУЗ Томская областная клиническая больница, Томск