

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ У ПАЦИЕНТОВ ГЕМОДИАЛИЗА С РЕЦИДИВИРУЮЩИМИ ТРОМБОЗАМИ АРТЕРИО-ВЕНОЗНЫХ ФИСТУЛ

*О. П. Гумилевская, К. П. Вахания*

*Волгоградский государственный медицинский университет,  
Волгоградский областной уронефрологический центр*

Изучен полиморфизм промоторной области генов системы гемостаза (MTHFR 677 C-T, F5 G1691A, F2 202010 G-A, FGB -455 G-A) у 120 пациентов, находящихся на лечении программным гемодиализом. Показано, что возникновение тромбоза сосудистого доступа связано со структурными изменениями генов свертываемости крови MTHFR 677 C-T, F2 202010 G-A, FGB -455 G-A.

*Ключевые слова:* гемодиализ, сосудистый доступ, тромбоз, гены системы гемостаза.

## GENETIC DETERMINATION OF HEMOSTASIS SYSTEM INDICATORS IN PATIENTS WITH END STAGE RENAL DISEASE UNDERGOING HEMODIALYSIS

*O. P. Gumilevskaya, K. P. Vakhanija*

We studied polymorphism of promoter region of hemostasis genes (MTHFR 677 C-T, F5 G1691A, F2 202010 G-A, FGB -455 G-A) in 120 patients undergoing hemodialysis program. It was found that the development of vascular access thrombosis is associated with the structural features of genes of hemostatic system MTHFR 677 C-T, F2 202010 G-A, FGB -455 G-A.

*Key words:* hemodialysis, vascular access, thrombosis, genes of hemostasis.

Адекватная терапия гемодиализом больных, страдающих терминальной стадией хронических болезней почек, требует постоянного внимания к состоянию постоянного сосудистого доступа (ПСД) [7]. Оптимальный сосудистый доступ обеспечивает соответствие скорости кровотока назначенной дозе диализа, функционирует многие годы и не имеет осложнений [2]. В наибольшей степени этим требованиям соответствует нативная артериовенозная фистула (АВФ), безоговорочно признающаяся методом выбора при формировании ПСД [9], так как реже приводит к осложнениям и длительно сохраняет свою функцию. Многообразие осложнений, связанных с ПСД, являются основной причиной заболеваемости, госпитализации [5] и увеличения стоимости лечения.

Тромбоз АВФ остается основным осложнением у пациентов на гемодиализе [6], требующим неотложного внутрисосудистого вмешательства и снижающим эффективность заместительной почечной терапии. Следует отметить, что состояние гомеостаза пациентов с хронической болезнью почек (ХБП) отличается от здоровых за счет отклонений во всех регуляторных системах организма [1] и важную роль в выраженности нарушений играют индивидуальные особенности генетического репертуара. Тромбоз является полиэтиологическим состоянием, вызванным различными генетическими и приобретенными факторами. Несмотря на большое количество исследований в области генетики гемостаза, полученные данные не согласованы, неоднозначны. Это связано с особенностями популяционной генетики, дизайнов исследований и статистических методов [4, 8].

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определение взаимосвязи аллельных вариантов мутаций генов MTHFR, F5, F2, FGB с нарушением состояния свертывающей системы крови у больных с тромбозами артериовенозных фистул, находящихся на программном гемодиализе.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе использованы данные, полученные при обследовании 120 больных терминальной хронической почечной недостаточностью (ТХПН) (возраст от 21 до 63 лет), находящихся на лечении программным гемодиализом, из них 80 пациентов без тромбозов артериовенозной фистулы в анамнезе и 30 пациентов с тромбозами в анамнезе. Пациенты обеих групп были сопоставимы по возрасту и полу. Причиной ТХПН являлся диффузный склерозирующий хронический гломерулонефрит. В работу не были включены пациенты с диабетической нефропатией, выраженной уремической энцефалопатией, а также тяжелыми сопутствующими заболеваниями в стадии обострения. Контрольную группу составили 100 здоровых лиц.

Процедура гемодиализа проводилась на аппарате 4008S (Fresenius, Германия) с точным волюметрическим управлением ультрафильтрацией для ацетатного и бикарбонатного диализа. Использовались диализаторы с полисульфоновыми мембранами. Антикоагулянтом являлся гепарин в индивидуально установленной дозе. Длительность процедуры для пациентов составляла четыре часа и проводилась три раза в неделю.

Таблица 1

### Показатели системы гемостаза пациентов, получающих гемодиализ в сравнении со здоровыми ( $M \pm m$ )

Показатели	Пациенты гемодиализа без тромбозов	Пациенты гемодиализа с тромбозами	Здоровые
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$212,4 \pm 9,7^\#$	$233,7 \pm 20,8$	$249 \pm 15$
ПВ, с	$14,6 \pm 0,2^\#$	$14,16 \pm 0,20^\#$	$12,60 \pm 0,13$
АЧТВ, с	$31,7 \pm 1,4$	$28,7 \pm 0,8^*$	$30,15 \pm 0,70$
ТВ, с	$20,50 \pm 1,02$	$20,4 \pm 1,6$	$18,6 \pm 0,3$
Фибриноген, г/л	$5,3 \pm 0,2^\#$	$5,4 \pm 0,2^\#$	$3,5 \pm 0,3$

\*Значимые отличия между 1-й и 2-й группами, при  $p \leq 0,05$ ;

<sup>#</sup>значимые отличия в сравнении со здоровыми, при  $p \leq 0,05$ .

Таблица 2

### Частоты аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов MTHFR 677 у пациентов гемодиализа, %

Полиморфизм		Пациенты гемодиализа без тромбозов	Пациенты гемодиализа с тромбозами	Здоровые ( $n = 100$ )
MTHFR 677 C-T	CC	(20) 29 <sup>#</sup> ( $p = 0,01$ )	(9) 31 <sup>#</sup>	(63) 63
	CT	(49) 71 <sup>#</sup> ( $p = 0,01$ )	(11) 62 <sup>#</sup>	(31) 31
	TT	(0)*	(9) 31*	(6) 6
	Ал-лель С	64 <sup>#*</sup>	50 <sup>#*</sup>	78,5
	Ал-лель Т	36 <sup>#*</sup>	50 <sup>#*</sup>	21,5

\*Значимые отличия между 1-й и 2-й группами, при  $p \leq 0,05$ ;

<sup>#</sup>значимые отличия в сравнении со здоровыми, при  $p \leq 0,05$ .

Изучение аллельного полиморфизма гена F5G1691A позволило установить статистически значимое отличие распределения генотипов GG и GA в группах гемодиализных пациентов с отсутствием и наличием тромбоза артериовенозной фистулы (75 и 93 %, 24 и 4 % соответственно,  $p < 0,05$ ) (табл. 3). В сравнении со здоровыми лицами, отличие наблюдалось только по генотипу GG и аллеля G (75 и 94 %, 87 и 97 % соответственно,  $p < 0,05$ ). По полученным данным генотип AA не связан с развитием тромботических состояний у гемодиализных пациентов.

Материалом для исследования послужила венозная кровь в объеме 8—9 мл, взятая из локтевой вены. Забор венозной крови проводили в вакуумные пробирки с консервантом, содержащим 0,5М раствор ЭДТА (рН = 8,0) (для генетических исследований), и цитрат Na (3,8 %) (для коагулологических исследований). Исследование гемостаза проводилось по следующим параметрам: количество тромбоцитов, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время (ТВ), содержание в сыворотке фибриногена. Проводилось изучение следующих полиморфизмов генов свертываемости крови: MTHFR 677 C-T (метилтетрагидрофолатредуктаза), F5 G1691A (фактор Лейдена), F2 202010 G-A (протромбин), FGB -455 G-A (фибриноген).

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 6.0». Характеристика выборок представлена в формате  $M \pm m$ , где  $M$  — среднее арифметическое значение признака,  $m$  — ошибка средней арифметической. Проверку статистических гипотез проводили с использованием параметрических ( $t$ -критерий Стьюдента) и непараметрических (критерий Фишера) критериев. Различия считали достоверно значимыми при  $p \leq 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании системы гемостаза у обследованных больных было установлено, что у всех пациентов наблюдалось повышение уровня фибриногена в сравнении со здоровыми [(5,3  $\pm$  0,2) и (5,4  $\pm$  0,2) г/л против (3,5  $\pm$  0,3) г/л,  $p \leq 0,05$ ] (табл. 1). Это может быть связано с развитием иммунного системного воспаления на стадии ХПН и является предиктором повышенного тромбообразования. А у пациентов с тромбозами АВФ обнаружено уменьшение АЧТВ [(28,7  $\pm$  0,8) с против (31,7  $\pm$  1,4) с,  $p \leq 0,05$ ], что является свидетельством гиперкоагуляции у пациентов с тромбозами сосудистого доступа.

Изучение распределения аллельных вариантов генов системы гемостаза у пациентов на программном гемодиализе в зависимости от наличия тромботических осложнений сосудистого доступа позволило выявить следующие закономерности.

При изучении полиморфизма гена MTHFR выявлено, что тромбоз сосудистого доступа ассоциирован с носительством гомозиготы (ТТ) в 677 позиции (31 % против 0 % у пациентов без тромбоза сосудистого доступа,  $p < 0,05$ ), причем аллельный вариант MTHFR 677 C-T чаще встречался у пациентов с тромбозами (табл. 2). Распределение генотипов CC и CT не выявило значимых отличий среди пациентов обеих групп (29 и 31 %, 71 и 62 % соответственно). Полученные данные согласуются с результатами исследований Al-Muhanna F., et al. (2008) [3].

Таблица 3

**Частоты аллелей и генотипов  
полиморфных маркеров генов F5 1691G/A  
у пациентов гемодиализа, %**

Полиморфизм		Пациенты гемодиализа без тромбозов	Пациенты гемодиализа с тромбозами	Здоровые (n = 100)
F5 G1691A	GG	(47) 75*#	(26) 93*	(94) 94
	GA	(15) 24* (p = 0,01)	(1) 4* (p = 0,01)	(6) 6
	AA	(1) 1	(1) 3	—
	Аллель G	87#	95	97
	Аллель A	13#	5	3

\*Значимые отличия между 1-й и 2-й группами, при p ≤ 0,05;

#значимые отличия в сравнении со здоровыми, при p ≤ 0,05.

При изучении распределения частот генотипов полиморфного гена F2 202010 G-A различия выявлены по GG генотипу между двумя группами пациентов (41 % против 15 % у пациентов без тромбоза сосудистого доступа, p < 0,05) (табл. 4). Частота встречаемости аллеля G также значительно отличалась у данных пациентов (67 % против 47 % у пациентов без тромбоза сосудистого доступа, p < 0,05). Вероятно, в развитие тромбоза сосудистого доступа вносит вклад аллель G в гомозиготном состоянии.

Таблица 4

**Частоты аллелей и генотипов  
полиморфных маркеров генов F2 202010 G/A  
у пациентов гемодиализа**

Полиморфизм		Пациенты гемодиализа без тромбозов	Пациенты гемодиализа с тромбозами	Здоровые (n = 100)
F2 202010 G-A	GG	(11) 15*# (p = 0,04)	(12) 41*# (p = 0,04)	(94) 94
	GA	(50) 66*# (p = 0,01)	(15) 52*# (p = 0,01)	(6) 6
	AA	(15) 19	(1) 7	—
	Аллель G	47*#	67*#	97
	Аллель A	53*#	33*#	3

\*Значимые отличия между 1-й и 2-й группами, при p < 0,05;

#значимые отличия в сравнении со здоровыми, при p < 0,05.

Аллельный вариант FGB -455 G-A встречался чаще у пациентов с тромбозами сосудистого доступа (54 % против 38 %, p < 0,05), причем чаще в гетерозиготном варианте (табл. 5). Распределение генотипа GG и аллеля G выявило статистически значимые отличия в

группе гемодиализных пациентов с отсутствием и наличием тромбоза сосудистого доступа (34 и 10 %, 62 и 46 % соответственно, p < 0,05).

Таблица 5

**Частоты аллелей и генотипов  
полиморфных маркеров генов FGB -455 G/A  
у пациентов гемодиализа, %**

Полиморфизм		Пациенты гемодиализа без тромбозов	Пациенты гемодиализа с тромбозами
FGB - 455 G-A	GG	(26) 34* (p = 0,01)	(1) 10* (p = 0,01)
	GA	(43) 56	(21) 72
	AA	(7) 10	(2) 18
	Аллель G	62*	46*
	Аллель A	38*	54*

\*Значимые отличия между 1-й и 2-й группами, при p ≤ 0,01.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У больных ТХПН, получающих гемодиализ, наблюдается повышенный уровень фибриногена в сыворотке крови на фоне тромбоцитопении. Предрасполагающим фактором для развития тромбозов является состояние гиперкоагуляции, отражающееся в уменьшении АЧТВ. Тромбоз сосудистого доступа связан с полиморфизмом промоторной области генов системы гемостаза. Гомозиготные варианты SNP мутаций MTHFR 677 TT, F2 202010 GG чаще встречаются у пациентов с тромбозами. В то же время варианты генотипов F5 1691AG, FGB -455 GG являются протективными.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Гумилевский Б. Ю., Гумилевская О. П., Кабурнеева О. Г. // Вестник ВолгГМУ. — 2011. — № 3. — С. 88—92.
2. Мойсюк Я. Г., Беляев А. Ю. // Нефрология и диализ. — 2002. — Т. 4, № 1.
3. Al-Muhanna F., Al-Mueilo S. // Saudi J Kidney Dis Transpl. — 2008. — Vol. 19 (6). — P. 937—941.
4. Girndt M., Heine G. H. // Semin Dial. — 2007. — Vol. 20 (1). — P. 63—67.
5. Yao-Cheng Chuang, Jin-Bor Chen. // Nephrol Dial Transplant. — 2003. — Vol. 18. — P. 947—950.
6. Kapun S., Zibar L. // Acta Med Croatica. — 2008. — Vol. 62 (1). — P. 9—13.
7. Letachowicz K., Weyde W. // J Ren Nutr. — 2010. — Vol. 20 (5 Suppl). — P. 118—121.
8. Rios D. R., Fernandes A. P. // Clin Chim Acta. — 2011. — Vol. 412 (5—6). — P. 425—429.
9. Stuard S., Belcaro G. // Panminerva Med. — 2010. — Vol. 52 (2 Suppl 1). — P. 33—36.

### Контактная информация

**Гумилевская Оксана Петровна** — д. м. н. профессор кафедры клинической лабораторной диагностики, ВолгГМУ, e-mail: ogum@mail.ru