

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ  
ГЕТЕРОЗИГОТНОГО СОСТОЯНИЯ ГЕНОВ КОАГУЛЯЦИОННОГО  
ФАКТОРА V И ПРОТРОМБИНА**

**Петухова А.В., Зыкова У.В.**

**Научные руководители – доцент Ольховский И.А., доцент Субботина Т.Н.**

*Красноярский филиал ФГБУ Гематологический научный Центр  
Минздравоохранения России  
Сибирский федеральный университет*

**Введение**

На сегодняшний день по данным Росстата ведущими причинами смертности населения РФ являются болезни системы кровообращения. Структуру этих заболеваний составляют такие патологические состояния как инсульты, инфаркты, тромбозы, тромбоэмболии и др. Очевидно, что в развитии этих болезней участвуют различные факторы, как внешнесредовые, так и генетические.

Безусловно, особое значение при этом имеет гемостаз. Под гемостазом понимают совокупность механизмов, которые обеспечивают: сохранение жидкого состояния крови, предупреждение и остановку кровотечений, а также целостность кровеносных сосудов. Условно гемостаз принято подразделять на сосудистый, тромбоцитарный и плазменный. Плазменный гемостаз представляет собой каскад последовательных превращений, происходящих с участием 13 факторов свертывания.

Факторы свертывания – это белки плазмы крови, в результате последовательного взаимодействия которых образуется нерастворимый белок фибрин. Именно фибрин играет важнейшую роль в образовании кровяного сгустка. Результатом этого может быть остановка кровотечения при ранении сосуда. При таких состояниях как воспаление, прием гормональных контрацептивов, атеросклероз, стресс и т.д. инициируется чрезмерное образование фибрина, что в свою очередь может привести к сосудистым катастрофам.

Исследования системы гемостаза показали, что на образование тромбов большое влияние оказывают генетические полиморфизмы в генах факторов свертывания крови. Наибольшее клиническое значение имеют мутация в *гене фактора Лейдена* (V фактора) и мутация в *гене протромбина* (II фактора). Оба этих фактора играют важную роль в каскаде свертывания крови.

При реализации процесса свертывания крови на одном из этапов осуществляется активация V фактора, который способен совместно с ионами  $Ca^{2+}$  и активированным Ха фактором на фосфолипидной поверхности создать протромбиназный комплекс (*Рис.1*).

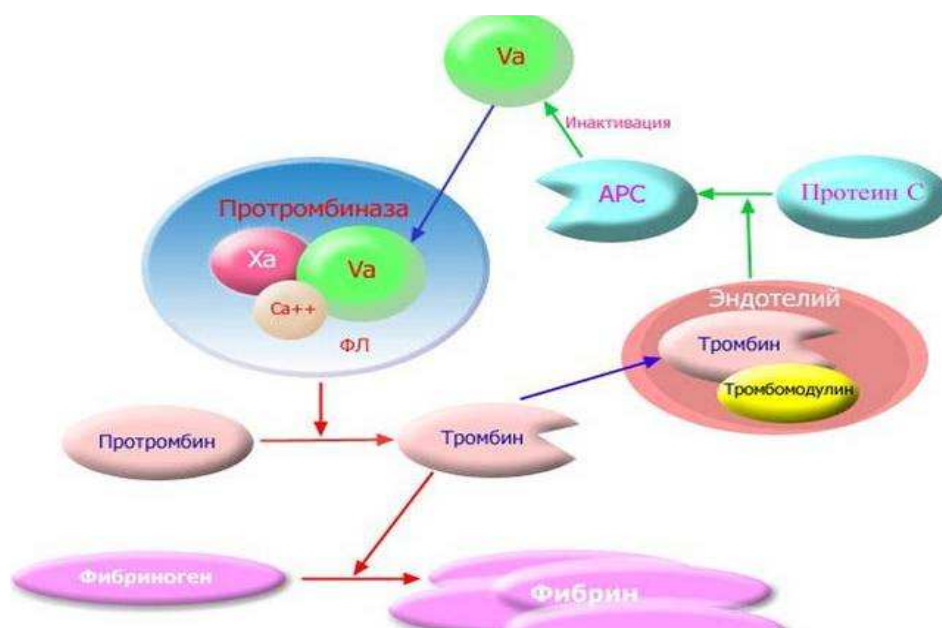


Рисунок.1 - Роль V фактора в каскаде свертывания крови

Функция протромбиназного комплекса заключается в отщеплении от молекулы *протромбина* пептидных фрагментов, при этом протромбин превращается в тромбин. Тромбин же, осуществляет полимеризацию фибрина из фибриногена.

Тромбин так же способен по принципу отрицательной обратной связи взаимодействовать на эндотелии сосуда с тромбомодулином. Образовавшийся комплекс активирует белок противосвертывающей системы - протеин С. Именно активированный протеин С (APC) разрушает Va фактор свертывания крови, блокируя тем самым образование тромбина.

Известно, что одной из важнейших причин тромбофилии является устойчивость Va фактора к разрушающему действию APC. Такое состояние называется резистентностью к APC. Главная причина описанной резистентности - Лейденская мутация. При этой мутации в гене V фактора свертывания крови происходит замена в 1691 нуклеotide гуанина на аденин, что приводит к замещению в белковой молекуле аргинина глутамином в положении 506 (FV, генотип Лейден, 1691 G->A; rs6025). Лейденскую мутацию обнаруживают у 20-40 % больных венозными тромбозами и тромбоемболиями. При ее наличии повышается риск первичных и рецидивирующих венозных тромбозов в 3—6 раз.

Мутация в гене протромбина характеризуется заменой нуклеотида гуанина нуклеотидом аденин в позиции 20210 (FII, 20210 G->A; rs1799963). В результате этого увеличивается экспрессия мутантного гена, и уровень протромбина может быть в полтора-два раза выше, чем в норме. Такое увеличение исследуемого белка способствует развитию сосудистых катастроф.

Таким образом целью нашей работы явилось исследование фенотипических проявлений гетерозиготного состояния генов V и II факторов свертывания крови.

#### **Материалы и методы**

В исследование были включены 406 человек, проживающих в г.Красноярске. Взятие крови производилось натощак из локтевой вены с помощью закрытой вакуумной системы. Для молекулярно-генетического анализа использовался антикоагулянт ЭДТА, для коагулологических тестов – цитрат натрия. Коагулологическое исследование проводилось на автоматическом коагулометре Sysmex CA-560. Определение резистентности фактора Va к действию APC проводили с помощью PeaPrC/FV теста. Протромбиновое время и протромбиновый индекс определяли

хронометрическим методом по Квику с использованием коммерческих реактивов НПО Ренам.

Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови проводили с использованием реагента «ДНК-экспресс-кровь» (НПО Литех). Далее проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с электрофоретической детекцией (наборы «SNP-экспресс», НПО Литех). Для подтверждения полученных результатов гетерозиготного состояния исследуемого гена проводили дополнительное тестирование ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени (ПЦР-РТ) при помощи «iCycler iQ5» (BioRad) (набор «SNP-экспресс-PB» НПО Литех).

#### **Результаты и их обсуждение**

В результате проведенной работы из 406 человек, протестированных на наличие мутации в гене фактора Лейдена, было выявлено 25 гетерозиготных носителей, что составило 6,2%. Обследование на наличие мутации в гене протромбина выявило 12 гетерозиготных носителей исследуемого гена из 403 человек той же выборки. Таким образом, частота встречаемости данной мутации составила 2,98%. При этом из всей анализируемой группы нами не было обнаружено ни одного человека с гомозиготной формой мутантного аллеля в исследуемых генах. Затем был проведен сравнительный анализ полученных нами результатов с литературными данными о частоте встречаемости исследуемых полиморфизмов в различных регионах нашей страны и за рубежом (Табл. 1)

Таблица 1 - Частоты генотипов исследуемых полиморфизмов в сравнении с другими популяциями.

<b>Ген, полиморфизм</b>	<b>Генотип</b>	<b>Красноярск</b>	<b>Московский регион, Ленинградская обл.</b>	<b>Европа</b>	<b>Украина</b>
<b><i>FV, G1691A (FV Leiden)</i></b>	<b><i>G/A G/G</i></b>	<b><i>6,2% 93,8%</i></b>	<b><i>2,60% 97,40%</i></b>	<b><i>4,40% 95,60%</i></b>	<b><i>3,50% 96,50%</i></b>
<b><i>FII, G20210A</i></b>	<b><i>G/A G/G</i></b>	<b><i>2,98% 97,02%</i></b>	<b><i>2,74% 92,26%</i></b>	<b><i>2,0-3,0% 97,0-98,0%</i></b>	<b><i>3,0% 97,0%</i></b>

Таким образом, по результатам данного этапа работы, можно сделать вывод о том, что распространенность носительства мутации в исследуемых генах у людей, проживающих в г.Красноярске в целом, статистически не превышает частоту их распространения в других популяциях.

На следующем этапе нашей работы из всей исследуемой выборки (406 человек) была выделена группа риска, которую составили 63 профессиональных спортсмена разрядника, участвующие в соревнованиях мирового уровня. Наличие исследуемых генетических полиморфизмов у спортсменов могут значительно увеличить предрасположенность к развитию тромбов, поскольку известны данные об увеличении риска тромбообразования при интенсивной физической нагрузке и спортивных травмах. При тестировании проб было выявлено 4 спортсмена с гетерозиготным носительством мутации в гене фактора Лейдена, что составило 6,3% от всей группы спортсменов. В то же время не было выявлено ни одного человека с носительством мутантного аллеля протромбина.

При исследовании фенотипических проявлений данных полиморфизмов, с помощью коагулогических тестов было показано, что фактически у всех носителей

Лейденской мутации выявляется снижение резистентности активированного протеина С до значений 0,3-0,8. У лиц без мутации данный показатель составляет  $1,1 \pm 0,3$ . Исследование параметра протромбинового времени не выявило каких либо изменений в работе данного белка у лиц с гетерозиготным состоянием гена протромбина.

#### **Выводы**

В результате проведенной работы были выявлены клинически здоровые носители генов предрасположенности к повышенному тромбообразованию. Фенотипическое исследование коагулогических сдвигов при данных полиморфизмах позволяет говорить о проявлении генетического статуса в случае с мутацией Лейдена в реакции резистентности APC и отсутствия каких-либо выявленных фенотипических проявлений в случае с мутацией в гене протромбина.