

УДК 575.165

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА *G1691A* В ГЕНЕ КОАГУЛЯЦИОННОГО ФАКТОРА V (*FV*)

© 2011 Э.А. Хисматуллина, Г.Р. Гумерова, Е.В. Воробьева, В.Ю. Горбунова

ГОУ ВПО «Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы», г. Уфа

Поступила 27.07.2011

Проведен анализ распределения частот генотипов и аллелей гена *FV* – Leiden у лиц, подвергающихся различным факторам риска развития тромбоэмболии. Мутация в гене *F5* (*FV*) – Leiden (1691G>A (Arg506Gln), приводит к изменению продукта гена, который является одним из ключевых звеньев патогенеза венозного тромбоза.

Ключевые слова: гены свертываемости крови, спортивная генетика, мутация Лейдена, привычное невынашивание.

Успехи молекулярной генетики, достигнутые в течение последних лет, позволили по-новому оценить многие факты, связанные с патологией системы гемостаза, включая наследственную предрасположенность к кровотечениям или тромбозам. Тромбофилия может быть наследственным нарушением, но может быть связана и с внешними причинами, такими как хирургические операции, ожирение, беременность, использование гормональных контрацептивов, повышение уровня гомоцистеина, постоянная физическая нагрузка или долгий период неподвижности.

Учитывая новизну и недостаточную освещенность вопросов, связанных с изучением влияния наследственных мутаций в генах, кодирующих факторы плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза, на особенности развития тромбоцистических осложнений, эти вопросы явились целью данной работы.

Целью исследования является оценка распределения частот генотипов и аллелей полиморфного варианта *G1691A* в гене коагуляционного фактора V (*FV*) – Leiden у лиц, подвергающихся различным факторам риска развития тромбоэмболии из Республики Башкортостан (РБ).

Процесс свертывания крови реализуется многоэтапным взаимодействием на фосфолипидных мембранах плазменных белков, называемых факторами свертывания крови. Существует 12 факторов свертывания крови (обозначаются римскими цифрами), необходимых для процесса коагуляции (свертывания) [2]. Коагуляционный фактор V является одним из важных компонентов свертывающей системы крови. Активированный фактор V, соединяясь с Ха на фосфолипидной поверхности, ускоряет реакцию образования тромбина в десятки тысяч раз. Функция протромбиназного комплекса заключается в отщеплении от молекулы протромбина пептидных фрагментов, превращающем протромбин в тромбин (фермент, осуществляющий поли-

меризацию фибрина из фибриногена). Фибрин является конечным продуктом свертывания крови. Ферментом, расщепляющим протромбин в протромбиназном комплексе, является фактор Ха, однако без участия фактора V эта реакция протекает очень медленно [1].

Ген *FV* кодирует аминокислотную последовательность белка – коагуляционного фактора V (фактор Лейдена). Ген *FV* локализован на длинном плече 1 хромосомы – 1q23. Полиморфизм 1691 G>A (R506Q) гена *FV* обусловлен заменой нуклеотидного основания гуанина (G) на аденин (A) в положении 1691 (экзон 10), что приводит к аминокислотной замене аргинина на глутамин в позиции 506. Замена аминокислоты одного из трех участков фактора V, в которых он расщепляется естественным антикоагулянтом – активированным протеином С придает устойчивость активной форме фактора Лейдена. Данная мутация фактора V, приводит к тому, что активированная форма фактора V (*Va*) становится относительно устойчивой к расщепляющему действию активированного протеина С, что приводит к гиперкоагуляции (повышенной свертываемости) крови [5, 6, 9].

Будучи в гетерозиготном состоянии, Лейденская мутация сопряжена с 3-7-кратным увеличением риска тромбообразования, у гомозигот этот риск повышен в 80-100 раз [3, 4, 7].

Риск тромбообразования у носителей Лейденской мутации может возрастать при наличии ряда провоцирующих факторов, таких как замедление тока крови, нарушение целостности сосудистой стенки и усиление процессов свертывания, хирургические вмешательства, длительная иммобилизация, травмы, тяжелые воспалительные заболевания, опухоли и др. Физическая нагрузка, которую постоянно испытывают профессиональные спортсмены, относится к внешним факторам, вызывающим развитие заболеваний вен. Беременность также может явиться дополнительным фактором развития тромбозов.

В настоящей работе представлены результаты двух групп людей с различными внешними факторами риска к тромбоэмболии: беременные женщины и профессиональные спортсмены.

Хисматуллина Эльмира Амировна, e-mail: elf214@mail.ru;
Гумерова Гузель Рифовна, e-mail: gumerovagr@yandex.ru;
Воробьева Елена Владимировна, канд. биол. наук, e-mail: vorobuevaev@rambler.ru; *Горбунова Валентина Юрьевна*, докт. биол. наук, проф., e-mail: obg bspu@mail.ru

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили образцы ДНК, полученные из цельной венозной крови 516 человек, проживающих в РБ.

Образцы ДНК получены после медицинского осмотра с письменного согласия испытуемых.

Исследуемая выборка была разделена на группы по уровню спортивных достижений: кандидаты в мастера спорта и мастера спорта, в возрасте 17-30 лет, специализирующиеся в следующих видах спорта: баскетбол, мини-футбол, русская лапта, волейбол, единоборства, легкая атлетика, плавание, гиревой спорт, хоккей, лыжные гонки; группа контроля (лица, профессионально не занимающиеся спортом).

Также была исследована выборка беременных женщин, которые по результатам обследования

Таблица 1. Тип полиморфизма, последовательность праймеров анализируемого ДНК-локусов

Ген, хромосомная локализация	Полиморфизм (локализация)	Праймеры (рестриктаза)
1	2	3
<i>FV</i> (1q23)	G1691 A (10 экзон)	5'-TCTCTTGAAGGAATGCCCCATTA-3' 5'-GGGСТААТААТАGGAСТACTTСТААТС-3' (MnlI)

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета программ "Statistica for Windows 5.0" (StatSoft), программного обеспечения MS Excel 98 (Microsoft) и компьютерных программ "GENEPOP" и "RxC" (Rows x Columns) [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного варианта G1691A в гене

Таблица 2. Распределения частот генотипов и аллелей полиморфного варианта *G1691A* в гене коагуляционного фактора V (*FV*) у в женщин в РБ

		Генотипы			Аллели	
		*G/*G	*G/*A	*A/*A	*G	*A
Контроль n=103	n	100	3	0	203	3
	p _i ± Sp	97,09±2,12	2,91±1,66	0	98,54±0,83	1,46±0,83
С акушерским анамнезом n=112	n	95	17	0	207	17
	p _i ± Sp	84,82±3,39	15,18±3,39	0	92,41±1,77	7,59±1,77
		χ ² =8,1701; P=0.0052	χ ² =8.1701; P=0.0052	χ ² =0.0005; P=1.005	χ ² =7.7716; P=0.0417	
С невынашиванием n=97	n	71	23	3	165	29
	p _i ± Sp	73.20±4,5	23,71±4,31	3,09±1,76	85,05±2,56	14,95±2,56
		χ ² = 21.1139; P=0.0005	χ ² =17.3126; P=0.0006	χ ² =1.4800; P=0.2247	χ ² =22.9124; P=0.0005	

Прим. здесь и далее: n – численность группы; p – частота генотипа (аллеля); Sp – ошибка; χ² – критерий значимости различий популяций по распределениям частот генотипов (аллелей); P – вероятность

Частоты аллелей и генотипов данного полиморфного варианта в группе беременных женщин также представлены в таблице 2. Генотип *G/*G

были разделены на три группы: беременные с отягощенным акушерским анамнезом; беременные с привычным невынашиванием беременности; рожавшие женщины с не выявленными нарушениями гемостаза (контроль).

ДНК была выделена из периферической крови человека стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции [8].

Анализ полиморфного ДНК-локуса в гене *FV* (табл. 1) осуществляли методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК и ПДРФ-анализа. Продукты амплификации анализировались электрофоретически в 7% полиакриламидном геле. Окрашивание гелей проводили бромистым этидием с последующей визуализацией ДНК в ультрафиолетовом свете.

коагуляционного фактора V (FV) у в женщин в РБ. При типировании по полиморфному варианту *G1691A*, локализованному в 10 экзоне гена *FV*, выявлено два аллеля: *(1691)*G, *(1691)*A и три генотипа - *G/*G, *G/*A, *A/*A. В группе контроля генотип *G/*G встречается с частотой 97,09%, генотип *G/*A с частотой 2,91%, а генотип *A/*A не выявлен. Аллель *G обнаружен с частотой 98,54%, аллель *A – с частотой 1,46%. (табл. 2).

встречается с частотой 84,82%, генотип *G/*A с частотой 15,18%, генотип *A/*A не выявлен. Аллель *G обнаружен с частотой 92,41%, аллель *A – с

частотой 7,59%. В группе с привычным невынашиванием генотип $*G/*G$ встречается с частотой 73,20%, генотип $*G/*A$ с частотой 23,71%, а частота $*A/*A$ генотипа составила 3,09%. Аллель $*G$ обнаружен с частотой 85,05%, аллель $*A$ – с частотой 14,95%.

Сравнительный анализ распределения частот генотипов гена *FV* выявил статистически значимые различия между контролем и 1 и 2 группами вследствие понижения частоты гомозиготного генотипа $*G/*G$ (84,82% ($P=0.0052$) и 73,20% ($P=0.0006$) соответственно, против 97,09%). Статистически значимые различия между контролем и 1 и 2 группами вследствие повышения частоты гетерозиготного генотипа $*G/*A$ (15,18% ($P=0.0052$) и 23,71% ($P=0.0006$) соответственно, против 2,91%).

Таким образом, исходя из анализа полученных данных, установлено: 1) полиморфный вариант *G1691A* гена *FV* ассоциирован с осложнениями при беременности и привычным невынашиванием; 2)

частота аллеля $*G$ и генотипа $*G/*G$ в группах 1 и 2 с достоверно ниже таковой в группе контроля; 3) частота генотипа $*G/*A$ в 1 и 2 группах достоверно выше таковой в группе контроля.

Анализ распределения частот генотипов и аллелей *G1691A* полиморфизма в гене коагуляционного фактора V (*FV*) в группах людей, различающихся по уровню спортивных достижений. При типировании полиморфного варианта *G1691A* гена коагуляционного фактора V *FV* выявлено два аллеля – $FV*G$ и $FV*A$ и три генотипа: $*G/*G$, $*A/*A$, $*A/*G$.

В группе людей, профессионально не занимающихся спортом (контроль), генотип $*G/*G$ представлен с частотой 29,29%, генотип $*G/*A$ с частотой 67,8% и генотип $*A/*A$ с частотой 3,03%.

В группе спортсменов генотип $*G/*G$ представлен с частотой 19,05%, генотип $*G/*A$ с частотой 70,5%, генотип $*A/*A$ – 10,5% (табл. 3).

Таблица 3. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *G1691A* в гене коагуляционного фактора V (*FV*) в группах с различным уровнем спортивной подготовки

		Генотипы			Аллели	
		$*G/*G$	$*G/*A$	$*A/*A$	$*G$	$*A$
Группа контроля n=99	n	29	67	3	125	73
	$p_i \pm Sp$	29,3±4,5	67,8±4,7	3,03	63,1±3,4	36,8±3,4
Группа спортсменов n=105	n	20	74	11	114	96
	$p_i \pm Sp$	19,05±3,8	70,5±4,4	10,5±2,9	54,3±3,4	45,7±3,4
		$\chi^2=2,39$; $P=0.12$	$\chi^2=0,07$; $P=0.77$	$\chi^2=3,33$; $P=0,06$	$\chi^2=2,93$; $P=0.08$	

Наибольшей частотой встречаемости в обеих исследованных группах, независимо от уровня спортивной подготовки, обладал гетерозиготный генотип $*G/*A$ (67,8% в группе контроля; 70,5% в группе спортсменов). Генотип $*G/*G$ встречался с частотой 29,3% и 19,05% соответственно. Самым редким явился гомозиготный генотип $*A/*A$ – 3,03% в группе контроля и 10,5% в группе спортсменов.

В группе контроля аллель $*G$ встречался чаще (63,1%) аллеля $*A$ (36,8%), и в группе спортсменов также преобладает аллель $*G$ (54,3%). Частота аллеля $*A$ в группе спортсменов составила 45,7%.

Сравнительный анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного варианта *G1691A* гена коагуляционного фактора V (*FV*) не выявил статистически значимых различий между группой контроля и группой спортсменов. Выявлена тенденция к повышению гомозиготного генотипа $*A/*A$ в группе спортсменов по сравнению с группой контроля (10,5% против 3,03%, $\chi^2 = 3,33$; $P=0.06$).

В заключение следует сказать, что данное исследование посвящено анализу генетических ассоциаций полиморфного варианта *G1691A* в гене коа-

гуляционного фактора V (*FV*), ключевого компонента системы свертываемости крови, в группах людей, подвергающихся различным факторам риска развития тромбозомболии.

В ходе работы была исследована частота встречаемости генетического маркера, дисфункции плазменного, тромбоцитарного звеньев гемостаза при осложнениях беременности тромбозами, тромбозомболиями, маточно-плацентарной недостаточностью, задержкой развития и антенатальной смертью плода, самопроизвольным и привычным абортom, преждевременной отслойкой нормально расположенной плаценты.

Установлены различия в распределении частот генотипов и аллелей гена, вовлеченных в развитие указанных осложнений у женщин с наследственными формами тромбофилии.

Определены частоты генотипов и аллелей *G1691A* полиморфизма в гене *FV* в группах лиц с различным уровнем спортивной подготовки.

Сравнительный анализ не выявил статистически значимых различий между группой контроля и группой спортсменов, но в выборке спортсменов наблюдается тенденция к повышению частоты гомозиготного генотипа $*A/*A$ по сравнению с груп-

пой контроля (10,5% против 3,03%, соответственно $\chi^2 = 3,33$; $P=0.06$).

Наличие мутантного аллеля гена *FV* (фактора Лейдена) в значительной степени увеличивает риск венозных тромбозов, при этом необходимо проведение профилактических мер для коррекции тренировочного процесса и улучшения качества жизни спортсменов.

Полученные данные представляют интерес для понимания молекулярно-генетических механизмов предрасположенности к тромбозам и могут быть использованы при проведении профилактических мероприятий и выделения в группы риска беременных женщин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьев А.И., Бувеч Е.И. Проблемы физиологии и патологии системы гемостаза. Барнаул, 2000. 451 с.
2. Гальперин С.И. Физиология человека и животных. М.: Высшая школа, 1977. 653 с.
3. Готов О.С., Готов А.С., Баранов В.С. Состояние и перспективы генетического тестирования в спорте. Генетический паспорт спортсмена становится реальным // Медико-биологические технологии повышения работоспособности в условиях напряжённых физических нагрузок. Вып. 2. ООО «Анита Пресс», 2006. С. 39-51.
4. Зайнуллина М.С., Корнюшина Е.А., Мозговая М.Л. и др. Тромбофилия в акушерской практике / под ред. Э.К. Айламазяна, Н.Н. Петрищева. СПб., 2005. 46 с.
5. Макацария А.Д., Бицадзе В.О. Тромбофилии и противотромботическая терапия в акушерской практике. М.: Триада-Х, 2003. 904 с.
6. Bertina R.M., Koeleman B.P.C., Koster T. et al. // Nature. 1994. V. 369. P. 64-67.
7. Khan S., Dickerman J.D. Hereditary thrombophilia // Thrombosis J. 2006. V. 4. № 15.
8. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA // Methods in Molecular Biology. V. 2 / ed. Walker J.M., N.Y., L.: Human Press, 1984. P. 31-34.
9. Nicolaes G.A.F., Dahlback B. // Hematol. Oncol. Clinics of North Amer. 2003.V. 17. I. 1. P. 37-61.
10. Roff D.A., Bentzen P. The statistical analysis of mitochondrial DNA: χ^2 and problem of small samples // Mol. Biol. Evolution. 1998. V. 6. P. 539-545.

MOLECULAR-GENETIC RESEARCH OF POLYMORPHIC VARIANTS G1691A IN GENE OF COAGULATIVE FACTOR V (*FV*)

© 2011 E.A. Khismatullina, G.R. Gumerova, E.V. Vorobeva, V.Yu. Gorbunova

Bashkir State Pedagogical University named by M. Akmulla, Ufa

The analysis of distribution of frequencies of genotypes and allele gene *FV* – Leiden at the persons who are exposed to various risk factors of development thrombembolia is carried out. A mutation in gene *F5* (*FV*) – Leiden (1691G>A (Arg506Gln), leads to change a product of a gene which is one of key links pathogenesis a venous thrombosis.

Key words: genes of coagulability of blood, sports genetics, a mutation of Leiden, recurrent miscarriage.