

DOI 10.52727/2078-256X-2021-17-29-37

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА F5 У МУЖЧИН С КОРОНАРНЫМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

**Е. В. Стрюкова¹, Е. В. Шахтшнейдер^{1,2}, Д. Е. Иванощук^{1,2}, Ю. И. Рагино¹, Я. В. Полонская¹,
И. С. Мурашов³, А. М. Волков³, А. В. Кургузов³, А. М. Чернявский³, Э. С. Валеев²,
В. Н. Максимов¹, Е. В. Каштанова¹**

¹ *НИИ терапии и профилактической медицины — филиал ФГБНУ ФИЦ
Институт цитологии и генетики СО РАН
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1*

² *ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 1*

³ *ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика
Е. Н. Мешалкина» Минздрава России
630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15*

Фактор V, кодируемый геном F5, является прокоагулянтным фактором свертывания крови, который усиливает выработку тромбина, центрального фермента, преобразующего фибриноген

Стрюкова Евгения Витальевна — аспирант, младший научный сотрудник лаборатории клинических, биохимических, гормональных исследований терапевтических, ORCID ID0000–0001–5316–4664, e-mail: stryukova.j@mail.ru

Шахтшнейдер Елена Владимировна — канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний ИИТПМ — ФИЦ ИЦиГ СО РАН.; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и биоинформатики ФГАОУВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»; e-mail: shakhtshneyderev@bionet.nsc.ru, ORCID ID0000–0001–6108–1025,

Иванощук Динара Евгеньевна — научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний ИИТПМ — ФИЦ ИЦиГ СО РАН.; младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и биоинформатики ФГАОУВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»; ORCID0000–0002–0403–545X, e-mail: dinara@bionet.nsc.ru

Рагино Юлия Игоревна — д-р мед. наук, чл.-корр. РАН, проф., рук. . ORCID ID0000–0002–4936–8362. e-mail: ragino@mail.ru

Полонская Яна Владимировна — д-р биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории клинических, биохимических, гормональных исследований терапевтических заболеваний. ORCID ID0000–0002–3538–0280 e-mail: yana-polonskaya@yandex.ru,

Мурашов Иван Сергеевич — научный сотрудник лаборатории патоморфологии, ORCID ID0000–0002–3712–1258 e-mail: ivmurashov@gmail.com

Волков Александр Михайлович — д-р мед. наук, проф., зав. лабораторией патоморфологии, ORCID ID0000–0001–9697–7091, e-mail: iren167@yandex.ru,

Кургузов Алексей Витальевич — научный сотрудник центра хирургии аорты, коронарных и периферических артерий, ORCID ID0000–0003–1345–2199, e-mail: aleksey_kurguzov@mail.ru,

Чернявский Александр Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий центром хирургии Аорты, коронарных и периферических артерий Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е. Н. Мешалкина «Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, e-mail: amchern@mail.ru, тел.: +7(383) 3280066 ORCID ID0000–0001–9818–8678

Валеев Эмиль Салаватович — студент, Новосибирский государственный университет (НГУ), Институт Медицины и Психологии им. Зельмана (ИМПЗ), ORCID0000–0003–3480–3963, e-mail: emil@bionet.nsc.ru

Максимов Владимир Николаевич — д-р мед. наук, проф., зав. лабораторией молекулярно — генетических исследований терапевтических заболеваний ORCID ID0000–0002–7165–4496. e-mail: medik11@mail.ru

Каштанова Елена Владимировна — канд. биол. наук, доцент, зав. лабораторией клинических, биохимических, гормональных исследований терапевтических заболеваний. ORCID ID0000–0003–2268–4186, e-mail: elekstanova@yandex.ru.

© Стрюкова Е. В., Шахтшнейдер Е. В., Иванощук Д. Е., Рагино Ю. И., Полонская Я. В., Мурашов И. С., Волков А. М., Кургузов А. В., Чернявский А. М., Валеев Э. С., Максимов В. Н., Каштанова Е. В., 2021

в фибрин, что приводит к образованию тромба. Ген *F5* локализован на хромосоме 1q24.2 и состоит из 25 экзонов. Существуют различные варианты в гене *F5*, приводящие к резистентности активированного протеина С (АПС) (устранение места расщепления АПС в факторах V и Va), что может вызывать артериальные и венозные тромбозы. Целью настоящего исследования — выполнить анализ вариантов гена *F5* у пациентов с диагнозом «коронарный атеросклероз» без острого коронарного синдрома со стабильной стенокардией напряжения II–IV функционального класса (ФК), подтвержденным данными коронароангиографии, с использованием метода полноэкзомного секвенирования. **Материал и методы.** Исследование проведено в рамках Программы совместных научно-исследовательских работ НИИ терапии и профилактической медицины — филиала ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН и ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е. Н. Мешалкина» Минздрава России. В исследование включены 30 мужчин 40–70 лет с коронароангиографически верифицированным коронарным атеросклерозом без острого коронарного синдрома, со стабильной стенокардией напряжения II–IV ФК. Пациенты поступали на операцию коронарного шунтирования, в ходе которой по интраоперационным показаниям была проведена эндартерияэктомиа из коронарных артерий. Полноэкзомное секвенирование выполнено с использованием набора SureSelectXT Human All Exon v.6 + UTR на приборе Illumina NextSeq 500 (США). **Результаты.** У 30 пациентов в гене *F5* обнаружено 28 однонуклеотидных полиморфизмов. У пациентов с коронарным атеросклерозом rs9332701 гена *F5* встречается в 3,33 раза чаще, а rs6027 — в 1,67 раза чаще, чем в популяции. Полиморфизм rs184663825 обнаружен в 3,33% случаев, в то время как его встречаемость в популяции составляет 0,05%. Для вариантов rs6034 и rs144979314 показано возможное повреждающее действие на белковый продукт. **Заключение.** Однонуклеотидные полиморфизмы rs9332701, rs6027, rs184663825, rs6034, rs144979314 гена *F5* являются объектом интереса для включения в генетические панели анализа факторов риска развития коронарного атеросклероза.

Ключевые слова: ген *F5*, фактор V, rs9332701, rs6027, rs184663825, rs6034, rs144979314, коронарный атеросклероз.

Фактор V, кодируемый геном *F5*, является прокоагулянтным фактором свертывания крови, который усиливает выработку тромбина. Последний представляет собой фермент, преобразующий фибриноген в фибрин, что приводит к образованию тромба. Фактор V синтезируется как неактивный фактор, циркулирующий в плазме, а небольшое количество тромбина в месте раны активирует его путем ограниченного протеолиза. Этот активированный фактор V (фактор Va) затем служит кофактором в протромбиназном комплексе, который расщепляет протромбин, чтобы генерировать больше тромбина.

Тромбин (связанный с тромбомодулином на поверхности эндотелиальных клеток) может замедлять собственную выработку по принципу отрицательной обратной связи. Он делает это путем преобразования протеина С в активированный протеин С (АПС) — протеазу, которая действует как мощный природный антикоагулянт. АПС разрушает активированный фактор Va (и активированный фактор VIIIa, на более раннем этапе в каскаде коагуляции), в конечном счете снижая выработку тромбина. АПС

использует белок S в качестве кофактора во всех своих реакциях расщепления [1].

Ген *F5* локализован на 1q24.2 и состоит из 25 экзонов [2]. Существуют различные мутации в гене *F5*, приводящие к АПС-резистентности (устранении места расщепления АПС в факторах V и Va): фактор V Cambridge (замена Arg306 на треонин) [3]), фактор V Nara (замена Trp1920 на аргинин) [4], фактор V Ливерпуль (замена Ile359 на треонин) [5, 6], фактор V Бонн (замена Ala512 на валин) [7].

Наиболее часто встречается лейденовская мутация фактора V (FVL) — результат единственной точечной мутации rs6025 в гене фактора V (1691 G>A), которая приводит к замене Arg506 на глутамин (R506Q). FVL — аутосомно-доминантная, и 99% людей ее носителей гетерозиготны по этому варианту. Остальные (1%) являются гомозиготами или крайне редкими случаями компаунд-гетерозигот по FVL — вариант по другому аллелю *F5*, который вызывает дефицит фактора V, в результате чего FVL является его единственной доступной формой в циркуляции [8–11]. Эти пациенты, по-видимому,

более склонны к тромбозам, чем гетерозиготные родственники с одним только FVL [12–14].

Примерно у 5% гетерозигот FVL будут тромбозэмболические события в течение жизни. Причины высокой вариабельности фенотипа не до конца понятны. Это может быть частично объяснено сосуществованием других наследственных тромбофилий или генетических модификаторов, еще не полностью изученных в настоящее время. Гетерозиготность по FVL является наиболее распространенной наследственной тромбофилией у европеоидов с венозной тромбозэмболией (ВТЭ). Из 121 мужчины с ВТЭ, участвовавших в исследовании Physicians' Health Study, примерно 12% были гетерозиготными по FVL [15]. У 31 мужчины старше 60 лет с ВТЭ FVL присутствовал в 26% случаев (8 человек). В общей популяции без личного анамнеза ВТЭ исследование с участием 1690 неродственных лиц из Европы выявило распространенность FVL около 4%, а у 356 человек из Канады она составила около 5% [16]. В исследовании, включавшем 4047 мужчин и женщин, и исследовании здоровья женщин (оба в США), обнаружены следующие частоты гетерозиготности FVL [17]: европейцы — 5,3%, латиноамериканцы — 2,2%, коренные американцы — 1,2%, афро-американцы — 1,2%, американцы азиатского происхождения — 0,45%.

Связь между мутациями *F5* и артериальной тромбозэмболией остается спорной, и исследования по данному вопросу касаются в основном FVL. В исследовании Physicians' Health Study, в котором приняли участие почти 15 000 условно здоровых мужчин, FVL был одинаково распространен среди пациентов с инфарктом миокарда (ИМ) и инсультом в качестве контроля [15]. Другие небольшие исследования (<1000 пациентов) также не обнаружили ассоциации FVL и ИМ [18–22]. Однако выполненный в 2006 г. метаанализ выявил увеличение риска развития ишемической болезни сердца при наличии FVL, так же как и метаанализ 2010 г., включающий более 66 000 случаев ИМ у пациентов в возрасте до 45 лет и более 91 000 человек в контрольной группе (соответственно отношение шансов 1,17, 95%-й доверительный интервал (ДИ) 1,08–1,28) [23] и 1,66, 1,15–2,38) [24]. У небольших групп пациентов с инсультом или транзиторной ишемической атакой FVL ассоциируется с повышенным риском, особенно у молодых людей, женщин и курильщиков [22, 25–27].

Цель настоящего исследования — выполнить анализ вариантов гена *F5* у пациентов с диагнозом «коронарный атеросклероз» без острого коронарного синдрома со стабильной стенокардией напряжения II–IV функционального класса (ФК), подтвержденным данными коронароангиографии, с использованием метода полноэкзомного секвенирования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено в рамках Программы совместных научно-исследовательских работ НИИ терапии и профилактической медицины — филиала ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН (научный руководитель работы — д-р мед. наук, чл.-корр. РАН Ю.И. Рагино) и ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России (ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России; научный руководитель работы — д-р мед. наук, проф. А.М. Чернявский), одобрено локальными этическими комитетами обоих учреждений. До включения в исследование от всех участников получено письменное информированное согласие.

В исследование вошли 30 мужчин 40–70 лет с коронароангиографически верифицированным коронарным атеросклерозом без острого коронарного синдрома, со стабильной стенокардией напряжения II–IV ФК. Пациенты поступали в клинику ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России на операцию коронарного шунтирования, в ходе операции по интраоперационным показаниям им проведена эндартерэктомия из коронарных артерий. Полученный материал эндартерэктомии был поперечно разделен на фрагменты, содержащие атеросклеротические бляшки для проведения гистологических исследований. Гистологический анализ фрагментов интимы/меди коронарных артерий после стандартной окраски гематоксилином и эозином и по методу Ван Гизона проводился на бинокулярном микроскопе Axiostar Plus (Zeiss AG, Германия) с цифровым фотовыходом.

Критериями исключения пациентов из исследования были ИМ давностью менее шести месяцев, острые воспалительные заболевания, обострение хронических воспалительных заболеваний, активные заболевания печени, почечная недостаточность, онкологические заболевания.

Геномная ДНК выделена из лейкоцитов венозной крови путем экстракции фенол-хлороформом [28]. Качество анализируемой ДНК оценивали с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., США). Обогащение и подготовка библиотек выполнялись с использованием набора SureSelectXT Human All Exon V6 +UTR (Agilent Technologies Inc.), готовые библиотеки анализировали с использованием платформы Illumina Nextseq 500 (Illumina, США). Анализ данных секвенирования включал картирование данных на геном человека версии GRCh38 с помощью программы Burrow–Wheeler Alignment tool (BWA v.0.7.17) (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>). Покрывание при экзомном секвенировании составляло не менее 50 прочтений с качеством $70 < Q < 100$. После биоинформационной обработки проведен поиск вариантов. Интерпретация данных, полученных методом

секвенирования, выполнена в соответствии с рекомендациями Американского колледжа медицинской генетики и геномики [29].

Проведен анализ литературных данных выявленных вариантов в исследуемых генах (PubMed, HGMD), оценка частоты встречаемости в базах данных 1000genomes (<http://www.internationalgenome.org/>) и gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>). Выявленные варианты в изученных генах тестированы *in silico* с помощью программы PolyPhen-2 с целью предсказания возможного функциональнозначимого эффекта (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

У 30 пациентов в гене *F5* обнаружено 28 однонуклеотидных вариантов (Таблица 1). Ряд вариантов представлен синонимичными заменами rs6037, rs6036, rs6015,

Таблица 1

Варианты гена *F5* у пациентов с коронарным атеросклерозом в Западной Сибири

Номер однонуклеотидного варианта	Позиция на хромосоме (GRCh38.p12)	Вариант	Частота редкого аллеля (GnomAD)
1	2	3	4
rs9332701	chr1:169515529	p.Met2148Thr	G=0,03
rs6037	chr1:169544345	p.Thr642=	T=0,07
rs6036	chr1:169546488	p.Glu572=	T=0,07
rs6015	chr1:169550656	p.Asn460=	G=0,07
rs6033	chr1:169552615	p.Met413Thr	G=0,07
rs200583841	chr1:169526042	c.5600–25T>C	G=0,001
rs6027	chr1:169514323	p.Asp2222Gly	C=0,06
rs2227243	chr1:169514524	c.6529–65A>G	G=0,04
rs6013	chr1:169518583	c.6194–20C>T	T=0,04
rs9332639	chr1:169524657	c.5788+180T>C	G=0,06
rs1800595	chr1:169541110	p.His1327Arg	C=0,06
rs6018	chr1:169542640	p.Asn817Thr	G=0,06
rs9332609	chr1:169540245	c.4796+49A>C	G=0,06
rs6024	chr1:169542801	p.Glu763=	C=0,06
rs184663825	chr1:169586275	p.Ala38Thr	A=0,0005
rs6035	chr1:169552611	p.Lys414=	C=0,09
rs12139696	chr1:169546687	c.1612–95T>C	G=0,08
rs145706683	chr1:169518602	c.6194–39A>G	C=0,0005
rs182046835	chr1:169520505	c.6193+15T>C	G=0,0001
rs6034	chr1:169529782	p.Leu1749Val	C=0,003
rs6011	chr1:169530940	p.Thr1685Ser	C=0,003
rs140984709	chr1:169547152	c.1612–560G>A	T=0,07
rs6010	chr1:169530972	p.Gly1674=	C=0,09
rs9332608	chr1:169540880	p.Pro1404Ser	A=0,08
rs41272457	chr1:169542165	p.Pro975=	A=0,02
rs144979314	chr1:169542868	p.Asn741Ser	C=0,002
rs6023	chr1:169559146	c.730+7C>T	A=0,06
rs202118934	chr1:169582408	c.250+23T>A	T=0,0006

rs6024, rs6035, rs6010, rs41272457 и «вероятно доброкачественными» заменами rs6033, rs1800595, rs6018, rs6011, rs9332608. Определены 11 вариантов, расположенных в интронах гена *F5*: rs200583841, rs2227243, rs6013, rs9332639, rs9332609, rs12139696, rs145706683, rs182046835, rs140984709, rs6023, rs202118934. Rs6025 — FVL — у пациентов с коронарным атеросклерозом в нашем исследовании не выявлена. Все обнаруженные варианты находились в гетерозиготном состоянии.

При анализе с использованием программного обеспечения прогнозирования структуры белка PolyPhen-2 для вариантов rs9332701 (p.Met2148Thr), rs6027 (p.Asp2222Gly), rs184663825 (p.Ala38Thr) показана высокая

вероятность повреждающего действия на белковый продукт (score 0,999, 0,997 и 1,000 соответственно, рисунок). Rs6027 в базе данных ClinVar отмечена как «доброкачественная» в отношении ассоциации с развитием тромбофилии, обусловленной FVL, ассоциация данного варианта с другими фенотипами не выявлена. У одного из обследованных пациентов с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях определен редкий «вероятно патогенный» вариант rs184663825 с частотой редкого аллеля $A=0,0005$ по данным базы gnomAD.

Для вариантов rs6034 (p.Leu1749Val) и rs144979314 (Asn741Ser) показано возможное повреждающее действие на белковый продукт (score 0,941 и 0,919 соответственно, см. рисунок). Вариант rs6034 определен у одного из пациентов с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях, частота редкого аллеля в популяциях составляет $C=0,003$ по данным базы gnomAD. Вариант rs144979314 (Asn741Ser) с частотой редкого аллеля $C=0,002$ обнаружен у одного обследованного с наличием стабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях.

У лиц с коронарным атеросклерозом вариант rs9332701 гена *F5* встречается в 3,33, а rs6027 — в 1,67 чаще, чем в популяции. Частота редкого аллеля rs184663825 у пациентов с коронарным атеросклерозом составляет 3,33%, в то время как в популяции по данным базы gnomAD — 0,05%. Частота редких аллелей rs6034 и rs144979314 не отличалась от популяционной. Однонуклеотидный вариант rs6027 находится в неравновесии по сцеплению с аллельными вариантами rs6015, rs6033, rs6036, rs6037 (r^2 0.88 D' 1.000) и rs6018 и rs6024 (r^2 1.00 D' 1.000) гена *F5*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования ассоциации вариантов гена *F5* (за исключением лейденской мутации) с такими клиническими проявлениями, как венозные и артериальные тромбозы, являются малочисленными.

Гетерозиготы по rs9332701 имеют на 25% ниже уровень фактора V в плазме крови и ассоциированы с активированным частичным тромбопластиновым временем независимо от FVL [30, 31]. Кроме того, в исследовании Lu-Chen

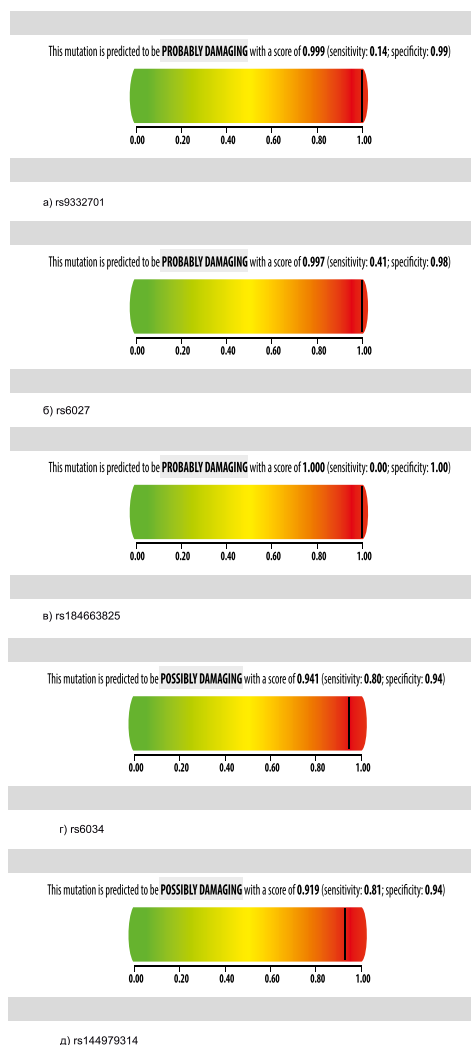


Рис.1

Результаты анализа вариантов гена *F5* с использованием PolyPhen-2

Weng et al. данный показатель был достоверно ассоциирован с однонуклеотидными полиморфизмами, которые находятся в области *F5* на хромосоме 1q23 (rs9332701 и rs2239852) [32]. Генотип CC rs9332701 связан с уменьшением содержания фактора V (79 Ед/дл), генотипы СТ и ТТ — с повышением (в среднем на 7,7 и 13,6 Ед/дл соответственно) [33]. У 11 пациентов с недостаточностью фактора V вариант rs9332701 выявлен в трех случаях (три сестры) [34]. По данным исследования О. Segers et al., rs9332701 у гетерозигот по FVL, но не у родственников без FVL, увеличивал нормализованный коэффициент чувствительности АПС на основе протромбиназы, который является маркером риска ВТЭ и модулируется общими однонуклеотидными полиморфизмами *F5*, влияющими на соотношение содержания дефектного (мутация FVL) и нормального вариантов фактора V [35].

Полиморфизм rs6027 гена *F5* был предсказан как повреждающий; в ряде исследований показано, что он связан с дефицитом фактора V [36, 37]. По данным работы Т. Yamazaki et al., мутация Asp2194Gly (rs6027) гена *F5* играет ключевую роль в нарушении секреции измененного фактора V, препятствуя его транспорту из эндоплазматического ретикула в комплекс Гольджи. Установлено, что повреждающий эффект мутации Asp2194Gly является доминирующим среди четырех изученных мутаций (Met385Thr, His1299Arg, Met1736Val и Asp2194Gly) [38]. В исследовании, проведенном в Пакистане, сообщается об ассоциации варианта *F5* p.Asp2222Gly (rs6027) с преэклампсией [39]. В некоторых российских работах [40, 41] у пациентов с острым коронарным синдромом с подъемом сегмента ST изучен вариант rs6027 гена *F5*, однако статистической значимости не обнаружено.

В литературе не встречаются данные об ассоциации редких вариантов rs184663825, rs6034, rs144979314 гена *F5* с клиническими фенотипами, включая венозные и артериальные тромбозы. Для оценки их функциональной значимости требуются дальнейшие исследования, в том числе для пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и коагулопатиями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У пациентов с коронарным атеросклерозом без острого коронарного синдрома со стабильной стенокардией напряжения II–IV ФК выявлено пять однонуклеотидных вариантов (rs9332701, rs6027, rs184663825, rs6034 и rs144979314) гена *F5*, которые могут приводить к нарушению функции фактора V и являются объектом интереса для включения их в генетические панели анализа факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Для проверки их функциональной значимости требуются дальнейшие исследования.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента РФ по поддержке ведущих научных школ НШ-2595.2020.7.

Благодарности

Авторы благодарят заведующего сектором геномных механизмов онтогенеза ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», в.н.с., канд. биол. наук Фишмана В.С. за помощь в проведении биоинформационного анализа. Авторы благодарят пациентов за участие в этом исследовании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Neuenschwander P.F. Coagulation cascade: Factor V. In: Encyclopedia of Respiratory Medicine, Four-Volume Set, Elsevier Inc.; 2006: 490–494. doi: 10.1016/B0-12-370879-6/00083-1
2. NCBI. F5 coagulation factor V [Homo sapiens (human)] — Gene — NCBI. Gene. 2016.
3. Williamson D., Brown K., Luddington R. et al. Factor V cambridge: A new mutation (Arg306→Thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood*, 1998; 91 (4): 1140–1144. doi: 10.1182/blood.v91.4.1140
4. Nogami K., Shinozawa K., Ogiwara K. et al. Novel FV mutation (W1920R, FVNara) associated with serious deep vein thrombosis and more potent APC resistance relative to FVLeiden. *Blood*, 2014; 123 (15): 2420–2428. doi: 10.1182/blood-2013-10-530089

5. Steen M., Norström E.A., Tholander A.L. et al. Functional characterization of factor V–Ile359Thr: A novel mutation associated with thrombosis. *Blood*, 2004; 103 (9): 3381–3387. doi: 10.1182/blood-2003-06-2092
6. Mumford A.D., McVey J.H., Morse C.V. et al. Factor V I359T: a novel mutation associated with thrombosis and resistance to activated protein C. *Br.J. Haematol.*, 2003; 123 (3): 496–501. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04624.x
7. Pezeshkpoor B., Castoldi E., Mahler A. et al. Identification and functional characterization of a novel F5 mutation (Ala512Val, FVBonn) associated with activated protein C resistance. *J. Thromb. Haemost.*, 2016; 14 (7): 1353–1363. doi: 10.1111/jth.13339
8. Reitsma P.H., Bernardi F., Doig R. G. et al. Protein C deficiency: A database of mutations, 1995 update. *Thromb. Haemost.*, 1995; 73 (5): 876–889. doi: 10.1055/s-0038-1653885
9. Simioni P., Scudeller A., Radossi P. et al. «Pseudo homozygous» activated protein C resistance due to double heterozygous factor V defects (Factor V Leiden mutation and type I quantitative factor V defect) associated with thrombosis: Report of two cases belonging to two unrelated kindreds. *Thromb. Haemost.*, 1996; 75 (3): 422–426. doi: 10.1055/s-0038-1650290
10. Zehnder J.L., Jain M. Recurrent thrombosis due to compound heterozygosity for factor V Leiden and factor V deficiency. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 1996; 7 (3): 361–2. doi: 10.1097/00001721-199604000-00012
11. Guasch J.F., Lensen R.P.M., Bertina R.M. Molecular characterization of a type I quantitative factor V deficiency in a thrombosis patient that is «pseudo homozygous» for activated protein C resistance. *Thromb Haemost.*, 1997; 77 (2): 252–257. doi: 10.1055/s-0038-1655948
12. Simioni P., Castoldi E., Lunghi B. et al. An underestimated combination of opposites resulting in enhanced thrombotic tendency. *Blood*, 2005; 106 (7): 2363–2365. doi: 10.1182/blood-2005-04-1461
13. Brugge J.M., Simioni P., Bernardi F. et al. Expression of the normal factor V allele modulates the APC resistance phenotype in heterozygous carriers of the factor V Leiden mutation. *J. Thromb. Haemost.*, 2005; 3 (12): 2695–2702. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01634.x
14. Duckers C., Simioni P., Tormene D. et al. Factor V Leiden pseudo-homozygotes have a more pronounced hypercoagulable state than factor V Leiden homozygotes. *J. Thromb. Haemost.*, 2011; 9: 864–867. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04205.x
15. Ridker P.M., Hennekens C.H., Lindpaintner K. et al. Mutation in the gene coding for coagulation factor v and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N. Engl. J. Med.*, 1995; 332 (14): 912–917. doi: 10.1056/nejm199504063321403
16. Lee D.H., Henderson P.A., Blajchman M.A. Prevalence of factor V Leiden in a Canadian blood donor population. *CMAJ*, 1996; 155 (3): 285–289.
17. Ridker P.M. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. *JAMA*, 1997; 277 (16): 1305. doi: 10.1001/jama.1997.03540400055031
18. Biasiutti F.D., Merlo C., Furlan M. et al. No association of APC resistance with myocardial infarction. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 1995; 6 (5): 456–459. doi: 10.1097/00001721-199507000-00013
19. Kontula K., Ylikorkala A., Miettinen H. et al. Arg506Gln factor V mutation (factor V Leiden) in patients with ischaemic cerebrovascular disease and survivors of myocardial infarction. *Thromb. Haemost.*, 1995; 73 (04): 558–560. doi: 10.1055/s-0038-1653820
20. Longstreth W.T., Rosendaal F.R., Siscovick D.S. et al. Risk of stroke in young women and two prothrombotic mutations: Factor V Leiden and prothrombin gene variant (G20210A). *Stroke*, 1998; 29 (3): 577–580. doi: 10.1161/01.STR.29.3.577
21. Cushman M., Rosendaal F.R., Psaty B.M. et al. Factor V Leiden is not a risk factor for arterial vascular disease in the elderly: Results from the Cardiovascular Health Study. *Thromb. Haemost.*, 1998; 79 (5): 912–915. doi: 10.1055/s-0037-1615092
22. Juul K., Tybjaerg-Hansen A., Steffensen R. et al. Factor V Leiden: The Copenhagen City Heart Study and 2 meta-analyses. *Blood*, 2002; 100 (1): 3–10. doi: 10.1182/blood-2002-01-0111
23. Ye Z., Liu E.H.C., Higgins J.P.T. et al. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: Meta-analysis of 66 155 cases and 91 307 controls. *Lancet*, 2006; 367 (9511): 651–658. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68263-9
24. Mannucci P.M., Asselta R., Duga S. et al. The association of factor V Leiden with myocardial infarction is replicated in 1880 patients with premature disease. *J. Thromb. Haemost.*, 2010; 8 (10): 2116–2121. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.03982.x

25. Lalouschek W., Schillinger M., Hsieh K. et al. Matched case-control study on factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutation in patients with ischemic stroke/transient ischemic attack up to the age of 60 years. *Stroke*, 2005; 36 (7): 1405–1409. doi: 10.1161/01.STR.0000170635.45745.b8
26. Rosendaal F.R., Siscovick D.S., Schwartz S.M. et al. Factor V Leiden (resistance to activated protein C) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood*, 1997; 89 (8): 2817–2821. doi: 10.1182/blood.v89.8.2817
27. Becker S., Heller C., Gropp F. et al. Thrombophilic disorders in children with cerebral infarction. *Lancet*, 1998; 352 (9142): 1756–1757. doi: 10.1016/s0140-6736(05)79830-5
28. Sambrook J., Russell D.W. Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol: Chloroform. *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2006; 2006 (1): pdb.prot4455. doi: 10.1101/pdb.prot4455
29. Richards S., Aziz N., Bale S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.*, 2015; 17 (5): 405–424. doi: 10.1038/gim.2015.30
30. Scanavini D., Girelli D., Lunghi B. et al. Modulation of factor V levels in plasma by polymorphisms in the C2 domain. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004; 24 (1): 200–206. doi: 10.1161/01.ATV.0000109750.34073.f6
31. Tang W., Schwienbacher C., Lopez L.M. et al. Genetic associations for activated partial thromboplastin time and prothrombin time, their gene expression profiles, and risk of coronary artery disease. *Am. J. Hum. Genet.*, 2012; 91 (1): 152–162. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.05.009
32. Weng L.C., Cushman M., Pankow J.S. et al. A genetic association study of activated partial thromboplastin time in European Americans and African Americans: *The ARIC Study*. *Hum. Mol. Genet.*, 2015; 24 (8): 2401–2408. doi: 10.1093/hmg/ddu732
33. Suhre K., Arnold M., Bhagwat A.M. et al. Connecting genetic risk to disease end points through the human blood plasma proteome. *Nat. Commun.*, 2017; 8 (1): 1–14. doi: 10.1038/ncomms14357
34. Al-Numair N.S., Ramzan K., Saleh M. et al. First description of the molecular and clinical characterization of hereditary factor V deficiency in Saudi Arabia. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 2019; 30 (5): 224–232. doi: 10.1097/MBC.0000000000000828
35. Segers O., Simioni P., Tormene D. et al. Genetic modulation of the FVLeiden/normal FV ratio and risk of venous thrombosis in factor V Leiden heterozygotes. *J. Thromb. Haemost.*, 2012; 10 (1): 73–80. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04546.x
36. Cutler J.A., Patel R., Rangarajan S. et al. Molecular characterization of 11 novel mutations in patients with heterozygous and homozygous FV deficiency. *Haemophilia*, 2010; 16 (6): 937–942. doi: 10.1111/j.1365-2516.2010.02330.x
37. Vos H.L. Inherited defects of coagulation factor V: The thrombotic side. *J. Thromb. Haemost.*, 2006; 4: 35–40. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01572.x
38. Yamazaki T., Nicolaes G.A.F., Sørensen K.W. et al. Molecular basis of quantitative factor V deficiency associated with factor V R2 haplotype. *Blood*, 2002; 100 (7): 2515–2521. doi: 10.1182/blood.V100.7.2515
39. Khidri F.F., Waryah Y.M., Ali F.K. et al. MTHFR and F5 genetic variations have association with preeclampsia in Pakistani patients: A case control study. *BMC Med. Genet.*, 2019; 20 (1): 163. doi: 10.1186/s12881-019-0905-9
40. Пат. 2502474РФ. Способ генетической диагностики неблагоприятных исходов у больных в течение одного года после острого коронарного синдрома с подъемом сегмента ST. О.Л. Барбараш, М.В. Зыков, Е.В. Кулиш и др. Оpubл. 27.12.2013.
41. Толмачева А.А., Рагино Ю.И., Максимов В.Н. и др. Способ определения риска развития инфаркта миокарда с подъемом сегмента ST с использованием генетических маркеров. Пат. 2019129933 РФ. Оpubл. 17.01.2020.

ANALYSIS OF *F5* GENE POLYMORPHISM IN MEN WITH CORONARY ATHEROSCLEROSIS USING WHOLE EXOME SEQUENCING

E. S. Striukova¹, E. V. Shakhtshneider^{1,2}, D. E. Ivanoshchuk^{1,2}, Yu. I. Ragino¹, Ya. V. Polonskaya¹, I. S. Murashov³, A. M. Volkov³, A. V. Kurguzov³, A. M. Chernyavsky³, E. S. Valeev², V. N. Maksimov¹, E. V. Kashtanova¹

¹ *Research Institute of Internal and Preventive Medicine — Branch of the Federal Research Center
Institute of Cytology and Genetics of SB RAS
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1*

² *Federal State Autonomous Educational Institution for Higher Education «Novosibirsk State University»*

³ *The Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Center named academician
E. N. Meshalkin» of the Ministry of Health of the Russian Federation
630055, Novosibirsk, Rechkunovskaya str., 15*

Factor V, encoded by the *F5* gene, is a procoagulant blood clotting factor that increases the production of thrombin, the central enzyme that converts fibrinogen to fibrin, which leads to the formation of a blood clot. The *F5* gene is localized to 1q24.2 chromosome and consists of 25 exons. There are various mutations in the *F5* gene that lead to resistance of activated protein C (APC) (elimination of the APC cleavage site in factor V and factor Va), which can lead to arterial and venous thrombosis. The aim of the present study was to analyze variants of the *F5* gene in patients diagnosed with coronary atherosclerosis without acute coronary syndrome with stable functional class II–IV angina pectoris, confirmed by coronary angiography data, using the method of whole exome sequencing. **Material and methods.** The study was conducted in the framework of the Program of joint research work IIPM — branch of the ICG SB RAS and the FSBI «Research Institute of Circulation Pathology named after E. N. Meshalkin» Ministry of Health of Russian Federation. The study included 30 men aged 40–70 years with coronary angiography-verified coronary atherosclerosis, without ACS, with stable angina pectoris of the II–IV FC. Patients were admitted for coronary bypass surgery, and endarteriaectomy from the coronary artery (s) was performed during the operation according to intraoperative indications. Whole exome sequencing (SureSelectXT Human All Exon v.6+UTR) was carried out on an Illumina NextSeq 500 instrument (USA). **Results.** In 30 patients, 29 single-nucleotide variants were found in the *F5* gene. In patients with coronary atherosclerosis, rs9332701 of the *F5* gene is 3.33 times more common, and rs6027 is 1.67 times more common than in the population. And rs184663825 was found in 3.33% of cases, while its occurrence in the population is 0.05%. For variants rs6034 and rs144979314, a possible damaging effect on the protein product is shown. **Conclusion.** The single-nucleotide variants rs9332701, rs6027, rs184663825, rs6034, rs144979314 of the *F5* gene are of interest for inclusion in the genetic panels for the analysis of risk factors for the development of acute coronary syndrome.

Keywords: *F5* gene, factor V, rs9332701, rs6027, rs184663825, rs6034, rs144979314, coronary atherosclerosis.

*Статья поступила 18.02.21
Принята к печати 02.03.21*