

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СКРЫТОГО НАРУШЕНИЯ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ (ДЕФИЦИТ XI ФАКТОРА) МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

© Е. С. Усенбеков¹, О. О. Жансеркенова¹, Ш. Н. Касымбекова¹, С. Т. Сиабеков¹, И. В. Соболев²,
Р. И. Глушаков³, В. П. Терлецкий⁴, С. Н. Прошин³

¹Казахский национальный аграрный университет, Алмааты;

²ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический);

³ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России;

⁴ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных», Санкт-Петербург

Резюме. Незначительные кровотечения довольно часто встречаются у детей и в некоторых случаях маскируют серьезные заболевания системы свертывания крови. Как правило, это редкие наследственные заболевания, связанные с недостаточностью таких факторов свертывания как I, II, V, VII, X, XI и XIII, а также дефицит наиболее часто сопряженный с совместной недостаточностью факторов V и VIII и факторов, синтез которых связан с витамином K. В педиатрической клинике проблематично провести рандомизированное исследование из-за сложности выявления таких детей-носителей по наследственной аномалии по определенному фактору свертывания крови. В связи с этим модель дефицита XI фактора свертывания крови у млекопитающих (*Bos Taurus L.*) с наследованием по аутосомально-рецессивному типу представляется особенно перспективной. Впервые данная патология была зарегистрирована в 1969 году у особей, принадлежащих к виду *Bos Taurus L.* голштинской породы. Часто этиологическим фактором большинства скрытых генетических дефектов у человека и животных являются точечные мутации в кодирующей части соответствующих генов. Известно, что генетический дефект, дефицит XI фактора свертывания крови *B. Taurus L.* (FXID), наоборот является последствием вставки нуклеотидной последовательности в составе экзона 12 гена FXI длиной 76 пар оснований. В результате инсерции появился STOP codon (TAA). Фенотипически дефицит XI фактора (FXID) свертывания крови у телят характеризуется длительным кровотечением из пупочного канатика, анемией. У коров, гетерозиготных носителей дефицита XI фактора свертывания крови, молозиво розового цвета, обычно такие животные восприимчивы к пневмонии, маститам и эндометритам. Мы провели мониторинг племенных быков-производителей и коров голштинской породы на носительство генетического заболевания – дефицита XI фактора свертывания крови. Для детекции инсерции нуклеотидных последовательностей размером 76 п. н. рекомендуется использовать метод полимеразной цепной реакции.

Ключевые слова: дефицит XI фактора свертывания крови; аутосомно-рецессивная болезнь; инсерция; репродуктивная функция млекопитающих.

IDENTIFICATION OF CONCEALED DISTURBANCE OF BLOOD COAGULATION (DEFICIENCY OF FACTOR XI) BY POLYMERASE CHAIN REACTION (EXPERIMENTAL STUDY)

© E. S. Ussenbekov¹, O. O. Zhanserkenova¹, Sh. N. Kasymbekova¹, S. T. Siyabekov¹, I. V. Sobolev²,
R. I. Glushakov³, V. P. Terletskiy⁴, S. N. Proshin³

¹Kazakh Agrarian National University, Almaaty, Kazakhstan;

²Saint Petersburg Clinical Research Center of Specialized Types of Medical Care, Russia;

³Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Russia;

⁴Federal Research Institute for Farm Animal Genetics and Breeding, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Minor bleeding is quite common in children and in some cases masks the serious disease of blood clotting. As a rule, this rare inherited disease associated with deficiency of coagulation factors as the I, II, V, VII, X, XI and XIII, as well as deficiency conjugate, most often, the joint failure factors V and VIII and factor whose synthesis associated with vitamin K. The pediatric clinic is difficult to fulfill a randomized trial because of the difficulty of identifying such children carriers of genetic abnormalities at a specific blood clotting factor. In connection with the model of deficiency of coagulation factor XI in a mammals (*Bos Taurus L.*) with autosomal recessive type of inheritance is particularly promising. Deficiency of coagulation factor XI in cattle is inherited autosomal recessive defect. At the first time this pathology was recognized in Holstein

cows in 1969. Frequently the etiologic factor of most hidden genetic defects in animals are point mutations in the coding region of the respective genes. On the contrary it has been found that deficiency of coagulation factor XI cattle (FXID) is a consequence of the insertion of nucleotide sequences within exon 12 of the gene FXI length of 76 base pairs. STOP codon (TAA) was resulted from insertion. Phenotypically deficiency of factor XI (FXID) in calves is resulted in disturbance of blood clotting and characterized by prolonged bleeding from the umbilical cord and anemia. Cows which are heterozygous in deficiency of coagulation factor XI have colostrum pink color. Those animals are frequently suffered from pneumonia, mastitis and endometritis. We monitored the breeding sires and Holstein cows on the carrier of the genetic disease: deficiency of coagulation factor XI. To detect the insertion of nucleotide sequences of 76 bp in size it is recommended to use the polymerase chain reaction.

Key words: deficiency of coagulation factor XI; autosomal recessive disease; insertion; reproductive function of mammals.

АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Незначительные кровотечения довольно часто встречаются у детей и в некоторых случаях маскируют серьезные заболевания системы свертывания крови. Как правило, это редкие наследственные заболевания, связанные с недостаточностью таких факторов свертывания как I, II, V, VII, X, XI и XIII, а также дефицит, наиболее часто сопряженный с совместной недостаточностью факторов V и VIII и факторов, синтез которых связан с витамином K [2]. Считается, что у детей кровотечения из носа и легкие кровотечения являются нормой в 39 и 24% случаев [6]. К другим кровотечениям, которые, как считается, не связаны с дефицитом факторов (наследственных) свертывания, относятся определенные анатомические аномалии недоразвития черепно-мозговой, желудочно-кишечной, мочеполовой систем и, что особенно актуально, системы эндокринной регуляции: тяжело протекающие и затяжные менструации у девочек-подростков, сопряженные, предположительно, с недоразвитием гипоталамо-гипофизарно-гонадного тракта, включая ановулаторные циклы [1]. Дети со скрытыми кровотечениями, сопряженными с врожденными аномалиями факторов свертывания крови, часто невосприимчивы к стандартным методам антикоагуляционной фармакотерапии. При этом в педиатрической клинике зачастую трудно провести рандомизированное исследование, вследствие сложности выявления таких детей-носителей наследственной аномалии по определенному фактору свертывания крови [8]. Поэтому мы и предприняли данное сравнительное экспериментальное исследование.

По сведениям OMIA — ON LINE MENDELIAN INHERITANCE IN ANIMALS каталога у млекопитающих (*Bos Taurus L.*) в настоящее время выявлено 462 генетически обусловленных морфологических и функциональных нарушений и из них 46 наследственных аномалий можно идентифицировать с помощью молекулярно-генетических методов. Своевременная диагностика данных мутаций и выбраковка животных и племенного материала, а также требования генетического паспорта при за-

купке животных, эмбрионов, замороженной спермы позволяют элиминировать наследственные заболевания.

Дефицит XI фактора свертывания крови у *Bos Taurus L.* является аутосомальным рецессивным наследственным генетическим дефектом. Впервые данная патология была зарегистрирована у *Bos Taurus L.* в 1969 году. Часто этиологическим фактором большинства скрытых генетических дефектов у животных являются точечные мутации в кодирующей части соответствующих генов. Известно, что генетический дефект, дефицит XI фактора свертывания крови у *Bos Taurus L.* (FXID), наоборот, является последствием вставки нуклеотидной последовательности в составе экзона 12 гена FXI длиной 76 пар оснований. В результате инсерции появился STOP codon (TAA) [3].

Высокая скорость распространения вредных мутаций определяется рецессивным характером их наследования. Продукты таких генов, как правило, участвуют в регуляции тканеспецифичных функций и неблагоприятные эффекты мутантного аллельного варианта компенсируются в гетерозиготе нормальной функцией аллеля дикого типа. Селекция на уровне фенотипа является неэффективной в связи с низкой частотой гетерозигот по отношению к гомозиготам. Фенотипически, дефицит XI фактора (FXID) свертывания крови у телят характеризуется длительным кровотечением из пупочного канатика, анемией. У коров, гетерозиготных носителей дефицита XI фактора свертывания крови, проявляется молозиво розового цвета, обычно такие животные восприимчивы к пневмонии, маститам и воспалениям верхнего репродуктивного тракта [4].

Исследованиями наших зарубежных коллег установлено, что недостаточность FXI фактора свертывания крови у млекопитающих негативно влияет на репродуктивную функцию у коров, в частности у таких животных снижается рост фолликулов и половой цикл сопровождается снижением пиковой концентрации эстрадиола в крови животных. У *Bos Taurus L.*, гомозиготных и гетерозиготных носителей генетического дефекта фактора XI свертывания

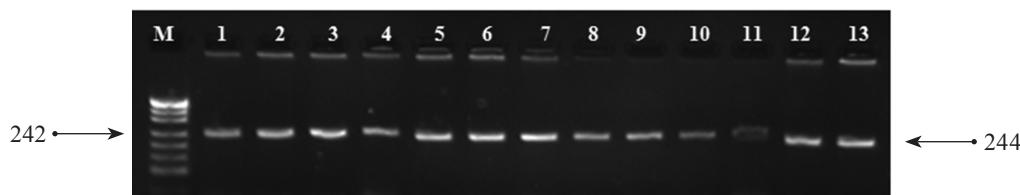


Рис. 1. Электрофорограмма продукта амплификации участка гена *FXI*

крови регистрируются низкие показатели воспроизводительной функции, часто встречаются трудные отелы и рождение нежизнеспособных телят [5].

В настоящее время молекулярно-генетические основы генетических дефектов млекопитающих, принадлежащих к виду *Bos Taurus L.*, достаточно хорошо изучены, на основании этих исследований разработаны методы диагностики наследственных заболеваний. Все наследственные заболевания животных в той или иной степени связаны с нарушением репродуктивной функции у коров, снижением резистентности организма телят, у носителей мутации генетического дефекта часто регистрируется эмбриональная смертность, повышение индекса осеменения в результате ранней смертности предимплантационных эмбрионов в период стельности [7].

Цель работы: разработка метода идентификации дефицита XI фактора свертывания крови методом полимеразной цепной реакции и изучение распространенности данной патологии у популяции *Bos Taurus L.* Акмолинской и Алматинской областей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на 35 племенных быках АО «Асыл-Тулик» и на 24 быках ТОО «Асыл» и 37 коровах голштинской породы ТОО «Байсерке-Агро» в рамках реализации проекта «Мониторинг племенных животных Республики Казахстан на носительство генетических дефектов с помощью молекулярно-генетических методов» в учебно-научно-диагностической лаборатории Казахстанско-Японского инновационного центра Казахского национального аграрного университета.

В качестве материала для исследования были использованы замороженная сперма быков и периферическая кровь коров. ДНК из крови коров и спермы быков выделяли с помощью набора «ДНК сорб В». При выделении ДНК из замороженной спермы с целью оптимизации и выделения более качественной ДНК нами был использован способ предварительной обработки спермы следующим образом: вносили в пробирку 200 мкл спермы, затем добавляли 1 мл лизирующего буфера, имеющий состав: 100 мМ Трис, 20 мМ ЭДТА, 10 мМ NaCl, pH 8,0 и перемешивали в течение 30 секунд, далее центрифугировали г

10 000 об/мин в течение 5 минут. После центрифугирования, суспендировали осадок в 500 мкл буфера: 100 мМ Трис, 20 мМ ЭДТА, 10 мМ NaCl, pH 8,0 и добавляли 8 мкл 2-меркаптоэтанола. Затем перемешивали на вортексе в течение 1 минуты и оставляли на 30 минут при комнатной температуре.

Полимеразную цепную реакцию проводили на термоциклире «Терцик» производства России. Для детекции носителей дефицита XI фактора свертывания крови использовали праймеры: F-5'-CCCACTGGCTAGGAATCATT-3' и R-5'- CAAGGCAATGTCATATCCAC-3'. Использование данной пары праймеров позволяет амплифицировать фрагмент гена *FXID* размером 244 п. н. у здоровых гомозиготных животных, 244 п. н. и 320 п. н. у гетерозиготных носителей и 320 п. н. у гомозиготных носителей генетического дефекта (рис. 1).

Условия проведения ПЦР: первый шаг — денатурация ДНК при температуре 95 °С — 10 минут, второй шаг 35 циклов, денатурация при 95 °С — 30 сек, отжиг праймеров — 55 °С 60 с и элонгация при температуре 72 °С 30 с. Завершающий синтез при 72 °С продолжительностью 10 мин. Хранение при +4 °С. Объем реакционной смеси был 50 мкл, имеющий следующий состав: 5 мкл 10 X буфера для ПЦР, 1,5 мМ MgCl₂, 2,5 мкл 25 мКМ прямого и обратного праймеров, 5 мкл 0,2 мМ концентрации каждого dNTP, 0,5 мкл фермента Taq Polymerase с активностью 5U/μl, 5 мкл ДНК и 26,5 мкл дистиллированной воды.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе для выделения ДНК из спермы быков-производителей и из периферической крови коров был использован метод экстракции ДНК с помощью набора «ДНК сорб В». Амплификация нужного фрагмента гена *FXID* проводилась с использованием прямого и обратного праймеров в течение 35 циклов. ПЦР-диагностика данного генетического дефекта основана на том, что у здоровых гомозиготных животных при амплификации образуется один бэнд размером 244 п. н., в случае гетерозиготного носительства в результате инсерции (вставки нуклеотидных последовательностей 76 п. н.) образуется второй бэнд размером 320 п. н.

Нами были тестираны методом полимеразной цепной реакции 59 голов племенных быков-производителей и 37 голов коров голштинской породы Канадского происхождения ТОО «Байсерке-Агро». На электрофорограмме хорошо видны полоски ДНК-размером 244 п.н., лунки (1–13) и лунка M — ДНК-маркер плазмида pUC19DNA (рис. 1), рестрицированная эндонуклеазой MspI. Данный ДНК-маркер имеет фрагменты длиной 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67, 34, 34 и на электрофорограмме четко видно, что амплификат размером 244 п.н. идет на уровне 242 п.н. ДНК-маркера. Предварительные результаты исследований свидетельствуют, что среди исследуемых животных отсутствуют носители генетического дефекта — дефицита XI фактора свертывания крови крупного рогатого скота (FXID). При этом в последнее время Республика Казахстан ежегодно в большом объеме закупает живой племенной скот и замороженную сперму племенных быков-производителей зарубежной селекции.

ВЫВОДЫ

Необходимо проведение мониторинга всего племенного поголовья на носительство данного наследственного заболевания, так как у гетерозиготных носителей дефицита XI фактора свертывания не проявляются клинические признаки этого генетического дефекта.

ЛИТЕРАТУРА

- Appelbaum H., Acharya S.S. Heavy menstrual bleeding in adolescents: hormonal or he-

- matologic? *Minerva Ginecology*. 2011; 63 (6): 547–561.
- Brown D.L. Congenital bleeding disorders. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2005; 35 (2): 38–62.
- Kunieda M., Tsuji T., Abbasi A.R., Khalaj M., Ikeda M., Miyadera K., Ogawa H., Kunieda T. An insertion mutation of the bovine F11 gene is responsible for factor XI deficiency in Japanese black cattle. *Mamm Genom*. 2005; 16: 383–389.
- Marron B.M., Robinson J.L., Gentry P.A., Beever J.E. Identification of a mutation associated with factor XI deficiency in Holstein cattle. *Anim Genet*. 2004; 35 (6): 454–456.
- Meydan H., Yildiz M.A., Özdil F., Gedik Y., Özbeяз C. Identification of factor XI deficiency in Holstein cattle in Turkey. *Acta Vet Scand*. 2009; 22: 51–55.
- Nosek-Cenkowska B., Cheang M.S., Pizzi N.J., Israels E.D., Gerrard J.M. Bleeding/bruising symptomatology in children with and without bleeding disorders. *Thromb Haemost*. 1991; 65 (3): 237–241.
- Patel R.K., Soni K.J., Chauhan J.B., Singh K.M., Krothapalli R.S. Sambasiva Rao Factor XI deficiency in Indian *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos taurus* x *Bos indicus* crossbreds and *Bubalus bubalis*. *Genet Mol Biol São Paulo*. 2007; 30 (3): 28–34.
- Peyvandi F., Palla R., Menegatti M. European Network of Rare Bleeding Disorders Group. Coagulation factor activity and clinical bleeding severity in rare bleeding disorders: results from the European Network of Rare Bleeding Disorders. *J Thromb Haemost*. 2012; 10 (4): 615–621.

◆ Информация об авторах

Усенбеков Есенгали Серикович – канд. бiol. наук, профессор, заведующий кафедрой клинической ветеринарной медицины. Казахский национальный аграрный университет. 150013, Алматы, пр. Абая, д. 8. E-mail: usen03@mail.ru.

Жансеркенова Орик Оразимановна – канд. ветеринарных наук, руководитель учебно-научно-диагностической лаборатории Казахстанско-Японского инновационного центра. Казахский национальный аграрный университет. 150013, Алматы, пр. Абая, д. 8. E-mail: orik10@inbox.ru.

Касымбекова Шинар Николаевна – ст. науч. сотрудник учебно-научно-диагностической лаборатории Казахстанско-Японского инновационного центра. Казахский национальный аграрный университет. 150013, Алматы, пр. Абая, д. 8. E-mail: 070702007@mail.ru.

Сиябеков Сарсенбек Тореханович – канд. ветеринарных наук, доцент кафедры клинической ветеринарной медицины. Казахский национальный аграрный университет. 150013, Алматы, пр. Абая, д. 8. E-mail: usen03@mail.ru.

Ussenbekov Yessengali Serikovich – PhD, Professor, the Head of Department of Clinical Veterinary Medicine. Kazakh Agrarian National University. 8, Abaya pr., Almaaty, 150013, Republic of Kazakhstan. E-mail: usen03@mail.ru.

Zhanserkenova Orik Orazimanovna – Ph.D., the Head of Educational, Scientific and Laboratory Diagnostic Center of Joint Kazakhstan and Japan Innovation Center. Kazakh Agrarian National University. 8, Abaya pr., Almaaty, 150013, Republic of Kazakhstan. E-mail: orik10@inbox.ru.

Kasymbekova Shinar Nikolaevna – Senior researcher, Educational, Scientific and Laboratory Diagnostic Center of Joint Kazakhstan and Japan Innovation Center. Kazakh Agrarian National University. 8, Abaya pr., Almaaty, 150013, Republic of Kazakhstan. E-mail: 070702007@mail.ru.

Siyabekov Sarsenbek Torekhanovich – Ph.D., Associate Professor of Department of Clinical Veterinary Medicine. Kazakh Agrarian National University. 8, Abaya pr., Almaaty, 150013, Republic of Kazakhstan. E-mail: usen03@mail.ru.

Соболев Иван Викторович – врач-онколог, отд. гинекологии. ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)». 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68 а, литер А. E-mail: sobol548@inbox.ru.

Глушаков Руслан Иванович – канд. мед. наук, доцент. ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. E-mail: glushakovruslan@gmail.com.

Терлецкий Валерий Павлович – д-р биол. наук, профессор, ведущий научный сотрудник отдела биотехнологии лаборатории молекулярной цитогенетики. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных». 196601, Санкт-Петербург, Пушкин, Московское шоссе, д. 55 а. E-mail: valeriter@mail.ru.

Прошин Сергей Николаевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии. ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. E-mail: psnjsn@rambler.ru.

Sobolev Ivan Viktorovich – Oncologist, Department of gynecology. St. Petersburg Clinical Research Center of Specialized Types of Medical Care. 68 a, block A, Leningradskaya St., St. Petersburg, Pesochniy, 197758, Russia. E-mail: sobol548@inbox.ru.

Glushakov Ruslan Ivanovich – MD, PhD, Associate Professor. St. Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: glushakovruslan@gmail.com.

Terle茨kiy Valeriy Pavlovich – PhD, Dr Biol Sci, Leading researcher the Department of Biotechnology of the Laboratory of Molecular Cytogenetics. Federal Research Institute for Farm Animal Genetics and Breeding. 55 a, Moskovskoye shosse, St. Petersburg, Pushkin, 196601, Russia. E-mail: valeriter@mail.ru.

Proshin Sergei Nikolaevich – MD, PhD, Dr Med Sci, Professor, Head of the Department of Pharmacology. St. Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: psnjsn@rambler.ru.