

ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ГЕМОФІЛІЇ А

Воробйов Д.О.¹, Грищенко Н.В.²

¹КПІ ім. Ігоря Сікорського, danylo.vorobyov805@gmail.com

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

Abstract

Haemophilia A (HA) is a severe hereditary disease. HA affects males while females are asymptomatic carriers. DNA diagnostics is the most informative method of HA diagnostics. The aim is the selection of the diagnostic strategy and a research group creation. The most justified strategy for HA diagnostics was selected. An experimental group of patients and family members was created.

Keywords: *Haemophilia A, diagnostic test, carrier screening, intron 22 inversion.*

Вступ. Гемофілія – це інвалідизуюче, загрозливе для життя захворювання, що супроводжується зниженням здатності до утворення тромбу, кровотечами в суглобах, м'яких тканинах, інколи – внутрішньочерепними [1]. Існують різні причини виникнення гемофілії: генетичні (обумовлені мутаціями в генах факторів згортання крові) та негенетичні (аутоімунні та інфекційні) [2, 3]. Найпоширенішою є гемофілія А (ГА), яка є наслідком мутацій в гені *F8*, що кодує фактор згортання крові VIII [2]. Існує припущення, що ГА є і найважчим різновидом спадкових гемофілій [4]. Частота ГА варіює в різних популяціях світу, хоча однією з причин відмінностей частоти є обмежена можливість діагностики ГА в країнах з низьким рівнем доходу, в середньому вона становить 1 на 6000 новороджених [5, 6].

Оскільки *F8* розташований в локусі Xq28 X-хросоми [7], захворювання успадковується за X-зчепленим рецесивним типом [2]. Тому переважно хворіють чоловіки, а їх матері зазвичай є гетерозиготними носіями мутантного гена. Усі родички за материнською лінією є потенційними носіями такого ж мутантного гена, і всі вони потребують визначення статусу носійства.

Насьогодні існує багато способів діагностики ГА, наприклад – Long-Range PCR (різновид полімеразної ланцюгової реакції, ПЛР), повний генетичний аналіз тощо. Однак ці методи є дорогими й працемісткими [8-10].

Виходячи з вищенаведеного, метою роботи є провести збір, обробку, аналіз та систематизацію актуальної науково-технічної інформації в галузі діагностики гемофілії А з доступних онлайн-ресурсів та літературних джерел, запропонувати найбільш ефективну стратегію та сформувану дослідну групу для створення вітчизняного прототипу тест-системи ДНК-діагностики цього захворювання, який відповідає діючим стандартам, а також сучасним досягненням науки і техніки.

Матеріали й методи. Аналіз науково-технічної інформації проводили з використанням онлайн ресурсів: PubMed [11], EAHAD Coagulation Factor Variant Databases [12], CDC Hemophilia Mutation Project [13] and ResearchGate [14].

Матеріалом дослідження були зразки геномної ДНК, отримані з лейкоцитів крові або клітин букального епітелію пацієнтів з клінічним діагнозом ГА та

членів їх родин, отримані в рамках даного дослідження а також з колекції ДНК, яка зберігається в ІМБГ НАН України. Біологічні зразки пацієнтів передані до лабораторії генетики спадкових патологій ІМБГ НАН України спеціалізованими закладами МОЗ України згідно договорів про наукову співпрацю. Від усіх пацієнтів та їх родичів отримано інформовану згоду на участь в дослідженні. ДНК виділяли комерційним набором Quick-DNA Miniprep (Zymo Research) згідно інструкції виробника. Якість та кількість отриманих зразків ДНК оцінювали з використанням спектрофотометру ND-1000 (NanoDrop).

Результати та обговорення. За результатами проведеного аналізу інформації в галузі діагностики ГА з доступних онлайн-ресурсів та літературних джерел встановлено наступне.

У гені виявлено усі типи генних мутацій – однонуклеотидні заміни, делеції, інсерції, дуплікації та інверсії [15]. Найбільш поширеною є інверсія 22-го інтрону (*inv22*), яку виявляють у 40% хворих на тяжку форму захворювання [16, 17]. Важливо зазначити, що такий тип геномних реорганізацій, як інверсії, практично неможливо проаналізувати стандартними молекулярно-генетичними методами [18].

Існує декілька методів ДНК-діагностики інверсій гена *F8*: Long-Range, Саузерн-блоттинг, інвертована ПЛР (Inverse-Shifting-PCR). На відміну від перших двох методів, метод інвертованої ПЛР є менш дорогішим і працевітким [9, 10].

За результатами аналізу літературних джерел нами обрано найбільш інформативну, доступну та економічно обґрунтовану стратегію створення прототипу тест-системи для прямої ДНК-діагностики ГА на основі аналізу мажорної мутації цього гена, яка базується на універсальних молекулярно-генетичних методиках аналізу та загальнодоступному лабораторному обладнанні і реактивах – аналізі ПЛР-фрагментів, утворених на ДНК-матриці після *NotI*-гідролізу геномної ДНК та лігування гідролізованих фрагментів *T4*-лігазою [9, 10].

Для цього нами створено дослідну групу, яка складається з 31 зразка ДНК клінічно підтверджених ГА-пацієнтів та членів їх родин. Відпрацювання методики та визначення її діагностичної інформативності наразі триває.

Висновки. За результатами аналізу доступної науково-технічної інформації та аналізу наявного банку ДНК отримано наступні результати:

1. Визначено оптиміальну стратегію прямої ДНК-діагностики ГА - аналіз мажорної мутації *F8 inv22*.
2. Обрано оптиміальну методику аналізу мажорної мутації гена *F8*.
3. Створено дослідну групу для відпрацювання методики та визначення діагностичних параметрів прототипу тест-системи ДНК-діагностики ГА.

Список використаної літератури:

1. Castaman G., Matino D. Hemophilia A and B: molecular and clinical similarities and differences. *Haematologica*. 2019. Vol. 104, no. 9. P. 1702–1709. URL: <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.221093> (date of access: 12.03.2024).

2. Iqbal W., Raza M., Khan M. S. Intron 22 inversions in severe hemophiliacs. *American journal of medicine and medical sciences*. 2013. Vol. 3, no. 6. P. 190–196. URL: <https://doi.org/10.5923/j.ajmms.20130306.12> (date of access: 12.03.2024).
3. Demographic and clinical data in acquired hemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia Registry (EACH2) / P. Knoebl et al. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2012. Vol. 10, no. 4. P. 622–631. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04654.x> (date of access: 09.04.2024).
4. Mannucci P. M., Franchini M. Is haemophilia B less severe than haemophilia A?. *Haemophilia*. 2013. Vol. 19, no. 4. P. 499–502. URL: <https://doi.org/10.1111/hae.12133> (date of access: 12.03.2024).
5. Bolton-Maggs P. H., Pasi K. J. Haemophilias A and B. *The Lancet*. 2003. Vol. 361, no. 9371. P. 1801–1809. URL: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)13405-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13405-8) (date of access: 12.03.2024).
6. A study of variations in the reported haemophilia A prevalence around the world / J. S. Stonebraker et al. *Haemophilia*. 2010. Vol. 16, no. 1. P. 20–32. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2009.02127.x> (date of access: 09.04.2024).
7. Characterization of the human factor VIII gene / J. Gitschier et al. *Nature*. 1984. Vol. 312, no. 5992. P. 326–330. URL: <https://doi.org/10.1038/312326a0> (date of access: 08.04.2024).
8. Comprehensive analysis of hemophilia A (CAHEA): towards full characterization of the F8 gene variants by long-read sequencing / Y. Liu et al. *Thrombosis and Haemostasis*. 2023. URL: <https://doi.org/10.1055/a-2107-0702> (date of access: 25.04.2024).
9. Eighteen years of molecular genotyping the hemophilia inversion hotspot: from southern blot to inverse shifting-PCR / L. C. Rossetti et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011. Vol. 12, no. 10. P. 7271–7285. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms12107271> (date of access: 25.04.2024).
10. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR / L. C. Rossetti et al. *Clinical chemistry*. 2005. Vol. 51, no. 7. P. 1154–1158. URL: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.046490> (date of access: 25.04.2024).
11. PubMed. *PubMed*. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov> (date of access: 25.04.2024).
12. EAHAD Coagulation Factor Variant Databases: dbs.eahad.org – EAHAD DATABASES. *EAHAD Coagulation Factor Variant Databases: dbs.eahad.org – EAHAD DATABASES*. URL: <https://dbs.eahad.org/home> (date of access: 25.04.2024).
13. Home | Hemophilia | NCBDDD | CDC. *Centers for Disease Control and Prevention*. URL: <https://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia> (date of access: 25.04.2024).
14. ResearchGate | Find and share research. *ResearchGate*. URL: <https://www.researchgate.net> (date of access: 25.04.2024).
15. Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene, second edition / E. G. D. Tuddenham et al. *Nucleic Acids Research*. 1994. Vol. 22, no. 17. P. 3511–3533. URL: <https://doi.org/10.1093/nar/22.17.3511> (date of access: 09.04.2024).
16. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A / D. Lakich et al. *Nature Genetics*. 1993. Vol. 5, no. 3. P. 236–241. URL: <https://doi.org/10.1038/ng1193-236> (date of access: 09.04.2024).
17. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions / J. Naylor et al. *Human Molecular Genetics*. 1993. Vol. 2, no. 11. P. 1773–1778. URL: <https://doi.org/10.1093/hmg/2.11.1773> (date of access: 09.04.2024).
18. Molecular characterization of severe hemophilia A suggests that about half the mutations are not within the coding regions and splice junctions of the factor VIII gene. / M. Higuchi et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991. Vol. 88, no. 16. P. 7405–7409. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7405> (date of access: 09.04.2024).