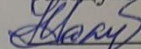


НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ імені ІГОРЯ  
СІКОРСЬКОГО»

Факультет біотехнології і біотехніки  
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

 Наталія ГОЛУБ

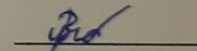
« 6 » червня 2024 р.

Дипломна робота  
на здобуття ступеня бакалавра  
за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»  
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
на тему: «Оптимізація методики ДНК-діагностики інверсії 22 інтрона  
гена *F8*»

Виконав:

студент IV курсу, групи БМ-01

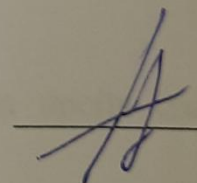
Воробйов Данило Олексійович



Науковий керівник:

Професор кафедри біоенергетики, біоінформатики та  
екобіотехнології, д.б.н., професор

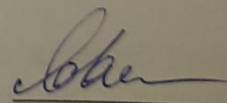
Горго Юрій Павлович



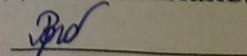
Рецензент:

Доцент кафедри промислової біотехнології, к.б.н.,

с. н. сп. Яловенко Олена Ігорівна



Засвідчую, що у цій дипломній роботі  
немає запозичень з праць інших авторів  
без відповідних посилань.

Студент 

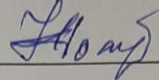
Київ – 2024 року

**Національний технічний університет України**  
**«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»**  
Факультет біотехнології і біотехніки  
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)  
Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

 Наталія ГОЛУБ  
(ім'я, прізвище)

«15» квітня 2024р.

**ЗАВДАННЯ**  
**на дипломну роботу студента**  
**Воробйова Данила Олексійовича**

1. Тема диплому "Оптимізація методики ДНК-діагностики інверсії 22 інтрона гена F8"

Керівник проекту д.б.н, професор Горго Юрій Павлович, затверджені наказом по університету від «27» травня 2024 р. No 2117-с

2. Термін подання студентом роботи **6** червня 2024

3. Вихідні дані до роботи: оптимізація методики визначення носіїв спадкової гемофілії шляхом ДНК-діагностики інверсії 22 інтрона гена F8.

4. Завдання роботи:

- провести літературний аналіз з пошуку методів досліджень ядерної геномної ДНК з лейкоцитів периферійної крові та букального епітелію людей з клінічними ознаками гемофілії А;
- освоїти метод виділення ДНК з біологічних зразків пацієнтів та проведення їх кількісного та якісного контролю;
- провести якісний аналіз виділеної ДНК дослідної групи за спектральними характеристиками та з використанням електрофорезу;
- визначити правила оптимізації методики аналізу інверсії 22 інтрона гена F8.
- описати правила охорони праці та довілля під час виконання роботи у мікробіологічній лабораторії.

5. Перелік графічного матеріалу: презентація

6. Консультанти розділів проекту\*

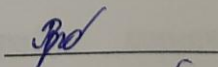
Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв

7. Дата видачі завдання *15 квітня* 2024

Календарний план

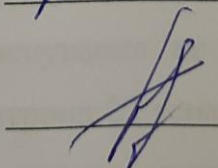
№ з/п	Назва етапів виконання дипломної роботи	Термін виконання етапів проекту	Примітка
1	Визначення предмету дослідження	20.05.24-22.05.24 р	виконано
2	Характеристика об'єкту дослідження, підготовка плану дипломної роботи	23.05.24-25.05.24 р	виконано
3	Підготовка огляду літератури та цитованих джерел	26.05.24-3.06.24 р	виконано
4	Підготовка визначених матеріалів і методів дослідження	4.06.24- 6.06.24	виконано
5	Підготовка експериментальної частини роботи	7.06.24-9.06.24	виконано
6	Аналіз отриманих результатів та підготовка висновків	10.06.24-11.06.24	виконано
7	Оформлення дипломної роботи та підготовка презентації для захисту	12.06.24-14.06.24	виконано

Студент



Данило ВОРОБІЙОВ

Керівник проекту



Юрій ГОРГО

## РЕФЕРАТ

Гемофілія є спадковим захворюванням, яке супроводжується порушенням здатності до утворення тромбу. У здоровому організмі у випадку пошкодження кровоносних судин запускається каскад біохімічних реакцій (каскад згортання крові), що призводить до утворення тромбу, який перекриває місце витоку крові. Білки, які беруть участь у каскаді згортання крові, називають факторами згортання крові. Причиною хвороби є нестача одного з таких білків, спричинена мутацією у відповідному гені. Найчастіше трапляється гемофілія А, до якої призводить нестача фактора VIII, спричинена різними мутаціями в гені *F8*, розташований в Х-хромосомі, тому хвороба успадковується за Х-зчепленим рецесивним типом. Ген є великим і містить понад два десятки екзонів та інтронів. Якщо рівень активності фактора VIII становить 5-40% від нормального, має місце легка форма хвороби. Якщо рівень фактора перебуває в межах від 1% до 5% від нормального, хвороба протікає у середньотяжкій формі, а якщо даний показник є меншим від 1% нормального, має місце тяжка форма. Майже половина всіх випадків тяжкої форми гемофілії виникає внаслідок інверсії 22-го інтрона гена *F8*. Захворювання супроводжується частими крововиливами, які в разі тяжкої форми виникають без видимої причини. Якщо крововиливи відбуваються у суглобах, вони можуть призвести до інвалідації, а внутрішньочерепні крововиливи є небезпечними для життя.

У зв'язку з вищесказаним виникає необхідність діагностики носійства для жінок, які планують народжувати дітей. Секвенування геному дозволяє виявити точкові мутації, проте потребує дороговартісного обладнання, яким є секвенатори. До того ж, секвенування не дозволяє виявити найпоширенішу причину гемофілії – інверсію інтрона 22 гена *F8*. Дана робота присвячена вибору та оптимізації методики виявлення даної мутації.

**Ключові слова:** Гемофілія А, інверсія 22 інтрона гена *F8*, діагностика носійства, методика діагностики, оптимізація параметрів методики.

## ABSTRACT

Haemophilia is a hereditary disease accompanied by violation of clot formation ability. In healthy organism, in case of blood vessels trauma, a biochemical reaction cascade (coagulation cascade) is started, which leads to clot formation which seals the blood leak. Proteins involved in coagulation cascade are called coagulation factors. The disease is induced by lack of one of these proteins which is caused by a mutation in respective gene. The most common kind of haemophilia is haemophilia A, which is caused by factor VIII deficiency induced by different mutations in *F8* gene, which is located in X chromosome, so the disease is inherited in X-linked recessive manner. The gene is large and contains more than twenty exons and introns. If factor VIII activity level is 5-40% of normal one, mild disease form occurs. If factor level lies between 1% and 5% of normal one, the disease proceeds in moderate form, and if this parameter is less than 1% of normal, severe form occurs. Nearly half of all haemophilia severe issues are caused by gene *F8* intron 22 inversion. The disease is accompanied with frequent bleeding episodes which occur for no apparent reason in case of severe form. If hemorrhage occurs in joints, it may lead to disability, and intracranial hemorrhage is life-threatening.

Due to everything said above, for women planning to have children, carrier screening necessity arises. Genome sequencing allows detecting point mutations but requires expensive equipment such as DNA sequencers. Furthermore, DNA sequencing does not allow detecting the most common haemophilia cause – gene *F8* intron 22 inversion. This study is devoted to choice and optimization of a method of such mutation detection.

**Keywords:** Haemophilia A, gene *F8* intron 22 inversion, carrier screening, diagnostics method, method parameters optimization.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ДНК	Дезоксирибонуклеїнова кислота
ПЛР (PCR)	Полімеразна ланцюгова реакція (polymerase chain reaction)
LD-PCR	Long-distance polymerase chain reaction (ПЛР довгих фрагментів)
IS-PCR	Inverse shifting polymerase chain reaction (інвертована ПЛР зі зсувом)
Inv22	інверсія 22 інтрона гена <i>F8</i>
п.н.	пари нуклеотидів
т.п.н.	тисячі пар нуклеотидів
ФХЕ	фенол-хлороформна екстракція
ЕОМН	екстракція з осадженням на мікромагнітних носіях
ЕОКМ	екстракція з осадженням на колонках з мікрофільтрами

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	11
1.1. Гемофілія. Причини та клінічні прояви .....	11
1.2. Гемостаз. Фактори коагуляції та їх гени .....	14
1.3. Мутації гена <i>F8</i> . Методи аналізу мутацій гена <i>F8</i> .....	17
1.4. Географічний розподіл мутацій. Методи аналізу мутацій <i>F8</i> .....	20
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	23
2.1. Матеріали дослідження .....	23
2.2. Методи дослідження .....	27
3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ .....	33
3.1. Методика аналізу інверсії 22 інтрону гена <i>F8</i> , обрана для оптимізації .....	33
3.2. Етапи методики та їх оптимізація.....	33
3.3. Параметри оптимізації методики аналізу інверсії 22-го екзона гена <i>F8</i> .....	42
4. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ДОВКІЛЛЯ .....	46
ВИСНОВКИ .....	55
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	56

## ВСТУП

Гемофілія може розвиватися внаслідок як набутих, так і успадкованих порушень системи гемостазу людини. Набута гемофілія – це рідкісне захворювання аутоімунного характеру, що виникає внаслідок утворення антитіл до функціональних епітопів фактора коагуляції VIII [1-6]. Хвороба проявляється кровотечами, що виникають спонтанно або внаслідок хірургічного втручання, травмування тощо. Виявляється у пацієнтів раптово, в яких предки не мали подібних кровотеч [7].

Хвороба трапляється в усіх етнічних та расових групах з частотою приблизно 1 випадок на 5000-7000 новонароджених [8, 19]. Проте поширення гемофілії А серед осіб чоловічої статі у різних країнах значно відрізняється. Особливо помітною є різниця між країнами з високим та низьким рівнями доходу. Кількість виявлених випадків гемофілії А в країнах з низьким рівнем доходу часто значно нижча, ніж той самий показник в країнах з високим рівнем доходу. Наприклад, кількість виявлених випадків захворювання в Індії становить тільки 10% від очікуваного, а в Малайзії та Південно-Африканській республіці – менше, ніж 50% [20, 21].

Поширення гемофілії А серед осіб жіночої статі невідоме. У той час як більшість чоловіків, що мають мутантний алель, хворіють, жінки зазвичай є безсимптомними носіями [29]. Носії гемофілії А або В жіночої статі мають один нормальний та один аномальний алель гена фактора VIII або IX, відповідно [30, 31]. Більш того, залежно від моменту діагностики у носіїв може бути виявлений як нормальний рівень фактора згортання крові, так і помірна його нестача [28].

Але розроблено та існує мало методів проведення своєчасної діагностики носіїв спадкової гемофілії, що є важливим для жінок при їх вагітності. Секвенування геному дозволяє виявити точкові мутації, проте потребує дороговартісного обладнання, яким є секвенатори. До того ж, секвенування не дозволяє виявити найпоширенішу причину гемофілії – інверсію інтрона 22 гена *F8*. Виникає необхідність діагностики носійства для жінок, які планують народжувати дітей. Тому розробка простої і доступної діагностики носіїв

спадкової гемофілії є важливою процедурою для жінок, в родині яких є випадки гемофілії А та які планують народжувати дітей. В цьому полягає *актуальність* дослідження. Робота присвячена вибору та оптимізації методики виявлення даної мутації інтрона 22 гена *F8*.

**Мета роботи.** Оптимізація методики визначення носіїв спадкової гемофілії при ДНК-діагностиці інверсії 22 інтрона гена *F8*.

**Завданнями дослідження** згідно зі встановленою метою було:

1. Провести літературний аналіз з пошуку методів досліджень ядерної геномної ДНК з лейкоцитів периферійної крові або букального епітелію людей з клінічними ознаками гемофілії А.
2. Освоїти метод виділення ДНК з біологічних зразків пацієнтів та проведення їх кількісного та якісного контролю.
3. Провести якісний аналіз виділеної ДНК дослідної групи за спектральними характеристиками та з використанням електрофорезу.
4. Визначити правила оптимізації методики аналізу інверсії 22 інтрону гена *F8*.
5. Описати правила охорони праці та довілля під час виконання роботи у мікробіологічній лабораторії.

**Об'єкт дослідження.** Зразки ядерної геномної ДНК з лейкоцитів периферійної крові або букального епітелію хворих з клінічними ознаками гемофілії А.

**Предмет дослідження.** Предметом дослідження є оптимізація методики діагностики носійства спадкової гемофілії шляхом ДНК-діагностики інверсії 22 інтрона гена *F8*.

**Наукова новизна.** Наукова новизна полягає у вперше розробленій методиці оптимізації параметрів ДНК-діагностики інверсії 22 інтрона гена *F8*.

**Практична новизна.** Розроблена методика оптимізації параметрів ДНК-діагностики інверсії 22 інтрона гена *F8* дозволяє зробити її простою і доступною для жінок, в родині яких є випадки гемофілії А, та сприяє її застосуванню в Україні.

**Методи досліджень.** Використано мікробіологічні, біохімічні методи, методи статистичного аналізу. В роботі використаний метод виділення ДНК з лімфоцитів периферійної крові з фенолом. Також використані методи виділення геномної ДНК з осадженням на мікромагнітних носіях та на колонках із мікрофільтрами.

*Апробація.* Отримані в роботі результати були апробовані в роботі XVIII Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених "Біотехнологія XXI століття" та тезах:

Воробйов Д.О., Грищенко Н.В. Проблеми та перспективи молекулярно-генетичної діагностики гемофілії А. «Біотехнологія XXI століття»: Мат. XVIII Міжн. науково-практичної конф., 17.05.2024. Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2024, с. 60-62.

Дослідження було виконане в лабораторії генетики спадкових патологій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. 28 зразків крові пацієнтів та членів їхніх родин із різних регіонів України надані державними і приватними медико-генетичними центрами України в межах договорів про наукове співробітництво з ІМБГ НАН України.

Висловлюємо подяку к.б.н., науковому співробітнику лабораторії генетики спадкових патологій ІМБГ НАН України Грищенко Наталії Володимирівні за цінні поради, допомогу при виконанні роботи і проведення практики.

# 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

## 1.1. Гемофілія. Причини та клінічні прояви

Гемофілія (від дав.-грец. αἷμα – «кров» і дав.-грец. φίλια, тут – «схильність») – це геморагічне захворювання, яке спричинює зниження здатності до утворення тромбу. Може бути вродженою (спадковою) та набутою (аутоімунною).

*Причини гемофілії.* Гемофілія може розвиватися внаслідок як набутих, так і успадкованих порушень системи гемостазу людини. Набута гемофілія – це рідкісне захворювання аутоімунного характеру, що виникає внаслідок утворення антитіл до функціональних епітопів фактора коагуляції VIII [1-6]. Хвороба проявляється кровотечами, що виникають спонтанно або внаслідок хірургічного втручання, травмування тощо. Виявляється у пацієнтів раптово, в яких предки не мали подібних кровотеч [7].

Спадкова гемофілія – це вроджене зниження здатності утворювати тромб, обумовлене термінальними (успадкованими) порушеннями генів факторів згортання крові, яке призводить до пошкоджень відповідних білків, залучених у процес коагуляції. У людини гемофілія спричинена нестачею фактора 8 (ф. VIII) або фактора 9 (ф. IX) згортання крові. У першому випадку має місце гемофілія А (85% випадків), а в другому – гемофілія В (15% випадків) [8]. Наразі тільки гемофілію А та гемофілію В визначають як гемофілію, а нестачу фактора XI (яку в минулому визначали як гемофілію С) та інших факторів коагуляції називають рідкісними порушеннями згортання крові [9].

*Варіабельність клінічних проявів спадкової гемофілії.* Рівень активності факторів VIII та IX у плазмі крові визначає ступінь тяжкості захворювання. Якщо рівень фактора нижчий від 1% нормального вмісту, має місце тяжка форма. Вміст фактора в межах 1-5% відповідає середньотяжкій формі, а рівень фактора від 5% до 40% від нормального має місце при легкій формі захворювання [10, 11]. Також застосовують ще одну класифікацію, засновану на залишковій активності фактора в крові в міжнародних одиницях на децилітр (мо/дл). Відповідно до такої класифікації, хвороба вважається тяжкою, якщо

концентрація фактора становить менше від 1 мо/дл, середньою, якщо 1-5 мо/дл, та легкою, якщо 6-40 мо/дл [9, 12, 13]. В осіб з легкою та середньотяжкою формою захворювання надмірні крововиливи зазвичай трапляються внаслідок травмування або інвазивних процедур, а спонтанні кровотечі спостерігаються рідко. У хворих на тяжку форму гемофілії часто трапляються крововиливи у м'які тканини, м'язи та суглоби без видимої причини. Можливі також небезпечні для життя кровотечі, як-от внутрішньочерепні [11].

Наслідком численних крововиливів може стати довгострокова інвалідність. Крововиливи в суглобах, що повторюються, можуть призвести до таких наслідків, як псевдопухлини, атрофія м'язів, серйозна артропатія, хронічний біль та обмеження фізичних можливостей. В останньому випадку для покращення роботи суглобів часто виникає необхідність у хірургічному втручанні та артропластиці [11]. Клінічні прояви гемофілії А та гемофілії В – схожі, однак деякі дослідження вказують на можливі відмінності в таких показниках, як витрата факторів, частота кровотечі [14], клінічні оцінки [15], потреба в ортопедичних операціях [11, 16, 17]. Існують свідчення на користь того, що гемофілія В є більш легкою хворобою в порівнянні з гемофілією А за однакового рівня фактора, якого не вистачає [18].

*Розповсюдженість гемофілії А.* Хвороба трапляється в усіх етнічних та расових групах з частотою приблизно 1 випадок на 5000-7000 новонароджених [8, 19]. Проте поширення гемофілії А серед осіб чоловічої статі у різних країнах значно відрізняється. Особливо помітною є різниця між країнами з високим та низьким рівнями доходу. Кількість виявлених випадків гемофілії А в країнах з низьким рівнем доходу часто значно нижча, ніж той самий показник в країнах з високим рівнем доходу. Наприклад, кількість виявлених випадків захворювання в Індії становить тільки 10% від очікуваного, а в Малайзії та Південно-Африканській республіці – менше, ніж 50% [20, 21]. Інше дослідження [20, 22] показує, що:

- З 11 африканських країн тільки у 5 поширення гемофілії А оцінюється в межах від 1,7 до 6,5 на 100 000 осіб чоловічої статі;

- З 9 південноамериканських країн тільки в 4 цей показник перебував у межах від 3,0 до 9,3;
- З 10 азійських країн тільки в трьох цей показник перебував у межах від 2,9 до 3,6.

Існує багато можливих причин недовиявлення випадків гемофілії А [20]. За Aledort [23], більшість хворих на гемофілію у світі або не виявлені через недостатню можливість діагностики, або, не маючи доступу та/або матеріальних можливостей для діагностики та лікування, не доживають до дорослого віку. Без лікування особи з тяжкою формою гемофілії гинуть в дитячому або молодому віці [24-27], що знижує співвідношення поширеності гемофілії до числа новонароджених [20].

Останнім часом спостерігається стабільне підвищення рівня поширеності захворювання в усьому світі [20].

*Гемофілія у жінок* [28]. Поширення гемофілії А серед осіб жіночої статі невідоме. У той час як більшість чоловіків, що мають мутантний алель, хворіють, жінки зазвичай є безсимптомними носіями [29]. Носії гемофілії А або В жіночої статі мають один нормальний та один аномальний алель гена фактора VIII або IX, відповідно [30, 31]. Більш того, залежно від моменту діагностики у носіїв може бути виявлений як нормальний рівень фактора згортання крові, так і помірна його нестача [28].

Носії можуть не мати симптомів, однак у випадку помірно зниженого (0,41-0,60 IU/мл) або низького вмісту фактора (<0,40 IU/мл) зазвичай має місце підвищена частота крововиливів [28, 30, 32]. У рідкісних випадках може мати місце середньотяжкий або тяжкий клінічний фенотип [29, 33-38]. У носіїв гемофілії А можлива підвищена схильність до кровотеч навіть за нормального рівня фактора коагуляції [32, 39-42]. Під терміном «жінки та дівчата з гемофілією» (ЖДГ) мають на увазі саме носіїв з наявними симптомами захворювання [43]. Серед кровотеч можуть бути носові кровотечі, легкі синці, тривалі або тяжкі кровотечі після травм, стоматологічних процедур або хірургічних операцій [39-41]. Можливе посилення кровотечі під час менструації,

під час або після пологів [44, 45]. Актуальні труднощі полягають у недостатній діагностиці, нестачі чіткої номенклатури й принципів лікування [28]. У більшості випадків причиною появи середньотяжкої та тяжкої форм гемофілії у жінок є вибірковість (порушення випадковості) інактивації X-хромосоми [29].

## 1.2. Гемостаз. Фактори коагуляції та їх гени

Гемостаз [46-48] – це процес контрольованого перекриття кровоносних судин, що попереджає небезпечні крововиливи та зазвичай здійснюється на межі позасудинної тканини та кровоносних судин. Система складається з двох великих компонентів: кров'яних пластинок (тромбоцитів) та факторів коагуляції (згортання крові). Останні являють собою систему білків, які контролюють перетворення розчинного фібриногену, що міститься в плазмі, у фібрин – нерозчинний полімер, який формує сітку, яка затримує клітини. За відсутності формених елементів крові неозброєним оком можна побачити, як прозора плазма перетворюється на напівпрозорий гель у процесі коагуляції [49].

Фактори коагуляції (надалі – фактори) позначають римськими цифрами, а до позначень активованих факторів додають суфікс «а». Неактивовані фактори (ф.): ф. II, ф. V, ф. VII, ф. VIII, ф. IX, ф. X, ф. XI, ф. XII, ф. XIII. Приклади активованих факторів: ф. VIIa, ф. IXa [49]. Окрім факторів, для згортання крові необхідними є катіони  $Ca^{2+}$  [50].

Фактор VIII синтезується в лімфатичній тканині та в клітинах печінкової синусоїди, а решта факторів – у гепатоцитах. Зазвичай фактори циркулюють у плазмі крові в неактивній або латентній формі, а оскільки більшість факторів є протеазами, їх у латентному стані можна називати «зимогенами». Фактори VIII та IX називають гемофільними, позаяк саме їх нестача, визначена генами, зчепленими з X-хромосою, спричиняє розвиток гемофілії [49].

*Гени факторів коагуляції.* Як вже зазначено раніше, нестача фактора VIII призводить до розвитку гемофілії А, а нестача фактора IX – до розвитку гемофілії В. Фактор VIII та фактор IX кодують відповідно ген *F8* та *F9*. Обидва гени розташовані в X-хромосомі, у довгому плечі, причому ген *F8* знаходиться в плеча дистальній частині плеча, в хромосомній ділянці Xq28 [51], а ген *F9* – ближче до

центромери, в ділянці Xq27 [52]. Як гемофілія А, так і гемофілія В успадковуються рецесивно зчеплено з X-хромосою [28].

Ген *F8* великий та структурно складний. Він має довжину приблизно 180 тисяч пар основ та складається 26 екзонів. Матрична РНК, отримувана при транскрипції гена *F8*, має довжину 9 тисяч основ. Мутації в гені *F8* спричиняють нестачу фактора VIII [53].

Натомість, ген *F9* значно менший та структурно простіший. Він містить 8 екзонів, найбільший з яких має довжину тільки 1935 пар основ, а загальна довжина гена складає приблизно 34 тисячі п.н. [11].

Фактор VIII (рис. 1.1а)[54].

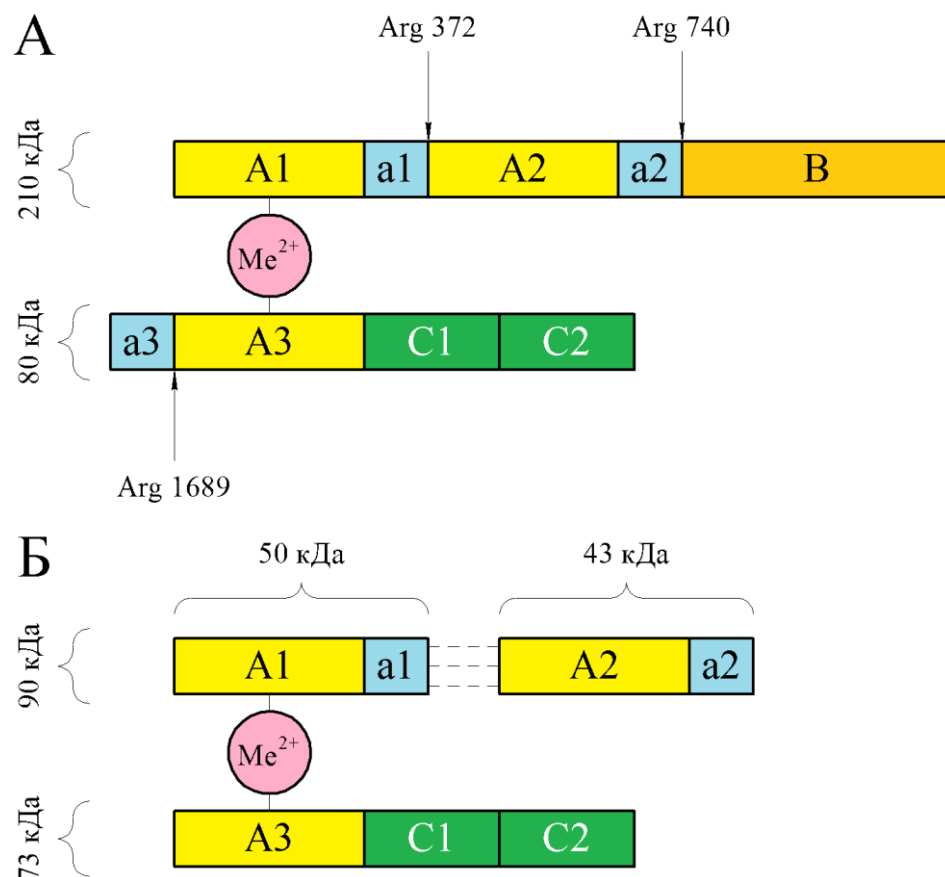


Рис. 1.1 – Структура фактора VIII в латентному (а) та активованому (б) станах [49, 55, 56]. Позначення Me<sup>2+</sup> означає Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, або Mn<sup>2+</sup>

Зрілий фактор VIII є великим білком масою приблизно 300 кДа та містить 2332 залишки амінокислот [55-57]. Латентний фактор VIII формує комплекс з фактором фон Віллебранда. Останній захищає фактор Віллебранда від протеолізу та продовжує період напіврозпаду до 8-12 год. Молекула фактора VIII включає в

себе 2 ланцюги, сполучені двовалентним катіоном ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  або  $\text{Mn}^{2+}$ ), та 6 доменів: 3 А-домени, 1 В-домен та 2 С-домени. GLA-домени відсутні. Кожний А-домен має довжину приблизно 330 амінокислотних залишків, а домен В, який в первинній структурі білка сполучає домени А2 та А3, містить 883 амінокислотні залишки [55, 56]. З 25 потенційних аспарагінових сайтів глікозилювання фактора VIII 19 припадають на В-домен. На С-кінці первинної структури білку знаходяться два С-домени, кожний з яких містить по 150 залишків амінокислот. За допомогою С-доменів здійснюється прикріплення до мембран.

У структурі фактора VIII, окрім перерахованих вище доменів, також виділяють менші субдомени а1, а2 та а3, довжина яких становить 40-50 амінокислотних залишків. Вони містять залишки сульфатованого тирозину й багаті на залишки кислих амінокислот, а саме – аспартату й глютамату.

У зрілій (гетеродимерній) формі фактора в більшому ланцюзі розташовані домени А1, А2 та В, натомість менший ланцюг містить домени А3, С1 та С2. Схему фактора VIIIа зображено на рис. 1.16. Активація фактора VIII під дією тромбіну полягає в розщепленні латентної форми в трьох сайтах, а саме в Arg 372, Arg 740 та Arg 1689. Ці сайти знаходяться відповідно в субдоменах а1, а2 та між субдоменом а3 й доменом А3. Активація призводить до втрати В-домену та а3-субдомену, причому видалення останнього зумовлює вивільнення фактору VIII з комплексу з фактором фон Віллебранда. Це дозволяє активованому фактору взаємодіяти з фосфоліпідними мембранами. Катіонний зв'язок між доменами А1 й А3 зберігається. «Шматки» колишнього великого ланцюга пов'язані нековалентною взаємодією. Таку форму білку називають гетеротримерною [49].

*Фактор IX (рис. 1.2, стор. 16).* Зрілий фактор IX, синтезований гепатоцитами, містить 415 залишків амінокислот, а його молекулярна маса становить 57 кДа. Активований фактор IXа є протеазою й утворює стабільну теназу в комплексі з фактором VIIIа. У структурі фактора послідовно розташовані домени GLA, EGF1, EGF2 та протеаза, при цьому молекула фактора VIII складається з двох ланцюгів, сполучених дисульфідним зв'язком. GLA, EGF1 та EGF2

розташовані у легшому ланцюзі, а протеаза – у важчому. У GLA-домені міститься 12 залишків глутамату, карбоксильованих до Gla-залишків.

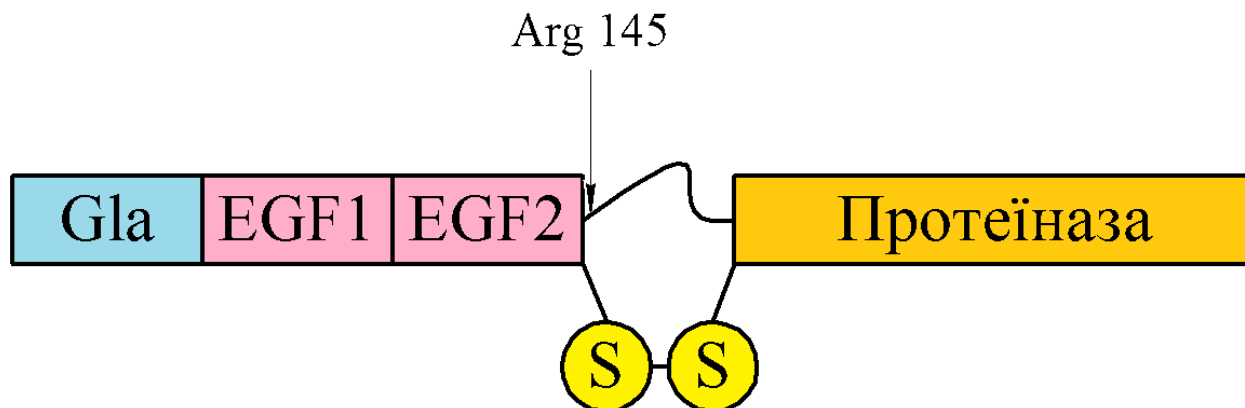


Рис. 1.2 – Структура фактора ІХ [49]

Активация фактора ІХ здійснюється шляхом розщеплення в точці Arg 145, а потім – у точці Arg 180 [58-60]. Каталізаторами активації можуть бути фактор ХІа або комплекс TF/FVII. Значення першого способу *in vivo* наразі не з'ясоване. Імовірно, він здійснюється в процесі активації фактора ІХ. Другий спосіб бере участь у лавиноподібному прискоренні процесу згортання крові [49, 54].

Як вже зазначено раніше, гемофілія А трапляється набагато частіше від гемофілії В, а також, імовірно, має тяжчі клінічні прояви, тому далі йтиметься тільки про гемофілію А.

### 1.3. Мутації гена *F8*. Методи аналізу мутацій гена *F8*

*Мутації гена F8*. Гемофілія А успадковується за Х-зчепленим рецесивним типом [53]. В гені *F8* різноманітні виявлено практично усі типи мутацій. Трапляються точкові мутації (однонуклеотидні заміни – місенс- та нонсенс-мутації), делеції, інсерції, транслокації та інверсії [11]. Насьогодні, в базі даних ЕАНAD зареєстровано понад 3 тис. різних мутацій гена *F8* у понад 10 тисяч пацієнтів [61]. Розподіл мутацій див. на рис. 1.3 та 1.4 (стор. 17).

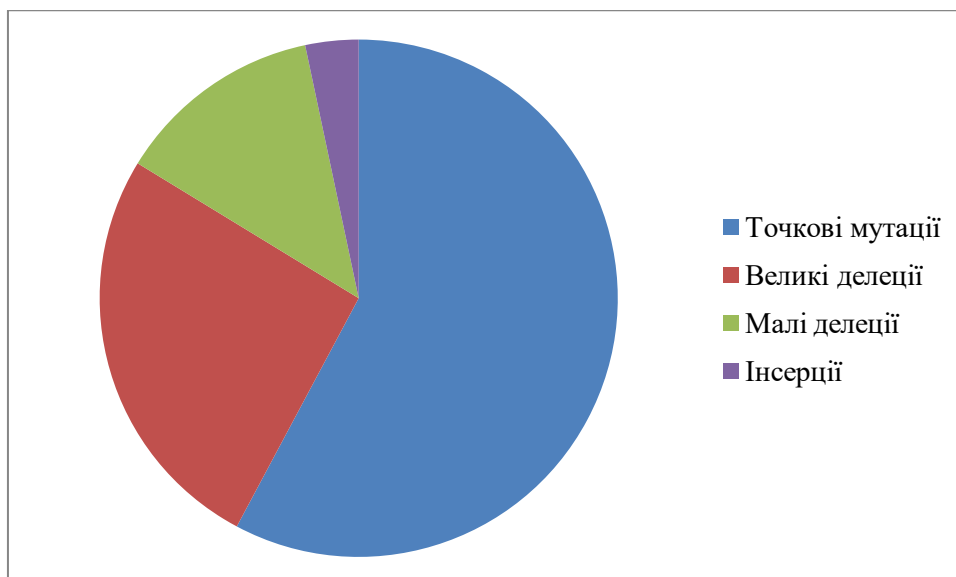


Рис. 1.3 – Існуючі різновиди мутацій гена *F8*, окрім інверсій [53]

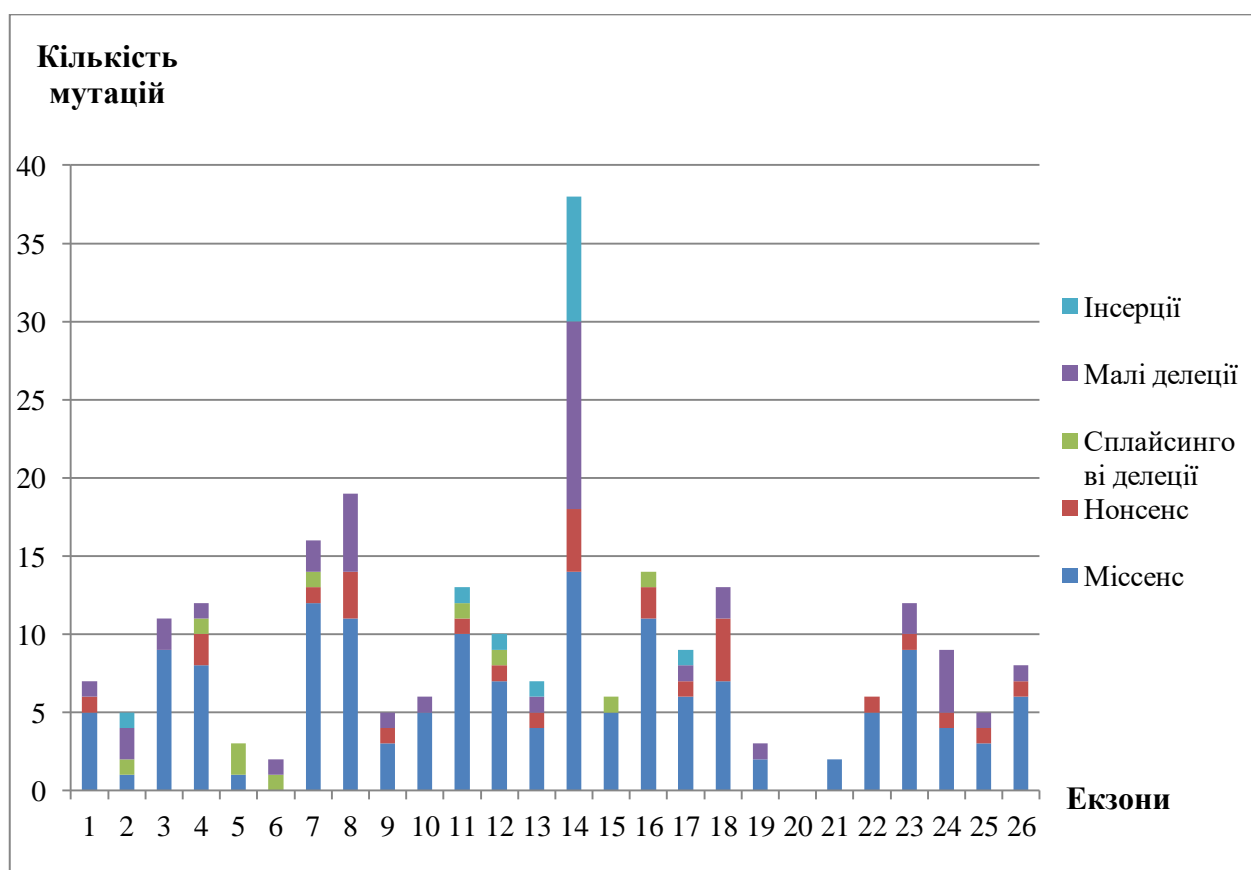


Рис. 1.4 – Типи точкових мутацій в екзонах *F8*

Із досліджень ми бачимо, що тип мутації корелює із залишковою активністю фактора в плазмі, а також зі схильністю до кровотеч. Більші дефекти генів зазвичай спричиняють тяжчу форму захворювання [62, 63]. Більш патогенними є інверсії, делеції та інерції. Точкові мутації – менш патогенні [53].

*Інверсії ділянок ДНК* [53]. Ще до недавнього часу приблизно в 40% пацієнтів, що хворіють на тяжку форму гемофілії не вдавалося виявити ніякої мутації ані в жодному екзоні гена *F8*, ані в місцях їх з'єднання в зрілій мРНК [64]. Вирішити цю проблему вдалося, коли стало зрозуміло, що скринінг кДНК гена *F8* утруднений неможливістю здійснити ПЛР-ампліфікацію ділянки між 22-м та 23-м екзонами [65, 66]. Дослідники припустили, що це спричинено порушенням в інтроні 22, який, маючи довжину 32 т.п.н., є найбільшим інтроном у гені *F8*. CpG-острівець, розташований у цьому інтроні на відстані приблизно 10 т.о. від 3'-кінця екзона 22, вважається двонаправленим промотором для двох транскрибованих генів, які позначають як *F8A* та *F8B* [67, 68]. Ген *F8A* не містить інтронів та читається у протилежному до гена *F8* напрямі [53]. Два додаткових гена (гени *A*), які є гомологами гена *F8A*, теж піддаються транскрипції та розташовані на відстані приблизно 500 т.о. від 5'-кінця гена *F8* [67, 68]. Ці гени транскрибуються у напрямі, протилежному до *F8A* [53].

Наразі відомо, що гомологічна рекомбінація всередині хромосоми відбувається між геном *F8A* та одним з *A*-генів, і це призводить до появи інверсій всередині гена *F8*. Такі інверсії призводять до відділення екзонів 1-22 від екзонів 23-26 є причиною 40% тяжкої форми гемофілії [69, 70].

*Точкові мутації* [53]. У базі даних міститься 174 різноманітні точкові мутації, які зачіпають одну пару основ [53]. З них 138 є міссенс-мутаціями, а 24 – нонсенс-мутаціями. Інші 12 мутацій, як вважається, порушують правильний мРНК-сплайсинг одним з наступних способів: видалення сплайсингового сайту донора чи акцептора, або, імовірно, активація прихованого сплайсингового сайту. Чверть точкових мутацій зачіпають динуклеотиди CpG та відповідають механізму дезамінування, опосередкованому метилюванням. В такому випадку Ц перетворюється на Т, а Г – на А [53, 71]. Пацієнти з однаковими точковими мутаціями не завжди мають однакові клінічні прояви [53].

У базі даних наявний 31 пацієнт, організми яких при зовнішньому введенні фактора VIII синтезують інгібітори (антитіла до фактора 8), причому 27 з них мають нонсенс-мутації, а решта 4 – міссенс-мутації, дві з яких спричиняють легку

або середньотяжку форму гемофілії А. Одна і та сама точкова мутація не завжди призводить до появи одного і того клінічного фенотипу у пацієнтів з гемофілією А. Цей феномен спостерігається в кодонах 22, 162, 295, 326, 390, 412, 473, 479, 593, 704, 1680, 1689, 1922, 1941, 1997, 2150, 2159, 2209, 2304 та 2307. Одне з можливих пояснень – вплив поліморфізму або інших успадкованих мутацій [53].

*Делеції фрагментів ДНК.* Відомі великі та малі делеції. Серед перших описано 78 різних делецій в гені *F8*, причому їх розміри знаходяться в діапазоні від 2 до понад 210 т.о. Однак тільки для меншості великих делецій складені карти. Окрім трьох, усі мутації такого типу спричиняють тяжку форму гемофілії, причому значна частина (33%) делецій пов'язані з утворенням інгібіторів.

Описано 39 малих делецій у гені *F8*, розмір яких коливається в діапазоні від 1 до 23 пар основ. Гарячою точкою для мікроделецій є ділянка від 339 до 341 кодону, де описано три різні делеції, що відповідають ковзкому механізму неправильного сполучення та охоплюють подвійний прямий повтор ААТААТГААГАА, який, у свою чергу, відповідає консенсусній ділянці, що містить сайт множинних делецій [53, 71]. Випадки синтезу інгібіторів у разі виникнення мікроделецій невідомі [53].

*Інсерції фрагментів ДНК.* У гені *F8* описано 10 інсерцій, більшість з яких мають довжину в одну пару основ. Інсерція довжиною 10 пар основ являє собою дуплікацію існуючої послідовності. Інсерція однієї пари основ у кодон 1439 відбувається у тій самій позиції, де й делеція однієї пари нуклеотидів [53].

#### **1.4. Географічний розподіл мутацій. Методи аналізу мутацій *F8***

При дослідженні 45 родин з гемофілією А в провінції Хенань (Китай) виявлено 41 мутацію, 19 з яких були новими. Результати дослідження наведено на рис. 1.5 (стор. 20). 80% з патогенних мутацій розподілилися по таких категоріях, як міссенс (43,6%), нонсенс (16,36%), зсув рамки зчитування (14,55%), сплайсингові мутації (5,45%). Решта мутацій припадає на інверсії в інтронах 22 та 1 (18,18%, 10 пацієнтів), а також на делецію фрагмента довжиною 3059 пар основ (1,82%, 1 пацієнт) [72].

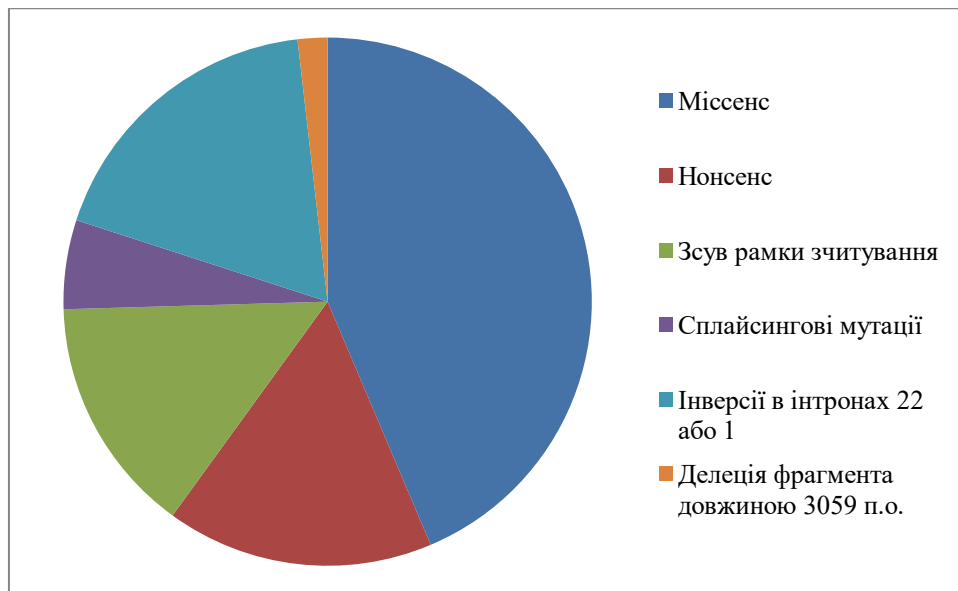


Рис. 1.5 – Різновиди мутацій в дослідній групі з провінції Хенань [72]

При обстеженні 22 корейських пацієнтів, які не є родичами, виявлено 7 випадків Inv22, 9 точкових мутацій та 4 малі перестановки. Серед точкових мутацій було 6 нонсенс- та 3 міссенс-мутації (рис. 1.6) [73].

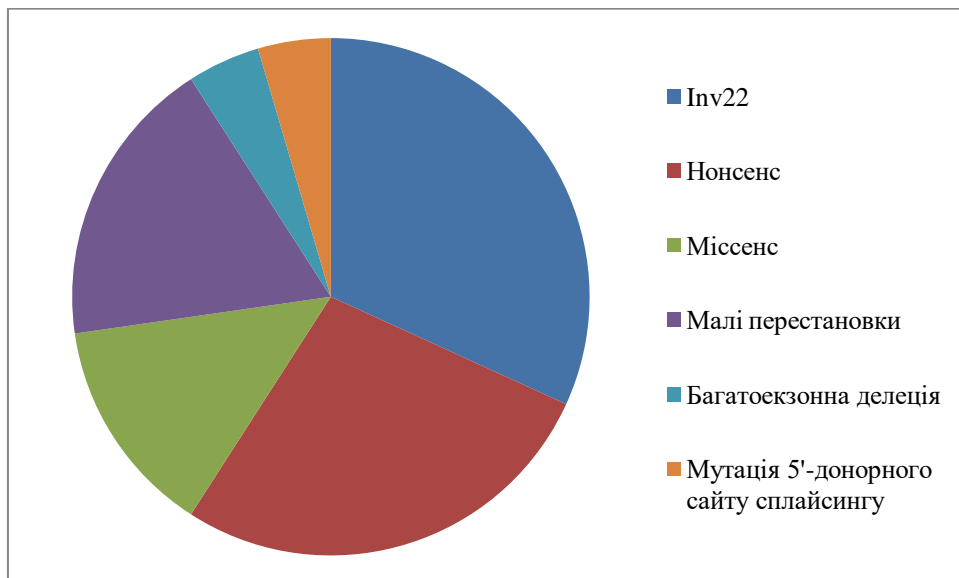


Рис. 1.6 – Різновиди мутацій в дослідній групі з Кореї [73]

Серед 120 оглянутих єгипетських пацієнтів 72 мали тяжку форму захворювання, а решта 48 – середньо тяжку. Інверсія інтрона 22 (Inv22) гена *F8* була виявлена у 33% хворих на тяжку форму та у 6% пацієнтів з середньотяжкою формою ГА. Таким чином, Inv22 присутня у 23% хворих на гемофілію, що близько до такого показника в інших людських популяціях [74].

Мутація Inv22 призводить до того, що С-домени не добудовуються [75]. А саме С-домени відповідають за прикріплення до фосфоліпідних мембран [49], про що вже було згадано раніше.

*Методи аналізу мутації гена F8.* Для аналізу Inv22 використовують низку методик, як-от: інвертована ПЛР зі зсувом (IS-PCR) [76], long-distance polymerase chain reaction (LD-PCR, ПЛР довгих фрагментів) тощо [77, 78]. Також застосовують Саузерн-блоттинг [78].

Суть методики інвертованої ПЛР зі зсувом полягає в тому, що Inv22 призводить до зміни взаємного розташування сайтів певної ендонуклеази рестрикції, а отже – і до зміни довжини фрагментів, що утворюються після розрізання вихідної ДНК ендонуклеазою рестрикції. Фрагмент, довжина якого залежить від наявності (20,0 т.п.н.) або відсутності Inv22 (21,5 т.п.н.), зшивають в кільце, а далі ампліфікують ділянку кільця, яка містить сайт зшивання. Виявлення фрагментів зміненої довжини здійснюють шляхом гель-електрофорезу [77].

Принцип ПЛР довгих фрагментів (Long distance PCR) загалом аналогічний до принципу IS-PCR, за винятком того, що вирізані з вихідної ДНК фрагменти не зшиваються у кільце, а ампліфікуються в лінійному вигляді з використанням двох ферментів-полімераз [79].

Саузерн-блоттинг передбачає фрагментацію ДНК з наступним електрофорезом фрагментів та їх іммобілізацією на мембрані. Для пошуку потрібного фрагмента (у даному випадку – фрагмента, який містить Inv22) здійснюють гібридизаційний аналіз [80].

Для подальшої оптимізації буде обрано метод IS-PCR [77] завдяки простоті й доступності. Метод IS-PCR технічно є менш часомістким за метод Long distance PCR [77] та менш часо- і праце містким за метод Саузерн-блоттингу [78], тому може бути широко застосований.

## 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Матеріали дослідження

**Об'єкт досліджень:** ядерна геномна ДНК з лейкоцитів периферійної крові або букального епітелію хворих з клінічними ознаками ГА та членів їх родин із різних регіонів України. Зразки крові пацієнтів та членів їхніх родин надані обласними медико-генетичними центрами (м. Хмельницький, м. Ужгород, м. Одеса, м. Івано-Франківськ, м. Житомир), ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України» (м. Львів) клінікою ІСІДА-IVF (м. Київ) в межах договорів про наукове співробітництво з ІМБГ НАН України.

Згідно з основними правилами біоетики при використанні людини в якості об'єкту дослідження, була отримана інформована згода на проведення даного дослідження від усіх досліджуваних індивідів або їх законних опікунів, та було введено номенклатуру зразків ДНК, яка включала проточний порядковий номер у журналі реєстрації зразків біоматеріалу, код ДНК-аналізу за призначенням лікаря та та зазначення родинного зв'язку (пр – пробанд, м – мати пробанда, б – батько пробанда, с – сибс і т.ін.).

**Матеріали дослідження:** В ході дослідження використовували праймери, гомологічні дистальним ділянкам інверсії 22 інтрона гена *F8*, які синтезовані у лабораторії генетики спадкових патологій ІМБГ НАН України методом твердофазного фосфоамітидного синтезу, а також замовлені за авторським дизайном у фірмі Metabion international AG (ФРН).

**Реагенти.** Для проведення ПЛР використовували термостабільну Taq-ДНК-полімеразу - FIREPol® DNA Polymerase, ПЛР-буфер з  $MgCl_2$  та набори дезоксинуклеозидтрифосфатів (dNTP) фірми Solis Biodyne (ЄС), ендонуклеазу рестрикції BclI (Thermo Fisher Scientific, ЄС) та лігазу T4 (EURx, Польща) з відповідними буферами, набори для виділення нуклеїнових кислот (Zymo Research, ThermoFisher, MagMax).

В роботі також використані протеїназа К, додецилсульфат натрію виробництва фірми "SERVA"; агароза, етідіум бромід, ізопропіловий та етиловий спирт, бромфеноловий синій, ксиленціанол виробництва фірми "SIGMA";

одноразовий лабораторний пластик (ПЛР-пробірки, мікроцентрифужні пробірки 0,5-2 мл, наконечники для дозаторів перемінного об'єму), захисний одяг та рукавички.

**Обладнання.** В роботі використано:

-загальнолабораторне обладнання виробництва США та ЄС: мікроцентрифуги, ультрацентрифуги, змішувачі, водяний та повітряний термостати, холодильники та морозильні камери, вакуумний концентратор, дозатори перемінного об'єму, технічні та аналітичні електронні ваги, багаторазовий лабораторний посуд, мульти-ротатор;

-транслюмінатор УФ-світла з випроміненням 260-280 нм, камери для горизонтального гель-електрофорезу з блоками живлення, система гель-документації вітчизняного виробництва;

-ПЛР-обладнання: ПЛР-бокси з лампами УФ-світла, автоматичні термоциклери BioRad (США) та Applied Biosystems (ЄС).

**Обладнання "Центру колективного користування науковими приладами" ІМБГ НАН України:**

1. Синтезатор ДНК/РНК олігонуклеотидів (АКТА oligopilot 10, Amersham Biosciences).

2. Ультрацентрифуга 80 000 об/хв., максимально можливе прискорення 602640 g.

3. Капілярний ДНК-аналізатор ABI PRISM 350 Applied Biosystems на 4 капіляри.

4. Аналізатор нового покоління для масового паралельного секвенування Ion Torrent Ion GeneStudio S5 Plus Thermo Scientific з обладнанням для автоматичного приготування геномних бібліотек Ion Chef™ Instrument Thermo Scientific.

5. Термоциклери з оптичним блоком для ПЛР в реальному часі IQ5 Real-Time PCR Bio-Rad та CFX96 Bio-Rad.

## Обладнання ЛГС

**Кімната реєстрації біологічного матеріалу та виділення нуклеїнових кислот – передпокій з мийкою та гардеробом (2 м<sup>2</sup>) та лабораторна кімната (25 м<sup>2</sup>) з люком для передачі зразків у ПЛР-кімнату:**

1. Лабораторні меблі: лабораторні столи та стільці, шафи для скляного посуду, витяжна шафа з підключенням до електромережі та набором дозаторів змінного об'єму, лабораторна мийка.

2. Центрифуги: мікроцентрифуга з вортексом Microspin FV-2400 Biosan, мікроцентрифуга mini spin Eppendorf, ультрацентрифуга 5819R Eppendorf з охолодженням та змінні роторами, вакуумний концентратор 5301 Eppendorf.

3. Змішувачі та струшувачі: Multi RS-60 Multi-Rotator, Mixer 5432 Eppendorf, магнітний змішувач з підігрівом вітчизняного виробництва.

4. Термостати та інкубатори: водяні електронні термостати –КН-3 Biometra, MultiTemp III Amersham Biosciences, термостат повітряний вітчизняного виробництва.

5. Спектрофотометр ND-100 NanoDrop та ПК з мережевим доступом.

6. Дистилятор лабораторний ДЭ-4 вітчизняного виробництва.

7. Опромінювач бактерицидний ОБПе 6-30 вітчизняного виробництва

8. Сухожарова шафа вітчизняного виробництва.

9. Побутові холодильні та морозильні камери вітчизняного виробництва.

10. Джерела безперебійного живлення та мережеві фільтри.

**ПЛР-кімната – передпокій з мийкою та гардеробом (2 м<sup>2</sup>) та лабораторна кімната (25 м<sup>2</sup>) з люком для отримання зразків ДНК:**

1. Лабораторні меблі: лабораторний стіл, тумби та стільці, шафа для скляного посуду, витяжна шафа з підключенням до електромережі та набором дозаторів змінного об'єму.

2. ПЛР-бокси з підключенням до електромережі та УФ-опромінювачами (2 шт) з індивідуальними наборами дозаторів змінного об'єму.

3. Термоциклери: GeneAmp PCR System 2700 Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 2720 Applied Biosystems, T100 Thermal Cycler Bio-Rad

4. Змішувач Agitateur Top-Mix 11118 Bioblock Scientific
5. Мікроцентрифуга MC-4/7s JoanLab
6. Опромінювач бактерицидний ОБПе 6-30 вітчизняного виробництва
7. Побутові холодильні та морозильні камери вітчизняного виробництва.

**Кімната для електрофорезу – передпокій з мийкою та аварійною душовою (2 м<sup>2</sup>), гардеробом (5 м<sup>2</sup>) та кімнатою для тимчасового зберігання біовідходів (2 м<sup>2</sup>) та лабораторна кімната (30 м<sup>2</sup>) з фотобоксом:**

1. Лабораторні меблі: лабораторні столи та стільці, шафи для скляного посуду, навісні шафи, витяжна шафа з підключенням до електромережі та 2 наборами дозаторів змінного об'єму, лабораторна мийка.

2. Обладнання для горизонтального електрофорезу – камера для форезу, підставка для заливки з рівнем горизонтально нахилу та блок живлення (2 комплекти).

3. Обладнання для вертикального поліакриамідного форезу: камера для форезу, підставка для заливки з рівнем горизонтально нахилу та блок живлення (3 комплекти), обладнання для DGGE –DCode Universal Mutation Detection System Біо-Rad - прилад для заливки градієнтного геля, камера для форезу з підігрівом та змішувачем.

4. Системи для автоматичного вертикального ПААГ з лазерною детекцією: генетичний гелевий аналізатор ALF-express II (камери для гелів різного об'єму, система для високовольтного форезу з підігрівом та лазерною детекцією, стіл для заливки та полімеризації з УФ-опромінювачем), генетичний гелевий аналізатор 4300 DNA Analyzer Li-Cor (камера для геля, система для високовольтного форезу з підігрівом та лазерною детекцією).

5. Система для фотодокументації гелів, забарвлених EtBr – УФ-транслюмінатори вітчизняного виробництва, система фотодетекції – GelDoc.

6. Автоматичний повітряний інкубатор Forced Convection Laboratory Incubator Esco Isotherm.

7. Змішувач Agitateur Top-Mix 11118 Bioblock Scientific.

8. Центрифуги: мікроцентрифуга MC-4K JoanLab, ультрацентрифуга Eppendorf 5415 C.

9. Ваги: технічні електронні ваги вітчизняного виробництва, аналітичні електронні ваги Sartorius Analytic.

10. Опромінювач бактерицидний ОБПе 6-30 вітчизняного виробництва.

11. Дистилятор лабораторний ДЭ-4 вітчизняного виробництва.

12. Побутові холодильні та морозильні камери вітчизняного виробництва.

13. 2 комплекти ПК з підключенням до мережі.

14. Джерела безперебійного живлення та мережеві фільтри.

**Кімната для аналітичного аналізу та роботи з онлайн-ресурсами (25 м<sup>2</sup>) з перерядпокоєм (гардеробна та мийка – 2 м<sup>2</sup>)**

1. Офісні меблі: письмові столи, книжкові шафи та стільці (4 комплекти), ПК з під'єднанням до лабораторної мережі та інтернету (4 комплекти)

2. Диски мережевого сховища даних

3. Джерела безперебійного живлення та мережеві фільтри.

## **2.2. Методи дослідження**

*Суть методики [77] полягає в тому, що у разі інверсії 22-го інтрона гена F8 в останньому змінюється відстань між сайтами рестрикції ендонуклеази BclI, що призводить до зміни довжин фрагментів, що утворюються після розрізання вихідної ДНК. Ампліфікувавши один з таких фрагментів, можна виявити зміну його довжини методом електрофорезу в агарозному гелі. Однак такий фрагмент є доволі великим (нормальний – 21,5 тис. п. н., мутантний – 20,0 тис. п. н.), тому його необхідно «зшити» в кільце й ампліфікувати ділянку кільця, яка містить місце зшивання. Справа в тому, що ампліфікація довгих фрагментів ДНК утруднена. Ампліфіковані нормальні фрагменти матимуть більшу довжину, ніж мутантні, тому останні можна виявити методом електрофорезу в агарозному гелі.*

*Метод виділення ДНК з лімфоцитів периферійної крові з фенолом. Для виділення ДНК застосовували стандартний метод – гідроліз лізатів клітин під дією протеїнази К та наступна фенольна екстракція [81]. Цей метод не було застосовано власноруч, однак у дослідній групі були наявні зразки, виділені*

методом фенол-хлороформної екстракції. Ці зразки були взяті з колекції ДНК, яка зберігається у ЛГСП ІМБГ НАН України

Якість препаратів ДНК визначали за спектральними характеристиками та шляхом електрофорезу в 1%-ному агарозному гелі. Відношення оптичної щільності, визначеної відповідно при  $\lambda 260$  та при  $\lambda 280$ , а також при  $\lambda 230$ , показує чистоту ДНК. Спектральні характеристики визначали на приладі ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, США).

*Метод виділення геномної ДНК з осадженням на мікромагнітних носіях.* Для виділення ДНК з осадженням на магнітних носіях використовували набір MagMAX<sup>TM</sup> згідно з інструкцією виробника, але зі змінами. Збовтували суспензію магнітних частинок до однорідного стану шляхом вортексування з середньою швидкістю. З суспензії магнітних частинок та лізис-зв'язувального розчину готували суміш 1:1, перемішуючи м'яким вортексуванням. У кожену пробірку додавали 235 мкл отриманої суміші та 175 мкл зразка. Перемішували протягом 5 хв на мульти-ротаторі. Для осадження магнітних носіїв та решток клітин пробірки центрифугували за 16 000 g протягом 3 хв.

Наступним кроком нагрівали елюційний буфер у водяній бані до 65°C. 115 мкл супернатанту переносили в іншу пробірку та додавали 65 мкл 100% ізопропанолу, після чого перемішували на мульти-ротаторі протягом 1 хв. Додавали 20 мкл суспензії магнітних частинок, попередньо гомогенізованої вортексуванням із середньою швидкістю, та перемішували протягом 5 хв на мульти-ротаторі. Далі пробірки зі зразками встановлювали в магнітний штатив і витримували протягом 1 хв. Обережно повністю видаляли супернатант.

Наступним кроком здійснювали промивання зразків. Для цього в кожній зразок додавали по 150 мкл промивного розчину 1 (містить ізопропанол) та перемішували протягом 1 хв на мульти-ротаторі. Зразки витримували в магнітному штативі протягом 1 хв, після чого повністю видаляли супернатант та виймали пробірки зі зразками з магнітного штатива. Промивання розчином 1 повторювали ще раз. Аналогічним чином двічі здійснювали промивання

промивним розчином 2, який містить етанол. Магнітні носії висушували в концентраторі за температури 65°C протягом 5 хв.

Для елюції ДНК з магнітних носіїв в кожний зразок додавали 20-50 мкл елюційного буфера, завчасно нагрітого у водяній бані до 65°C, та перемішували на мульти-ротаторі протягом 3 хв. Якщо магнітні частинки утворювали агрегати, розчин пікетували 10 разів і перемішували на мульти-ротаторі протягом 1 хв. Суміші ставили в магнітний штатив на 1 хв та переносили супернатант у підходящу ємність для подальшого контролю якості й зберігання за -20°C.

Якість препаратів ДНК визначали за спектральними характеристиками та шляхом електрофорезу в 1%-ному агарозному гелі. Відношення оптичної щільності, визначеної відповідно при  $\lambda 260$  та при  $\lambda 280$ , а також при  $\lambda 230$ , показує чистоту ДНК. Спектральні характеристики визначали на приладі ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, США).

*Метод виділення геномної ДНК з осадженням на колонках з мікрофільтрами.* Дезінтеграцію клітин проводили аналогічно до того, як описано в методі фенол-хлороформної екстракції. Виділення ДНК проводили згідно з інструкцією виробника комплекту ZymoSearch.

У мікроцентрифужну пробірку об'ємом 1,5 мл додавали 1 об'єм вихідного ДНК-зразка та 2 об'єми зв'язувального буфера. Для очищення ДНК від фермента (ендонуклеази рестрикції та лігази) до 1 об'єму ДНК-зразка додавали 5 об'ємів зв'язувального буфера. Суміш перемішували коротким вортексуванням та переносили в центрифужну колонку ZymoSpin™, яку вставляли у пробірку для збору. Далі суміш центрифугували протягом 30 с за відцентрового прискорення 13 000 g та видаляли рідину з пробірки для збору. Потім в колонку додавали 200 мікролітрів (мкл) промивного буфера та центрифугували протягом 30 с з відцентровим прискоренням 13 000 g. Повторювали промивання ще раз. На завершальному етапі виділення ДНК прямо в колонку додавали 6 мкл елюційного буфера та витримували (інкубували) за кімнатної температури протягом 1 хв. Колонку переносили в мікроцентрифужну пробірку об'ємом 1,5 мл й центрифугували протягом 30 с, щоб елювати ДНК.

Якість препаратів ДНК визначали за спектральними характеристиками та шляхом електрофорезу в 1%-ному агарозному гелі. Відношення оптичної щільності, визначеної відповідно при  $\lambda 260$  та при  $\lambda 280$ , а також при  $\lambda 230$ , показує чистоту ДНК. Спектральні характеристики визначали на приладі ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, США).

*Метод гідролізу геномної ДНК ендонуклеазами рестрикції.* Для здійснення ферментативного гідролізу використовували Thermo Scientific™ BclI (10 U/ $\mu$ L). Концентрації реагентів суміші були наступними: 1x буфер; 150-200 одиниць активності ендонуклеази рестрикції на зразок ДНК (1,5-3,0 мкг). Проби витримувались 10-15 годин у повітряному термостаті, за температури 50-55°C. Гідролізовану ДНК очищували одним з 3 методів (фенол-хлороформна екстракція, очищення на мікромагнітних носіях або на колонках за допомогою комерційних наборів) і розчиняли у 10 мМ TE або очищеній воді для ПЛР. Далі цей зразок використовувались для проведення лігазної реакції, або зберігалися до 1 тижня при +5°C.

Якість препаратів ДНК визначали шляхом електрофорезу в 1%-ному агарозному гелі, звертаючи увагу на характер плям, які повинні мати вигляд яскравої смуги, від якої тягнеться шлейф. Відсутність яскравої смуги свідчить про фрагментацію зразка та його непридатність для подальшого дослідження.

*Метод лігування гідролізованої ДНК за допомогою ДНК-лігази.* Лігування фрагментів гідролізованої ДНК було здійснено за допомогою T4 ДНК-лігази (T4 DNA Ligase cat. no. E1060). Концентрації реагентів суміші були наступні: 200 одиниць активності на зразок ДНК (1,5-3,0 мкг), 1x буфер, 1x розчин бичачого сироваткового альбуміну (BSA). Суміш витримували в ампліфікаторі 10 хв за температури +65°C, а потім 16 год або 2 год за температури +16°C. Ліговану ДНК очищували одним з трьох методів (фенол-хлороформна екстракція, очищення на мікромагнітних носіях або на колонках за допомогою комерційних наборів) і розчиняли у 10 мМ TE або очищеній воді для ПЛР. Далі цей зразок використовувались для проведення полімеразної ланцюгової реакції, або зберігалися до 1 тижня при +5°C.

Якість препаратів ДНК визначали шляхом електрофорезу в 1,2%-ному агарозному гелі, звертаючи увагу на характер плям, які повинні мати вигляд яскравої смуги, розташованої посеред шлейфу. Відсутність яскравої смуги свідчить про фрагментацію зразка та його непридатність для подальшого дослідження.

*Ампліфікація геномних послідовностей за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.* Полімеразно ланцюгову реакцію (ПЛР) здійснювали в автоматичному режимі в термоциклері GeneAmp PCR system 2720 (фірма Applied Biosystems, ЄС) або T100 Thermal Cycler (BioRad, СІР).

Реакційні суміші об'ємом 15 мкл містили: ПЛР-буфер (Трис-НСІ 67 мМ (рН 8,8 при 25°C); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 16,7 мМ; ЕДТА 6,7 мкМ; MgCl<sub>2</sub> 2,5 мМ); Бичачий сироватковий альбумін 170 мкг/мл; dNTP 400 мМ кожного типу; термостабільна ДНК-полімераза 0,7 одиниць активності; олігонуклеотидні праймери Pr ID та Pr ED по 7-10 нмоль кожного, олігонуклеотидний праймер Pr IU 12-15 нмоль та ДНК-матрицю, отриману після лігазної реакції.

Пробірки вміщували в ампліфікатор і використовували режими проведення стадій полімеразної ланцюгової реакції, наведені в таблиці 1, відповідно до розрахованої температури відпалювання праймерів та властивостей ДНК-полімерази (вразних фірмою-виробником).

Таблиця 2.1 – Режими проведення ПЛР

Температура, °С	95	95	60	72	95	58	72	72
Час, с	180	10	50	50	10	50	50	300
Кількість циклів	1	5			27			1

Якщо зразки не підлягали аналізу відразу після закінчення полімеразної ланцюгової реакції, то їх зберігали до 1 тижня при +4°C.

*Метод створення дизайну праймерів та пошук сайтів рестрикції.* Аналіз послідовностей і пошук сайтів для відпалу праймерів був проведений з використанням бази даних GenBank, NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Для підбору праймерів застосовували пакет програм Primer3, а для пошуку сайтів впізнавання

для обраної ендонуклеази рестрикції – базу даних GenBank і програмне забезпечення Invitrogen Vector NTI Advance 10.

*Метод електрофорезу фракціонованих фрагментів ДНК в агарозному гелі.* Описаний спосіб було застосовано й в попередніх методиках (виділення ДНК, ферментативний гідроліз, ферментативне лігування). Для здійснення електрофорезу готували 5X TBE-буфер, що містить 61 г трис-буфера, 30 г борної кислоти та 5 мл 0,5 М ЕДТА рН 8,0. Перемішуючи на магнітній мішалці, поступово додавали дистильовану воду до загального об'єму 1 л. Розчин фільтрували через фільтрувальний папір після повного розчинення компонентів буфера.

Для електрофорезу готували розведений (1-кратний) TBE буфер, вносячи у конічну колбу місткістю 0,5 л 100 мл 5-кратного буфера TBE для електрофорезу та додаючи дистильованої води до мітки 0,5 л. Розчин ретельно перемішували. Отриманий розчин можна було зберігати за кімнатної температураури

Приготування 1,6% агарозного гелю. У конічну термостійку колбу місткістю 250 мл вносили 0,8 г ага рози та 50 мл розведеного TBE буфера. Суміш ретельно перемішували і доводили до кипіння на електричній плитці або в мікрохвильовій пічі з метою повного розчинення агарози. Далі у колбу з розплавленою агарозою додавали 7-10 мкл 1% розчину етидіум броміду.

500 мл розведеного (1X) розчину TBE буфера додавали у ванночку апарата для електрофорезу. Для створення лунок у гелі встановлювали гребінку на платформу, в яку заливали розплавлену агарозу, охолоджену до 50-60°C. Після застигання агарози гребінку обережно виймали, а платформу переносили в електрофоретичну ванну. Кожну аналізовану пробу змішували з розчином для нанесення, що містив 0,5% барвників бромфенолового синього та ксиленцианолу, та 30% гліцерину. Суміші барвників зі зразками наносили в лунки, дотримуючись послідовності зразків, та підключали камеру до джерела постійного струму. Задавали напругу 180-220 В і витримували протягом 20-40 хв.

### 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Методика аналізу інверсії 22 інтрону гена *F8*, обрана для оптимізації

Суть методики [77] полягає в тому, що у разі інверсії 22-го інтрону гена *F8* в останньому змінюється відстань між сайтами рестрикції ендонуклеази *VspI*, що призводить до зміни довжин фрагментів, що утворюються після розрізання вихідної ДНК. Ампліфікувавши один з таких фрагментів, можна виявити зміну його довжини методом електрофорезу в агарозному гелі. Однак такий фрагмент є доволі великим (нормальний – 21,5 тис. п. н., мутантний – 20,0 тис. п. н.), тому його необхідно «зшити» в кільце й ампліфікувати ділянку кільця, яка містить місце зшивання. Справа в тому, що ампліфікація довгих фрагментів ДНК утруднена. Ампліфіковані нормальні фрагменти матимуть більшу довжину, ніж мутантні, тому останні можна виявити методом електрофорезу в агарозному гелі.

#### 3.2. Етапи методики та їх оптимізація

*Методи виділення ДНК з біологічних зразків пацієнтів та контроль кількості її якості і кількості.* Зразки ДНК, які увійшли у дослідну групу, отримані із зразків біологічного матеріалу пацієнтів з клінічним діагнозом ГА та членів їх родин у період з 2013 року та до теперішнього часу. Частину зразків ДНК було отримано за період практики, решту – з колекції ДНК, яка зберігається у ЛГСП ІМБГ НАН України згідно договорів про наукове співробітництво та договорів про надання послуг з державними та приватними медичними установами України. В дослідній групі були зразки ДНК, отримані 3 різними методами, які описані в Розділі 2.

Якість препаратів ДНК дослідної групи визначали за спектральними характеристиками та шляхом електрофорезу в 1,0 % агарозному гелі. Спектральні характеристики та концентрацію ДНК визначали на приладі ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, США) у діапазоні довжин хвиль від 220 нм до 300 нм. Відношення  $X$  оптичної щільності  $D$ , визначеної відповідно при 260 нм

( $D_{260}$ ) та при 280 нм ( $D_{280}$ ), показує чистоту препарату ДНК по відношенню до білків і має вкладатися в рамки між 1,8 та 2,0:

$$X = \frac{D_{260}}{D_{280}}, 1,8 < X < 2,0.$$

Значення  $X$  менше 1,8 вказує на наявність у розчині значної кількості білків, а вище 2,0 – на домішки РНК. Деякі білки, крім поглинання при 280 нм мають максимум при 230 нм, до того ж, поглинання в цьому діапазоні хвиль відбувається також для багатьох інших органічних сполук.

$$Y = \frac{D_{260}}{D_{230}} \approx 2,0,$$

де  $D_{230}$  – значення оптичної густини при довжині хвилі 230 нм.

Таким чином, відношення  $Y$  для нативної ДНК без органічних домішок має складати 2,0. Найчастіше проби ДНК, які екстраговані стандартним методом з фенолом та хлороформом, крім домішок білків мають залишки фенолу, який поглинає при 280 нм. Відношення  $X$  для ДНК без фенолу становить 1,2. Домішки, які мають спектр поглинання вищий за 300 нм, візуалізуються у видимому світлі, при цьому розчин ДНК стає непрозорим. Результати спектрофотометрії зразків наведено на рис. 3.1 та 3.2 .

Додатково було проведено якісний аналіз виділеної ДНК, яка не повинна бути фрагментована, методом електрофорезу в 1% агарозному гелі. У якості флуоресцентного інтеркалюючого барвника ДНК на всіх етапах дослідження використано етидій бромід (EtBr). Якщо на доріжці видно яскраву риску, це означає, що зразок придатний для подальшої роботи. Якщо зразок деградував (зазнав фрагментації), видно довгу «розмиту» смугу (рис. 3.3).

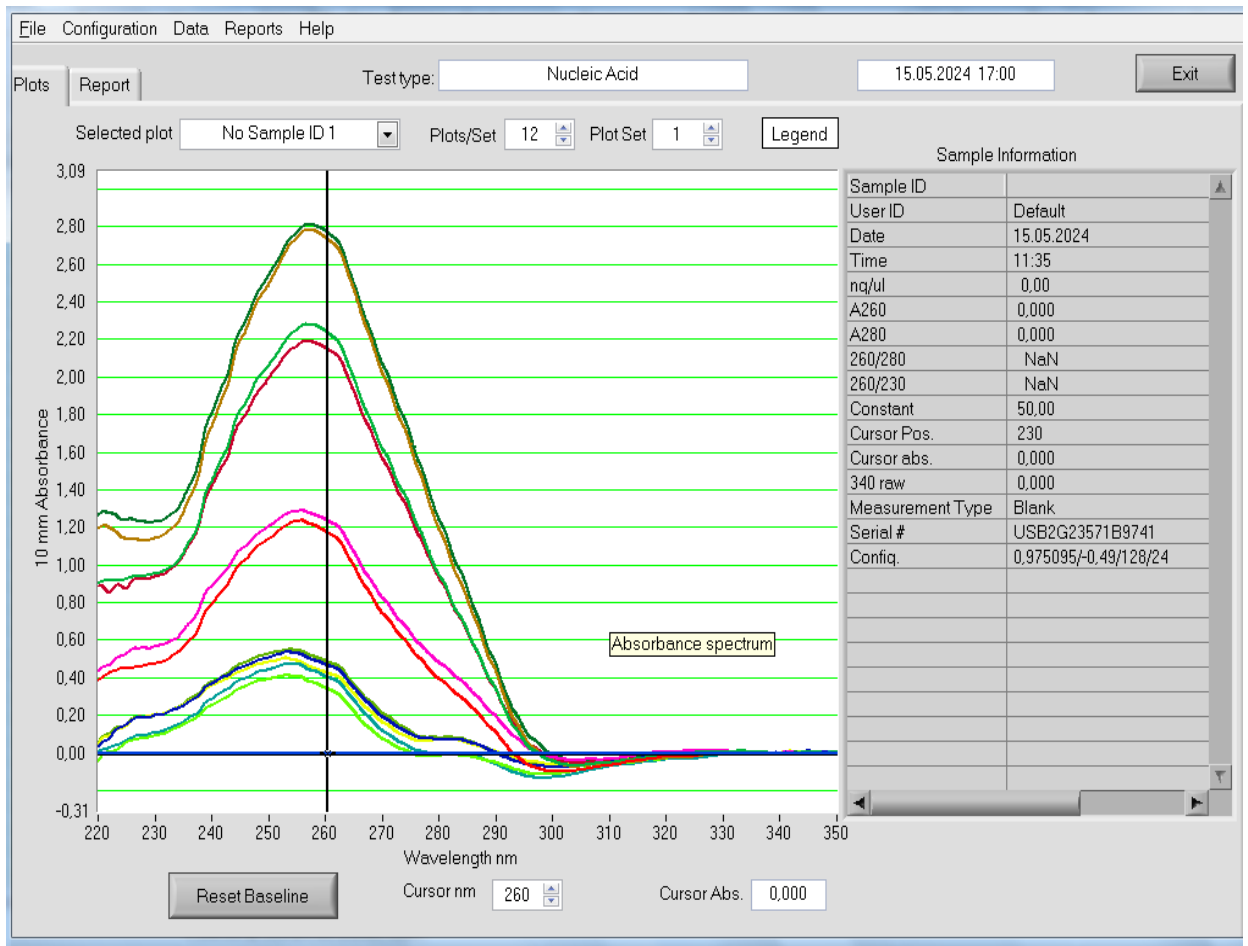


Рис. 3.1 – Спектри поглинання препаратів ДНК

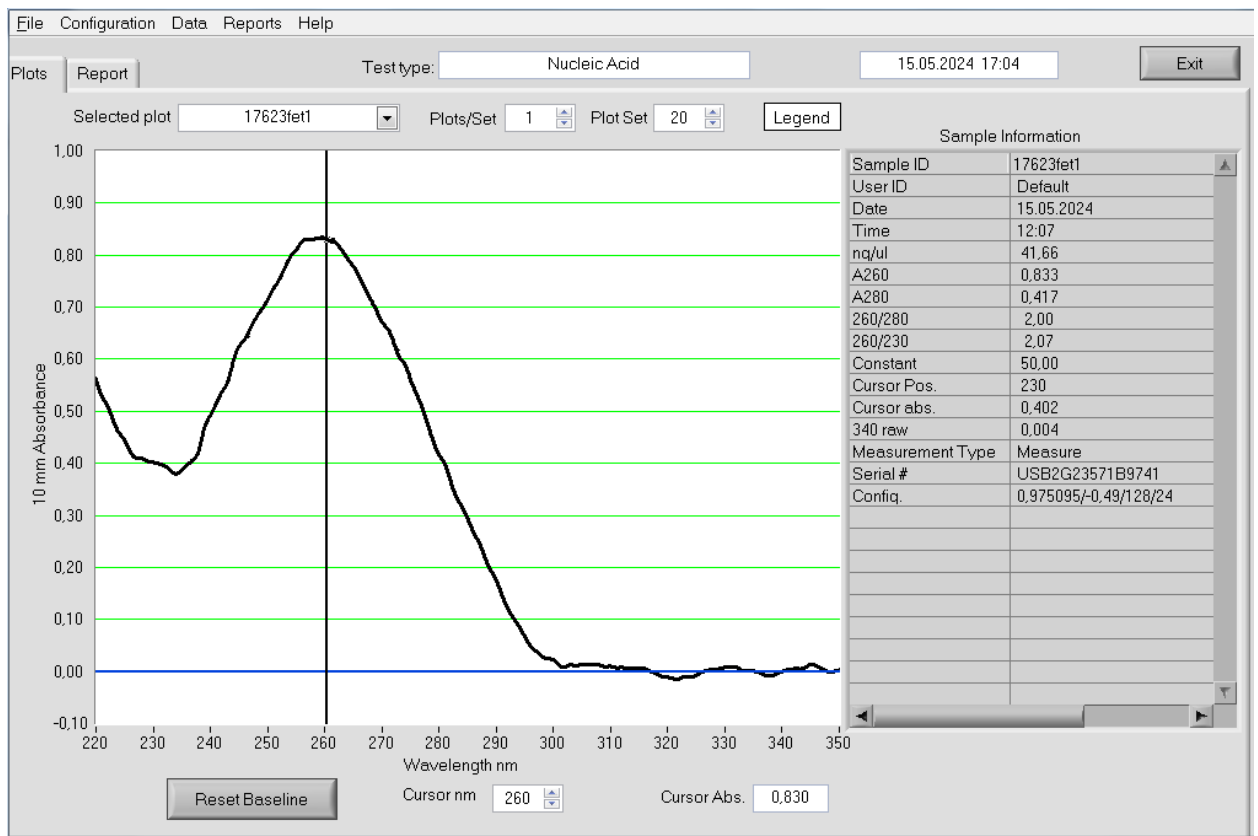


Рис. 3.2 – Спектр поглинання одного з препаратів ДНК

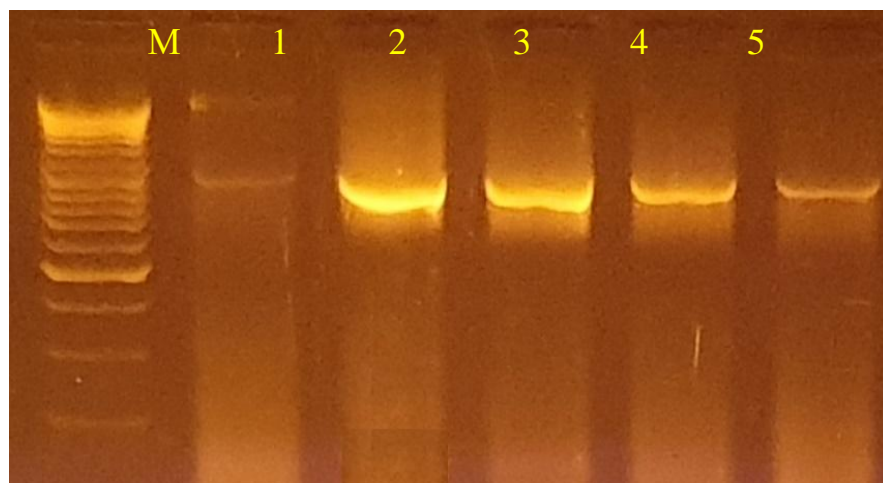


Рис. 3.3 – Електрофореграма зразків ДНК. Позначення: М – маркер молекулярної ваги (Ladder 100 bp), 1-5 – номери доріжок

Встановлено, що зразок 1 на першій доріжці геля (рис. 3.3) зазнав деградації, а решта зразків являють собою цільну повнорозмірну ДНК. Тим не менш, деградований зразок було використано в подальших експериментах, щоб визначити допустиму якість ДНК, придатну для подальшого аналізу, і уникнути використання непридатних зразків у майбутньому.

Спектральні характеристики (концентрація  $C$ , відношення  $X$ , відношення  $Y$ ) зразків ДНК дослідної групи, які отримані різними методами екстракції, наведено в таблицях 3.1-3.3. Скорочення: сер. – середнє значення.

Таблиця 3.1 – Спектральні характеристики зразків ДНК, виділених методом фенол-хлороформної екстракції (ФХЕ)

№	$C$ , нг/мкл	$X$	$Y$	№	$C$ , нг/мкл	$X$	$Y$
1	934.97	1.89	2.33	16	755.95	2.03	2.07
2	315.19	1.83	2.18	17	977.68	2.09	2.30
3	440.14	1.83	2.30	18	250.06	1.85	2.04
4	710.83	1.92	2.32	19	519.71	1.87	2.30
9	450.50	1.87	2.05	20	773.08	1.88	2.22
11	863.10	1.75	2.11	23	948.20	1.76	1.86
12	1948.22	1.89	2.18	24	855.03	1.94	2.07
13	736.00	1.63	1.54	25	436.96	1.85	2.06
14	115.53	1.85	1.55	26	1660.01	1.89	2.15
15	1165.58	1.91	2.13	<b>Сер.</b>	<b>781.93</b>	<b>1.87</b>	<b>2.09</b>

Таблиця 3.2 – Спектральні характеристики зразків ДНК, виділених методом екстракції з осадженням на мікромагнітних носіях (ЕОМН)

№	C, нг/мкл	X	Y	№	C, нг/мкл	X	Y
5	179.05	1.66	0.48	8	88.66	1.88	1.46
6	309.73	1.76	0.76	10	77.43	1.90	0.93
7	656.60	1.81	1.96	<b>Сер.</b>	<b>262.29</b>	<b>1.80</b>	<b>1.12</b>

Таблиця 3.3 – Спектральні характеристики зразків ДНК, виділених методом екстракції з осадженням на колонках з мікрофільтрами (ЕОКМ)

№	C, нг/мкл	X	Y	№	C, нг/мкл	X	Y
21	201.39	1.87	2.23	27	730.31	1.69	1.70
22	292.39	1.86	2.03	28	216.40	1.83	2.20
<b>Сер.</b>	<b>360.12</b>	<b>1.81</b>	<b>2.04</b>				

Середня концентрація виділеної ДНК становила 628.88 нг/мкл, середнє відношення X – 1.85, середнє співвідношення Y – 1.91. Ці співвідношення мають бути близькими до 2, отже, найвищу якість виділеної ДНК дає фенол-хлороформна екстракція (ФХЕ), трохи нижчу – екстракція з осадженням на мікромагнітних носіях (ЕОКМ), найнижчу – екстракція з осадженням на колонках з мікрофільтрами (ЕОМН). Таким чином найбільшу кількість ДНК було отримано при застосуванні фенол-хлороформної екстракції, меншу – при здійсненні екстракції з осадженням на мікромагнітних носіях, ще меншу – при застосуванні екстракція з осадженням на колонках з мікрофільтрами.

*Порівняння методів виділення ДНК.* Згідно отриманих нами даних про якість та кількість ДНК, яка отримана різними методами, а також аналізу токсичності реагентів, ринкової вартості в Україні комерційних наборів для екстракції ДНК та окремих реагентів для ДНК-екстракції, проведено порівняння трьох методів (ФХЕ, ЕОМН та ЕОКМ), результати якого наведені в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4 – Якісні характеристики методів виділення ДНК

Метод	ФХЕ	ЕОМН	ЕОКМ
Вартість	min	mid	max
Тривалість процедури	max	min	mid
Токсичність реагентів	є	нема	нема
Кількість виділеної ДНК	max	min	mid
Чистота виділеної ДНК	max	min	mid

Перевагами ФХЕ є дешевизна, а також вища порівняно з ЕОМН та ЕОКМ кількість і якість виділеної ДНК. Недоліками є більша кількість людино/годин на процедуру, токсичність застосовуваних реагентів (фенолу та хлороформу), а також схильність фенолу до окиснення, що є причиною деградації ДНК.

Перевагою ЕОМН та ЕОКМ порівняно з ФХЕ є відсутність летких токсичних реагентів, а недоліком – менша кількість отриманої ДНК.

ЕОМН є більш дешевим методом, а також не потребує центрифугування зразків на високій швидкості. Недоліком методу ЕОМН є нижча якість виділеної ДНК.

Метод ЕОКМ є дорожчим порівняно з ЕОМН та ФХЕ, але дозволяє отримати високоякісну ДНК без застосування токсичних реагентів.

Таким чином, у всі три методи дають задовільну кількість і якість ДНК (табл. 3.4), а отже, можуть бути застосовані в оптимізованій методиці аналізу Inv22, хоча за співвідношенням ціна/якість можна рекомендувати метод ЕОКМ.

*Метод ферментативного гідролізу для фрагментації ДНК.* Гідроліз ДНК проводили ендонуклеазою рестрикції *VspI*, дотримуючись рекомендацій виробника, за методикою, описаною у Розділі 2.

Ця ендонуклеаза розпізнає та розрізає сайт T<sup>^</sup>GATCA. Найвища активність спостерігається за температури +55°C в G-буфері, що містить BSA [82].

З метою оптимізації такого параметра, як необхідна кількість досліджуваної ДНК для аналізу, було здійснено експеримент з використанням 0,5 мкг, 1,5 мкг та 2 мкг ДНК. А для оптимізації температури витримки зразки витримували в термостаті за температури 50°C або 55°C, оскільки є 55°C оптимальним для

фермента *VspI*, але при тривалій інкубації може призводити для неспецифічної деградації ДНК. Оскільки в попередньому пункті було показано, що всі три методи очищення ДНК є придатними для використання в даному дослідженні, застосовувати можна будь-який з них.

Якість гідролізованої ДНК контролювали шляхом електрофорезу в 1% агарозному гелі. Якщо на доріжках видно яскраву риску і шлейф, зразок є високоякісним. Якщо видно «розмиту» смугу з нечіткими межами, зразок зазнав деградації. Результат гідролізу ДНК ендонуклеазою рестрикції *VspI* показано на рис. 3.4. Видно, що на перших трьох доріжках знаходяться частково гідролізовані зразки ДНК високої якості, а на четвертій – низької (повнорозмірна ДНК відсутня, оскільки зразок зазнав деградації). Молекули повнорозмірної ДНК за час обробки рестриктазою «встигають» гідролізуватися до різного ступеня, що зумовлює утворення різних за довжиною фрагментів ДНК (деякі молекули повнорозмірної ДНК взагалі не встигають гідролізуватися або не мають сайтів впізнання для даної ендонуклеази). Цим зумовлене утворення шлейфів.



Рис. 3.4 – Електрофореграма гідролізованих зразків в 1% агарозному гелі  
Далі продукти гідролізу очищували від ендонуклеази та її буферу згідно методики, наведеної в розділі 2. Очищення від ендонуклеази необхідне, оскільки

вона заважає лігуванню, розрізаючи зшиті кільця та зводячи нанівець дію лігази. Це, у свою чергу, унеможлиблює ПЛР та подальший аналіз, оскільки полімераза «проходить» через місце зшивання. Також необхідність видалення ендонуклеази зумовлена тим, що остання не інактивується навіть за високих температур.

*Метод ферментативного лігування ДНК.* Зшивання ВсII-гідролізованих фрагментів ДНК у кільцеві структури проводили з метою наближення кінців досліджуваної ділянки 22 інтрона гена *F8* (розміром близько 22 т.п.н.) до придатних для ПЛР меж. Для лігазної реакції застосовано T4-лігазу згідно методики описаної в розділі 2. При лігуванні дотримувались рекомендацій виробника.

З метою оптимізації температури й часу лігазної реакції реакційні суміші було витримано за кімнатної температури та за +16°C протягом 2 год та 16 год. Також було перевірено необхідність видалення лігази з метою спрощення методики.

Ліговану ДНК піддано електрофорезу в 1,2% агарозному гелі (рис. 3.5, стор. 39). Якщо на доріжках видно яскраву риску і шлейф, зразок є високоякісним. Якщо видно «розмиту» смугу з нечіткими межами, зразок зазнав деградації.

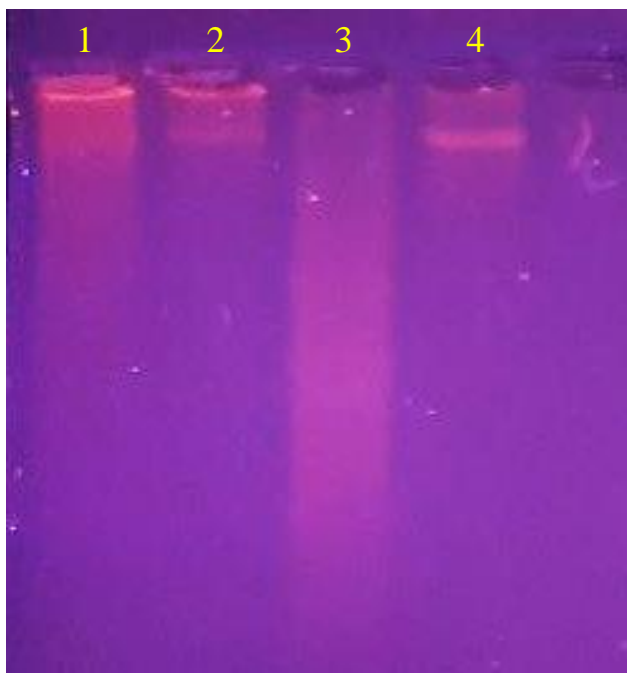


Рис. 3.5 – Електрофорез в 1,2% АГ лігованих фрагментів ДНК

На доріжках 1, 2 і 4 знаходяться ліговані фрагменти високої якості, а на зразок на доріжці 3 – деградований. Такий результат електрофорезу зразку на доріжці 4 (шлейф без смуги повнорозмірної ДНК) свідчить про високий ступінь деградації, що може свідчити про його непридатність для подальшого дослідження (відсутність специфічних для 22 інтрону кільцевих структур ДНК розміром 21-22,5 т.п.н.). Щоб дізнатися, чи має фрагментований зразок специфічну ліговану ДНК-матрицю, його також піддано ампліфікації разом зі зразками високої якості.

*Методи полімеразної ланцюгової реакція (ПЛР) та електрофорезу в агарозному гелі.* Для аналізу можливої геномної реорганізації ділянки гена *F8* (інверсії 22-го інтрона) проведено ПЛР зі специфічними до кінців інверсії олігонуклеотидними праймерами [77] на кільцевих ДНК-матрицях, зшитих лігазою.

Було здійснено оптимізацію температури відпалу праймерів та кількості праймерів. Праймери ID та ED брали у кількості по 10 та 7 нмоль на 1 зразок ДНК. Праймер IU додавали в кількості 15 та 12 нмоль, оскільки цей праймер, згідно методики, є спільним як для нормальної послідовності гена, так і для інвертованої послідовності, тому у гетерозиготних носіїв інверсії він використовується для ПЛР обох алелів гена.

Температуру відпалу праймерів встановлювали рівною +56°C, +58°C та +60°C. Визначено, що оптимальною є температура +58°C, тоді як за нижчої температури утворювались неспецифічні ПЛР-фрагменти, а за вищої температури ефективність ПЛР знижувалась.

Ампліфіковану ДНК піддано електрофорезу в 1,6% агарозному гелі. Напругу в межах 180-220 В підтримували впродовж 20-40 хв. Якщо на доріжках видно яскраву риску і шлейф, зразок є високоякісним. Якщо видно «розмиту» смугу з нечіткими межами, зразок зазнав деградації. Результат електрофорезу ПЛР-фрагментів за оптимальної температури відпалювання праймерів (+58°C) наведено на рис. 3.6.

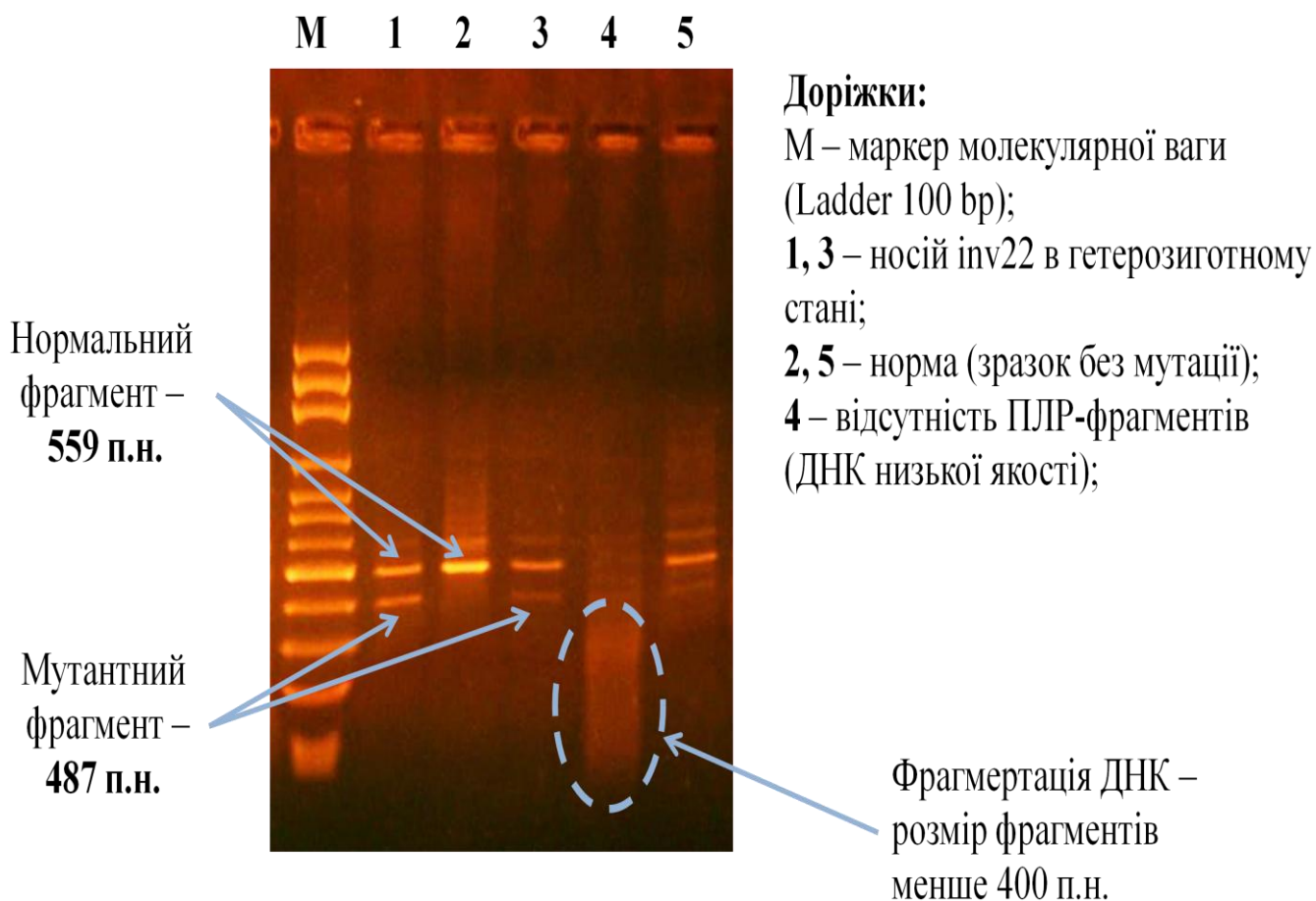


Рис. 3.6 – Електрофореграма специфічних ПЛР-фрагментів Inv22 гена *F8* в 1,6% АГ

Як видно на рисунку, на четвертій доріжці зразок ДНК, який від самого початку був деградований, не утворив специфічну ДНК-матрицю, що призвело до відсутності відповідних ПЛР-продуктів. На доріжках 2 і 5 зразок не містив мутації, а на доріжках 1 і 3 – містив як нормальний, так і інвертований фрагменти, що свідчить, що ці зразки належить гетерозиготним носіям мутації (родички хворого з ГА, який має мутацію в гемізіготному стані).

### 3.3. Параметри оптимізації методики аналізу інверсії 22-го екзона гена *F8*

Підсумовуючи отримані результати, внесено оптимізовані параметри у вихідну методику аналізу (рис. 3.7).



Рис. 3.7 – Оптимізована методика аналізу інверсії 22-го екзона гена *F8*

1. Після лізису клітин виділяти ДНК можна одним з трьох методів: або фенол-хлороформна екстракція, або екстракція ДНК з адсорбцією на мікромагнітних носіях, або екстракція ДНК з адсорбцією на колонках з мікрофільтрами.
2. Визначити концентрацію та чистоту виділеної ДНК шляхом спектрофотометричного аналізу (наприклад, за допомогою спектрофотометра ND-1000, NanoDrop). Мінімальна кількість ДНК становить 1500 нг в 25 розчину.
3. Визначити ступінь цілісності зразків ДНК шляхом електрофорезу в 1% агарозному гелі. Деградовані зразки виключити з подальшого аналізу.
4. Відібрати не менш ніж 1500 нг ДНК та обробити її ендонуклеазою рестрикції *BclI* в кількості 10 одиниць активності на 1000 нг ДНК (в 1x відповідному рестрикційному буфері з 1x BSA).

5. Інкубацію зразків можна проводити протягом 10-16 год у повітряному термостаті за температури +50°C.
6. Гідролізовану ДНК потрібно очистити одним з трьох методів (фенол-хлороформна екстракція, очищення на мікромагнітних носіях або на колонках за допомогою комерційних наборів).
7. Очищену ДНК розчинити у воді для ПЛР.
8. Здійснити електрофорез зразків у 1% агарозному гелі з метою контролю якості. На електрофореграмі має бути видно риску повнорозмірної ДНК, від якої «тягнеться» шлейф. Гідролізовані зразки невідповідної якості виключити з подальшого аналізу.
9. Обробити гідролізовані зразки T4 ДНК-лігазою в кількості 100 одиниць активності та 1000 нг гідролізованої ДНК (в 1x лігазному буфері з 1x BSA).
10. Інкубацію зразків проводити за температури +16°C не менше 2 год.
11. Витримати зразки за температури +65°C протягом 10 хв для денатурації та інактивації лігази, це дозволяє не проводити очищення зразків після лігазної реакції.
12. Здійснити електрофорез зразків у 1,2% агарозному гелі з метою контролю якості. На електрофореграмі має бути видно яскраву риску лігваної ДНК, та шлейфи. Зразки невідповідної якості виключити з аналізу.
13. З кожного зразка приготувати реакційну суміш з ПЛР-буфера (Трис-НСІ 67 мМ (рН 8,8 при 25°C); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 16,7 мМ; ЕДТА 6,7 мкМ; MgCl<sub>2</sub> 2,5 мМ), BSA (170 мкг/мл), dNTP 400 мМ кожного типу, лігваної ДНК-матриці, термостабільної ДНК-полімерази в кількості 0,7 одиниць активності та трьох різних праймерів: по 7 нмоль Pr ID і Pr ED та 12 нмоль Pr IU. Витримати реакційні суміші за наступним температурним режимом, наведеним у табл. 3. 5.

Таблиця 3.5 – Оптимальний режим ПЛР

Температура, °C	95	95	60	72	95	58	72	72
Час, с	180	10	50	50	10	50	50	300
Кількість циклів	1	5			27			1

14. Провести електрофорез ампліфікованих зразків разом з набором маркерів молекулярної маси ДНК у 1,6% агарозному гелі за постійної напруги 180-220 В протягом 20-40 хв.
15. Візуалізувати розділені ПЛР-фрагменти на УФ-трансілюмінаторі. Нормальному фрагменту відповідає смуга 559 п.н., а мутантному – 487 п.н. Якщо поряд зі смугою фрагмента 559 п.н. наявна смуга фрагмента 487 п.н., то пацієнт, в якої взято ДНК, є гетерозиготним носієм інверсії 22 інтрону гена *F8*. Якщо смуга фрагмента 487 п.н. відсутня, людина не є носієм досліджуваної мутації.

## **4. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ДОВКІЛЛЯ**

Положення охорони праці були основані на Державних санітарних правилах та нормах, гігієнічних нормативах, правилах влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю ДСП 9.9.5.-080-02.

### **4.1 Загальні положення**

4.1.1 До роботи в лабораторії особи допускаються тільки після проходження інструктажу з охорони праці. Відмітка по завершенню оформлюється у спеціальному журналі. По проходженню інструктажу, персонал повинен бути навчений безпечним методам та прийомам роботи, пройти стажування на робочому місці та перевірку знань вимог охорони праці

4.1.2 Для допуску до роботи працівники повинні мати спеціальний одяг.

4.1.3 Під час роботи працівники повинні:

- Використовувати обладнання тільки за призначенням;
- Знати правила користування та перевірки обладнання;
- Вміти користуватися первинними засобами пожежогасіння;
- Слідкувати за заземленням електроприладів;
- Тримати робоче місце в чистоті;
- Не працювати з невідомими речовинами;
- Дотримуватися правил внутрішнього розпорядку і режиму праці.

4.1.4 Заборонено приносити, зберігати та підігрівати їжу в лабораторії.

4.1.5 У разі несправності обладнання або засобів захисту, працівники повинні негайно повідомити керівника.

### **4.2 Вимоги безпеки для початку роботи**

- Привести в порядок спецодяг і засоби захисту.
- Перевірити роботу вентиляції та витяжних шаф.
- Оглянути робоче місце, необхідно прибрати все, що не є потрібним під час роботи, та може заважати її безпечному проведенню, проходи звільнити та тримати вільними.

- Переконайтесь у достатності освітленості робочого місця.

- Порядок розміщення апаратури та обладнання повинен відповідати етапам проведення лабораторних робіт та забезпечувати безпеку під час роботи з матеріалами, заготовками, напівфабрикатами, а також можливість технічного обслуговування виробничого обладнання.

- Поверхні робочих столів і витяжних шаф, що призначені для роботи з використанням нагрівальних приладів, а також легкозаймистими чи вибухонебезпечними речовинами, повинні бути повністю вкриті негорючим матеріалом, а при роботі з кислотами і лугами - антикорозійним та мати бортики з незаймистого матеріалу.

- Електроприлади мають бути заземлені за допомогою стандартного заземлення. Справність електроприладів, що працюють цілодобово, повинна перевірятися щодня, а періодично, що працюють, - один раз на два місяці.

- Електроплитки із закритою спіраллю, муфельні печі та інші нагрівальні прилади необхідно встановлювати на негорючі теплоізоляційні матеріали.

- При роботі з кислотами, лугами, маслами, розчинами солей слід вживати особливих запобіжних заходів з метою виключення їх потрапляння на електроприлади.

- Переконалися у наявності та справності первинних засобів пожежогасіння, а також комплектності аптечки.

- Про всі зауваження та порушення виявлених перед початком роботи повідомити свого безпосереднього керівника для вжиття заходів щодо їх усунення.

### **4.3 Вимоги безпеки під час роботи**

#### *4.3.1 Загальні вимоги безпеки:*

- Працюючи з реактивами у витяжній шафі, не засувати голову всередину та не працювати наодинці. Не загромождувати проходи і точки доступу до засобів пожежогасіння.

- Під час збовтування розчинів у колбах або пробірках закривати їх притертими пробками.

- Заборонено нахилитися над ємностями з нагрітими рідинами, їдкими та отруйними речовинами.
- Оцінюючи хімічну речовину за запахом, тримати ємність на відстані і злегка поворухнути рукою, щоб направити пари до себе.
- Для приготування розчину сірчаної кислоти вливайте кислоту у воду тонкою цівкою, постійно перемішуючи. Забороняється наливати воду в кислоту.
- Заповнювати ємність розчином не більше ніж на 3/4 об'єму для кип'ятіння.
- Отруйні речовини розтирати в закритій ступці у витяжній шафі.
- Якщо хімічні речовини пролилися на підлогу або стіл, їх треба негайно знешкодити і видалити, використовуючи засоби індивідуального захисту. Небезпечні речовини слід засипати тирсою або піском, зібрати і знешкодити. Поверхні опісля оброблюються хлорним вапном, яке змивається водою. Для нейтралізації сильно летючих кислот, як азотної, використовувати фільтруючі респіратори.
- Використані фільтри та папір з токсичними речовинами слід зберігати в закритому контейнері для утилізації.
- Заборонено зливати хімічні відходи і органічні розчинники в каналізацію. Їх слід збирати в спеціальні контейнери, нейтралізувати і утилізувати.
- Для перегонки чи нагрівання легкозаймистих речовини що мають низькі температури кипіння, використовується спеціальний жаростійкий посуд та процес проводиться на водяній чи піщаній бані або на закритих електричних плитах.
- Під час роботи з легкозаймистими матеріалами або ввімкненими електроплитами заборонено стояти спиною до плити або біля витяжної шафи.
- Використовуйте термостійкий або керамічний посуд для поглинання тепла під час змішування або розчинення хімікатів.

#### *4.3.2 Вимоги охорони праці під час роботи зі скляним посудом.*

- Під час складання устаткування зі скляних хімічних ємностей використовувати гнучкі з'єднання та прокладки.
- Заборонено нагрівати хімічний посуд із звичайного скла відкритим вогнем.
- Для перемішування розчину скляною паличкою, спочатку необхідно надягти на її кінчик гумову або армовану тефлонову трубку.
- Розчини лугів і концентрованих кислот заборонено зберігати у тонкостінній скляній тарі.
- Для насадження гумової трубки на скляну трубку або стрижень, необхідно змочити кінець трубки водою, гліцерином або вазеліном, та одягти використовуючи рушник.
- Перед тим як відправити посуд, що містив хімічні речовини на мийку, необхідно видалити всі залишки.

#### **4.4 Вимоги безпеки після виконання роботи**

- Перед закінченням роботи в лабораторії вимкнути витяжну вентиляцію та опустити стулки витяжних шаф, відключити електроустаткування, закрити газові та водопровідні крани.
- Після закінчення роботи з біологічним матеріалом персонал зобов'язаний:
  - всі біоматеріали прибрати до сховищ (холодильники, термостати, шафи тощо);
  - використане скло, піпетки, шпателі занурити на одну добу в банки з дезінфікуючим розчином, потім промити і прокип'ятити;
  - поверхні робочих столів обробити дезінфікуючим розчином та вимити теплою водою з милом;
- Наприкінці робочого дня вологе прибирання всіх приміщень лабораторії.
- Про всі порушення вимог охорони праці, виявлених під час роботи, повідомити свого безпосереднього керівника.

## **4.5. Правила поведження під час аварійних ситуаціях**

### *4.5.1. Можливі аварійні ситуації:*

- виникнення пожежі або вибуху;
- ураження електричним струмом;
- потрапляння лугу чи кислоти в очі або на шкіру;
- витік їдких, отруйних, вогне- та вибухонебезпечних речовин.

### *4.5.2 У разі аварійної ситуації працівник лабораторії повинен:*

- негайно припинити роботу;
- відключити з електромережі усі прилади та обладнання;
- у разі необхідності, відокремити небезпечне місце;
- негайно повідомити завідувача лабораторії або його заступника.

4.5.3 Працівники лабораторії, які перебувають поблизу, повинні по сигналу тривоги, підійти і взяти участь у наданні першої допомоги потерпілому або в ліквідації аварійної ситуації.

### *4.5.4. У разі пожежі або загоряння займистої речовини:*

- визначити точне місце пожежі;
- негайно повідомити завідувача лабораторії або його заступника;
- перекрити вентиляцію, знеструмити приміщення, перекрити загальну газову арматуру;
- розпочати пожежогасіння та евакуювати ємності з горючими та вибухонебезпечними речовинами.

### *4.5.5 Для гасіння пожеж використовувати:*

- для займистих рідин, що змішуються з водою: будь-які вогнегасники, струмінь води, пісок, азбестове або брезентове покривало;
- для займистих рідин, що не змішуються з водою: вуглекислотні або порошкові вогнегасники, пісок, накрити азбестовими або брезентовими покривала (починаючи з периферії);
- для електроустановок під напругою: тільки вуглекислотні або порошкові вогнегасники. Під час користування не слід братися рукою за розтруб вогнегасника.

4.5.6 Користуючись пінними, вуглекислотними чи порошковими вогнегасниками, не направляти струмінь на людей. У разі попадання піни на незахищені ділянки тіла, її можна витерти тканиною чи змити за допомогою водного розчину харчової соди.

4.5.7 Якщо приміщення обладнане внутрішніми пожежними кранами, до гасіння пожежі слід залучати двох людей: один котить шланг від крана до місця пожежі, інший відкриває кран за командою.

4.5.8 Якщо на працівнику загорівся одяг, його необхідно загасити якнайшвидше. Запалений одяг слід негайно зняти, розірвати або загасити водою. На палаючий одяг можна накинути щільну тканину, ковдру або брезент і зняти після гасіння полум'я [75].

#### **4.6. Виконання лабораторних робіт студентами.**

До виконання лабораторних робіт із генетичним матеріалом студенти допускаються за виконання наступних умов [83]:

- проходження інструктажу;
- вивчення правил техніки безпеки;
- вивчення протипожежних правил;
- перевірка освоєння правил;
- відповідне оформлення допуску до роботи в спеціальному журналі.

За недотримання вимог техніки безпеки студенти несуть особисту відповідальність.

Наведено такі основні вимоги.

1. Виконання лабораторних робіт здійснюється суворо за методикою і порядком проведення роботи. «Відхилення від методики можливе тільки з дозволу та під керівництвом викладача» [83].

2. Виконання лабораторних робіт можливе тільки за наявності захисного одягу – халату.

3. Ручне подрібнення твердих речовин здійснюють у захисних окулярах з оправою, що щільно прилягає до обличчя.

4. Виконання робіт з генетичним матеріалом здійснюють в одноразових рукавичках.

5. Усі роботи із застосуванням отруйних речовин проводять у витяжній шафі. Роботу слід негайно припинити, якщо вентиляція раптово припинила працювати. Засовувати голову всередину шафи з метою з'ясування причин неполадок – недопустимо.

6. В лабораторії обов'язково мають бути аптечка та перев'язувальні матеріали.

7. «Для роботи можна використовувати тільки реактиви, які знаходяться в хімічному посуді, на яких є етикетки з назвами реактивів» [83]. Лабораторний посуд з будь-якими реактивами або рідинами всередині необхідно маркувати спеціальним олівцем по склу під час виконання роботи.

8. Відбирати реактиви дозволено тільки піпеткою з гумовою грушею або автоматичною піпеткою.

9. Куштувати хімічні речовини на смак заборонено. Визначати їх запах можна, тільки направляючи до себе пари або газу рухом руки. Визначати хімічні речовини за смаком або запахом недопустимо.

10. Залишки концентрованих кислот та лугів, розчинників та інших їдких рідин зливають в каналізацію тільки після нейтралізації та знешкодження.

11. Необхідно уникати потрапляння реактивів на одяг, руки, лабораторні столи та інші об'єкти. У разі потрапляння токсичних або агресивних речовин на одяг його необхідно терміново зняти і, не виходячи з лабораторії, попрайти.

12. Переливати хімічні речовини з великих ємкостей в малі треба за допомогою гумової груші, сифону, лійки. Всі операції з їдкими та отруйними речовинами необхідно проводити під увімкненою витяжною шафою.

13. Правила поведінки у разі опіків:

- у випадку термічного опіку обпечене місце після обробки водою промити розчином етилового спирту та обробити маззю від опіків;

- «у разі незначного опіку шкіри кислотою або лугом постраждале місце негайно промивають великою кількістю проточної водопровідної води протягом 10-30 хв» [83];
- після обробки водою обпечене місце у разі кислотного опіку промивають 5%-м розчином питної соди, а у разі лужного опіку – 5%-м розчином оцтової кислоти.

14. У випадку отруєння газами або парами необхідно винести потерпілого на свіже повітря.

15. У разі потрапляння отрути всередину слід викликати блювання та дати потерпілому протиотруту. За необхідності – зробити штучне дихання. У разі отруєння хлором штучне дихання протипоказано.

16. У випадку порізу рану треба обробити розчином пероксиду водню або йоду.

17. Під час роботи з електроприладами необхідно суворо дотримуватись інструкції до приладу. «Всі кабелі і проводи мають бути ізольовані» [83]. Слід перевірити технічний стан приладу перед його увімкненням. У разі виявлення дефектів їх необхідно усунути до увімкнення приладу. Заборонено переносити чи ремонтувати обладнання, яке знаходиться під напругою. Неприпустимо працювати з електроприладами, якщо передню або задню кришку знято.

18. Необхідно суворо дотримуватись правил протипожежної безпеки. Неприпустимо залишати увімкнені прилади без нагляду.

19. «Заборонено працювати з легкозаймистими речовинами, які знаходяться близько до відкритих електронагрівальних пристроїв» [83].

20. В лабораторії необхідно підтримувати чистоту. Неприпустимо обмежувати проходи, виходи з лабораторії, підходи до протипожежного обладнання.

21. На робочі столи заборонено класти одяг та їжу. Також заборонено захаращувати столи посудом, банками з реактивами, піпетками, витратним матеріалом. «У разі розбиття посуду та пролиття його вмісту все має бути негайно прибрано» [83].

22. Вживати їжу в лабораторних приміщеннях категорично заборонено.

23. Після закінчення роботи необхідно: вимкнути всі електроприлади, ретельно вимити використаний посуд, прибрати робоче місце, вимити риуки з милом, закрити водопровідні крани [83].

## ВИСНОВКИ

1. Оптимізація параметрів ДНК-діагностики гемофілії А, спричиненої інверсією 22-го інтрона гена *F8*, робить швидкою та доступною методику тестування носійства гемофілії та для жінок, в родині яких є випадки гемофілії А.

2. Визначено, що інвертована полімеразна ланцюгова реакція (IS-PCR), при якій наявність мутантної *Inv22* (20,0 тис.п.н.) або її відсутність (21,5 тис.п.н.) призводить до зміни взаємного розташування сайтів ендонуклеази рестрикції і до зміни довжини фрагментів гену.

3. Найвищу якість виділеної ДНК дає застосування фенол-хлороформної екстракції у порівнянні із екстракцією з осадженням на мікромагнітних носіях та з осадженням на колонках з мікрофільтрами, що є та оптимальним найдешевшим праймером при проведенні ПЛР.

4. Спектральні виміри відношення значень оптичної щільності концентрації ДНК при 260 нм та при 280 нм і 230 нм, мають вкладатися в оптимальні рамки від 1,8 до 2,0, що визначають чистоту препарату ДНК по відношенню до білків.

5. Показано, що оптимальною температурою при ДНК-діагностиці гемофілії А, є витримка зразків у термостаті за температури 50°C - 55°C, яка є оптимальною для фермента *VcII*, який розпізнає та розрізає сайт T<sup>^</sup>GATCA.

## ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. 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: 13.06.2024).
2. Cohen A. J., Kessler C. M. 9 Acquired inhibitors. *Baillière's Clinical Haematology*. 1996. Vol. 9, no. 2. P. 331–354. URL: [https://doi.org/10.1016/s0950-3536\(96\)80067-9](https://doi.org/10.1016/s0950-3536(96)80067-9) (date of access: 13.06.2024).
3. Collins P. W. Management of acquired haemophilia A. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011. Vol. 9. P. 226–235. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04309.x> (date of access: 13.06.2024).
4. Acquired Haemophilia: Review and Meta-Analysis Focused on Therapy and Prognostic Factors / J. Delgado et al. *British Journal of Haematology*. 2003. Vol. 121, no. 1. P. 21–35. URL: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04162.x> (date of access: 13.06.2024).
5. Hay C. R. M. 1 Acquired haemophilia. *Baillière's Clinical Haematology*. 1998. Vol. 11, no. 2. P. 287–303. URL: [https://doi.org/10.1016/s0950-3536\(98\)80049-8](https://doi.org/10.1016/s0950-3536(98)80049-8) (date of access: 13.06.2024).
6. Toschi V., Baudo F. Diagnosis, laboratory aspects and management of acquired hemophilia A. *Internal and Emergency Medicine*. 2010. Vol. 5, no. 4. P. 325–333. URL: <https://doi.org/10.1007/s11739-010-0380-y> (date of access: 13.06.2024).
7. Consensus recommendations for the diagnosis and treatment of acquired hemophilia A / P. Collins et al. *BMC Research Notes*. 2010. Vol. 3, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-161> (date of access: 13.06.2024).
8. 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).
9. Haemophilia / E. Berntorp et al. *Nature Reviews Disease Primers*. 2021. Vol. 7, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00278-x> (date of access: 13.06.2024).

10. Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH / V. S. Blanchette et al. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014. Vol. 12, no. 11. P. 1935–1939. URL: <https://doi.org/10.1111/jth.12672> (date of access: 13.06.2024).
11. 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: 13.06.2024).
12. Biggs R., Macfarlane R. G. Haemophilia and Related Conditions: A Survey of 187 Cases. *British Journal of Haematology*. 1958. Vol. 4, no. 1. P. 1–27. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1958.tb03830.x> (date of access: 13.06.2024).
13. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis / G. C. White 2nd et al. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2001. Vol. 85, no. 3. P. 560.
14. Comparing bleed frequency and factor concentrate use between haemophilia A and B patients / K. Nagel et al. *Haemophilia*. 2011. Vol. 17, no. 6. P. 872–874. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2011.02506.x> (date of access: 13.06.2024).
15. Validation of a composite score for clinical severity of hemophilia / S. Schulman et al. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2008. Vol. 6, no. 7. P. 1113–1121. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03001.x> (date of access: 13.06.2024).
16. The frequency of joint hemorrhages and procedures in nonsevere hemophilia A vs B / J. M. Soucie et al. *Blood Advances*. 2018. Vol. 2, no. 16. P. 2136–2144. URL: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018020552> (date of access: 13.06.2024).
17. Comparison of the rates of joint arthroplasty in patients with severe factor VIII and IX deficiency: an index of different clinical severity of the 2 coagulation disorders / G. Tagariello et al. *Blood*. 2009. Vol. 114, no. 4. P. 779–784. URL: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-195313> (date of access: 13.06.2024).
18. 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: 13.06.2024).

19. 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: 13.06.2024).
20. 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: 13.06.2024).
21. Management of haemophilia in the developing world / C. A. Lee et al. *Haemophilia*. 1998. Vol. 4, no. 4. P. 474–480. URL: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.1998.440474.x> (date of access: 13.06.2024).
22. Nathwani A. C., Tuddenham E. G. D. Epidemiology of coagulation disorders. *Baillière's Clinical Haematology*. 1992. Vol. 5, no. 2. P. 383–439. URL: [https://doi.org/10.1016/s0950-3536\(11\)80025-9](https://doi.org/10.1016/s0950-3536(11)80025-9) (date of access: 13.06.2024).
23. Unsolved problems in haemophilia / C. A. Lee et al. *Haemophilia*. 1998. Vol. 4, no. 4. P. 341–345. URL: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.1998.440341.x> (date of access: 13.06.2024).
24. Evatt B. L. The natural evolution of haemophilia care: developing and sustaining comprehensive care globally. *Haemophilia*. 2006. Vol. 12, s3. P. 13–21. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2006.01256.x> (date of access: 13.06.2024).
25. Skinner M. W. Treatment for all: a vision for the future. *Haemophilia*. 2006. Vol. 12, s3. P. 169–173. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2006.01280.x> (date of access: 13.06.2024).
26. Changes in the life expectancy of patients with severe haemophilia A in Finland in 1930-79 / E. Ikkala et al. *British Journal of Haematology*. 1982. Vol. 52, no. 1. P. 7–12. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1982.tb03856.x> (date of access: 13.06.2024).
27. Larsson S. A. Life expectancy of Swedish haemophiliacs, 1831–1980. *British Journal of Haematology*. 1985. Vol. 59, no. 4. P. 593–602. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1985.tb07353.x> (date of access: 13.06.2024).
28. Women and girls with haemophilia and bleeding tendencies: Outcomes related to menstruation, pregnancy, surgery and other bleeding episodes from a

retrospective chart review / A. Chaudhury et al. *Haemophilia*. 2020. URL: <https://doi.org/10.1111/hae.14232> (date of access: 13.06.2024).

29. Severe and moderate haemophilia A and B in US females / D. M. Di Michele et al. *Haemophilia*. 2014. Vol. 20, no. 2. P. e136-e143. URL: <https://doi.org/10.1111/hae.12364> (date of access: 13.06.2024).

30. Hermans C., Kulkarni R. Women with bleeding disorders. *Haemophilia*. 2018. Vol. 24. P. 29–36. URL: <https://doi.org/10.1111/hae.13502> (date of access: 13.06.2024).

31. Prevalence of symptoms in hemophilia carriers in comparison with the general population: a systematic review / A. B. Hirayama et al. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*. 2019. Vol. 41, no. 4. P. 349–355. URL: <https://doi.org/10.1016/j.htct.2019.02.006> (date of access: 13.06.2024).

32. Bleeding in carriers of hemophilia / I. Plug et al. *Blood*. 2006. Vol. 108, no. 1. P. 52–56. URL: <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3879> (date of access: 12.06.2024).

33. Female haemophiliac homozygous for the factor VIII intron 22 inversion mutation, with transcriptional inactivation of one of the factor VIII alleles / D. David et al. *Haemophilia*. 2003. Vol. 9, no. 1. P. 125–130. URL: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.2003.00704.x> (date of access: 12.06.2024).

34. Unbalanced X-chromosome inactivation with a novel FVIII gene mutation resulting in severe hemophilia A in a female / R. Favier et al. *Blood*. 2000. Vol. 96, no. 13. P. 4373–4375. URL: <https://doi.org/10.1182/blood.v96.13.4373> (date of access: 12.06.2024).

35. Skewed X chromosome inactivation in fraternal female twins results in moderately severe and mild haemophilia B / K. Okumura et al. *Haemophilia*. 2008. Vol. 14, no. 5. P. 1088–1093. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2008.01786.x> (date of access: 12.06.2024).

36. Deletion of the factor IX gene as a result of translocation t(X;1) in a girl affected by haemophilia B / A. C. V. Krepischi-Santos et al. *British Journal of*

*Haematology*. 2001. Vol. 113, no. 3. P. 616–620. URL: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.02786.x> (date of access: 12.06.2024).

37. Heritable skewed X-chromosome inactivation leads to haemophilia A expression in heterozygous females / N. K. Renault et al. *European Journal of Human Genetics*. 2007. Vol. 15, no. 6. P. 628–637. URL: <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201799> (date of access: 12.06.2024).

38. Female hemophilia A heterozygous for a de novo frameshift and a novel missense mutation of factor VIII / X. H. Cai et al. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006. Vol. 4, no. 9. P. 1969–1974. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02105.x> (date of access: 12.06.2024).

39. Clotting factor level is not a good predictor of bleeding in carriers of haemophilia A and B / A. Olsson et al. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2014. Vol. 25, no. 5. P. 471–475. URL: <https://doi.org/10.1097/mbc.0000000000000083> (date of access: 12.06.2024).

40. A cross-sectional study of bleeding phenotype in haemophilia A carriers / A. Paroskie et al. *British Journal of Haematology*. 2015. Vol. 170, no. 2. P. 223–228. URL: <https://doi.org/10.1111/bjh.13423> (date of access: 12.06.2024).

41. Both Hemophilia Health Care Providers and Hemophilia A Carriers Report That Carriers Have Excessive Bleeding / A. Paroskie et al. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 2014. Vol. 36, no. 4. P. e224-e230. URL: <https://doi.org/10.1097/mpg.0000000000000022> (date of access: 12.06.2024).

42. Females with FVIII and FIX deficiency have reduced joint range of motion / R. F. Sidonio et al. *American Journal of Hematology*. 2014. Vol. 89, no. 8. P. 831–836. URL: <https://doi.org/10.1002/ajh.23754> (date of access: 12.06.2024).

43. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition / A. Srivastava et al. *Haemophilia*. 2020. Vol. 26, S6. P. 1–158. URL: <https://doi.org/10.1111/hae.14046> (date of access: 12.06.2024).

44. Pregnancy complications and obstetric care in women with inherited bleeding disorders / R. A. Kadir et al. *Haemophilia*. 2013. Vol. 19. P. 1–10. URL: <https://doi.org/10.1111/hae.12269> (date of access: 12.06.2024).

45. Kulkarni R. Improving care and treatment options for women and girls with bleeding disorders. *European Journal of Haematology*. 2015. Vol. 95. P. 2–10. URL: <https://doi.org/10.1111/ejh.12580> (date of access: 12.06.2024).
46. Harris N., Winter W., Ledford-Kraemer M. Assessment of hemostasis in the clinical laboratory / ed. by W. Clarke, R. D. Dufour. Washington DC : Contemporary Practice in Clinical Chemistry, AACC Press, 2006.
47. Harris N., Winter W., Ledford-Kraemer M. Hemostasis: a review and methods of assessment in the clinical laboratory / ed. by W. Clarke. Washington DC : Contemporary Practice in Clinical Chemistry, AACC Press, 2011.
48. Harris N., We W. Hemostasis: a review and methods of assessment in the clinical laboratory / ed. by W. Clarke. Washington DC : Contemporary Practice in Clinical Chemistry, AACC Press, 2016.
49. Clinical biochemistry and their roles as plasma enzymes / W. E. Winter et al. *Advances in Clinical Chemistry*. 2019. Vol. 2020, no. 94. P. 31–84. URL: <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2019.07.008> (date of access: 08.04.2024).
50. Winter W. E., Flax S. D., Harris N. S. Coagulation Testing in the Core Laboratory. *Laboratory Medicine*. 2017. Vol. 48, no. 4. P. 295–313. URL: <https://doi.org/10.1093/labmed/lmx050> (date of access: 12.06.2024).
51. 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: 12.06.2024).
52. Complete nucleotide sequences of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B) / S. Yoshitake et al. *Biochemistry*. 1985. Vol. 24, no. 14. P. 3736–3750. URL: <https://doi.org/10.1021/bi00335a049> (date of access: 12.06.2024).
53. 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: 12.06.2024).
54. UniProt. *UniProt*. URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P08709> (date of access: 12.03.2024).

55. Lenting P. J., van Mourik J. A., Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood*. 1998. Vol. 92, no. 11. P. 3983–3996. URL: <https://doi.org/10.1182/blood.v92.11.3983> (date of access: 08.04.2024).
56. Lenting P. J., Christophe O. D., Guéguen P. The disappearing act of factor VIII. *Haemophilia*. 2008. Vol. 16, no. 102. P. 6–15. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2008.01864.x> (date of access: 12.06.2024).
57. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII / B. W. Shen et al. *Blood*. 2008. Vol. 111, no. 3. P. 1240–1247. URL: <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-109918> (date of access: 12.06.2024).
58. The mechanism underlying activation of factor IX by factor XIa / D. Gailani et al. *Thrombosis Research*. 2014. Vol. 133. P. S48–S51. URL: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.03.020> (date of access: 12.06.2024).
59. Schmidt A. Structure–Function Relationships in Factor IX and Factor IXa. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2003. Vol. 13, no. 1. P. 39–45. URL: [https://doi.org/10.1016/s1050-1738\(02\)00210-4](https://doi.org/10.1016/s1050-1738(02)00210-4) (date of access: 12.06.2024).
60. Zögg T., Brandstetter H. Activation mechanisms of coagulation factor IX. *Biological Chemistry*. 2009. Vol. 390, no. 5/6. URL: <https://doi.org/10.1515/bc.2009.057> (date of access: 12.06.2024).
61. EAHAD Factor VIII Variant Database. EAHAD Factor VIII Variant Database. URL: <https://f8-db.eahad.org/> (date of access: 03.05.2024).
62. Severe hemophilia with mild bleeding phenotype: molecular characterization and global coagulation profile / E. Santagostino et al. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010. Vol. 8, no. 4. P. 737–743. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03767.x> (date of access: 12.06.2024).
63. Molecular genotyping of the Italian cohort of patients with hemophilia B / D. Belvini et al. *Haematologica*. 2005. Vol. 90, no. 5. P. 635–42. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15921378/> (date of access: 08.04.2024).
64. 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: 12.06.2024).

65. Factor VIII gene explains all cases of haemophilia A / J. A. Naylor et al. *The Lancet*. 1992. Vol. 340, no. 8827. P. 1066–1067. URL: [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)93080-7](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)93080-7) (date of access: 12.06.2024).

66. Analysis of factor VIII mRNA reveals defects in everyone of 28 haemophilia A patients / J. A. Naylor et al. *Human Molecular Genetics*. 1993. Vol. 2, no. 1. P. 11–17. URL: <https://doi.org/10.1093/hmg/2.1.11> (date of access: 12.06.2024).

67. A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene / B. Levinson et al. *Genomics*. 1990. Vol. 7, no. 1. P. 1–11. URL: [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(90\)90512-s](https://doi.org/10.1016/0888-7543(90)90512-s) (date of access: 12.06.2024).

68. Evidence for a third transcript from the human factor VIII gene / B. Levinson et al. *Genomics*. 1992. Vol. 14, no. 3. P. 585–589. URL: [https://doi.org/10.1016/s0888-7543\(05\)80155-7](https://doi.org/10.1016/s0888-7543(05)80155-7) (date of access: 12.06.2024).

69. 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: 12.06.2024).

70. 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: 12.06.2024).

71. Cooper D. N., Krawczak M. Human gene mutation. Oxford : Bios Scientific, 1993.

72. Factor VIII mutation spectrum in haemophilia A patients in the population of Henan, China / N. Bai et al. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2017. Vol. 28, no. 7. P. 509–513. URL: <https://doi.org/10.1097/mbc.0000000000000628> (date of access: 12.06.2024).

73. Mutation analysis of factor VIII in Korean patients with severe hemophilia A / C.-W. You et al. *International Journal of Hematology*. 2010. Vol. 91, no. 5. P. 784–791. URL: <https://doi.org/10.1007/s12185-010-0593-x> (date of access: 12.06.2024).

74. Factor VIII inhibitor development in Egyptian hemophilia patients: does intron 22 inversion mutation play a role? / L. M. Sherief et al. *Italian Journal of Pediatrics*. 2020. Vol. 46, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13052-020-00878-5> (date of access: 12.06.2024).

75. Endogenous factor VIII synthesis from the intron 22–inverted *F8* locus may modulate the immunogenicity of replacement therapy for hemophilia A / G. S. Pandey et al. *Nature Medicine*. 2013. Vol. 19, no. 10. P. 1318–1324. URL: <https://doi.org/10.1038/nm.3270> (date of access: 12.06.2024).

80 (76). Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene / L. C. Rossetti et al. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2008. Vol. 6, no. 5. P. 830–836. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.02926.x> (date of access: 13.06.2024).

77. Genotyping of intron 22 inversion of factor VIII gene for diagnosis of hemophilia A by inverse-shifting polymerase chain reaction and capillary electrophoresis / T.-Y. Pan et al. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014. Vol. 406, no. 22. P. 5447–5454. URL: <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7969-3> (date of access: 15.05.2024).

78. Liu Q., Nozari G., Sommer S. S. Single-Tube Polymerase Chain Reaction for Rapid Diagnosis of the Inversion Hotspot of Mutation in Hemophilia A. *Blood*. 1998. Vol. 92, no. 4. P. 1458–1459. URL: <https://doi.org/10.1182/blood.v92.4.1458> (date of access: 13.06.2024).

79. Barnes W. M. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994. Vol. 91, no. 6. P. 2216–2220. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.91.6.2216> (date of access: 13.06.2024).

80. Brown T. Southern Blotting. *Current Protocols in Immunology*. 1993. Vol. 6, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1006as06> (date of access: 13.06.2024).

81. Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y : Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

82. BclI (10 U/ $\mu$ L). Thermo Fisher Scientific - DE. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER0721> (дата звернення: 26.05.2024).

83. Основи молекулярної біології-1. Молекулярна біологія ДНК: Лабораторний практикум [Електронний ресурс] : навч. посіб. для студ. спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / А. І. Степаненко, О. Р. Лахнеко, Л. В. Маринченко, М. О. Банникова ; КПІ ім. Ігоря Сікорського, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії. – Електронні текстові дані (1 файл: 0,79 Мбайт). – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2021. – 70 с.