

## НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ ГЕМОФИЛИИ А И ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ

*Работа суммирует трехлетний опыт молекулярной диагностики гемофилии А при помощи ПДРФ-анализа и полимеразной цепной реакции синтеза ДНК. Из 80 семей 75 оказались информативными для ДНК-диагностики. У 18 родственников пробанда установлено носительство гемофилии А, у 23 — отвергнуто. В 20 случаях на I и II триместрах беременности проводили пренатальную диагностику этого заболевания. Приведены характерные примеры ДНК-анализа в семьях высокого риска, рассмотрены объективные факторы, затрудняющие пренатальную диагностику гемофилии А, а также наиболее перспективные новые методические подходы, повышающие эффективность молекулярных исследований природы мутации гена фактора VIII.*

**Введение.** Гемофилия А — тяжелое X-сцепленное наследственное заболевание, вызываемое мутациями в гене фактора VIII свертывания крови, встречается с частотой 1:4—5 тыс. новорожденных мальчиков [1, 2]. Современные клинико-биохимические и иммунологические методы определения уровня и активности фактора VIII в крови недостаточны для выявления гетерозиготного носительства и совершенно непригодны для пренатальной диагностики гемофилии А на ранних сроках беременности. В последние годы осуществлено клонирование гена фактора VIII и его частичное секвенирование. Установлено, что ген состоит из 26 экзонов (размерами от 69 до 3106 пар оснований (п. о.)), 25 интронов и имеет величину 186 тыс. п. о. К настоящему времени для него описано более 20 точечных мутаций, 14 делеций протяженностью от 2 до 145 тыс. п. о. и 5 инсерций [5, 6, 8, 9, 11, 16, 19].

Гетерогенность мутационных изменений, приводящих к заболеванию, и большие размеры гена существенно влияют и затрудняют прямое определение мутаций у пробанда (больного) и его ближайших родственников [16, 18].

Основу молекулярной диагностики гемофилии А в настоящее время составляет анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) с использованием пяти полиморфных свойств для соответствующих рестрикционных эндонуклеаз в интронах фактора VIII, а также полиморфных сайтов ДНК-лоуксов, тесно сцепленных с этим геном.

Наличие или отсутствие сайта рестрикции позволяет маркировать мутантный ген и таким образом проследить передачу «больной» X-хромосомы в потомстве.

Имеется, однако, ряд причин, существенно затрудняющих молекулярную диагностику.

1. Ложное отцовство, следствием чего может быть неправильный ответ о носительстве гена гемофилии А. Использование метода геномной дактилоскопии для обследования ДНК родителей и их дочерей позволит исключить эту ошибку.

2. Недостаточная информативность молекулярно-генетических методов. Трехлетний опыт работы убедил нас в том, что информативными, т. е. пригодными для диагностики, являются лишь 94 % семей высокого риска. Прямой анализ мутаций у больных и их родственников может решить эту проблему [17, 19]. Перспективным является также поиск новых полиморфных сайтов в интронных, нетранскрибируемых частях гена [16].

3. Примерно в 30 % случаев мутация возникает *de novo*, т. е. в оогенезе или сперматогенезе матери больного и родителей матери соответственно [4, 7]. Анализ трех родословных с изолированными случаями гемофилии А приведен в данной работе. Кроме того, в настоя-

шем сообщении суммированы результаты ПДРФ-анализа семей с высоким риском гемофилии А, обсуждаются объективные факторы, затрудняющие постановку диагноза, и намечены перспективы молекулярной диагностики этого заболевания.

**Материалы и методы.** Работа выполнена на 80 семьях, имеющих больных гемофилией А, состоящих на учете в Ленинградском гемфилическом центре, Одесском медицинском институте, медико-генетических центрах Минска, Киева, Кишинева. Все больные подвергались клиническому обследованию; в том числе определялась активность факторов VIII и IX. ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови по модифицированному бесфенольному методу [1]. Рестрикционное расщепление эндонуклеазой *TaqI* вели 6 ч при 65 °С, качество реакции проверяли на микрофорезе. Рестрикционную ДНК (10 мкг) каждого члена семьи разделяли с помощью электрофореза в 0,8 %-ной агарозе и переносили на капроновый фильтр «Хийу Калур» (Таллинн) по стандартной методике [13].

Зонд *St-14* (3,0 тыс. п. о., фрагмент локуса *DXS52*) любезно предоставлен Дж. Л. Манделем (Страсбург, Франция) [12]. Зонд выделяли из культуры клеток щелочным лизисом с последующим центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия в присутствии бромистого этидия, метили в реакции ник-трансляции <sup>32</sup>P (удельная активность (2—4) · 10<sup>8</sup> имп·мин<sup>-1</sup>·мкг<sup>-1</sup>), гибридизовали на фильтрах (6 × SSC, 5 × раствор Денхарда, 0,1 %-ный DS-Na, 100 мкг/мл ДНК спермы лосося, 10 %-ный декстрансульфат, 18 ч, 65 °С) с рестрицированной ДНК на фильтрах по методу [13] и после отмывки экспонировали с рентгеновской пленкой в кассетах с усиливающим экраном при 20 °С.

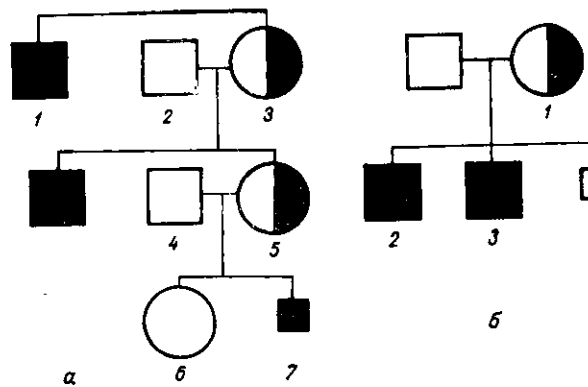
Олигопраймеры для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК ПДР синтезированы во Всесоюзном гематологическом центре Минздрава СССР (Москва) на приборе «Pharmacia Gene Assembler» фосфоамидитным методом [3]. Амплификацию проводили в инкубационной среде объемом 50 мкл (67 мМ трис-HCl, pH 8,8; 6,7 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ меркаптоэтанол; 16,6 мМ (NH)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 6,7 мМ ЭДТА, 170 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 4 дNTP (1,0 мМ каждый), пары праймеров (0,03 мкг каждый), 1 мкг ДНК). После денатурации в течение 10 мин при 98 °С добавляли 2 ед. активности ДНК-полимеразы *Thermus thermophilus* и вели синтез на термоциклере («Techne», Великобритания). Режим ПЦР: денатурация — 1 мин, 94 °С, отжиг праймеров — 1 мин, 54 °С, синтез ДНК — 3—5 мин, 73 °С (для амплификации фрагмента 730 п. о., рестрицируемого эндонуклеазой *HindIII*); денатурация — 0,5 мин, 94 °С, отжиг праймеров и синтез — 0,3 мин (для амплификации фрагмента 96 п. о., рестрицируемого эндонуклеазой *XbaI*). Обработывали рестриктазами непосредственно в реакционной среде при 37 °С 3 ч. Полученные таким образом гидролизаты ДНК разделяли электрофорезом в 7 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ) и тестировали после прокрашивания бромистым этидием в УФ-свете (трансиллюминатор, «ЛКВ», Швеция) при длине волны 302 нм.

Наличие сайта рестриктазы *HindIII* определяли по присутствию аллелей 160 и 90 п. о., отсутствие этого сайта приводило к появлению аллеля 250 п. о. [3]. Существование полиморфного сайта для *XbaI* во фрагменте 96 п. о. вызывало появление фрагментов длиной 68 и 28 п. о. [12].

**Результаты и обсуждение.** К настоящему времени молекулярно-генетический анализ проведен в 80 семьях — 320 человек. Из них информативными оказались 75 семей. Результаты исследований по выявлению гетерозиготного носительства и пренатальной диагностики суммированы в таблице.

Пренатальная диагностика и диагностика носительства в семьях с гемофилией А не вызывает затруднений в тех случаях, если заболевание зарегистрировали в нескольких поколениях либо если женщина

из группы высокого риска имеет два или более больных детей. Анализ полиморфных сайтов для рестрикционных эндонуклеаз внутри интронов позволяет проводить диагностику с ошибкой менее 0,2%. В таком случае функциональные и иммунологические методы определения



носительства, которые дают ошибку в 10—15% случаев, используются как дополнительные [4, 16, 17].

Так, в семье Т. (рис. 1, а) сцепление мутантного гена с фрагментом 250 п. о. (полиморфный сайт *HindIII*)

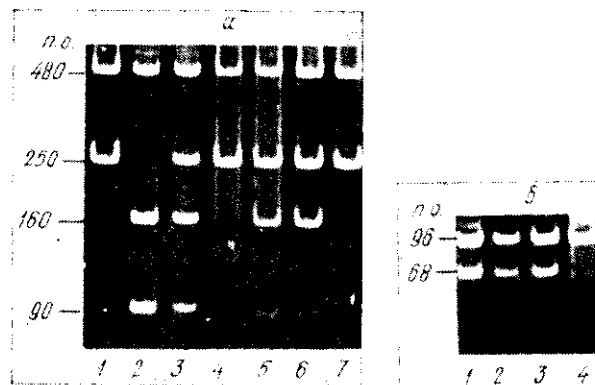


Рис. 1. Пренатальная диагностика гемофилии А методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК в семьях высокого риска в I триместре беременности: а — тестирование по *HindIII*-сайту. Плод мужского пола, диагноз гемофилии А подтвержден. Мутантный аллель сцеплен с аллелем 250 п. о.; б — тестирование по внутригенному сайту *XbaI* в семье Б. Плод мужского пола, здоров. Мутантный ген сцеплен с аллелем 68 п. о.

Fig. 1. Prenatal diagnosis of hemophilia A by polymerase chain reaction in high risk families at the 1st trimester of pregnancy

позволяет провести диагностику носительства у племянницы пробанда, ее дочери и поставить диагноз гемофилии А плоду мужского пола.

В семье Б. (рис. 1, б) у женщины с нормальной активностью фактора VIII (109%) двое детей больны гемофилией А. Так как вероятность повторной мутации крайне мала, женщина была определена нами как носительница, ей была рекомендована пренатальная диагностика. Данная семья была информативной по *XbaI*-сайту (интрон 22), выявленному методом полимеразной цепной реакции. Сложность работы с этим сайтом состоит в том, что наряду с районом 22 интрона фактора VIII синтезируется фрагмент из другой области генома, но этот фрагмент стабильно не имеет сайта рестрикции для *XbaI*. Тот факт, что больные дети и плод имеют разные аллели, свидетельствует о том, что женщина является гетерозиготной по этим аллелям и, следовательно, семья информативна. Анализ ДНК, взятой из пуповинной

*Итоги диагностики носительства и пренатальной диагностики гемофилии А молекулярно-генетическими методами*

*Basic results of carrier detection and prenatal diagnosis of hemophilia A by molecular methods*

Число информативных семей	Определение гетерозиготного носителя гемофилии А		Пренатальная диагностика			
	Установлено	Отвергнуто	Всего	Больных мужских плодов	Здоровых мужских плодов	Девочек-носительниц
25	18	23	20	12	3	3

вены, позволил установить, что плод мужского пола не будет страдать гемофилией А.

В ряде случаев использование ПДРФ-анализа дает возможность определить, у кого именно из родственников пробанда возникла спонтанная мутация. В семье Ш. мать двоих детей является гетерозиготной по аллелям полиморфного сайта *HindIII*, однако оба ее сына —

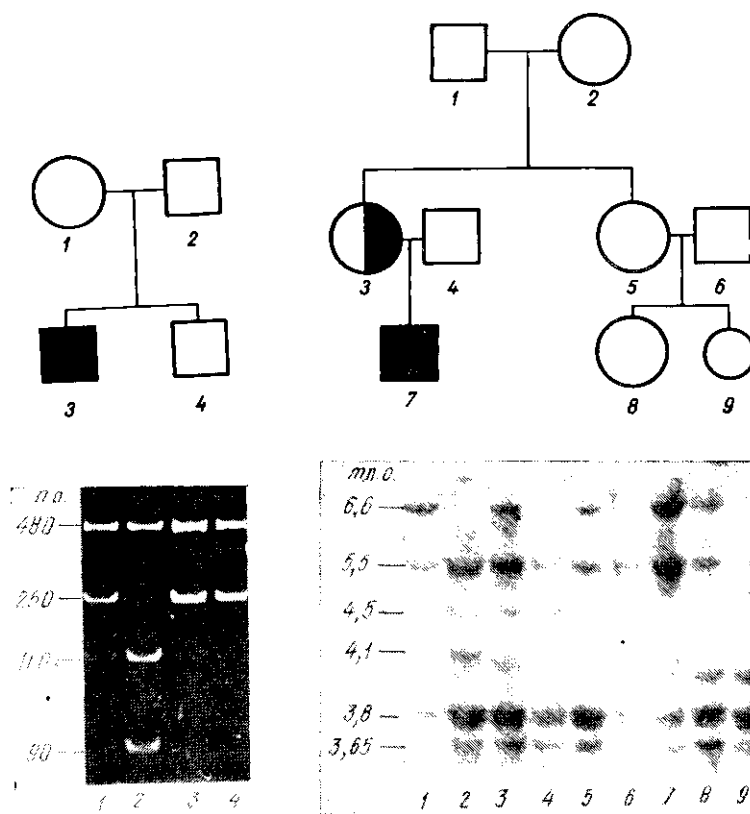


Рис. 2. ДНК-диагностика в семье Ш. методом полимеразной цепной реакции по внутривенному полиморфному сайту *HindIII*. Мутация гемофилии возникла в оогенезе. Пояснения в тексте

Fig. 2. DNA-diagnosis in the family Sh. by polymerase chain reaction method on intragenetic polymorphic site *HindIII*. Mutation sprang in oogenesis

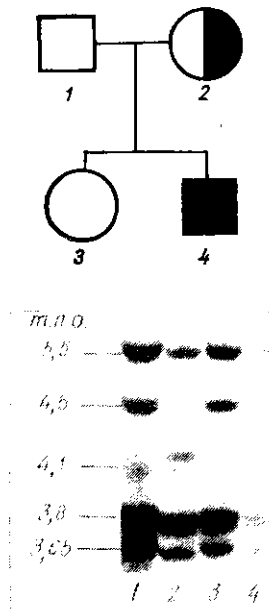
Рис. 3. ПДРФ-анализ в семье С. с использованием внегенного зонда *St-14* и рестрикции *TaqI*. Мутация гемофилии А маркирована аллелем 6,6 тыс. п. о. Наиболее вероятное возникновение мутации в сперматогенезе деда [1]. Пояснения в тексте

Fig. 3. RFLP-analysis in the family S. with intergenetic probe *St-14* and endonuclease *TaqI*

здоровый и больной гемофилией А — несут один и тот же аллель 260 п. о. (рис. 2). Последнее обстоятельство, а также то, что у женщины не наблюдалось снижения активности фактора VIII в крови, позволяют прийти к заключению о возникновении мутации в оогенезе. Это свидетельствует о том, что в семьях, где мутация возникла *de novo*, необходимо обследование не только самих больных и их матерей, но и их сибсов. С помощью подобного анализа можно избежать ложноположительных ответов о носительстве заболевания в пренатальной диагностике.

ПДРФ-анализ большой выборки семей со спонтанной формой гемофилии А показал, что примерно в 75 % случаев заболевание связано с мутацией, возникшей в сперматогенезе, и только в 25 % — в оогенезе [4, 7]. Примером такой семьи является семья С. (рис. 3), обратившаяся за консультацией в I триместре беременности. Исполь-

зование внутригенных маркеров было невозможно, так как семья оказалась неинформативной по *HindIII*- и *XbaI*-сайтам. ПДРФ-анализ с помощью зонда *St-14* выявил, что больной получил от матери X-хромосому здорового деда. Снижение активности фактора VIII у матери, а также спонтанный характер мутации дают основание считать, что мутация возникла в сперматогенезе. Это обстоятельство позволяет отвергнуть носительство мутации у двух родственниц (теток пробанда), которые тем не менее имеют аллель 6,6 тыс. п. о., сцепленный с мутантной хромосомой пробанда.



Однако в большинстве спорадических случаев гемофилии не удается выяснить происхождение мутации прежде всего из-за невозможности проведения молекулярного анализа ДНК родителей матери пробанда. Это приводит к фактическому завышению ложноположительных диагнозов как в пренатальной диагностике, так и в диагностике носительства. В таком случае молекулярный анализ носит скорее вероятностный характер. Ответ дается исходя из того, какой аллель сцеплен с X-хромосомой, несущей ген гемофилии А. Примером является семья П. (рис. 4). Хотя у матери

Рис. 4. ПДРФ-анализ в семье высокого риска П. гемофилии А. Полиморфная система *St-14/TaqI*. Мутантный ген сцеплен с аллелем 4,5 тыс. п. о. Снятие диагноза гетерозиготного носительства мутации у дочери [3]. Пояснения в тексте  
Fig. 4. RFLP-analysis in the family P. with high risk of hemophilia A. Polymorphic system *St-14/TaqI*

пробанда не была снижена активность фактора VIII, при диагностике носительства у дочери мы исходили из того, что 1) женщина имеет больного сына; 2) мутация возникает преимущественно в сперматогенезе. Основываясь на этом, был дан ответ дочери о носительстве гена гемофилии А и рекомендована пренатальная диагностика. Такая стратегия позволяет избежать ложноположительных диагнозов носительства и уменьшить число больных детей, рожденных вследствие ошибки молекулярного анализа. Таким образом, в семьях с подозрением на спонтанно возникшую мутацию гемофилии А в гаметах матери более оправданна комплексная диагностика во втором триместре беременности с использованием молекулярно-генетических методов и иммунологического определения уровня факторов VIII, IX и Виллибранта в крови плода.

Перспективным для молекулярной диагностики гемофилии А является использование электрофореза двуцепочечной ДНК в градиентном денатурирующем геле и электрофореза одноцепочечной ДНК в денатурирующем ПААГ [15, 16]. Оба подхода с успехом применимы для выявления точечных мутаций в достаточно больших фрагментах экзонов. Точное картирование самой мутации, т. е. выявление характера нуклеотидной замены, требует секвенирования амплифицированного участка ДНК (метод GAWTS) [18, 19].

Установление точной природы мутации в семьях высокого риска с гемофилией А существенно повысит выявление гетерозиготного носительства и пренатальной диагностики.

#### Резюме

В роботі підсумований трирічний досвід молекулярної діагностики гемофілії А за допомогою ПДРФ-аналізу та полімеразної ланцюгової реакції синтезу ДНК. Із 80 сімей 75 виявилися інформативними для ДНК-діагностики. У 18 родичок пробанда встановлена

присутність гемофілії А, у 23 — відкинута. У 20 випадках на I та II триместрах вагітності проводили пренатальну діагностику цього захворювання. Приведені характерні приклади ДНК-аналізу в сім'ях високого ризику, розглянуті об'єктивні фактори, що ускладнюють пренатальну діагностику гемофілії А, а також найбільш перспективні нові методичні підходи, які збільшують ефективність молекулярних досліджень природи мутації гену фактору VIII.

#### Summary

Three years experience in molecular diagnosis of hemophilia A by means of RFLP studies and PCR analysis of FVIII gene is summarised. 75 out of 80 families studied were found to be informative for DNA analysis. 18 hemophilia A carriers have been detected and in 23 female relatives the presence of hemophilia A has been rejected. The results of 27 cases of prenatal diagnoses of hemophilia A at the 1st and 2nd trimester of pregnancy are reported. The examples of DNA analysis in some hemophilia A families are presented. The difficulties of molecular studies in HA families are outlined and the options of new molecular approaches for effective detection of factor VIII gene mutations are discussed.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. ПДРФ-анализ и диагностика гемофилии А при помощи ДНК зондов / М. В. Асеев, Т. Э. Иващенко, В. Н. Горбунова и др. // Биополимеры и клетка.— 1990.— 6, № 2.— С. 45—52.
2. Баранов В. С. Дородовая диагностика наследственных болезней: современное состояние, реальные возможности и перспективы // Вест. АМН СССР.— 1987.— № 4.— С. 44—50.
3. Выявление носителей гемофилии А тестированием полиморфных *BclI* и *HindIII* сайтов методом полимеразной цепной реакции с внутренним контролем расщепления / В. Л. Сурин, Е. Л. Жукова, А. А. Крутов и др. // Гематология и трансфузиология.— 1990.— 355, № 3.— С. 3—6.
4. Direct characterization of Factor VIII in plasma. Detection of a mutation altering a thrombin cleavage site (arginine 372-histidine) / M. Arai, H. Inaba, M. Higuchi et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1989.— 86.— P. 4277—4281.
5. Characterization of partial deletion of the Factor VIII gene in a haemophiliac with inhibitor / B. Bardoni, M. Sampietro, M. Romano et al. // Hum. Genet.— 1988.— 79, N 1.— P. 86—88.
6. A *HindIII* RFLP and gene lesion in the coagulation factor VIII gene / F. Bernard, C. Legnani, S. Volinia et al. // Ibid.— 78, N 2.— P. 359—362.
7. RFLP analysis in families with sporadic haemophilia A. // Ibid.— 1987.— 76, N 2.— P. 253—256.
8. Gilscher J. Maternal duplication associated with gene deletion in sporadic hemophilia // Amer. J. Hum. Genet.— 1988.— 43.— P. 274—279.
9. Mild hemophilia A resulting from Arg to Leu substitution in exon 26 of the Factor VIII gene / H. Inaba, M. Fujinski, H. H. Kazazian et al. // Hum. Genet.— 1989.— 81, N 3.— P. 335—338.
10. Kaufman R. J. Genetic engineering of Factor VIII // Nature.— 1989.— 342, N 9.— P. 207—208.
11. Haemophilia A resulting from *de novo* insertion of *L1* sequence represents a novel mechanism for mutation in man / H. H. Kazazian, Jr., G. Wong, H. Youssoufian et al. // Ibid.— 1988.— 332.— P. 164—166.
12. Kogan S. G., Doherty M., Gilscher J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences application to hemophilia // New Engl. J. Med.— 1987.— 317, N 16.— P. 985—990.
13. Maniatis T., Fritsh E., Sambrook J. Molecular cloning.— New York: Cold Spring Harbor Lab., 1989.— 420 p.
14. Genetic screening for hemophilia A with a polymorphic DNA probes / I. Oberle, B. Gamberino, R. Heiling et al. // New Engl. J. Med.— 1985.— 312, N 13.— P. 682—686.
15. Rapid and sensitive detection of point mutation and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction / M. Orita, Y. Suzuki, T. Sekiya et al. // Genomics.— 1989.— 5.— P. 874—879.
16. Use of denaturing gradient gel electrophoresis to detect point mutations in the Factor VIII gene / M. D. Tragstman, M. Higushi, C. K. Kasper et al. // Ibid.— 1990.— 6.— P. 293—301.
17. Nonsense and missense mutations in hemophilia A: estimate of the relative mutation rate at CG dinucleotides / H. Youssoufian, S. E. Antonarakis, W. Bell et al. // Amer. J. Hum. Genet.— 1988.— 42, N 1.— P. 718—725.
18. Restriction endonuclease mapping of six novel deletions of the Factor VIII gene in hemophilia A // H. Youssoufian, C. K. Kasper, D. G. Phillips et al. // Hum. Genet.— 1988.— 80, N 1.— P. 143—148.

19. *Moderately severe hemophilia A resulting from Glu-Gly substitution in exon 7 of Factor III gene* / H. Youssoufian, C. Wong, S. Aronis et al. // *Amer. J. Hum. Genet.*— 1988.— 42.— P. 867—871.

НИИ акушерства и гинекологии АМН СССР, Ленинград

Получено 05.07.90

УДК 576.116.4

О. В. Малышева, В. Н. Горбунова, В. В. Красильников, В. С. Баранов

### ПДРФ-АНАЛИЗ И СКРИНИНГ ДЕЛЕЦИЙ В СЕМЬЯХ БОЛЬНЫХ МИОДИСТРОФИЕЙ ДЮШЕННА (МДД)\*

*Методами обычной и множественной полимеразной цепной реакции синтеза ДНК, а также блот-гибридизации по Саузерну исследованы аллельный полиморфизм пяти сайтов ДНК, тесно сцепленных с геном дистрофина, и наличие делеций этого гена у пробандов и в семьях высокого риска. Информативными по одному или нескольким полиморфным сайтам оказались 29 и 36 обследованных семей, т. е. они пригодны для пренатальной диагностики и определения гетерозиготного носительства мутации. У 11 из 32 больных МДД выявлены различные делеции гена дистрофина. Приведены конкретные примеры пренатальной диагностики МДД на ранних сроках беременности. Обсуждаются преимущества и недостатки ПДРФ-анализа и метода прямого определения мутаций гена дистрофина для выявления гетерозиготного носительства и пренатальной диагностики МДД.*

**Введение.** Миодистрофия Дюшенна — тяжелое сцепленное с полом наследственное заболевание, встречающееся в среднем у одного из 3 500 новорожденных мальчиков. МДД вызывается мутациями в гене дистрофина, расположенном в коротком плече X-хромосомы (Xp21.3). Начиная со второй половины 80-х годов были разработаны молекулярно-генетические методы, позволяющие проводить пренатальную диагностику и определять гетерозиготное носительство у женщин из группы высокого риска. В настоящее время существуют два принципиальных подхода в молекулярной диагностике МДД: анализ полиморфизма длины рестриционных фрагментов (ПДРФ) и прямое определение мутаций в гене дистрофина. Суть первого подхода состоит в том, что в консультируемой семье удается маркировать хромосому матери по наличию или отсутствию определенных сайтов рестрикции в тесно сцепленных с геном дистрофина локусах ДНК или внутри самого гена. Это делает возможным различить «больную» и «здоровую» хромосомы и проследить их наследование в данной семье. Со скидкой на вероятность кроссинговера между маркерным сайтом и мутацией (5—10 %) этот путь позволяет провести достоверную пренатальную диагностику и выявить гетерозиготное носительство.

Второй метод — прямое определение мутации. В настоящее время он может быть использован в 50—70 % семей с МДД, где удается обнаружить делеции гена дистрофина у пробанда, и является практически абсолютно достоверным способом пренатальной диагностики. Однако определение гетерозиготного носительства этим способом затруднено.

В данном сообщении представлены данные по изучению ПДРФ по пяти полиморфным сайтам в семьях больных МДД, а также приведены результаты скрининга делеций этого гена у больных.

**Материалы и методы.** ДНК из лейкоцитов периферической крови и клеток хориона выделяли, как описано ранее [1]. Для блот-гибри-

\* Работа частично финансируется ВОЗ (Грант G 3/181/139).