

## RAPORT DE ETAPĂ

### “Utilizarea machine learning pentru analiza datelor de secvențiere în investigarea profilului epigenetic în bolile hematologice rare”

#### INTRODUCERE ÎN HEMOFILIE

Hemofilia dobândită este caracterizată de o concentrație redusă de factori de coagulare circulanți. Spre deosebire de hemofilia clasică, în acest caz se generează anticorpi anti factorii de coagulare. Această patologie afectează în principal vârstnicii, iar în aproape jumătate dintre cazuri există o altă boală care este responsabilă de declanșarea hemofiliei dobândite, precum alte boli autoimune: artrita reumatoidă, scleroza multiplă, lupus, sindrom Sjogren sau colită ulcerativă. De asemenea, un alt factor declanșator poate fi inflamația cauzată de infecții, hepatita, diabetul sau diferite tipuri de cancer.

Pacienții diagnosticați cu hemofilie dobândită prezintă simptome similare cu cele ale hemofiliei A – HEM A (deficiența de FVIII), hemofiliei B - HEM B (deficiență de Factor IX) sau simptome de boală von Willenbrand – VWD, având ca principală diferență că nu este transmisă genetic – fiind boală autoimună.

Până în prezent, este cunoscut faptul că în hemofilia dobândită se dezvoltă spontan autoanticorpi ce țintesc FVIII și FIX, rezultând sângerări. Numeroase cazuri de hemofilie dobândită sunt confirmate clinic însă fără a investiga prezența autoanticorpilor. În toate cazurile de hemofilie dobândită, contextul genetic și transcripțional nu sunt cunoscute, astfel că în numeroase cazuri nu se cunoaște cauza agravării bolii, putând fi implicate mecanisme de reglare epigenetică, inhibări ale genelor sau blocări ale proteinelor efectoare în cascada de coagulare a sângelui.

Noi oportunități de dezvoltare a unor ținte pentru terapii avansate în hemofilia dobândită pot fi valorificate prin evaluarea epigenetică a cazurilor diagnosticate. Scopul studiului este să determinăm moleculele non-codificatoare de ARN, precum micro ARN-urile, care interacționează cu diverse gene codificatoare de proteine din cascada de coagulare și care inhibă exprimarea factorilor de coagulare, sau să evaluăm moleculele mici de ARN care modulează profilul imunitar, care pot stimula inflamația și pot inhiba mecanismele anti-inflamatoare.

#### DEZVOLTAREA FLUXULUI DE LUCRU – RECOLTARE ȘI STOCARE PROBE

Pentru fiecare subiect, se vor recolta două tuburi de sânge periferic (volum 2 mL/tub), fiecare în tuburi căptușite cu Citrat de sodiu cu rol de anticoagulant. Probele astfel prelevate vor fi stocate pentru realizarea biobăncii: 1 mL de sânge integral (neprosesat), 1mL de plasmă și fracția de celule mononucleare (PBMCs) folosind izolarea pe gradient de densitate cu Ficoll.

Stocarea probelor se realizează în ultracongelatoare, iar prelucrarea se va realiza după ce vor fi colectate toate probele necesare pentru evaluări ulterioare.

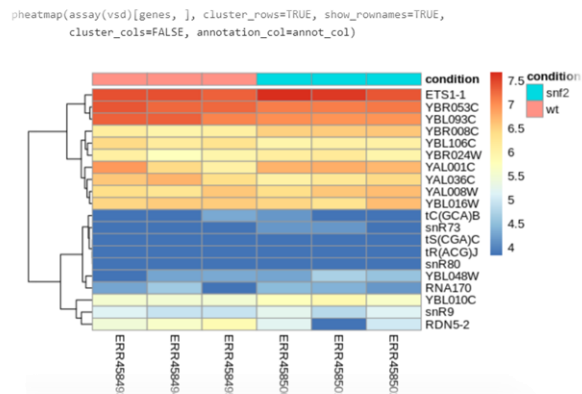
Această biobanca este realizată conform cu protocoalele standard din dotarea laboratorului, similar cu biobăncii anterioare deja existente în laboratorul nostru.

## PLANIFICAREA EXTRAȚIILOR ȘI ANALIZA FRAGMENTELOR DE ARNmi

1. Sângele integral se amesteca cu un volum de soluție de liză și 1%  $\beta$ - mercaptoetanol (Vortexăm și centrifugăm la 12.000xg timp de 2 minute, la temperatura camerei).
2. Transferăm supernatantul într-un tub steril și adăugăm un volum de etanol pur. Vortexăm și apoi transferăm proba pe un tub cu filtru, și centrifugăm 15 secunde, la temperatura camerei, la 12.000xg
3. Adăugăm 0.7 mL de Wash Buffer 1 și centrifugăm 15 secunde, la temperatura camerei, la 12.000xg
4. Adăugăm 0.5 mL de Wash Buffer 2 și centrifugăm 15 secunde, la temperatura camerei, la 12.000xg
5. Repetăm etapa 5
6. Centrifugăm tubul cu filtru, fără să adăugăm soluții, timp de 1 minut la 12.000xg pentru a scăpa de etanol.
7. Eluăm proba de ARN în apă ultra pură și citim proba la Nanodrop.
8. Stocăm probele la  $-80^{\circ}\text{C}$

## SECVENȚIEREA ARN

Librariile Secvențele mici de ARN vor fi generate folosind 'TrueQuant smallRNA-Seq Kit. După legarea de coloanele de silica, fragmente mici de RNA din plasma vor fi analizate. După generare cDNA și obținerea catenei secundare, se va realiza libraria ce se va analiza cu ajutorul ILLUMINA NextSeq 500. Quantificarea pentru fiecare gena mapata se va realiza cu HT-seq iar analiza diferentia la cu DESeq2. Rezultatele vor fi compilate și evaluate statistic folosind R-scripts în RStudio (conform cu exemplul).





## ELABORAREA GRUPURILOR EXPERIMENTALE

Pentru realizarea studiului, vom identifica potențiali biomarkeri prin compararea a patru grupuri:

1. Donori sănătoși – fără diagnostic de hemofilie.
2. Pacienți cu hemofilie dobândită.
3. Pacienți cu hemofilie clasica – forma moderată.
4. Pacienți cu hemofilie clasica – formă severă.

## PERSPECTIVA PENTRU ETAPELE URMĂTOARE

Lărgirea biobăncii de hemofilie – clasică și dobândită.

Participarea la conferințe de specialitate pentru diseminarea rezultatelor și aprofundarea cunoștințelor în ceea ce privește hemofilia și bolile rar hematologice.

Publicarea studiului preliminar pe grup restrâns de pacienți.

DATA 15.07.2023

## AVIZAT DE CĂTRE ECHIPĂ DE PROIECT

Dr. Adrian Bogdan Țigu

Drd. Raluca Andrada Munteanu

Drd. Rareș Drula