

ФАКТОР VIII ЗСІДАННЯ КРОВІ: БУДОВА МОЛЕКУЛИ ТА ЗАСТОСУВАННЯ

Н. Шурко*, Т. Даниш, В. Новак

*ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»
вул. Генерала Чупринки, 45, Львів 79044, Україна
e-mail: natalia_shurko@ukr.net*

У статті зроблено огляд наукових публікацій, присвячених дослідженню будови, функції та біологічної ролі фактора VIII. Фактор VIII зсідання крові людини (антигемофільний фактор А) є ключовим компонентом системи гемостазу. Роль фактора VIII полягає у підвищенні каталітичної ефективності фактора IXа у процесі активації фактора X. Ген фактора локалізований на довгому плечі X-хромосоми розміром 186 тисяч пар нуклеотидів, що складається з 26 екзонів, розділених 25 інтронами. Фактор VIII є глікопротеїном з 2332 амінокислотних залишків і має доменну структуру конформації: A1-A2-B-A3-C1-C2. У результаті посттрансляційної модифікації (furin протеази) та під дією протеолітичних ферментів плазми крові цей білок розщеплюється на два ланцюги: важкий 200 кДа (A1-A2-B) і легкий 80 кДа (A3-C1-C2). У плазмі крові людини фактор VIII представлений кількома формами з молекулярними масами 170–280 кДа та наявний у концентрації 0,1–0,2 мкг/мл. Практично весь фактор у кров'яному руслі є в комплексі з фактором фон Віллебранда, який стабілізує його у кровотоці та є ключовим регулятором активності, оскільки, з одного боку, сприяє його активації тромбіном, а з іншого – запобігає розщепленню молекули фактора протеїназами. Дефіцит фактора VIII, кількісний або якісний, призводить до порушення системи зсідання крові та розвитку захворювання, відомого як гемофілія А, з частотою виникнення 1 на 5000 новонароджених. З метою корекції дефіциту фактора або запобігання кровотеч у пацієнтів з гемофілією А проводять замісну терапію, яка полягає у введенні плазмових або рекомбінантних препаратів фактора VIII. Для лікування гемофілії А в Україні використовують зареєстровані препарати факторів зсідання крові як плазмового, так і рекомбінантного походження.

Ключові слова: фактор VIII зсідання крові, мутація, гемофілія А, препарати фактора

Фактор VIII (FVIII) зсідання крові – глікопротеїн плазми, неферментативний кофактор активного фактора IX (FIXa), який при протеолітичній активації утворює з FIXa нековалентний комплекс на поверхні фосфоліпідної мембрани, що активує фактор X (FX) [21]. Цей потрійний комплекс факторів зсідання на поверхні фосфоліпідної мембрани називають «X-аза» або «теназа» [4]. Після активації FXa вивільняється з комплексу та запускає реакцію перетворення протромбіну (FII) на тромбін (FIIa), який ініціює перетворення розчинного білка плазми фібриногену на нерозчинний фібрин. Унікальна властивість теназного комплексу полягає в надзвичайно великому ступені підвищення каталітичної активності (на п'ять порядків) FIXa, що обумовлена конформаційними змінами молекули FIXa при зв'язуванні з FVIIIa [3].

Біохімічна характеристика фактора зсідання VIII

Синтез молекули FVIII є тканиноспецифічним. Найвищий рівень мРНК і, відповідно, білка FVIII виявлено в клітинах ендотеліальної вистилки синусоїдних капілярів печінки, значна кількість є в гепатоцитах і клітинах Купфера (резидентні макрофаги вистилки

синусоїдів) [15]. Відомо, що синтез фактора відбувається також у нирках, ендотеліальних клітинах і лімфатичній тканині [21], селезінці та плаценті [2].

Ген FVIII людини локалізований на довгому плечі X-хромосоми (хромосомна локалізація Xq28) [1], займає ділянку завдовжки приблизно 186 тисяч пар нуклеотидів (тпн) і складається з 26 екзонів розміром від 69 до 3106 пар нуклеотидів (пн), розділених 25 інтронами розміром від 207 пн до 32,4 тпн [3]. Загальна довжина кодуючої послідовності цього гена дорівнює 9 тпн. Повний ген становить близько 0,1 % від усієї довжини X-хромосоми [10].

У літературі наведено небагато даних про ініціацію транскрипції гена FVIII. З основних елементів, що регулюють експресію, виявлено проксимальний ТАТА-бокс, який скеровує РНК-полімеразу до сайту ініціації мРНК, але не виявлено СААТ-бокс, який контролює частоту ініціації транскрипції. Охарактеризовано 12 білокзв'язуючих сайтів у промоторі гена FVIII. Один із них має спорідненість до ядерного фактора NF- Υ , а інший, відповідальний за транскрипцію сайт 1, – до ядерного фактора гепатоцитів HNF-1 [4].

Особливістю гена FVIII є наявність двох додаткових генів F8A і F8B в інтроні 22 (IVS22). F8A транскрибується в протилежному напрямку щодо гена FVIII. Є дві додаткові копії гена F8A, які розміщені ззовні в 400 тпн у напрямку теломери. Функції генів F8A і F8bB на теперішній час невідомі [21].

Пропотеїн FVIII синтезується у вигляді одного поліпептидного ланцюга з молекулярною масою приблизно 280–330 кДа та містить 2332 амінокислотних залишки (акз), яким передують 19 акз гідрофобного сигнального пептиду [21, 31]. У лідерний пептид входить ядро з 10-ти гідрофобних амінокислотних залишків, оточених радикалами, які несуть електростатичний заряд, утворюючи структуру як у більшості секреторних білків [2]. FVIII має доменну структуру конформації [3, 8, 17, 33]. У ньому виділяють: домен-А, який повторюється тричі, центральний В-домен і два С-домени. На границях А-доменів розміщені три кислі субдомени (містять в основному кислі амінокислоти), які позначають як a1-a3 (A1(a1)-A2(a2)-B-(a3)A3-C1-C2) і які відіграють важливу роль при взаємодії FVIII з іншими білками. У крові людини під дією протеолітичних процесів (фурипротеази) цей білок розщеплюється на два ланцюги: важкий 200 кДа (A1-A2-B) та легкий 80 кДа (A3-C1-C2). Ланцюги з'єднані один з одним за допомогою ковалентного зв'язку. Домени А FVIII на 30 % гомологічні один одному (A1 – 336, A2 – 337 та A3 – 329 акз відповідно), А доменам фактора V (FV) та мідь-зв'язуючому білку людини – церулоплазміну [18]. Домени A1 і A3 містять по одному атому купруму. У літературі зазначено, що саме взаємодія поліпептидного ланцюга FVIII з іонами металів відповідає за його структурну цілісність і кофакторну функцію [35].

Ділянка 558-565 домену A2 відповідає за зв'язування з FIXа та його конформаційну перебудову в складі тенази [22, 25]. Сайт зв'язування FX розташований у кінці домену A1 (від 337 до 372 акз). Залишок Arg336 домену A1 та Arg562 домену A2 є сайтами зв'язування для активованого протеїну С (APC) [10, 26].

Роль центрального В-домену FVIII не з'ясована до кінця. Він частково відщеплюється від молекули «зрілого» білка. На В-домен припадає приблизно 40 % амінокислотної послідовності (983 акз). Він містить 25 потенційних місць для N-глікозилювання, 16–19 з яких фактично мають N-зв'язуючі олігосахариди при значному рівні мікрогетерогенності [4]. Виходячи зі значної гомології факторів VIII та V, висувається припущення про еволюційне походження гена FVIII у результаті процесу дуплікації. При цьому відзначено, що функціональні домени А і С цих білків консервативні, а подібність доменів В обмежена високим ступенем глікозилювання, що свідчить на користь функціональної значущості високої щільності олігосахаридних груп у домені В FVIII [3, 4].

Домени C1 (153 акз) та C2 (160 акз), що входять до складу легкого ланцюга «зрілої» молекули FVIII, гомологічні доменам C1 та C2 FV [20], C-кінцевим доменам білка MFGE8 (milk fat globule EGF factor 8, lactadherin) [35] та фрагментові дискоїдину I [4]. Основою третинної структури C2-домену є конформація β -сендвіч, яка утворює внутрішню структуру домену, β -шпильки та петлі, які формують гідрофобну поверхню молекули. На верхній частині першої β -шпильки розташовані амінокислоти Met2199 і Phe2200, що відповідають за зв'язування FVIII з фосфоліпідами. C2-домен містить також сайти зв'язування тромбіну та FXa. «Зрілий» FVIII у плазмі крові людини представлений серією форм із молекулярними масами 170–280 кДа, що зумовлено процесами активації/інактивації молекули FVIII, та перебуває в концентрації порядку 0,1–0,2 мкг/мл [1].

Для відновлення прокоагулянтної активності FVIII при дисоціації-ресоціації ланцюгів необхідні як іони купруму, так й іони кальцію та марганцю. При цьому відзначено, що іони кальцію та марганцю не впливають на димеризацію ланцюгів, але сприяють утворенню активної конформації у відновленій молекулі FVIII [35], зв'язуючись зі сайтами, розміщеними на обох ланцюгах білка [11]. До складу FVIII входить 19 цистеїнових залишків, 16 із яких утворюють дисульфідні зв'язки з двовалентними іонами металів [1].

Взаємодія фактора VIII з фактором фон Віллебранда

Практично весь FVIII у плазмі крові людини входить до складу нековалентного комплексу з шапероном – фактором фон Віллебранда (vWF) та може дисоціювати при високій іонній силі. Період півжиття FVIII в цьому комплексі становить 10–12 год, а в дисоційованому вигляді – 2,5 год. Константа зв'язування становить $5,9 \pm 1,9 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [2].

Основним регулятором активності FVIII виступає vWF, а саме: дає можливість тромбіну активувати зв'язаний у комплексі FVIII [29], запобігає розщепленню протеазами FXa [12] і APC [13, 27]. Зазначено, що vWF запобігає неспецифічному зв'язуванню FVIII з мембранами клітин ендотелію судин і тромбоцитів [37].

vWF приєднується до N-кінцевої ділянки легкого ланцюга, де розташовані два сульфатованих залишки тирозину (Tyr1664 та Tyr1668) і кислий фрагмент 1649-1689 (ділянка a2). Ця ділянка не лише задіяна у зв'язуванні, але й впливає на C2-домен, надаючи йому спорідненості до vWF. Саме тому синтез дисфункціональної молекули FVIII, у якій Tyr1680 замінено на фенілаланін (Phe), веде до розвитку клінічної картини «м'якої» (легкої) форми гемофілії через порушення стабільності комплексоутворення [2].

Активация/інактивація фактора VIII зсідання крові

Активация FVIII при ініціації процесу зсідання крові здійснюється тромбіном (FII) чи FXa (рис. 1) та полягає у протеолітичних розривах в певних місцях білкової молекули [1, 2, 4]. Відмічено, що на першому етапі активації FII гідролізовані пептидні зв'язки в положеннях Arg372 (A1-A2 зв'язування доменів), Arg740 (A2-B зв'язування доменів) та Arg1689 (B-A3 домен зв'язування) [4]. У результаті цього відщеплюється домен B, важкий ланцюг розділяється на незв'язані ковалентні домени та відокремлюється коротка кисла область a3 перед доменом A3 [24].

Активация FVIII FXa відбувається за аналогічною схемою розриву цих пептидних зв'язків і двох додаткових у положенні Arg1721 і Arg336 [28], причому зауважено, що взаємодія FVIII з тромбіном опосередкована через сульфатування залишків тирозину в молекулі FVIII, тоді як активация FXa практично нечутлива до замін у сайтах сульфатування [26].

Одним із суттєвих етапів активації FVIII є його вивільнення з комплексу FVIII/vWF. Це відбувається під дією тромбіну після виділення кислого фрагмента a3, який прилягає з

N-кінця Arg1689 домену A3. FVIIIa – це гетеротример, до складу якого входить A1-домен (1-372 акз), A2 (373-740 акз) та зв'язаний A3-C1-C2 домени (1690-2332 акз) [1]. Зв'язування субодиниці A2 з іншими в четвертинній структурі білка, очевидно, має електростатичний характер, бо руйнується навіть за низької концентрації NaCl і підвищенні рН з 6,0 до 7,0, тобто при фізіологічному значенні рН. FVIII дуже лабільний через невисоку спорідненість субодиниці A2 до інших. В асоціації A1/A3-C1-C2 задіяні гідروفобні взаємодії та іони Ca²⁺ [3, 33].

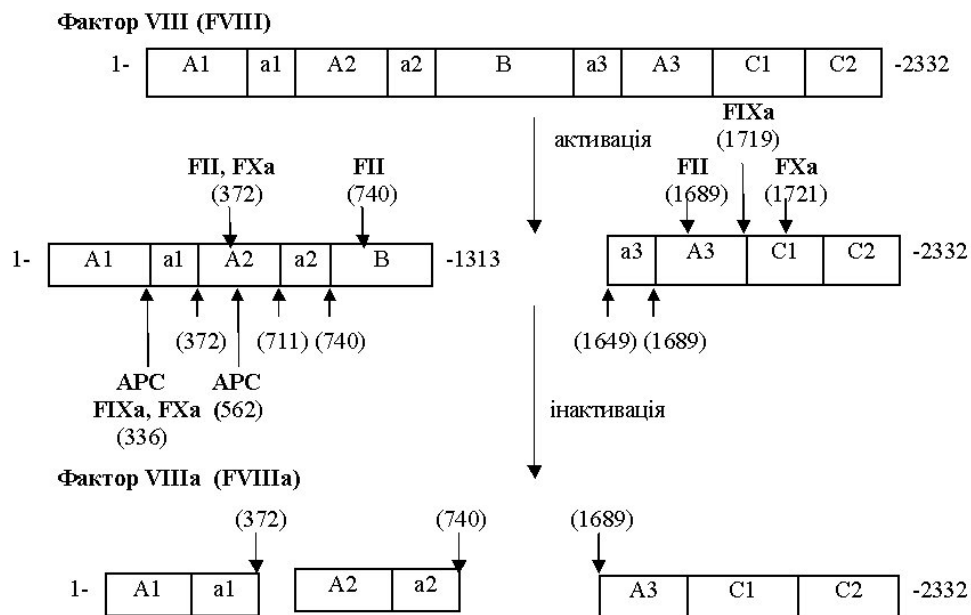


Рис. 1. Схема активації/інактивації FVIII [21, 23]

Щодо інактивації FVIIIa, то вона може відбуватися спонтанно та полягає у відділенні домену A2 важкого ланцюга, який не зв'язується з іншими доменами FVIII ковалентними зв'язками [14, 16].

Описано дві специфічні інактивації FVIIIa – опосередкована APC та FXa [3]. APC інактивує FVIIIa через низку протеолітичних розщеплень у положеннях Arg336 A1-домену та Arg562 A2-домену [9]. При цьому порушується область контакту FVIIIa/FIXa і дестабілізується взаємодія доменів A1 і A2. У літературі описано взаємодію між компонентами теназної й APC антикоагулянтної систем, які впливають на швидкість інактивації FVIIIa: FIXa запобігає розщепленню FVIIIa в положенні Arg562, а FX – сайту Arg336. Проте білок S нівелює захисний ефект FX і за відсутності FIXa також значно стимулює швидкість розщеплення в положенні Arg562 [2].

Інактивація FVIIIa за допомогою FXa відбувається значно швидше, ніж APC, та полягає у протеолітичному розщепленні зв'язків у позиціях Arg336, що спричиняє дестабілізацію домену A1 та відокремлення вільного A2-домену [4].

Гемофілія А

Дефекти гена FVIII можуть спричинити розвиток гемофілії А – X-зв'язаного спадкового рецесивного захворювання, що спостерігається з частотою 1 на 5000 новонароджених [4, 19, 21]. У 70 % пацієнтів спостерігається спадковий анамнез хвороби, 30 % припадає на спорадичні випадки захворювання внаслідок мутацій у локусі гена FVI-

II. Мутації можуть виникати як в екзонах, так і в інтронах, а також у 3'-нетрансльованій області, промоторі та в сигнальній ділянці. Так, приблизно у половини хворих із тяжкою формою гемофілії А виявлено пошкодження в інтронах 22 і 23, які відповідальні за кодування C1-домену [4].

Найпоширенішою мутацією у пацієнтів із тяжкою формою гемофілії А (близько 45 % випадків) є інверсія з транслокацією екзонів 1–22 (включаючи інтрони), як наслідок гомологічної рекомбінації між геном F8A в інтроні 22 та однією з копій F8A поза геном фактора зсідання крові VIII [21]. Інші мутації, що викликають розвиток гемофілії, – це точкові (85 % міссенс- і 15 % нонсенс-мутацій), 5 % з яких є великі або малі делеції та вставки, а також інверсії в межах інтрону 1 [7]. Із проаналізованих 80 точкових мутацій 27 викликають розвиток тяжкої форми гемофілії А, 29 – середньої форми тяжкості та 18 – легкої [15].

Описано більш ніж 60 різних видів делецій у гені FVIII. Встановлено, що гемофілія, яка виникає в результаті делецій, у 5 разів частіше супроводжується появою імунних антитіл, ніж у пацієнтів без делецій [2].

Залежно від активності FVIII, розрізняють три форми гемофілії: тяжка (рівень фактора <1,0 %), середня (від 1,1 до 5,0 %) та легка (від 5,1 до 15,0 %) [3, 21].

З метою корекції дефіциту фактора або уникнення кровотеч у пацієнтів з гемофілією А проводять замісну терапію, яка полягає у введенні плазмових або рекомбінантних препаратів фактора VIII. Для лікування гемофілії в Україні використовують низку препаратів фактора як плазмового, так і рекомбінантного походження [6].

Залежно від наявності баластних білків («чистоти»), розрізняють плазмові препарати проміжного ступеня очищення, отримані за допомогою традиційних методів осадження/адсорбції, та високоочищені препарати, виділені методами іонообмінної або афінної хроматографії [6].

З кінця 1980-х років у клінічній практиці почали застосовувати рекомбінантні препарати фактора [6, 21, 32, 34, 36], які за етапами технологічного одержання також поділяють на три покоління (залежно від наявності білка людини чи тварини в культуральному середовищі та кінцевому продукті).

Сучасні препарати FVIII мають бути вільні від надлишкових компонентів, таких як додаткові білки, активовані гемолізани, вірусні патогени й інші хімічні домішки, які використовуються у процесі отримання, та мати високу питому активність [30].

У табл. 1 та 2 наведено препарати FVIII (в алфавітному порядку), які зареєстровані в Україні, та перелічено основні методи їхнього отримання [6].

Лікування гемофілії А за допомогою препаратів FVIII на сьогоднішній час є розповсюдженою практикою і потребує препаратів високої чистоти, щоб, з одного боку, зменшити ризик зараження пацієнта вірусними захворюваннями, а з іншого, оскільки ін'єкції необхідно часто повторювати, – запобігти розвиткові небажаних імунних реакцій, які виникають у процесі накопичення залишкових забруднюючих речовин [8]. Тому надзвичайно важливими є створення сучасних і вдосконалення наявних методик виділення й очищення FVIII зсідання крові. У нашій лабораторії розроблено метод отримання високоочищеного вірус-безпечного FVIII зсідання крові з використанням методу афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах і тріазинових барвників у ролі лігандів [5]. Проте створення нових ефективних методів виділення й очищення фактора неможливе без знання структурної організації досліджуваної молекули.

Таким чином, підсумовуючи усі ці дані, ми можемо стверджувати, що FVIII відіграє важливу роль у процесі зсідання крові. Вроджений чи набутий дефіцит FVIII є причиною

виникнення розвитку гемофілії А, лікування якої полягає у компенсаторному введенні препаратів фактора як плазмового, так і рекомбінантного походження.

Таблиця 1

Плазмові препарати FVIII, зареєстровані в Україні (2016)

Препарат	Виробник, країна	Методи отримання	Вірусна інактивація	Наявність інших білків
Біоклот А	PrAT «БІОФАРМА» Україна	іонообмінна хроматографія	сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання	альбумін, vWF
Beriate	ЦСЛ Берінг ГмБХ/ CSL Behring GmbH Німеччина	преципітація, іонообмінна хроматографія	сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання (60 °С, 10 год)	альбумін, vWF
Emoclot D.I.	Kedrion, Італія	іонообмінна хроматографія	сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання (100 °С, 30 хв)	альбумін, vWF
Fanhdi	Grifols, Іспанія	гепарин-афінна хроматографія	сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання	альбумін, vWF
Feiba	Baxter AG, Австрія	іонообмінна хроматографія	сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання (100 °С, 30 хв)	FII, FVII, FIX, FX, фактори калікреїн-кінінової системи
Immunate	Baxter BioScience, Австрія	іонообмінна хроматографія	сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання-тиск (60 °С, тиск 190 мбар, 10 год)	альбумін, vWF
Octanate	Octapharma, Австрія, Швеція, Франція	преципітація, іонообмінна хроматографія	сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання (100 °С, 30 хв)	альбумін, vWF
Wilate	Octapharma, Австрія	преципітація, іонообмінна хроматографія, гель-фільтрація	сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання (100 °С, 120 хв)	альбумін, vWF

Таблиця 2

Рекомбінантні препарати фактора VIII, зареєстровані в Україні (2016)

Препарат	Виробник, країна	Методи отримання	Вірусна інактивація	Наявність інших білків
Advate	Baxter BioScience, Австрія	рекомбінант, імуноафінна хроматографія	сольвент-детергентний метод, ультрафільтрація	–
Recombinate rAHF	Baxter BioScience, США	рекомбінант, імуноафінна хроматографія	сольвент-детергентний метод	альбумін людини
ReFactor AF	Pfizer, Швеція	рекомбінант, іонообмінна, імуноафінна хроматографія	сольвент-детергентний метод, нанофільтрація	–

Серед основних біологічних властивостей FVIII можна виділити такі: хромосомна локалізація – Xq28; молекулярна маса – 170–280 кДа; кількість амінокислотних залишків – 2323; складається зі субодиниць – A1(a1)-A2(a2)-B-(a3)A3-C1-C2; концентрація у плазмі крові – 0,1–0,2 мг/мл; час півжиття у комплексі з vFW – 10–12 год, а у вільному (дисоційованому) стані – 2,5 год; константа зв'язування vFW – з $5,9 \pm 1,9 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Процес вірусної інактивації є обов'язковим під час отримання будь-яких препаратів із плазми крові. Сучасні препарати факторів зсідання крові є двічі вірус-інактивовані.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Волков Г. Л., Платонова Т. Н., Савчук А. Н. и др. Современные представления о системе гемостаза. К.: Наукова думка, 2005. 292 с.

2. *Зубайров А. Д.* Молекулярні основи згортання крові і тромбозоутворення. Казань: ФЕН, 2000. 364 с.
3. *Орлова Н. А.* Дизайн генетических элементов и оптимизация системы гетерологической экспрессии фактора свертывания крови VIII человека в клетках млекопитающих: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.03. М., 2013. 26 с.
4. *Орлова Н. А., Ковнир С. В., Воробьев И. И.* и др. Фактор свертывания крови VIII – от эволюции к терапии // *Acta Naturae*. 2013. Т. 5. 2 (17). С. 19–39 (русскоязычная версия).
5. Пат. 107509 UA, C07K 1/22, C07K 14/755, B01D 15/18. Спосіб виділення фактора VIII згортання крові / Шурко Н.О., Даниш Т.В., Новак В.Л. // u 201512302 від 11.12.2015. Опубл. 10.06.2016. Бюл. № 11. С. 5.
6. *Шурко Н. О., Вороняк М. І., Даниш Т. В.* Препарати фактора згортання крові VIII та способи їх отримання // *Біологічні студії*. 2014. Т. 8. № 1. С. 197–204.
7. *Al-Allaf F. A., Taher M. M., Abduljaleel Z.* et al. Mutation screening of the Factor VIII Gene in Hemophilia A in Saudi Arabia: Two Novel Mutations and Genotype-Phenotype Correlation // *J. Mol. Genet. Med*. 2016. Vol. 10 (2). P. 1–11.
8. *Ahmadian H., Hansen E. B., Faber J. H.* et al. Molecular design and downstream processing of processing of Turoctocog alfa (Novoeight), a B-domain truncated factor VIII molecule // *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2016. Vol. 27 (5). P. 568–575.
9. *Danese S., Vetrano S., Zhang L.* et al. The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications // *Blood*. 2010. Vol. 11. 115(6). P. 1121–1130.
10. *Fay P. J.* Activation of factor VIII and mechanism of cofactor action // *Blood Rev*. 2004. Vol. 18. P. 1–15.
11. *Fay P. J.* Factor VIII Structure and Function // *Int. J. Hematol*. 2006. Vol. 83. P. 103.
12. *Federici A. D., Lee Ma C. A., Berntorp E. E.* et al. Von Willebrand diseases: Basic and clinical aspect. Blacwell Publishing Ltd. 2011. 128 p.
13. *Gharagozlou S., Sharifian R. A., Khoshnoodi J.* et al. Epitope specificity of anti-factor VIII antibodies from inhibitor positive acquired and congenital haemophilia A patients using synthetic peptides spanning A and C domains // *Thromb Haemost*. 2009. Vol. 101 (5). P. 834–839.
14. *Hockin M. F., Jones K. C., Everse S. J.* et al. A model for the stoichiometric regulation of blood coagulation // *J. Biol. Chem*. 2002. 24, Vol. 277 (21). P. 18322–18333.
15. *Hollestelle M. J., Thinnest T., Crain K.* et al. Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo – a closer look // *Thromb Haemost*. 2001. Vol. 86 (3). P. 855–861.
16. *Koedam J. A., Meijers J. C., Sixma J. J.* et al. Inactivation of human factor VIII by activated protein C. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor // *J. Clin. Invest*. 1988. Vol. 82 (4). P. 1236–1243.
17. *Lange A. M., Altynova E. S., Nguyen N. G.* et al. Overexpression of factor VIII after AAV delivery is transiently associated with cellular stress in hemophilia A mice // Citation: *Molecular Therapy – Methods & Clinical Development*. 2016. Vol. 3. P. 1–8.
18. *Lin L., Huai Q., Huang M.* et al. Crystal structure of the bovine lactadherin C2 domain, a membrane binding motif, shows similarity to the C2 domains of factor V and factor VIII // *J. Mol. Biol*. 2007. Vol. 17, 371 (3). P. 717–724.
19. *Lee C. A., Berntorp E. E.* Textbook of hemophilia. Second edition. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication, 2010. 464 p.
20. *Liu M. L., Shen B. W., Nakaya S.* et al. Hemophilic factor VIII C1- and C2-domain missense mutations and their modeling to the 1.5-angstrom human C2-domain crystal structure // *Blood*. 2000. Vol. 1, 96 (3). P. 979–987.

21. Mazurkiewicz-Pisarek A., Ptucienniczak G., Ciach T. et al. The factor VIII protein and its function // *Acta Biochim. Pol.* 2016. Vol. 63 (1). P. 11–16.
22. Molinari M., Calanca V., Galli C. et al. Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle // *Sci.* 2003. Vol. 299. 5611. P. 1397–1400.
23. Myles T., Yun T. H., Leung L. L. Structural requirements for the activation of human factor VIII by thrombin // *Blood.* 2002. Vol. 100. P. 2820–2826.
24. Newell J. L., Fay P. J. Acidic Residues C-Terminal to the A2 Domain Facilitate Thrombin-Catalyzed Activation of Factor VIII // *Biochem.* 2008. Vol. 47 (33). P. 8786–8795.
25. Ngo J. C., Huang M., Roth D. A. et al. Crystal structure of human factor VIII: implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex // *Structure.* 2008. Vol. 16 (4). P. 597–606.
26. Nogami K., Lapan K. A., Qian Zhou Q. et al. Identification of a Factor Xa-interactive Site within Residues 337–372 of the Factor VIII Heavy Chain // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 15763–15771.
27. Nogami K., Shima M., Nishiya K. et al. A novel mechanism of factor VIII protection by von Willebrand factor from activated protein C-catalyzed inactivation // *Blood.* 2002. Vol. 1, 99 (11). P. 3993–3998.
28. Nogami K., Wakabayashi H., Schmidt K. et al. Altered interactions between the A1 and A2 subunits of factor VIIIa following cleavage of A1 subunit by factor Xa // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 17, 278 (3). P. 1634–1641.
29. Pittman D. D., Alderman E. M., Tomkinson K. N. et al. Biochemical, immunological, and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VIII // *Blood.* 1993. Vol. 1, 81 (11). P. 2925–2935.
30. Radosevich M., Burnouf T. Affinity chromatography – fractionated and DNA-engineered plasma proteins // *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology.* 2009. P. 1–12.
31. Ro Sen S., Casoni Chiarion M. Chromogenic determination of factor VIII activity in plasma and factor VIII concentrates // *Chromogenix – monograph series.* 2000. 34 p.
32. Santagostino E. A new recombinant factor VIII: from genetics to clinical use // *J. Drug Design, Development and Therapy.* 2014. Vol. 8. P. 2507–2515.
33. Shen B. W., Spiegel P. C., Chang C-H. et al. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII // *Blood.* 2008. Vol. 111 (3). P. 1240–1247.
34. Thim L., Vandahl B., Karlsson J. et al. Purification and characterization of a new recombinant factor VIII (N8) // *Haemophilia.* 2010. Vol. 16. P. 349–359.
35. Wakabayashi H., Koszelak M. E., Mastro M. et al. Metal ion-independent association of factor VIII subunits and the roles of calcium and copper ions for cofactor activity and inter-subunit affinity // *Biochem.* 2001. Vol. 28, 40 (34). P. 10293–10300.
36. Wynn T. T., Gumuscu B. Potential role of a new PEGylated recombinant factor VIII for hemophilia A // *J. Blood Med.* 2016. Vol. 7. P. 121–128.
37. Zhang B., Ginsburg D. Familial multiple coagulation factor deficiencies // *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice.* Sixth Edition. 2013. P. 709–714.

Стаття: надійшла до редакції 29.03.17

доопрацьована 13.08.17

прийнята до друку 22.09.17

THE COAGULATION FACTOR VIII: STRUCTURE AND APPLICATION**N. Shurko, T. Danysh, V. Novak**

*SI "Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine, NAMS of Ukraine"
45, Gen. Chuprynka St., Lviv 79044, Ukraine
e-mail: natalia_shurko@ukr.net*

The article reviews the scientific papers on the study of structure, function and biological role of coagulation factor VIII. Human coagulation factor VIII (anti-hemophilic factor A) is a key component of the blood hemostasis system and the nonenzymatic cofactor to the activated clotting factor IX. The role of factor VIII is to increase the catalytic efficiency of factor IXa in the process of activation of factor X. Factor VIII is a glycoprotein. The gene of factor is localized on the long arm of the X chromosome out occupies a region of 186 kbp, comprising of 26 exons and 25 introns. It consists of 2332 amino acids forming six domains described as A1-A2-B-A3-C1-C2. In blood, under the influence of proteolytic processes (furin protease), this protein is divided into two chains: a heavy chain of 200 kDa (A1-A2-B) and a light chain of 80 kDa (A3-C1-C2). In human plasma factor VIII can be in one of several forms with a molecular weight of 170–280 kDa and is present at a concentration of 0.1–0.2 µg/ml. Coagulation factor VIII in plasma forms complex with chaperone the von Willebrand factor, which stabilizes FVIII in the blood stream and is its key regulator as it allows thrombin to it activate and impedes cleavage of the molecules of nonactivated FVIII by the proteases FXa and activated protein C. The deficiency of factor VIII, either qualitative or quantitative, appears blood coagulation disorder is known as hemophilia A, a affecting approximately 1 in 5,000 newborns. To correct factor deficiency or prevent bleeding in patients with hemophilia A, the replacement therapy is carried out. This therapy involves administrating of plasma or recombinant preparations of factor VIII. A variety of plasma-derived and recombinant factor VIII preparations registered in Ukraine are used for haemophilia treatment in our country.

Keywords: coagulation factor VIII, mutation, hemophilia A, preparations of factor