Любушкин А.В., Гурьянова И.Е., Дмитриев Е.В.
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Liubushkin A., Guryanova I., Dmitriev E.
Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Генетическая основа гемофилии А

Genetic Base of Hemophilia A

Резюме

Молекулярно-генетические методы диагностики в настоящее время активно применяют для выявления наследственных нарушений системы свертывания крови. Одним из наиболее распространенных заболеваний является наследственный дефицит фактора свертывания крови VIII, снижение которого вызывает гемофилию А. Причиной возникновения гемофилии А, считают мутацию в гене, который кодирует синтез фактора свертывания крови VIII, что приводит как к количественному нарушению образования фактора, так и качественным изменениям в молекуле FVIII.

Различные типы генетических отклонений в гене F8 обуславливают различный фенотип заболевания. Гемофилия А – гетерогенное генетическое заболевание, которое связано с большим разнообразием генетических нарушений. Генетическое исследование гемофилии способствует лучшему пониманию биологии заболевания, выявлению носителей, установлению связи между генотипом и фенотипом, пренатальной диагностике и развитию новых терапевтических стратегий. В настоящее время известно, что нарушения в гене F8 могут коррелировать с клинической картиной заболевания и предоставлять важную информацию, связанную с вероятностью развития ингибиторов, тяжестью течения заболевания и склонностью к кровотечениям. Лабораторно-диагностическая точность в идентификации генетических отклонений при наследственных заболеваниях свертываемости крови зависит от генетической гетерогенности заболевания и используемого высокотехнологичного оборудования для молекулярно-генетического анализа. Применение высокопроизводительного секвенирования обеспечивает высокую диагностическую эффективность выявления генетических дефектов и способствует точной верификации диагноза и типа гемофилии.

Ключевые слова: гемофилия А, молекулярно-генетическая диагностика, генетические нарушения, инверсия 22-го интрона, инверсия 1-го интрона, ингибиторы.

Abstract

Molecular genetic diagnostic methods are currently actively used to diagnose hereditary disorders of the blood coagulation system. One of the most common diseases is hereditary deficiency of coagulation factor VIII, the deficiency of which causes hemophilia A. The cause of hemophilia A is generally believed to be a mutation in the gene that encodes the synthesis of coagulation factor VIII, which leads to both a quantitative disruption of the factor synthesis and qualitative changes in the FVIII molecule.

Different types of genetic abnormalities in the FVIII gene cause different phenotypes of the disease. Hemophilia A is a heterogeneous genetic disorder associated with a wide variety of mutations.

Genetic testing of hemophilia contributes to better understanding of the biology of the disease, identification of carriers, establishing the relationship between genotype and phenotype, prenatal diagnostics, and development of new therapeutic strategies. It is currently known that abnormalities in the FVIII gene can correlate with the clinical picture of the disease and provide important information related to probability of development of inhibitors, severity of the disease, and hemorrhagic tendency. Laboratory diagnostic accuracy in identifying genetic disorders in hereditary bleeding disorders depends on the genetic heterogeneity of the disease and high-tech equipment used for molecular genetic analysis. The use of next-generation sequencing ensures high diagnostic efficiency in detecting mutations and contributes to accurate verification of the diagnosis and type of hemophilia.

Keywords: hemophilia A, molecular genetic diagnostics, genetic defects, intron 22 inversion, intron 1 inversion, inhibitors.

■ ВВЕДЕНИЕ

Гемофилия А – это заболевание системы свертывания крови, характеризующееся преимущественно врожденным дефицитом фактора свертывания крови VIII, которое вызвано аномальными изменениями в гене, кодирующем белок фактора VIII (F8, OMIM 300841), что приводит к развитию клинических проявлений заболевания.

Наследственный дефицит фактора VIII (FVIII) является наиболее распространенным тяжелым врожденным нарушением свертываемости крови с различными клиническими проявлениями. Доказана прямая корреляционная связь между базовой активностью фактора VIII и тяжестью клинических проявлений: тяжелая степень заболевания (FVIII:C <1%), средняя (FVIII:C 1–5% от нормы) и легкая (FVIII:C >5 до <40%) [1]. Наиболее часто клиническими проявлениями заболевания страдают мальчики с тяжелой формой заболевания, что проявляется длительными кровотечениями в виде гематомного типа кровоточивости.

Дефицит фактора VIII представляет собой наиболее распространенное нарушение свертываемости крови, составляющее приблизительно 80% от всех типов гемофилии. Частота распространенности заболевания составляет 1 : 5000 новорожденных, гемофилии В – 1 : 60 000 новорожденных. Заболевание наследуется по X-сцепленному рецессивному типу, поэтому женщины являются носителями дефектного гена гемофилии, но клиническими проявлениями страдают редко. Около 30% случаев носят спорадический характер, обусловленный мутациями de novo и, следовательно, не имеют семейной истории болезни.

Большинство нарушений свертываемости крови, встречающихся в клинической практике, диагностируют с использованием стандартных рутинных лабораторных методов исследования по определению количественного содержания дефицитного фактора свертывания. Однако с момента открытия генов, кодирующих синтез факторов свертывания крови, в 1980-х гг. и методик по определению типа генетического отклонения был достигнут значительный прогресс в использовании этих знаний для диагностических и терапевтических целей. Выявление генетических дефектов у пациентов с гемофилией А имеет важное значение для понимания особенностей конкретного случая заболевания, а также для индивидуализации тактики проводимого лечения [1–3].

Постоянно растущий интерес к популяционной генетике и совершенствование методов секвенирования ДНК привели к очевидной активизации исследований в этой области и широкому внедрению молекулярно-генетических методов обследования в медицину.

Ген F8, кодирующий фактор VIII системы гемостаза, локализованный на длинном плече X-хромосомы (Xq28, chrX: 154,835,788-155,026,940, genome browser Ensembl), охватывает участок длиной порядка 186 тысяч пар нуклеотидов. Ген F8 состоит из 26 экзонов, которые различаются по размеру, в диапазоне от 69 п. н. (экзон 5) до 3106 п. н. (экзон 14, кодирующий большой B-домен фактора VIII, покрывающий примерно 40% кодирующей последовательности). Между экзонами локализованы 25 интронов, которые также различаются по размеру, охватывая расстояние от 200 до 32,5 т. п. н., шесть из которых имеют размер более 14 т. п. н. (интроны – 1, 6, 13, 14, 22 и 25). Длина кодирующей последовательности гена F8 составляет приблизительно 9 т. п. н.

Экспрессия гена F8 является тканеспецифичной и локализуется преимущественно в клетках печени. Наибольший уровень мРНК и белка F8 обнаружен в клетках эндотелиальной выстилки синусоидных капилляров печени. Однако мРНК и белок фактора VIII были идентифицированы и во многих других тканях человека, включая селезенку, легкие и почки. Помимо этого, значимые количества фактора VIII присутствуют в гепатоцитах и клетках Купфера [4–6].

Генетический профиль гемофилии А

Дефицит фактора VIII обусловлен широким спектром генетических нарушений, которые встречаются на протяжении всей последовательности гена F8. В настоящее время, по данным Factor VIII gene variant database, обнаружено порядка 3052 уникальных вариантов гена F8 (<https://f8-db.eahad.org/>) [7].

Геномные перестройки являются широко известной причиной генетических заболеваний и могут быть сформированы в результате различных механизмов. В силу своей патогенности такие генетические варианты связаны с тяжелым фенотипом гемофилии А. В настоящее время известно о нескольких грубых комплексных перестройках в гене F8. Примерно половина случаев тяжелых форм гемофилии А возникает в результате крупных генетических перестроек – инверсии 22-го интрона или инверсии 1-го интрона гена F8 (IVS-22 и IVS-1 соответственно) [5, 8, 9].

У 45% пациентов тяжелая форма гемофилии А возникает в результате инверсии 22-го интрона. Интрон 22 гена F8 содержит сегмент размером 9,5 т. п. н., который также присутствует вне последовательности гена, в теломерной области X-хромосомы в двух дополнительных копиях – int22h2 (проксимальный паттерн) и int22h3 (дистальный паттерн). Int22h1 – последовательность в интроне 22, локализованная в гене F8. Идентичность последовательностей трех областей составляет 99,9%. Инверсия 22-го интрона происходит в мужских половых клетках и вызвана внутрихромосомной гомологичной рекомбинацией между областью int22h-1 в локусе гена F8 и int22h-2 (инверсия 22-го интрона 2-го типа) либо int22h-3 (инверсия 22-го интрона 1-го типа), которые расположены приблизительно на 400 т. п. н. дистальнее гена F8 [10]. Рекомбинация происходит в результате пространственного сближения сегмента

Int22h1 с одним из сегментов, расположенных в теломерной области X-хромосомы (int22h-2 или int22h-3). В результате такой рекомбинации происходит изменение направления расположения большей части экзонов в гене F8, от 22-го к 1-му. Экзоны 23–26 остаются незатронутыми. В конечном итоге синтезируется неполноценный протеин, который не выходит из клеток и не может выполнять свою функцию в системе свертывания крови (рис. 1) [1].

Инверсия 1-го интрона – еще одна крупная генетическая аберрация, приводящая к развитию тяжелой гемофилии А примерно в 5% случаев. Патогенетический механизм, связанный с этим генетическим нарушением, включает гомологичную рекомбинацию между областью интрона 1 (int1h-1) гена F8 длиной 1041 п. н. и экстрагенной копией этой области (int1h-2), расположенной примерно на 140 т. п. н. теломернее гена фактора VIII (рис. 2) [11].

Инверсия 1-го и 22-го интрона предотвращает образование полно-размерной мРНК фактора VIII и создает дефицит белка VIII фактора свертывания, что в свою очередь приводит к тяжелой форме гемофилии А [12–16].

При тяжелой форме гемофилии А крупные генетические изменения (включая большие делеции или вставки), небольшие вставки или делеции, приводящие к сдвигу рамки считывания и изменениям в сайтах сплайсинга, а также нонсенс- и миссенс-мутации гена F8 составляют примерно 50% выявляемых мутаций.

Вставки и делеции, вызывающие тяжелую форму гемофилии А, могут быть крупными (более 50 п. н.) или затрагивать несколько нуклеотидов. Большие делеции гена наблюдаются примерно у 5% пациентов с тяжелой гемофилией А. Вставки и делеции одиночных нуклеотидов, обнаруживаемые на протяжении всего гена F8, могут приводить к сдвигу рамки считывания с образованием преждевременного стоп-кодона, тем самым вызывая тяжелую форму заболевания. У небольшой части пациентов генетические дефекты, вызывающие тяжелую или легкую формы гемофилии А, могут лежать в интронной части гена F8 и приводить к созданию новых участков сплайсинга глубоко в интронах [16–19].

Рис. 1. Схематический вид инверсии 22-го интрона [1]

Fig. 1. Schematic view of intron 22 inversion [1]

Рис. 2. Схематическое изображение инверсии 1-го интрона [11]

Примечания: А – гомологичная область интрона 1, расположенная во внутригенной (int1h-1) и экстрагенной (int1h-2) области; В – гомологичная рекомбинация происходит между int1h-1 и int1h-2; С – результат инверсии интрона 1 приводит к отсутствию синтеза соответствующего белка фактора VIII.

Fig. 2. Schematic view of intron 1 inversion [11]

Notes: A – homologous region of intron 1 located in the intragenic (int1h-1) and extragenic (int1h-2) regions; B – homologous recombination occurs between int1h-1 and int1h-2; C – the result of inversion of intron 1 leads to the absence of synthesis of the corresponding factor VIII protein.

Точечные мутации являются наиболее распространенным типом генетических нарушений, вызывающих гемофилию А. Они ассоциированы с различными формами тяжести заболевания и расположены по всему гену F8. Все точечные мутации можно разделить на следующие четыре группы: миссенс- и нонсенс-мутации, синонимичные замены и мутации в сайтах сплайсинга. Что касается типа и локализации мутации, то в настоящее время известно о различных механизмах, посредством которых они влияют на белок фактора VIII. Некоторые точечные мутации препятствуют связыванию фактора VIII с различными лигандами каскада свертывания и приводят к снижению функции или полному отсутствию синтеза фактора VIII. Другие точечные мутации нарушают экспрессию, транспортировку через клетку, а также активность и стабильность VIII фактора свертывания [5, 20, 21].

Генетические факторы, участвующие в развитии ингибиторов

В настоящее время известно, что тип нарушений в гене F8 коррелирует с клинической картиной заболевания и предоставляет важную информацию, связанную с развитием ингибиторов, тяжестью течения заболевания и склонностью к кровотечениям [5].

Основным методом терапии гемофилии в настоящее время является заместительная терапия концентратами соответствующих факторов свертывания крови. Развитие аллоантител к FVIII, называемых ингибиторами, является одним из самых серьезных и грозных осложнений при лечении гемофилии. Появление аллоантител приводит к частичному или полному инактивированию экзогенного FVIII. Инактивация экзогенного фактора свертывания крови сопровождается снижением

коагуляционного ответа на введение лекарственных средств и невозможностью остановки кровотечения. Ингибиторная форма заболевания развивается у 35% от всех пациентов с тяжелой гемофилией А и 3–5% при гемофилии В. Риск развития ингибиторов у ранее не леченных пациентов с гемофилией А коррелирует с типом мутации гена фактора свертывания крови VIII, а также, вероятно, с генетическими нарушениями компонентов иммунной системы [22, 23].

Выделяют две основные группы изменений гена F8 в контексте развития ингибиторов: мутации с высоким риском развития ингибиторов (нулевые мутации – большие делеции, инверсии 1-го и 22-го интронов, а также нонсенс-мутации), которые обычно связаны с отсутствием циркулирующего антигена и фенотипически связаны с тяжелой формой гемофилии А и мутации с низким риском развития ингибиторов (миссенс-мутации и небольшие делеции или вставки), нарушающие функциональность белка фактора VIII и фенотипически ответственные за легкую или умеренную формы гемофилии А. При больших делециях, затрагивающих более 1 домена, частота образования ингибиторов достигает 88%. Напротив, частота ингибиторов снижается до 5% в случае миссенс-мутаций и небольших делеций или вставок. Другие типы мутаций, охватывающие профиль мутации F8, предрасполагают к образованию ингибитора в диапазоне от 17 до 41%. Точечные мутации, связанные с ингибиторами, распределены неслучайным образом в гене F8. Ингибиторы чаще встречаются у пациентов с мутациями, сгруппированными в легкой цепи (домены A3, C1 и C2), чем с мутациями в тяжелой цепи (A1 и A2). Кроме того, риск образования ингибитора выше, если аминокислота относится к другому физико-химическому классу, чем исходная [5, 24, 25].

Генетическая диагностика гемофилии А

Как правило, молекулярно-генетическая диагностика гемофилии А начинается со скрининга по определению наличия инверсий 22-го и 1-го интронов (IVS-22 и IVS-1 соответственно) у пациентов с тяжелой формой с использованием надежных методов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Выявление точечных мутаций посредством прямого секвенирования кодирующей области гена F8 выполняют пациентам с тяжелой формой гемофилии А, у которых был отрицательный результат по IVS-22/IVS-1, и пациентам с легкой или умеренной формами гемофилии А. Прямое секвенирование экзонов и прилегающих к ним сплайс-сайтов выполняется в соответствии со стандартными протоколами. Этот подход обычно выполняется с помощью ПЦР-амплификации и секвенирования по Сэнгеру. В случае отрицательных результатов проводится MLPA-анализ (Multiplex ligation-dependent probe amplification) для обнаружения больших дупликаций. В последнее время секвенирование нового поколения (next generation sequencing, NGS) также используется для определения последовательности гена F8 и постепенно внедряется в рутинную диагностику. При таком подходе генетический дефект может быть идентифицирован у 97% пациентов. NGS-секвенирование с применением таргетных диагностических панелей генов, участвующих в развитии наследственных коагулопатий, позволяет одновременно исследовать большое количество фрагментов гена, даже если они охватывают очень обширные области (рис. 3) [5, 26–28].

Рис. 3. Алгоритм генетической диагностики гемофилии А [26]

Fig. 3. Algorithm of genetic diagnostics of hemophilia A [26]

Секвенирование нового поколения с высокой пропускной способностью произвело революцию в секвенировании ДНК, позволив одновременно быстрое исследование гена при разумных затратах. Практическая ценность этого метода генетического тестирования была продемонстрирована при генетической диагностике редких нарушений свертываемости крови [29, 30]. При гемофилии А молекулярное тестирование позволяет поставить точный диагноз, преодолевая вариабельность и противоречивые данные, полученные с помощью более старых методов, основанных на количественной оценке факторов свертывания крови.

При легком дефиците фактора VIII, когда генетический дефект в гене F8 не идентифицирован, причина фенотипа гемофилии А может быть связана с дефектами во взаимодействующих партнерах белка фактора VIII. Комбинированный дефицит факторов V и VIII из-за мутаций в генах LMAN1 и MCFD2 может имитировать легкую форму гемофилии А, если активность фактора V ранее не исследовалась. Болезнь Виллебранда типа 2N трудно отличить от легкой формы гемофилии, если не будут проведены подробные исследования, такие как анализ связывания фактора VIII. Наконец следует принять во внимание ошибочную диагностику гемофилии из-за первоначальных неверных измерений активности фактора VIII [5, 26, 31, 32].

Таким образом, изучение генетического профиля пациентов с гемофилией А способствует лучшему пониманию биологии заболевания и предоставляет важную информацию, необходимую для выбора типа терапии. Успех выявления генетических нарушений при гемофилии А зависит как от типа проведенного молекулярного анализа, так и от генетической гетерогенности заболевания. Применение генетического тестирования позволит повысить качество оказания медицинской помощи, улучшить условия жизни пациентов и снизить затраты на лечение пациентов с гемофилией А.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Gholami M.S. (2018) Hemophilia A. *Congenital Bleeding Disorders*, vol. 4, pp. 103–137.
2. Kadhim K.A.R., Al-Lami F.H., Baldawi K.H. (2019) Epidemiological Profile of Hemophilia in Baghdad-Iraq. *INQUIRY*, vol. 56, pp. 1–8.
3. Inaba H. (2017) Identification of deep intronic individual variants in patients with hemophilia A by next-generation sequencing of the whole factor VIII gene. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, vol. 1, no 2, pp. 264–274.
4. Orlova N.A., Kovnir S.V., Vorobie I.I. (2013) Blood Clotting Factor VIII: From Evolution to Therapy. *Acta naturae*, vol. 5, no 2, pp. 19–39.
5. Oldenburg J. (2014) Historical review on genetic analysis in hemophilia A. *Seminars in Thrombosis & Hemostasis*, vol. 40, no 8, pp. 895–902.
6. Terrauve V., O'donnell J.S., Jenkins P.V. (2010) Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia*, vol. 16, pp. 3–13.
7. Factor VIII Gene (F8) Variant Database [electronic resource]. Available at: <https://f8-db.eahad.org/> (accessed April 30, 2021).
8. Bagnall R.D. (2002) Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*, vol. 99, no 1, pp. 168–174.
9. Leuer M. et al. (2001) Somatic Mosaicism in Hemophilia A: A Fairly Common Event. *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 69, pp. 75–87.
10. Ppruthi R.K. (2005) Hemophilia: A Practical Approach to Genetic Testing. *Genetics in clinical practice*, vol. 80, no 11, pp. 1485–1499.
11. Hwang S.H., Kim H.J., Kim H.S. (2012) Profiling of Mutations in the F8 and F9, Causative Genes of Hemophilia A and Hemophilia B. *Hemophilia*, pp. 1–16.
12. Beskorovainaya T.S., Milovidova T.B., Shchagina O.A. (2016) DNA diagnostics in Russian hemophilia patients with new medical technology "Detection system for F8 Intron 22 inversion". *Medical Genetics*, vol. 15, no 3, pp. 23–29.
13. Bagnall R.D., Giannelli F., Green P.M. (2006) Int22h-related inversions causing hemophilia A: a novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 4, pp. 591–598.
14. Rossett L.C. (2008) Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 6, pp. 830–836.
15. Faridi N.J., Kumar P., Husain N. (2012) Prevalence of Intron 1 Inversion of Cases With Hemophilia A in North Indian Population. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, vol. 18, no 6, pp. 599–603.
16. Castaldo G. (2007) Haemophilia A: molecular insights. *Clin Chem Lab Med*, vol. 45, no 4, pp. 450–461.
17. Gouw S.C. (2012) F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood*, vol. 119, pp. 2922–2934.
18. Rossetti L.C. (2005) Genotyping the Hemophilia Inversion Hotspot by Use of Inverse PCR. *Clinical Chemistry*, vol. 51, no 7, pp. 1154–1158.
19. You G. (2014) Identification and characterization of a novel aberrant pattern of intron 1 inversion with concomitant large insertion and deletion within the F8 gene. *Thromb Haemost*, vol. 112, no 2, pp. 264–270.
20. Graw J. (2005) Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nature*, vol. 6, pp. 488–501.
21. Oldenburg J., Zeitler H., Pavlova A. (2010) Genetic markers in acquired haemophilia. *Haemophilia*, vol. 16, pp. 41–45.
22. Brasi C. (2014) Genetic testing in bleeding disorders. *Haemophilia*, vol. 20, no 4, pp. 54–58.
23. Margaglione M., Intriери M. (2018) Genetic Risk Factors and Inhibitor Development in Hemophilia: What Is Known and Searching for the Unknown. *Semin Thromb Hemost*, vol. 44, no 6, pp. 509–516.
24. Schwaab R. (2013) Significance of F8 missense mutations with respect to inhibitor formation. *Thromb Haemost*, vol. 109, pp. 464–470.
25. Tantawy A.G. (2010) Molecular genetics of hemophilia A: Clinical perspectives. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, vol. 11, pp. 105–114.
26. Bastida J.M. (2017) Application of a molecular diagnostic algorithm for haemophilia A and B using next-generation sequencing of entire F8, F9 and VWF genes. *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 26, no 1, pp. 66–74.
27. Salviato R. (2019) High resolution melting for F9 gene mutation analysis in patients with haemophilia B. *Blood Transfus*, vol. 17, pp. 72–82.
28. Salazar-Sánchez L. (2010) Molecular analysis of FVIII gene in severe HA patients of Costa Rica. *Haemostaseologie*, vol. 4, pp. 150–152.
29. Bastida J.M. (2016) Design and application of a 23-gene panel by next-generation sequencing for inherited coagulation bleeding disorders. *Haemophilia*, vol. 22, pp. 590–597.
30. Battle J. (2016) Molecular and clinical profile of von Willebrand disease in Spain (PCM-EVW-ES): Proposal for a new diagnostic paradigm. *Thromb Haemost*, vol. 115, no 1, pp. 40–50.
31. Villarreal-Martínez L. (2020) Molecular genetic diagnosis by next-generation sequencing in a cohort of Mexican patients with haemophilia and report of novel variants. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, vol. 83, pp. 1–6.
32. Jayandharan G.R. (2012) Role of molecular genetics in hemophilia: from diagnosis to therapy. *Seminars in Thrombosis & Hemostasis*, vol. 38, no 1, pp. 64–78.

Подана/Submitted: 31.05.2021

Принята/Accepted: 12.07.2021

Контакты/Contacts: aleksandr.liubushkin@gmail.com