



Редки Болести и Лекарства Сираци

Брой 1 / 2023 г.

ISSN 1314-3581
<http://journal.raredis.org>

Генетично профилиране при български пациенти с хемофилия А и В – случаи от нашата практика

Тихомир Тодоров¹, Анастасия Орманджиева¹,
Албена Тодорова^{1,2}

¹ Генетична медико-диагностична лаборатория „Геника“, София
² Катедра по Медицинска химия и биохимия, Медицински факултет,
Медицински университет – София

Резюме

Въведение: Хемофилията е генетично заболяване с Х-свързано рецесивно унаследяване, при което е нарушено кръвосъсирването, засяга основно мъже. В зависимост от засегнатия ген се дели на два вида – хемофилия А (*F8* ген) и хемофилия В (*F9* ген). Според нивата на коагулационния фактор (фактор VIII/IX), хемофилията може да бъде лека (5–40%), средно тежка (1–5%) или тежка форма (пог 1%).

Цел: Целта на настоящото изследване е да се направи генетично профилиране на български пациенти, диагностицирани с хемофилия А и В. Представени са 3 клинични случая на хемофилия А и един на хемофилия В.

Материал и методи: За хемофилия А са изследвани 75 индивиди от 36 семейства, а за хемофилия В – 11 индивиди от 6 семейства. Изолирана е геномна ДНК и е извършено класическо Sanger секвениране на гените *F8* (26 екзона), *F9* (8 екзона). За изследване на инверсия в интрон 22 в *F8* гена е извършена лигазно-зависима амплификация.

Резултати: Представените четири клинични случая са от интерес поради важноста на установените мутации за целите на пренаталната диагностика и за подготовка на пациентите за генна терапия в бъдеще.

Заклучение: Изясняването на хемофилията на генетично ниво е от изключителна важност за разработването на нови терапевтични подходи и планирането на проследяване на новородените с наследствени генетични дефекти, както и за целите на пренаталната диагностика.

Ключови думи: хемофилия А, хемофилия В, генетично профилиране, *F8* ген, *F9* ген

Genetic profiling in Bulgarian patients with haemophilia A and B – cases from our practice

Tihomir Todorov¹, Anastasia Ormandjieva¹,
Albena Todorova^{1,2}

¹ Genetic Medico-Diagnostic Laboratory “Genica”, Sofia
² Department of Medical Chemistry and Biochemistry,
Faculty of Medicine, Medical University of Sofia

Abstract

Introduction: Haemophilia is a genetic disease with an X-linked recessive inheritance. It is a bleeding disorder that affects mainly males. There are two types of haemophilia, depending on the affected gene – haemophilia A (*F8* gene) and haemophilia B (*F9* gene). According to the coagulation levels of factor VIII/IX, haemophilia can be mild (5–40%), moderate (1–5%), or severe (less than 1%).

Aim: The aim of the present study is to perform genetic profiling of Bulgarian patients diagnosed with haemophilia A and B. Presented are three clinical cases of haemophilia A and one of haemophilia B.

Material and methods: In total, 75 individuals from 36 families were examined for haemophilia A and for haemophilia B – 11 individuals from 6 families. Genomic DNA was isolated, and 26 exons from *F8* gene and 8 exons from *F9* gene were sequenced with Sanger sequencing. Ligase-dependent amplification was performed to investigate *inversion in intron 22* in the *F8* gene.

Results: The four presented clinical cases are of interest due to the importance of the detected mutations for the purposes of prenatal diagnostics and for future gene therapy of the affected patients.

Conclusion: Elucidating haemophilia at the genetic level is of utmost importance for the implementation of new therapeutic approaches and the postnatal care of newborns with inherited genetic defects, as well as for the purposes of prenatal diagnostics.

Keywords: haemophilia A, haemophilia B, genetic profiling, *F8* gene, *F9* gene

Кореспонденция:

Проф. Албена Тодорова, гбн
e-mail: todorova_albena@abv.bg

Correspondence:

Prof. Albena Todorova, DSc
e-mail: todorova_albena@abv.bg

Въведение

Хемофилия А и В са редки генетични заболявания, с увредена каскада на коагулация, поради което настъпва спонтанно кървене. Хемофилия А се дължи на мутации в гена, който кодира фактор VIII (*F8*), а при хемофилия В е засегнат генът за фактор IX (*F9*) [1]. Тежестта на заболяването се определя спрямо плазмените нива на активност на фактор VIII и фактор IX. Леката форма е с 5-40% ниво на коагулационния фактор, средно тежката форма – 1 до 5% и тежката форма с <1% [2]. Честотата на хемофилия А е 1 на 5 000 засегнати момчета, а хемофилия В е 1 на 30 000 [3].

Унаследяването при хемофилията е X-свързано рецесивно, като класически фенотип се наблюдава при момчетата, а жените обикновено са носителки без проява на симптоми. При здрави жени едната X хромозома е инактивирана на случаен принцип, а при жени с X-свързани заболявания тази инактивация е селективна, като преобладава експресията на незасегнатата X хромозома. В някои случаи инактивацията е в полза на засегнатата X хромозома, това са т.нар. изявени носителки, при които може да се наблюдава от лека до сравнително тежка клиника [4].

Гените *F8* и *F9* са разположени близо един до друг в терминалния участък на X хромозомата – Xq28 и Xq27.1. Генът за фактор VIII е по-голям, състои се от 26 кодиращи региона, като екзон 14 е най-голям. Освен това, *F8* е с обрната локализация, той не върви от центромер към теломер както повечето гени, а в обратна посока. Най-честите мутации са инверсията в интрон 22, инверсията в интрон 1 и точковите мутации в екзон 14, които са установени при най-тежките форми на заболяването [5]. При *F9* гена, екзон 8 е „гореща точка“ за мутации [6].

Изборът на генетично изследване зависи от типа и тежестта на хемофилията. Мутациите са различни при различните форми на заболяването – при тежката форма могат да бъдат инверсии, делеции и дупликации, както и nonsense, и frameshift мутации, а при средно тежката и леката – токови мутации от типа missense [7].

Материал и методи

За целта на настоящото проучване бяха изследвани 75 индивида от 36 семейства за хемофилия А и 11 индивида от 6 семейства за хемофилия В (Таблица 1). Настоящото проучване е в съответствие с етичните правила на участващите институции. Получено е информирано съгласие за генетично изследване от всички индивиди, които са взели участие.

Изолиране на ДНК и полимеразна верижна реакция (PCR)

Изолирана е геномна ДНК от периферна венозна кръв със солеви метод. За изследване на мутациите във *F8* гена е извършена амплификация на всичките 26 екзона, включително фланкиращите интронни региони с 50-100 ng от изолираната ДНК. Използваните праймери и PCR програма са описани в предишно изследване [8]. За изследване на инверсия в интрон 22 (*inv i22*) в *F8*, е използвана лигазно-зависима амплификация със следния протокол: фрагментиране на ДНК, преутаяване, лигиране, преутаяване, PCR, визуализация с агарозна гел електрофореза [9]. За изследване на мутациите във *F9* гена е извършена амплификация на 8 кодиращи региона.

Таблица 1. Изследвани за хемофилия семейства

	Хемофилия А	Хемофилия В
Изследвани семейства	36	6
Изследвани индивиди	75	11
Индексни пациенти	23	5
Извършени дородови изследвания	10	3
Нормални мъже	7	1
Жени носителки	1	2
Засегнати мъже	1	1
Открит молекулен дефект	20	5
<i>inv i22</i>	13	-
нуклеотидна замяна	7	5
Неизяснени фамилии	16	1

Секвениране и анализ

PCR продуктите са секвенирани по Sanger с ABI PRISM Dye terminator cycle секвенционен kit (Applied Biosystems, USA), а секвенирането е извършено на автоматичен секвенатор ABI3130 (Applied Biosystems, USA).

Резултати

Установени са 20 семейства с молекулни дефекти при хемофилия А, 13 от тях са *inv i22*, а 7 – нуклеотидна замяна. Инверсия в интрон 22 се наблюдава при 10 пациента, 1 майка и 2 лели. Нуклеотидните замени са установени при 2 пациента, 2 дъщери, 2 майки и 1 сестра. Те са в екзон 16 (с.5405A>G, р.Tyr1783Cys), екзон 15 (с.5519+1_5220-1del), екзон 14 (с.2665G>T, р.Glu889Ter), екзон 12 (с.1756A>G, р.Met586Val), екзон 11 (с.1726G>T, р.Glu576Ter) и екзон 4 (с.541G>T, р.Val162Leu).

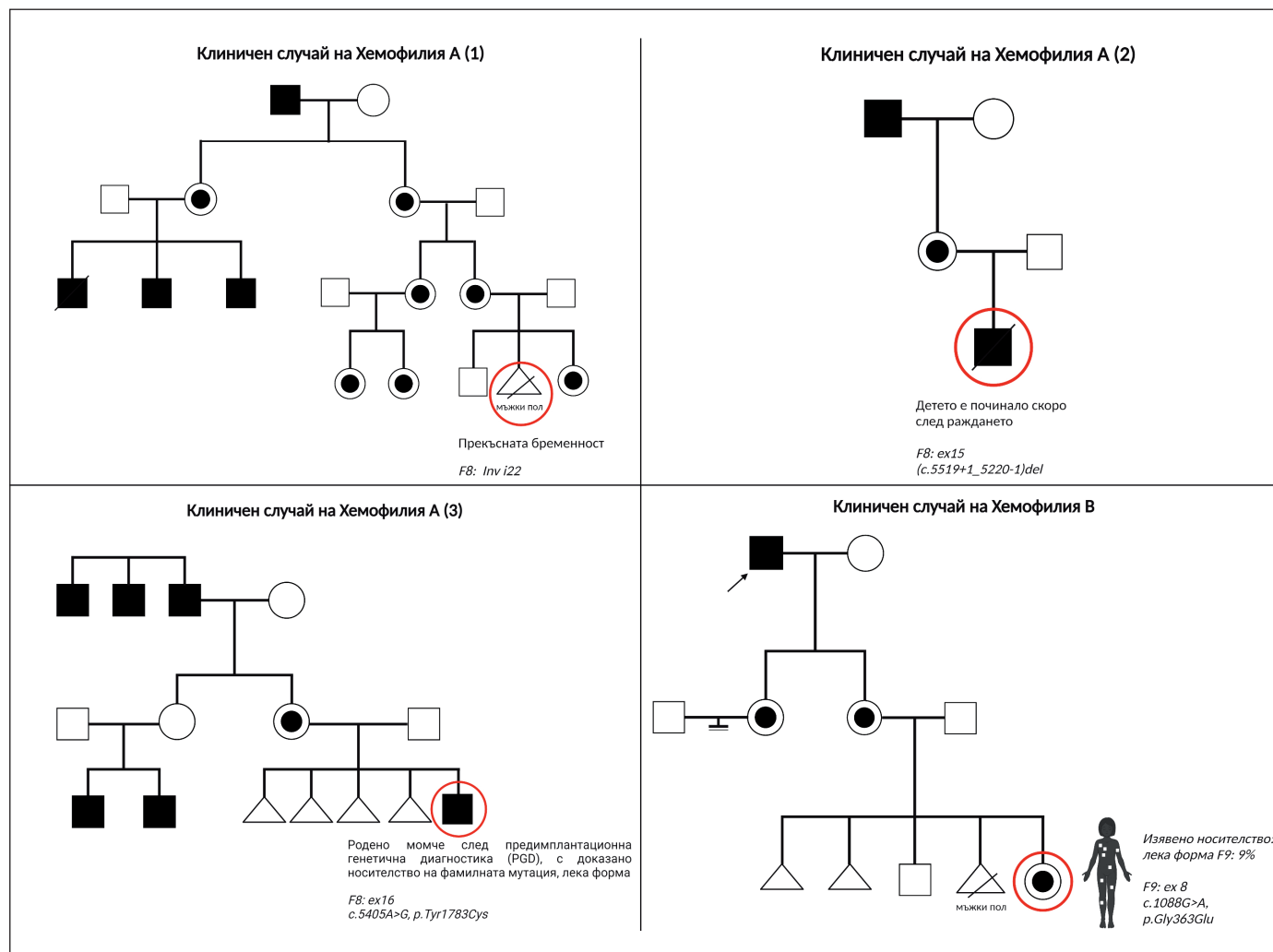
При хемофилия В са установени нуклеотидни замени при 5 пациента от 5 неродствени семейства. В екзон 2 (с.127C>T, р.Arg43Trp), интрон 4 (с.391+4A>G), екзон 5 (с.487G>A, р.Gly160Arg), екзон 6 (с.676C>T, р.Arg180Trp) и екзон 8 (с.1088G>A, р.Gly363Glu).

Клиничен случай на хемофилия А (1)

В първия клиничен случай на хемофилия А (Фигура 1) се касае за фетус от мъжки пол с установена *inv i22* на *F8* гена. Това е втора бременност на майката носител и е прекъсната по медицински причини след доказване на мутацията. При първата бременност се ражда здраво момче, но след възникнали усложнения. Майката кърви обилно дълго време и престоят ѝ в болницата е 10 дни. При третата бременност се ражда здраво момиче – носител, но раждането отново е тежко с тежък следродов период. Майката и сестра ѝ имат трима братовчеди с хемофилия А, като един от тях е починал. При планиране на бременност, те се интересуват от риска техните деца да унаследят заболяването и първоначално единият от братовчедите се изследва и се установява мутацията – *inv i22* в *F8* гена. След пренатална диагностика, сестрата на майката ражда две момичета – носителки, без проява на симптоми.

Клиничен случай на хемофилия А (2)

Вторият клиничен случай на хемофилия А (Фигура 1) е на новородено от мъжки пол, починало 24 часа след раждането.



Фигура 1. Родословие на представените клинични случаи на хемофилия А и В

След аутопсия се установява, че причината за смъртта е възникнал спонтанен кръвоизлив в коремната кухина. Майката е носител на мутация (делеция на екзон 15 на *F8* гена – *F8: ex 15(c.5519+1_5220-1del)*). Мутацията е унаследена от баща ѝ, диагностициран с тежка форма на хемофилия А.

Клиничен случай на хемофилия А (3)

Третият клиничен случай на хемофилия А (Фигура 1) е на момче, родено след предимплантационна генетична диагностика (PGD). Момчето е с доказано носителство на унаследената от майката мутация в екзон 16 на *F8* гена (*c.5405A>G, p.Tyr1783Cys*). Преди да се роди, направените опити за *in vitro* оплождане са неуспешни, като всички ембриони са анеуплоидни. Взето е решение за *in vitro* процедури, тъй като майката е имала няколко неуспешни опита за забременяване. Поради напредналата възраст на майката е инплантиран въпросният ембрион от мъжки пол, като роденото момче е с лека форма на хемофилия А. Мутацията, унаследявана в няколко поколения на това семейство, представлява “missense” мутация („доброкачествена“).

Клиничен случай на хемофилия В

При клиничния случай на хемофилия В (Фигура 1) се касае за момиче с изявено носителство на унаследена от майката – носител мутация в екзон 8 на *F9* гена (*c.1088G>A, p.Gly363Glu*). Момичето е с лека форма на хемофилия А (нивото на фактор IX е 9%), това е трета бременност. Преди това, майката – носител на мутацията има два спонтанни аборта. След пренатална диагностика ражда здраво момче. Следващата бременност е прекъсната по медицински показания – засегнат от мутацията ембрион от мъжки пол. Майката има сестра, която също е носител и претърпява два спонтанни аборта с обилно кървене и един неуспешен опит за забременяване с *in vitro* процедура.

Обсъждане

Хемофилия А и В са X-свързани рецесивни заболявания и класически фенотип се наблюдава при момчета, но момчетата могат да бъдат „изявени носители“ при възникване на не-случайна X-инактивация. Генетичната диагностика на хемофилията се базира на нивата на фактор VIII и фактор IX и съответно тежестта на клиничната изява. Генетичната диагностика на заболяването включва различни техники за откриване на различните видове генетични дефекти във всеки ген: за инверсии, за точкови мутации, за големи делеции и дупликации.

Заклучение

Изясняването на генетичния дефект е от изключителна важност за разработване на нови терапевтични подходи

и за целите на пренаталната диагностика. Пренаталната диагностика е важна, за да се планира рогоразрешаването и специализираното проследяване на новороденото, с цел да се избегнат фатални последици.

Благодарности

Фигура 1 е направена с BioRender.com.

Библиография

1. Castaman G, Matino D. Hemophilia A and B: molecular and clinical similarities and differences. *Haematologica*. 2019 Aug 31;104(9):1702.
2. Blanchette VS, Key NS, Ljung LR, et al. Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2014 Nov 1;12(11):1935–9.
3. Berntorp E, Shapiro AD. Modern haemophilia care. *Lancet*. 2012 Apr 14;379(9824):1447–56.
4. Shvetsova E, Sofronova A, Monajemi R, et al. Skewed X-inactivation is common in the general female population. *Eur J Hum Genet*. 2018 Dec 14;27(3):455–65.
5. Gene: F8 (ENSG00000185010) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 109.
6. Gene: F9 (ENSG00000101981) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 109.
7. Pavlova A, Oldenburg J. Defining severity of hemophilia: More than factor levels. *Semin Thromb Hemost*. 2013; 39(7):702–10.
8. Bogdanova N, Markoff A, Pollmann H, et al. Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with severe hemophilia A. *Hum Mutat*. 2005 Sep 1; 26(3):249–54.
9. Атанасов В, Николова С, Въжарова Р и съавт. Скрининг за инверсия (*Inp 22*) в гена за коагулационен фактор VIII при български пациенти с тежка форма на хемофилия А. *Science & Technologies*. 2017;8(3): 153–61.