

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 28.02.2023
Принята к печати 28.03.2023

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-48-57

Молекулярно-генетическая диагностика в группе пациентов с гемофилией А в Республике Беларусь: 12 новых аллельных вариантов в гене *F8*

А.В. Любушкин^{1,2}, И.Е. Гурьянова^{1,2}, Е.В. Дмитриев¹, В.Р. Вертелко¹, Е.А. Полякова^{1,2}, Л.И. Волкова³, О.В. Алейникова⁴

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Республика Беларусь, Минский район, д. Боровляны

²УО «Белорусский государственный медицинский университет», Республика Беларусь, Минск

³УО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» Минздрава Республики Беларусь, Республика Беларусь, Минск

⁴ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Контактная информация:

Любушкин Александр Владимирович,
младший научный сотрудник лаборатории
молекулярно-генетических исследований
научного отдела ГУ «Республиканский
научно-практический центр детской
онкологии, гематологии и иммунологии»,
Республика Беларусь
Адрес: Республика Беларусь, 223053,
Минский район, д. Боровляны,
ул. Фрунзенская, 43
E-mail: aleksandr.liubushkin@gmail.com

Гемофилия А является наиболее распространенным тяжелым нарушением свертываемости крови, обусловленным различными генетическими нарушениями в гене *F8*, приводящими к дефициту VIII фактора свертывания крови. Гемофилия А характеризуется крайне высокой гетерогенностью в отношении генетических нарушений. Степень тяжести гемофилии А варьирует в зависимости от типа нарушения в гене *F8*. Идентифицировано и описано более 3000 уникальных вариантов гена *F8*, ассоциированных с фенотипом гемофилии А. При этом примерно 30% генетических нарушений возникают *de novo*. Цель настоящего исследования – определить спектр генетических нарушений в гене *F8* у детей и подростков с гемофилией А в Республике Беларусь. Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь). В исследование были включены 98 пациентов с клиническим диагнозом гемофилии А, находившихся на обследовании и лечении в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь). В зависимости от тяжести заболевания распределение пациентов было следующим: 82 пациента – с тяжелой, 3 – со среднетяжелой и 13 – с легкой формой гемофилии А. У 20 (20,4%) пациентов в анамнезе имелись данные о развитии ингибиторов к VIII фактору свертывания крови. Материалом исследования послужила венозная кровь. Геномную ДНК выделяли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции из полученной суспензии лейкоцитов. Всем пациентам с тяжелой формой гемофилии А выполняли предскрининг на наличие инверсии 22-го и 1-го интронов гена *F8* методами инвертированной и мультиплексной полимеразной цепной реакции соответственно. Секвенирование кодирующих областей гена *F8* проводили методом высокопроизводительного секвенирования. Все клинически значимые изменения в нуклеотидной последовательности подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру. В результате проведенного исследования генетические нарушения в гене *F8* были обнаружены у 99% ($n = 97$) пациентов с гемофилией А. Инверсии 22-го и 1-го интронов гена *F8* были детектированы у 45,1% ($n = 37$) и 1,2% ($n = 1$) пациентов с тяжелой формой гемофилии А соответственно. У 2 пациентов выявлен аномальный паттерн инверсии 1-го интрона, ранее не описанный в литературе. Высокопроизводительное секвенирование выявило 48 различных генетических нарушений в гене *F8* у 57 пациентов. Из 48 обнаруженных генетических нарушений 11 ранее не были описаны в литературных источниках.

Ключевые слова: гемофилия А, ген *F8*, генетические нарушения, молекулярно-генетическая диагностика

Любушкин А.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 48–57. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-48-57

Molecular genetic diagnosis in the group of hemophilia A patients in Belarus: 12 new allelic variants in the *F8* gene

A.V. Liubushkin^{1,2}, I.E. Guryanova^{1,2}, E.V. Dmitriev¹, V.R. Vertelko¹, E.A. Polyakova^{1,2}, L.I. Volkova³, O.V. Aleinikova⁴

¹The Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, the Republic of Belarus, Minsk Region, Borovlyany

²Belarusian State Medical University, the Republic of Belarus, Minsk

³The Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education of Ministry of Health of the Republic of Belarus, the Republic of Belarus, Minsk

⁴The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 28.02.2023

Accepted 28.03.2023

Hemophilia A is the most common severe bleeding disorder caused by various genetic changes in the *F8* gene, leading to coagulation factor VIII deficiency. Hemophilia A is characterized by high heterogeneity of genetic defects. The severity of hemophilia A varies depending on the type of genetic defects in the *F8* gene. More than 3000 unique variants of the *F8* gene are associated with the hemophilia A. Approximately 30% of genetic defects occur *de novo*. The aim of this study is to determine the spectrum of genetic defects in the *F8* gene in children with hemophilia A in Belarus. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (the Republic of Belarus). The study included 98 patients with hemophilia A, who had been treated or followed up at the Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (the Republic of Belarus). Patients were categorized into 3 groups based on the severity of their disease: severe ($n = 82$), moderate ($n = 3$), and mild ($n = 13$). Twenty (20.4%) patients had a history of inhibitors to factor VIII. For our study, we used venous blood samples. Genomic DNA was isolated from leukocyte suspension (obtained from the whole blood samples) using phenol-chloroform extraction. All severe hemophilia A patients were prescreened for intron 22 and 1 inversions in the *F8* gene using inverse and multiplex polymerase chain reaction assays, respectively. Sequencing of *F8* coding regions was carried out by next generation sequencing. All clinically relevant variants were confirmed by Sanger sequencing. Genetic testing revealed that 99% of the patients with hemophilia A ($n = 97$) had pathogenic variants in the *F8* gene. Intron 22 and intron 1 inversion mutations within the *F8* gene were detected in 45.1% ($n = 37$) and 1.2% ($n = 1$) patients with severe hemophilia A, respectively. Two patients had an abnormal pattern of intron 1 inversion, not previously described in the literature. A total of 48 different variants in the *F8* gene were detected in 57 patients using next generation sequencing. Eleven of the 48 genetic variants identified have not been previously reported.

Key words: hemophilia A, *F8* gene, genetic defects, molecular genetic diagnosis

Liubushkin A.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 48–57.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-48-57

Среди коагулопатий наследственного генеза наиболее распространенным тяжелым заболеванием является гемофилия А с X-сцепленным рецессивным типом наследования [1–3]. Частота встречаемости гемофилии А оценивается около 1 случая на 5000 новорожденных мальчиков [4]. Причиной гемофилии А являются различные дефекты гена *F8* (OMIM #306700), приводящие к дефициту VIII фактора свертывания крови (FVIII). В зависимости от остаточной активности FVIII (FVIII:C) гемофилию А подразделяют на тяжелую (FVIII:C < 1%), среднетяжелую (FVIII:C 1–5%) и легкую (FVIII:C > 5%) формы [3, 4]. Пациенты с наследственной формой гемофилии А матери, как правило, являются гетерозиготными носителями 1 мутантного аллеля гена *F8*, ввиду чего также имеют пониженные уровни FVIII в крови, приводящие к легкому фенотипу гемофилии А [3].

Ген *F8* картирован на теломерном конце X-хромосомы в локусе Xq28, состоит из 25 интронов и 26 экзонов и имеет протяженность 186 тыс. пар нуклеотидов. Кодировочная часть включает 2332 аминокислотных остатка, формирующих структурные домены A1–A2–B–A3–C1–C2 [2, 4]. Домены A1–A2–B входят в состав тяжелой цепи, а домены A3–C1–C2 – в состав легкой цепи зрелого FVIII [5]. Высокое содержание GC-оснований делает ген *F8* подверженным к возникновению спонтанных аллельных вариантов в момент дробления зиготы, поэтому примерно в 30% случаев гемофилия А возникает в результате нарушений *de novo* [2].

Известно более 3000 уникальных вариантов в гене *F8*, ассоциированных с фенотипом гемофилии А [6], включающих миссенс- и нонсенс-мутации, мутации в сайтах сплайсинга, небольшие вставки и/или делеции, а также крупные перестройки [7]. На основании этого нарушения, приводящие к гемофилии А, характеризуются высокой гетерогенностью [4]. Наиболее частыми дефектами в гене *F8* у пациентов с тяжелой формой гемофилии А явля-

ются инверсии 1-го (IVS1) и 22-го (IVS22) интронов, которые встречаются у 1–5% и 45–50% пациентов соответственно [8]. Обе инверсии происходят в результате внутрихромосомной рекомбинации между гомологичными участками в 1-м или 22-м интроне и их внегенными копиями, расположенными дистальнее гена *F8* [9, 10]. У остальных пациентов с тяжелой формой гемофилии А выявляются различные однонуклеотидные варианты (single nucleotide variants). Легкие и среднетяжелые формы гемофилии А в основном обусловлены различными миссенс-мутациями в гене *F8* [8]. Миссенс-мутации являются наиболее распространенным типом нарушений среди пациентов с гемофилией А и встречаются во многих локусах гена *F8*. В зависимости от аминокислотной замены и конкретной локализации миссенс-мутации могут приводить к легкой, среднетяжелой и тяжелой формам гемофилии А [11].

Пациенты с тяжелой формой гемофилии А с различными нарушениями в гене *F8* демонстрируют значительную гетерогенность клинических проявлений. В литературе описаны различные клинические фенотипы среди пациентов с идентичными мутациями в гене *F8* [1]. Хотя делеции и инверсии ассоциированы с тяжелой формой гемофилии А, миссенс-мутации и некоторые небольшие делеции или инсерции в кодирующих областях гена *F8* могут приводить к смягчению фенотипа гемофилии А [1]. Более мягкий фенотип в таких случаях может быть обусловлен наличием остаточной активности FVIII в результате эндогенного восстановления рамки считывания из-за ошибок ДНК-полимеразы во время репликации ДНК/транскрипции РНК при небольших делециях или инсерциях, локализованных в регионах Poly-A – участках кодирующей последовательности гена *F8* из нескольких повторяющихся друг за другом аденинов [1, 12].

По способности продуцировать белок FVIII все мутации в гене *F8* классифицируют на 2 группы – нулевые и ненулевые [1]. К нулевым мутациям

Correspondence:

Aliaksandr V. Liubushkin,
junior researcher of Laboratory of Molecular
Genetic Research, Scientific Department,
Belarusian Research Center for Pediatric
Oncology, Hematology
and Immunology, Belarus
Address: 43 Frunzenskaya St.,
Borovlyany 223053, Minsk District, Belarus
E-mail: aleksandr.liubushkin@gmail.com

относят IVS22/IVS1, большие делеции, нонсенс-мутации, небольшие делеции/инсерции вне регионов Poly-A, мутации, затрагивающие регионы сайтов сплайсинга, при наличии которых синтез белка FVIII полностью отсутствует, т. е. активность FVIII не достигает пороговой чувствительности метода. К ненулевым мутациям относят миссенс-мутации, мутации в неконсервативных участках сайтов сплайсинга, небольшие делеции/инсерции внутри регионов Poly-A, при которых из-за синтеза некоторого количества белка определяется сниженная активность FVIII [1]. Таким образом, молекулярно-генетические исследования гена *F8* способствуют не только точной диагностике гемофилии А, но и позволяют в большинстве случаев устанавливать генотип-фенотипическую взаимосвязь у пациентов с данной патологией [8].

Образование аллоантител (ингибиторов) к FVIII является наиболее серьезным осложнением при применении заместительной терапии для лечения гемофилии А [13]. Процесс образования ингибиторов при использовании заместительной терапии концентратов FVIII имеет мультифакториальную природу и включает как генетические, так и негенетические факторы риска [7, 14]. Основным признанным генетическим фактором риска развития ингибиторов является тип нарушения в гене *F8* [14], т. е. нулевые мутации ассоциируют с высоким риском развития ингибиторов, а ненулевые мутации – с низким риском развития ингибиторов [7, 15].

Цель настоящего исследования – определить спектр генетических нарушений в гене *F8* у детей и подростков с гемофилией А в Республике Беларусь.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь). В исследование включены 98 пациентов с клиническим диагнозом гемофилии А, находившихся на обследовании и лечении в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь). Пациенты были разделены на 3 группы в соответствии с показателем FVIII:C: 1-я группа – FVIII:C < 1% (пациенты с тяжелой формой гемофилии А, $n = 82$); 2-я группа – FVIII:C 1–5% (пациенты со среднетяжелой формой гемофилии А, $n = 3$); 3-я группа – FVIII:C > 5% (пациенты с легкой формой гемофилии А, $n = 13$). У 20,4% ($n = 20$) пациентов с тяжелой формой гемофилии А в анамнезе имелись данные о развитии ингибиторов к FVIII. Возраст пациентов на момент исследования

варьировал от 1 месяца до 18 лет, медиана составила 7,5 года. От всех родителей пациентов и/или их официальных представителей было получено информированное согласие на проведение молекулярно-генетического исследования.

Коагуляционную активность FVIII определяли одностадийным клоттинговым методом на автоматическом коагулометрическом анализаторе ACL-9000 с использованием оригинальной тест-системы (Instrumental laboratory). Материалом для исследования служила венозная кровь, полученная с помощью вакутайнера путем пункции периферической вены без наложения жгута и стабилизированная 3,2% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Ингибитор к FVIII в единицах Бетезда (БЕ/мл) определяли методом М. Kasper (1968) с поправкой Nijmegen [16]. Материалом для молекулярно-генетического исследования служила венозная кровь, стабилизированная антикоагулянтом K_2 ЭДТА. Геномную ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции из цельной суспензии лейкоцитов. При выполнении молекулярно-генетических исследований использовали комплексный подход, включающий методы инвертированной и мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и метод высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing, NGS).

Всем пациентам с тяжелой формой гемофилии А выполняли исследования по определению IVS22 гена *F8* методом инвертированной ПЦР с использованием протокола, описанного в статье Rossetti и соавт. [17], и добавленными модификациями [18]. При отсутствии IVS22 гена *F8* в образцах далее выполняли исследования по определению IVS1 методом мультиплексной ПЦР в соответствии с публикацией Bagnall и соавт. [19]. ПЦР проводили с использованием амплификатора C1000 (BioRad, США). Детекцию продуктов амплификации осуществляли путем электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующей визуализацией результатов в системе гель-документирования (BioRad Gel Doc XR+, США). Интерпретацию результатов ПЦР проводили на основании размера фрагментов контролей и образцов пациентов, обнаруженных методом электрофореза в агарозном геле. В качестве положительных контролей использовали образцы ДНК пациентов с ранее диагностированной IVS22/IVS1 и образцы ДНК гетерозиготных носителей.

Далее всем пациентам с тяжелой формой гемофилии А, в образцах которых методами мультиплексной и инвертированной ПЦР IVS22/IVS1 гена *F8* не было выявлено, как и всем пациентам с легкой и среднетяжелой формами гемофилии А, проводили исследование всех экзонов и прилегающих к ним регионов сплайс-сайтов гена *F8*. Определение нуклеотидных последовательностей выполняли методом

NGS на генетическом анализаторе MiSeq (Illumina, США) с применением кастомной панели QIAseq Targeted DNA Custom Panels 333525 (LOT CDHS-33342Z-384, Qiagen, Германия), включающей зонды для амплификации регионов генов *F8*, *F9*, *VWF*, *ADAMTS13*, *F13A1* и *F13B*. Обработку полученных данных проводили с использованием автоматизированного программного обеспечения QIAseq Targeted Sequencing Data Analysis Portal (Qiagen, Германия). Выявленные олигонуклеотидные отличия от референсной последовательности (GRCh37) сравнивали с публичными базами данных ENSEMBL, gnomAD (the Genome Aggregation Database), EAHAD *F8* database и CHAMP (CDC Haemophilia A Mutation Project).

Не описанные однонуклеотидные варианты анализировали с применением онлайн-программ предсказания патогенности PolyPhen2, MutationTaster, SIFT, Mutation assessor, PROVEAN, Varsome, ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics). Для поиска отличий и оценки влияния мутации на размер белка, заряд и уровень гидрофобности, определения взаимодействий, нарушенных изменением аминокислоты, и анализа структурных доменов, в которых расположена измененная аминокислота, использовали онлайн-программу HOPE.

Наличие клинически значимых изменений в нуклеотидной последовательности подтверждали методом автоматического секвенирования по Сэнгеру на генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (Thermo Scientific, США) с использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Анализ результатов секвенирования по Сэнгеру проводили с помощью специализированных программных обеспечений Sequencing Analysis 7.0 (Applied Biosystems, США) и BioEdit (Bioedit Ltd, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное нами исследование, направленное на определение и анализ спектра нарушений в гене *F8*, приводящих к развитию гемофилии А, показало, что у 99% ($n = 97$) пациентов с гемофилией А выявлены патогенетические нарушения. У 41,2% ($n = 40$) пациентов нарушения в гене *F8* были выявлены методами на основе ПЦР (IVS22/IVS1), а у 58,8% ($n = 57$) пациентов – методом NGS. Все аллельные варианты в гене *F8* идентифицированы в гемизиготном состоянии. У 1 пациента с легкой формой гемофилии А патогенных генетических вариантов в гене *F8*, а также в генах *F9*, *VWF*, *ADAMTS13*, *F13A1* и *F13B* не обнаружено.

Среди детей с тяжелой формой гемофилии А в нашей выборке IVS22 гена *F8* выявлена у 45,1% ($n = 37$) пациентов, у 32 из которых определена IVS22

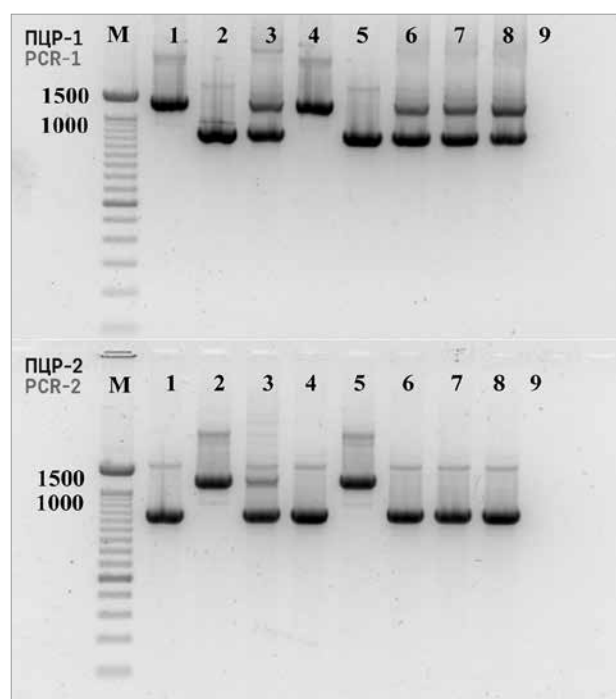
1-го типа, а у 5 – 2-го типа. Среди оставшихся пациентов с тяжелой формой гемофилии А, у которых методом инвертированной ПЦР не выявлена IVS22 ($n = 45$), в 1 случае определена IVS1 гена *F8*. Кроме того, у 2 родственных пациентов в ходе исследования обнаружен аномальный паттерн IVS1, который не соответствовал генотипу мутантного или дикого типа (рисунк 1). Таким образом, у пациентов с тяжелой формой гемофилии А IVS22 и IVS1 гена *F8* выявлены в 45,1% и 1,2% случаев соответственно. Согласно международным исследованиям, у пациентов с тяжелой формой гемофилии А IVS22 гена *F8* является наиболее часто встречаемой генетической перестройкой [4, 9, 10]. Полученные результаты

Рисунок 1

Электрофореграмма результатов детекции IVS1. ПЦР-1 характеризует состояние региона *int1h-1* в интроне 1 гена *F8*; ПЦР-2 – состояние экстрагенного региона *int1h-2*. При отсутствии IVS1 в ПЦР-1 и ПЦР-2 детектируются фрагменты размерами 1500 и 1000 пар нуклеотидов соответственно. При наличии IVS1 в ПЦР-1 и ПЦР-2 детектируются фрагменты размером 1000 и 1500 пар нуклеотидов соответственно. М – маркер молекулярных масс; 1 – контрольный образец дикого типа; 2 – контрольный образец гемизиготной IVS1; 3 – контрольный образец с гетерозиготной IVS1; 4 – пациент, у которого отсутствует IVS1; 5 – пациент с IVS1; 6, 7 – пациенты с аномальным паттерном IVS1; 8 – мать пациентов с аномальным паттерном IVS1; 9 – отрицательный контроль

Figure 1

An electropherogram showing the results of IVS-1 detection. PCR, polymerase chain reaction. PCR-1 characterizes the state of the *int1h-1* region in intron 1 of the *F8* gene; PCR-2 characterizes the state of the *int1h-2* extragenic region. In the absence of IVS1, 1500 bp and 1000 bp fragments are detected in PCR-1 and PCR-2, respectively. In the presence of IVS1, 1000 bp and 1500 bp fragments are detected in PCR-1 and PCR-2, respectively. M – a molecular weight marker; 1 – a wild-type control sample; 2 – a control sample of hemizygous IVS1; 3 – a control sample with heterozygous IVS1; 4 – a patient without IVS1; 5 – a patient with IVS1; 6, 7 – patients with an abnormal pattern of IVS1; 8 – the mother of the patients with an abnormal IVS1 pattern; 9 – a negative control



сопоставимы с данными из публикаций о генетических нарушениях у пациентов с тяжелой формой гемофилии А [20–25].

Аномальный паттерн IVS1, обнаруженный в ходе нашего исследования, показал, что в ПЦР-1 визуализировалось 2 фрагмента длиной 1000 пар нуклеотидов (соответствующий рекомбинации между int1h-1 и int1h-2 и указывающий на инверсию) и 1500 пар нуклеотидов (соответствующий участку int1h-1 дикого типа и характеризующий отсутствие инверсии), а в ПЦР-2 (для детекции региона int1h-2) наблюдался только 1 фрагмент длиной 1000 пар нуклеотидов (соответствующий участку int1h-2 дикого типа и характеризующий отсутствие инверсии). В литературе описано всего несколько случаев детектирования аномального паттерна IVS1 в гене *F8* [26–29], но ни один из них не соответствует паттерну IVS1, обнаруженному в нашем исследовании. Необычные паттерны IVS1, часто обнаруживаемые со сложными перестройками – дупликациями/делециями, могут быть обусловлены возможным присутствием дополнительных копий региона int1h или сегментных дупликаций гена *F8* [30]. Для полной характеристики патогенетического механизма обнаруженного паттерна IVS1 гена *F8* необходимо проведение дополнительного исследования, направленного на выявление крупных перестроек в гене *F8* методом мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции (multiplex ligation-dependent probe amplification).

По результатам выполненного NGS-исследования у 60 пациентов с гемофилией А (3 пациента со среднетяжелой формой, 13 – с легкой формой, 44 – с тяжелой формой (42 пациента без IVS22 и IVS1 и 2 – с аномальным паттерном IVS1)) выявлено 48 уникальных патогенетических нарушений

в 57 случаях. В зависимости от типа нарушения в гене *F8* распределились следующим образом: 47,9% ($n = 23$) миссенс-мутаций, 12,5% ($n = 6$) нонсенс-мутаций, 10,4% ($n = 5$) дефектов в сплайс-сайтах, 12,5% ($n = 6$) небольших делеций, приводящих к сдвигу рамки считывания, 12,5% ($n = 6$) небольших дупликаций, приводящих к сдвигу рамки считывания, 2,1% ($n = 1$) крупных делеций и 2,1% ($n = 1$) синонимичных замен (сайлент-мутации). В 14-м экзоне гена *F8* выявлено 27,1% ($n = 13$) аллельных вариантов, что может быть обусловлено его сравнительно большим размером по отношению к остальным экзонам. У 2 пациентов с аномальным паттерном IVS1, а также у 1 пациента с легкой формой гемофилии А по результатам NGS-исследования отличий от референсной нуклеотидной последовательности гена *F8* не обнаружено. Все результаты молекулярно-генетических исследований представлены в таблице.

В ходе исследования выявлена синонимичная однонуклеотидная замена с.1569G>T, не приводящая к замене одной аминокислоты на другую (p.Leu523Leu), у пациента с фенотипом легкой формы гемофилии А. Выявленная замена с.1569G>T, по данным литературных источников, приводит к появлению нового акцепторного сайта сплайсинга, что обуславливает делецию первых 36 нуклеотидов 11-го экзона гена *F8*. В результате этого синтезируется белок FVIII, в котором отсутствуют 12 аминокислот 6-го экзона гена *F8* [31–33]. В базе данных CHAMP замена с.1569G>T описана у пациентов как с легкой, так и со среднетяжелой формой гемофилии А [34]. Для верификации выявленной методом NGS гомизиготной делеции 6-го экзона проведено капиллярное секвенирование по Сэнгеру участка кодирующей ДНК гена *F8* (рисунок 2).

Таблица

Спектр выявленных нарушений в гене *F8*

Table

The spectrum of mutations identified in the *F8* gene

Тип нарушения Type of mutation	Число пациентов Number of patients	Выявленная мутация Identified mutation		Экзон Exon	Домен FVIII Domain of FVIII	Ингибиторы к FVIII Inhibitors to FVIII	Мутация в регионе Poly-A Poly(A) site mutation	Форма гемофилии А Severity of hemophilia A	Источник Source
		по кодирующей последовательности by coding sequence	по белку by protein						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IVS22	37	–	–	–	–	Да/нет Yes/no	–	Тяжелая Severe	Lakich et al. (1993), Nature Genetics
IVS1	1	–	–	–	–	Нет No	–	Тяжелая Severe	Brinke et al. (1996), Human Molecular Genetics
IVS1-аномальный паттерн IVS1 abnormal pattern	2	–	–	–	–	Нет No	–	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
Silent	1	с.1569G>T	p.Leu523Leu	11	A2	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Diamond et al. (1992), Human Mutation

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Missense	1	c.330G>A	p.Met110Ile	3	A1	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Johnsen et al. (2017), Blood Advances
	1	c.398A>G	p.Tyr133Cys	4	A1	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Tavassoli et al. (1998), Human Mutation
	1	c.1433A>G	p.Asp478Gly	9	A2	Нет No	Нет No	Легкая Mild	HAMSTERS (The Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site)
	1	c.1834C>T	p.Arg612Cys	12	A2	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Diamond et al. (1992), Human Mutation
	1	*c.3746T>G	p.Leu1249Arg	14	B	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Наши данные Our data
	1	c.5414A>G	p.Tyr1805Cys	16	A3	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Reitter et al. (2010), Thrombosis & Haemostasis
	1	*c.5879G>A	p.Arg1960Gln	18	A3	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Morichika et al. (1997), British Journal of Haematology
	1	c.6533G>A	p.Arg2178His	23	C1	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Schwaab et al. (1995), British Journal of Haematology
	1	c.6785T>C	p. Val2262Ala	25	C2	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Margaglione et al. (2008), Haematologica
	1	c.6968G>A	p.Arg2323His	26	C2	Нет No	Нет No	Легкая Mild	Schwaab et al. (1995), British Journal of Haematology
	2	c.1171C>T	p.Arg391Cys	8	A1	Нет No	Нет No	Легкая/ среднетя- желая Mild/ moderate	Shima et al. (1989), Blood
	1	c.902G>A	p.Arg301His	7	A1	Нет No	Нет No	Среднетя- желая Moderate	Higuchi et al. (1991), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
	1	c.1172G>A	p.Arg391His	8	a1	Нет No	Нет No	Среднетя- желая Moderate	Arai et al. (1989), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
	2	c.224A>T	p.Asp75Val	2	A1	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Johnsen et al. (2017), Blood Advances
	3	c.523T>G	p.Tyr175Asp	4	A1	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
	2	c.1042T>C	p. Cys348Arg	8	A1	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Kogan et al. (1990), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
	1	c.1662T>A	p. Ser554Arg	11	A2	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
	1	c.1681G>C	p. Asp561His	11	A2	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Waseem et al. (1999), Methods in Molecular Medicine
	1	c.2056A>C	p.Thr686Pro	13	A2	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
	1	c.5159C>A	p.Ala1720Asp	14	A3	Да Yes	Нет No	Тяжелая Severe	David et al. (2006), Haematologica
	1	c.6046C>T	p.Arg2016Trp	19	A3	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Liu et al. (2002), Thrombosis & Haemostasis
	1	c.6544C>T	p.Arg2182Cys	23	C1	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Reiner et al. (1992), Thrombosis Research
	1	c.6560G>A	p.Gly2187Asp	23	C1	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Santacroce et al. (2008), Journal of Human Genetics

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nonsense	3	c.1063C>T	p.Arg355Ter	8	A1	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Gitschier et al. (1988), Blood
	1	c.1804C>T	p.Arg602Ter	12	A2	Да Yes	Нет No	Тяжелая Severe	Pattinson et al. (1990), Blood
	1	c.2440C>T	p.Arg814Ter	14	B	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Pattinson et al. (1990), Blood
	1	c.2933C>A	p.Ser978Ter	14	B	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Gouw et al. (2011), Haemophilia
	1	c.4241C>G	p.Ser1414Ter	14	B	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
	1	c.4935G>A	p.Trp1645Ter	14	B	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Waseem et al. (1999), Methods in Molecular Medicine
Splicing	1	c.388+1G>A	–	–	–	Нет No	–	Тяжелая Severe	Rydz et al. (2013), American Journal of Hematology
	1	c.5220-2A>G	–	–	–	Нет No	–	Тяжелая Severe	Vinciguerra et al. (2006), Thrombosis & Haemostasis
	1	c.6430-2A>G	–	–	–	Да Yes	–	Тяжелая Severe	Repešé et al. (2007), Thrombosis & Haemostasis
	1	c.6723+1G>A	–	–	–	Нет No	–	Тяжелая Severe	Casana et al. (2008), Haematologica
	1	c.771_787+3 dupAAACA GGTCTCT GCCAGGTA	–	–	–	Нет No	–	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
Frameshift	1	c.4379dupA	p.Asn1460Lys fs 1461Ter	14	B	Нет No	Да Yes	Легкая Mild	Higuchi et al. (1991) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
	2	c.2945dupA	p.Asn982Lys fs990Ter	14	B	Нет No	Да Yes	Тяжелая Severe	Naylor et al. (1993), Human Molecular Genetics
	2	c.3637dupA	p.Ile1213Asn fs1240Ter	14	B	Нет No	Да Yes	Тяжелая Severe	Pieneman et al. (1995), British Journal of Haematology
	2	c.4379delA	p.Asn1460Ile fs 1464Ter	14	B	Нет No	Да Yes	Тяжелая Severe	Naylor et al. (1993), Human Molecular Genetics
	1	c.4825dupA	p.Thr1609Asn fs Ter4	14	B	Нет No	Да Yes	Тяжелая Severe	Lin et al. (1993), Genomics
	1	c.4843delG	p.Asp1615Ile fs 1620Ter	14	B	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
	1	c.5078delA	p.Lys1693Arg fs 1730Ter	14	a3	Нет No	Да Yes	Тяжелая Severe	Kim et al. (2012), Haemophilia
	1	c.5517dupA	p.His1840Thr fs 1846Ter	16	A3	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
Frameshift	1	c.6070dupC	p.His2024Pro fs 2039Ter	19	A3	Да Yes	Нет No	Тяжелая Severe	Ahmed et al. (2005), Haematologica
	1	6196delG	p.Ala2066Pro fs2098Ter	21	C1	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
	1	c.6737_6738 delAA	p.Lys2246Arg fs 2383Ter	25	C2	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
	1	c.6981_6989 delTCA CCCCCA	p.Ile2327Met fs 2349Ter	26	C2	Да Yes	Нет No	Тяжелая Severe	Наши данные Our data
Large deletion	1	Del 6 exon	–	6	–	Нет No	Нет No	Тяжелая Severe	Pavlova et al. (2008), Haemophilia

Примечание. * – генетические нарушения, идентифицированные у одного пациента.
Note. * – genetic defects identified in one patient.

Делеции всего 6-го экзона или затрагивающие последовательность 6-го экзона описаны в публичных базах данных EAHAD F8 database и CHAMP [34, 35].

Однонуклеотидная дупликация c.4379dupA, приводящая к сдвигу рамки считывания и появлению преждевременного стоп-кодона (p.Asn1460Lys fs

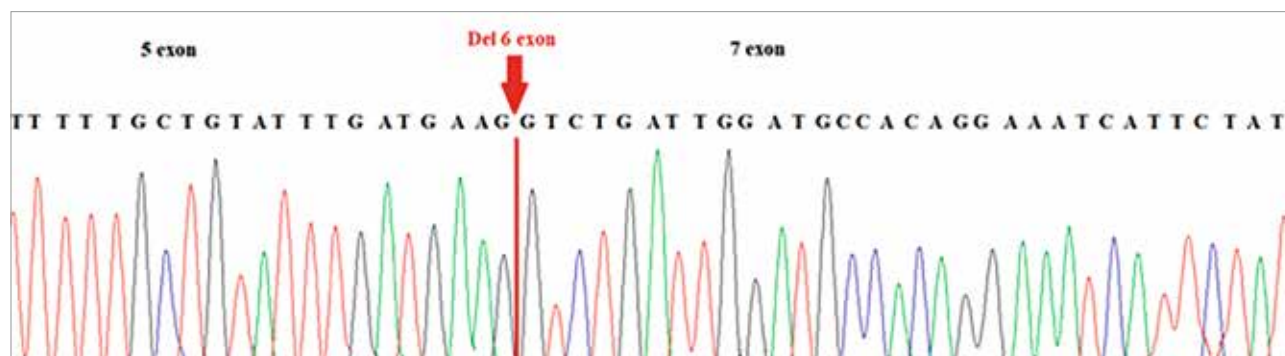
1461Ter), выявлена у пациента с легкой формой гемофилии А. Такой тип мутации, как правило, приводит к синтезу укороченного, функционально неактивного белка и ассоциирован с тяжелым течением заболевания. Однако легкий фенотип гемофилии А у данного пациента, возможно, может быть обусловлен локализацией выявленной дупликации

Рисунок 2

Результаты капиллярного секвенирования участка кодирующей ДНК пациента с делецией 6-го экзона гена *F8*

Figure 2

The results of Sanger sequencing of the cDNA region of a patient with an exon 6 deletion of the *F8* gene



в регионе Poly-A 14-го экзона. Для дупликаций/делеций в таких регионах кодирующей последовательности характерно восстановление рамки считывания за счет «проскальзывания» РНК-полимеразы [36]. Данный случай показывает, что при изучении взаимосвязей между генетическими предпосылками и клинической картиной гемофилии А необходимо оценивать не только тип нарушения, но и его локализацию.

Из 47 уникальных аллельных вариантов, идентифицированных в гене *F8* в нашем исследовании, 11 ранее не были описаны в литературных источниках и публичных базах данных EAHAD F8 database и CHAMP.

Нонсенс-мутации

В исследуемой когорте пациентов выявлена 1 не описанная в литературе однонуклеотидная замена в 14-м экзоне – с.4241C>G, приводящая к преждевременному появлению стоп-кодона (p.Ser1414Ter), в результате чего синтезируется укороченный, неполноценный белок с нарушенной функциональной активностью.

Мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания

Выявлены 4 ранее не описанные делеции и 1 однонуклеотидная дупликация: 14-й экзон – с.4843delG, p.Asp1615Ile fs 1620Ter; 21-й экзон – 6196delG, p.Ala2066Pro fs2098Ter; 25-й экзон – с.6737_6738delAA, p. Lys2246Arg fs 2383Ter; 26-й экзон – с.6981_6989delTCACCCCA, p.Ile2327Met fs 2349Ter и 16-й экзон – с.5517dupA, p.His1840Thr fs 1846Ter, которые приводят к сдвигу рамки считывания и впоследствии к образованию преждевременного стоп-кодона. Результатом такого рода мутаций является синтез укороченного, неполноценного белка.

Миссенс-мутации

Идентифицированы ранее не описанные 4 миссенс-мутации: с.523T>G, p.Tyr175Asp;

с.1662T>A, p.Ser554Arg; с.2056A>C, p.Thr686Pro; с.3746T>G, p.Leu1249Arg. Все обнаруженные однонуклеотидные замены не зарегистрированы в контрольной выборке популяционной базы gnomAD. Анализ с помощью онлайн-программы HOPE выявил структурные различия между референсной аминокислотой и возникшей в результате генетического нарушения, которые могут повлиять на функциональную активность белка.

Нуклеотидный вариант с.523T>G, обнаруженный у 3 родственных пациентов с фенотипом тяжелой гемофилии А, приводит к замене тирозина на аспарат в 175-м кодоне (p.Tyr175Asp). Компьютерные программы предсказания патогенности (PolyPhen2, MutationTaster, SHIFT, Mutation assessor, PROVEAN) расценивают выявленный вариант как вероятно патогенный. Кроме того, в базах данных EAHAD F8 database и CHAMP ранее описаны другие замены в 175-м кодоне, ассоциированные с различным фенотипом гемофилии А (с.523T>C, p.Tyr175His; с.524A>C, p.Tyr175Ser; с.524A>G, p.Tyr175Cys). По классификации ACMG выявленный вариант является вероятно патогенным.

Выявленная однонуклеотидная замена с.1662T>A приводит к ранее описанной в CHAMP аминокислотной замене Ser554Arg, но является следствием нуклеотидной замены, не встречающейся ранее. Компьютерные программы предсказания патогенности (PolyPhen2, MutationTaster, SHIFT, Mutation assessor, PROVEAN) расценивают выявленный вариант как вероятно патогенный. В базах данных EAHAD F8 database и CHAMP также описаны другие однонуклеотидные замены в 554-м кодоне, приводящие к гемофилии А (с.1660A>G, p.Ser554Gly; с.1660A>T, p.Ser554Cys; с.1661G>A, p.Ser554Asn). По классификации ACMG выявленный вариант относится к патогенным.

Замена с.2056A>C приводит к замене треонина на пролин в 686-м кодоне (p.Thr686Pro). При оценке выявленного варианта компьютерными программами

предсказания патогенности были получены неоднозначные результаты: PolyPhen2, SHIFT, Mutation assessor, PROVEAN расценивают выявленный вариант как вероятно патогенный, MutationTaster – как полиморфизм. В базах данных EAHAD F8 database и CHAMP также описаны другие однонуклеотидные замены в 686-м кодоне, ассоциированные с фенотипом гемофилии А (с.2057C>A, p.Thr686Lys; с.2057C>G, p.Thr686Arg). По классификации ACMG выявленный вариант является вероятно патогенным.

Ранее не описанная однонуклеотидная замена с.3746T>G, приводящая к замене лейцина на аргинин в 1249-м кодоне, выявлена у пациента с фенотипом легкой гемофилии А вместе с ранее описанной в базах данных EAHAD F8 database и CHAMP заменой с.5879G>A, приводящей к фенотипу гемофилии А. При оценке выявленного варианта с.3746T>G компьютерными программами предсказания патогенности были получены неоднозначные результаты: MutationTaster, Mutation assessor, PROVEAN расценивают вариант как непатогенный, а SHIFT и PolyPhen2 – как вероятно патогенный. Классификация ACMG относит выявленную замену к вариантам неопределенного клинического значения.

Мутации в регионе сайтов сплайсинга

Обнаружена дупликация в регионе, затрагивающем сайт-сплайсинга 6-го экзона, – с.771_787+3du pAAACAGGTCTCTGCCAGGTA. Предиктор патогенности MutationTaster расценивает выявленный вариант как патогенный. По классификации ACMG данная дупликация относится к вариантам неопределенного клинического значения.

В нашем исследовании среди пациентов с тяжелой формой гемофилии А ($n = 82$) были обнаружены следующие генетические нарушения: IVS22 – у 45,1% ($n = 37$) пациентов, IVS1 – у 1,2% ($n = 1$), аномальный паттерн IVS1 – у 2,4% ($n = 2$), миссенс-мутации – у 17,1% ($n = 14$), нонсенс-мутации – у 9,8% ($n = 8$), мутации в сайтах сплайсинга – у 6,1% ($n = 5$), небольшие делеции – у 8,5% ($n = 7$), небольшие дупликации – у 8,5% ($n = 7$), крупные делеции – у 1,2% ($n = 1$). Распределение выявленных генетических нарушений у пациентов с тяжелой

формой гемофилии А по классификации Pavlova и соавт. [1] на нулевые и ненулевые мутации было следующим: 60 пациентов имели нулевые мутации, а 22 – ненулевые мутации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате использованного комплексного подхода нарушения в гене *F8* были обнаружены у 99% ($n = 97$) пациентов с гемофилией А. Среди пациентов с тяжелой формой гемофилии А ($n = 82$) были обнаружены следующие генетические нарушения: IVS22 детектирована у 45,1% пациентов, IVS1 – у 1,2%, аномальный паттерн IVS1 – у 2,4%, миссенс-мутации – у 17,1%, нонсенс-мутации – у 9,8%, мутации в сайтах сплайсинга – у 6,1%, небольшие делеции – у 8,55%, небольшие дупликации – у 8,55%, крупные делеции – у 1,2%. Выявление генетических нарушений, ответственных за развитие гемофилии А, позволяет проводить правильное генетическое консультирование пациентов и их семей, предоставляет информацию о генотип-фенотипической корреляции и риске развития ингибиторов при заместительной терапии, особенно у пациентов с тяжелой формой гемофилии А, а в отдельных случаях позволяет проводить дифференциальную диагностику между схожими по фенотипу коагулопатиями.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке ГНТП «Научно-техническое обеспечение качества и доступности медицинских услуг» на 2021–2025 гг. (подпрограмма «Здоровье матери и ребенка»), номер госрегистрации 20201768.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Liubushkin A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6127-7404>

Guryanova I.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9696-3949>

Dmitriev E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0233-7718>

Vertelko V.R. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0274-2107>

Polyakova E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0706-6622>

Volkova L.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1054-0054>

Aleinikova O.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0143-1921>

Литература

- Pavlova A., Oldenburg J. Defining Severity of Hemophilia: More than Factor Levels. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39 (7): 702–10.
- Nair P.S., Shetty S.D., Chandrakala S., Ghosh K. Mutations in Intron 1 and Intron 22 Inversion Negative Haemophilia A Patients from Western India. *PLoS One* 2014; 9 (5): 1–9.
- Berntorp E., Fischer K., Hart D.P., Mancuso M.E., Stephensen D., Shapiro A.D., et al. Haemophilia. *Nat Rev Dis Primers* 2021; 7 (45): 45.
- Feng Y., Li Q., Shi P., Liu N., Kong X., Guo E. Mutation analysis in the *F8* gene in 485 families with haemophilia A and prenatal diagnosis in China. *Haemophilia* 2021; 27 (1): 88–92.
- Mazurkiewicz-Pisarek A., Plucieniczak G., Ciach T., Plucieniczak A. The factor VIII protein and its function. *Acta Biochim Pol* 2016; 63 (1): 11–6.
- McVey J.H., Rallapalli P.M., Kemball-Cook G., Hampshire D.J., Giansily-Blaizot M., Gomez K., et al. The European Association for Haemophilia and Allied Disorders (EAHAD) coagulation factor variant databases: Important resources for haemostasis clinicians and researchers. *Haemophilia* 2020; 26 (2): 306–13.
- Azadmehr S., Rahiminejad F., Motlagh F.Z., Jamali M., Tehrani P.G., Shirzadeh T., et al. The Spectrum of Pathogenic Variants in Iranian Families with Hemophilia A. *Arch Iran Med* 2021; 24 (12): 887–96.
- Villarreal-Martínez L., Ibarra-Ramirez M., Calvo-Anguiano G., Lugo-Trampe J.J., Luna-Záizar H., Martínez-de-Villarreal L.E., et al. Molecular genetic diagnosis by next-generation sequencing in a cohort of Mexican patients with haemophilia and report of novel variants. *Blood Cells Mol Dis* 2020; 83: 102423.
- Salazar-Sánchez L., Jiménez-Cruz G., Mendez M., Chaverri P., Alvarado P., Schröder W., et al. Molecular analysis of *FVIII* gene in severe HA patients of Costa Rica. *Hamostaseologie* 2010; 4: 150–2.
- Oldenburg J., Pezeshkpoor B., Pavlova A. Historical review on genetic analysis in hemophilia A. *Semin Thromb Hemost* 2014; 40 (8): 895–902.
- Schwaab R., Pavlova A., Albert T., Caspers M., Oldenburg J. Significance of *F8* missense mutations with respect to inhibitor formation. *Thromb Haemost* 2013; 109 (3): 464–70.
- Gouw S.C., Marijke van den Berg H., Oldenburg J., Astermark J., Groot P.G., Margaglione M., et al. *F8* gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood* 2012; 119 (12): 2922–34.
- Oldenburg J., Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia* 2006; 12: 15–22.
- Garagiola I., Palla R., Peyvandi F. Risk factors for inhibitor development in severe hemophilia A. *Thromb Res* 2018; 168: 20–7.
- Oldenburg J., Pavlova A. Genetic Basis for Inhibitor Development. *Current and Future Issues in Hemophilia Care* 2011; 79–83.
- Hay C.R.M., Brown S., Collins P.W., Keeling D.M., Liesner R. The diagnosis and management of factor VIII and IX inhibitors: a guideline from the United Kingdom Hemophilia Centre Doctors Organisation. *Br J Haematol* 2006; 133: 591–605.
- Rossetti L.C., Radic C.P., Larripa I.B., De Brasi C.D. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 830–6.
- Любушкин А.В., Гурьянова И.Е., Дмитриев Е.В., Полякова Е.А., Вертелко В.Р., Алейникова О.В. Частота встречаемости инверсии 22 интрона гена фактора VIII среди пациентов детского возраста в Республике Беларусь. *Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа* 2022; 8 (1): 41–8.
- Bagnall R.D., Waseem N., Green P.M., Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 2002; 99 (1): 168–74.
- Kumar P., Faridi N.J., Husain N., Soni P., Goel S.K. Study of intron 22 inversion mutation in north India with review. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2013; 24 (2): 120–4.
- Abdulqader A.M.R., Mohammed A.I., Rachid S., Ghoraishizadeh P., Mahmood S.N. Identification of the Intron 22 and Intron 1 Inversions of the Factor VIII Gene in Iraqi Kurdish Patients With Hemophilia A. *Clin Appl Thromb Hemost* 2020; 26: 1076029619888293.
- Milena Mantilla-Capacho J., Beltrán-Miranda C.P., Luna-Záizar H., Aguilar-López L., Esparza-Flores M.A., López-Guido B., et al. Frequency of intron 1 and 22 inversions of factor viii gene in Mexican patients with severe hemophilia A. *Am J Hematol* 2007; 82: 283–7.
- De Brasi C., Candela M., Cermelj M., Slavutsky I., Larripa I., Bianco R.P., et al. Intron 22 factor VIII gene inversions in Argentine families with severe haemophilia A. *Haemophilia* 2000; 6: 21–2.
- Corrêa M.C.S.M., Ferreira E., Veiga M.T.A., Bandinelli E., Rosset C. Prevalence of inversions in introns 1 and 22 of the factor VIII gene and inhibitors in patients from southern Brazil. *J Bras Patol Med Lab* 2019; 55 (6): 598–605.
- Бескороваяная Т.С., Миловидова Т.Б., Щагина О.А., Рыжкова О.П., Поляков А.В. Комплексная диагностика гемофилии А у российских больных. *Генетика* 2019; 55 (8): 1015–24.
- Pio S.F., Oliveira G.C., Soares S., Rezende S.M. An aberrant pattern for intron 1 inversion of factor VIII gene. *Haemophilia* 2011; 17: 703–20.
- Sanna V., Ceglia C., Tarsitano M., Lombardo B., Coppola A., Zarrilli F., et al. Aberrant *F8* gene intron 1 inversion with concomitant duplication and deletion in a severe hemophilia A patient from Southern Italy. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 195–7.
- Badoz M., Pellechia D., Fretigny M. Unusual intron 1 inversion with concomitant large duplication within the *F8* gene in a severe haemophilia A patient. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 807.
- Stefanovska E.S., Dejanova V., Tchakarova P., Petkov G., Efremov G.D. Genetic Inversions among Hemophilia A Patients from Macedonia and Bulgaria. *Acta Haematol* 2008; 120: 192–4.
- You G., Chi K., Lu Y., Ding Q., Dai J., Xi X., et al. Identification and characterisation of a novel aberrant pattern of intron 1 inversion with concomitant large insertion and deletion within the *F8* gene. *Thromb Haemost* 2014; 112 (2): 264–70.
- Jourdy Y., Fretigny M., Nougier C., Négrier C., Bozon D., Vinciguerra C. Splicing analysis of 26 *F8* nucleotide variations using a minigene assay. *Haemophilia* 2019; 25 (2): 306–15.
- Vidal F., Farssac E., Altisent C., Puig L., Gallardo D. Rapid Hemophilia A Molecular Diagnosis by a Simple DNA Sequencing Procedure: Identification of 14 Novel Mutations. *Thromb Haemost* 2001; 85 (4): 580–3.
- El-Maarri O., Herbiniaux U., Graw J., Schröder J., Terzic A., Watzka M., et al. Analysis of mRNA in hemophilia A patients with undetectable mutations reveals normal splicing in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost* 2005; 3 (2): 332–9.
- CDC Hemophilia Mutation Project (CHAMP & CHBMP) [Electronic resource]. Available at: <https://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html> (accessed December 15, 2020).
- Factor VIII Gene (*F8*) Variant Database [Electronic resource]. Available at: <https://f8-db.eahad.org/index.php> (accessed December 15, 2020).
- Green P.M., Bagnall R.D., Waseem N.H., Giannelli F. Haemophilia A mutations in the UK: results of screening one-third of the population. *Br J Haematol* 2008; 143: 115–28.