

Badania genetyczne w diagnostyce hemofilii A

Genetic testing in hemophilia A diagnostics

Edyta Odnoczko¹, Jerzy Windyga^{1, 2}

¹Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

²Klinika Zaburzeń Hemostazy i Chorób Wewnętrznych, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Streszczenie

Hemofilia A (HA) to jedna z najczęściej rozpoznawanych genetycznie uwarunkowanych skaz krwotocznych. U jej podłoża leży wrodzony brak, niedobór lub dysfunkcja czynnika krzepnięcia VIII (FVIII), co prowadzi do istotnych zaburzeń w układzie hemostazy. Nasilenie objawów skazy krwotocznej determinuje stopień niedoboru FVIII w osoczu. Diagnostykę hemofilii A stawia się głównie na podstawie wyników badań krzepnięcia osocza, w tym pomiaru aktywności koagulacyjnej FVIII. Współcześnie uważa się, że diagnostyka HA powinna być rozszerzona o badania genetyczne umożliwiające poznanie mutacji sprawczej. Określenie mutacji odpowiedzialnej za HA jest ważne z co najmniej dwóch powodów: 1) umożliwia wstępną ocenę ryzyka wystąpienia inhibitora FVIII oraz 2) umożliwia pewne rozpoznanie stanu nosicielstwa HA. W pracy przedstawiono algorytm przeprowadzania badań genetycznych u pacjentów z HA, a także scharakteryzowano najczęściej wykorzystywane techniki molekularne oraz omówiono trudności związane z interpretacją uzyskanych wyników.

Słowa kluczowe: hemofilia A, genetyka, mutacja sprawcza, inwersja w intronie 22

Hematologia 2014; 5, 3: 193–202

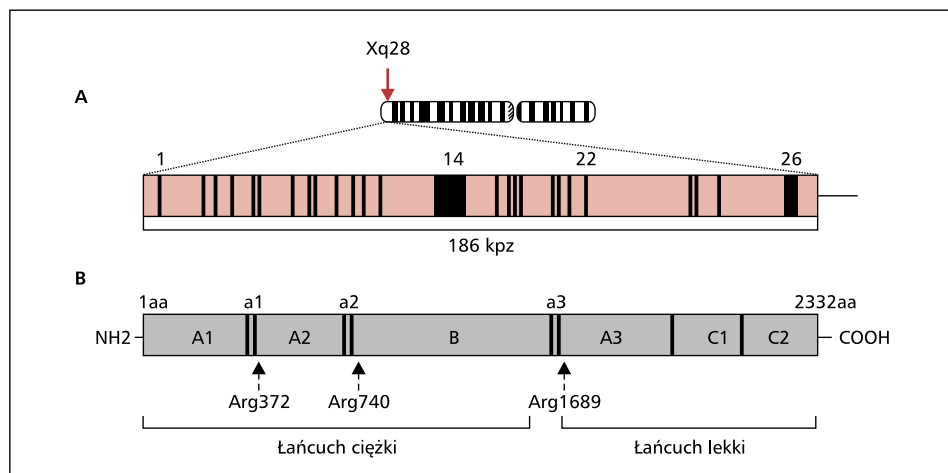
Abstract

Hemophilia A (HA) is one of the most frequently recognized genetically determined bleeding disorders. At its ground is a congenital lack, deficiency or dysfunction of coagulation factor VIII (FVIII), which leads to significant disturbances of hemostatic system. The severity of bleeding diathesis is determined by the degree of FVIII deficiency in plasma. The diagnosis of HA is mainly based on the results of the coagulation plasma test, including measuring the FVIII coagulation activity. Nowadays, it is believed that diagnosis of HA should be extended to genetic testing, to get to know the causative mutation. Determination of the mutation responsible for HA is important for at least two reasons: 1) enables a preliminary assessment of the risk of FVIII inhibitor development and 2) make possible the clear-cut diagnosis of HA carrier status. This paper presents an algorithm for genetic testing in patients with HA. On top of that characterizes the molecular techniques used in diagnostic process, and discusses the difficulties associated with the interpretation of the results.

Key words: haemophilia A, genetics, causative mutation, intron 22 inversion

Hematologia 2014; 5, 3: 193–202

Adres do korespondencji: Edyta Odnoczko, Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, tel.: 22 34 96 157, e-mail: eodnoczko@ihit.waw.pl



Rycina 1. Schemat struktury genu i syntetyzowanego białka czynnika VIII; czarne strzałki wskazują miejsca proteolitycznej aktywacji czynnika VIII z udziałem trombiny; aa — aminokwasy: **A.** Gen *F8* (186 kpb, 26 eksonów) i jego zmapowanie na chromosomie X; **B.** Dojrzały łańcuch białkowy czynnika VIII (2332aa)

Figure 1. Schematic structure of the factor VIII gene and synthesized protein; black arrows indicate the factor VIII activation site by thrombin; aa — amino acids: **A.** *F8* gene (186 kb, 26 exons) and its mapping on the X chromosome; **B.** The mature of factor VIII protein chain (2332aa)

Wprowadzenie

Hemofilia A (HA, *hemophilia A*) to druga po chorobie von Willebranda (vWD, *von Willebrand disease*) najczęściej wykrywana na świecie wrodzona skaza krwotoczna. Przeciętna częstość występowania tej choroby, niezależnie od rasy czy grupy etnicznej, to 1 na 5–10 tys. urodzonych mężczyzn. W Polsce, na podstawie wyników badania epidemiologicznego przeprowadzonego w 2004 roku, częstość występowania hemofilii A i B oszacowano łącznie na 1/5600 mężczyzn [1]. W Ogólnopolskim Rejestrze Wrodzonych Skaz Krwotocznych prowadzonym w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii (IHT) w Warszawie obecnie znajduje się ponad 2000 chorych na HA.

U podłoża HA leży brak lub upośledzenie syntezy osoczowego czynnika krzepnięcia VIII (FVIII, *factor VIII*). Choroba jest dziedziczona w sposób recesywny sprzężony z płcią, co sprawia, że skaza krwotoczna objawia się głównie u mężczyzn, zaś kobiety są nosicielkami zmutowanego wariantu genu kodującego czynnik krzepnięcia VIII (*F8*) (ryc. 1A). W literaturze opisano kilka niezwykle rzadkich przypadków kobiet z objawową HA, co może się zdarzyć: w przypadku skrajnej lionizacji (nieprawidłowej inaktywacji chromosomu X pochodzącego od jednego z rodziców); w zespole Turnera (monosomia chromosomu X); u córki urodzonej ze związku nosicielki HA i chorego na HA; w przypadku translokacji zrównoważonej z udziałem *locus* Xq28 [2, 3].

Należy dodać, że ryzyko urodzenia przez nosicielkę HA syna lub córki obarczonych genem hemofilii jest takie samo i wynosi 50%.

Budowa i rola czynnika VIII w hemostazie

Czynnik VIII, dawniej zwany czynnikiem przeciwhemofilowym A lub globuliną antyhemofilową, jest glikoproteiną osocza syntetyzowaną w wątrobie, śledzionie oraz węzłach chłonnych [4]. Wśród osoczowych czynników krzepnięcia FVIII jest jednym z większych białek, albowiem prekursor FVIII jest złożony z 2351 aminokwasów (aa) o łącznej masie cząsteczkowej blisko 300 kDa. Potranslacyjna modyfikacja cząsteczki FVIII, poprzedzona odszczepieniem 19-aa sekwencji sygnałowej, prowadzi do powstania dojrzałej formy zbudowanej z 2332 aa. W cząsteczce FVIII można wyodrębnić poszczególne domeny oznaczone jako *A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2* (ryc. 1B). Co ciekawe, struktura białkowa FVIII jest bardzo zbliżona do struktury innego ważnego czynnika krzepnięcia — czynnika V (proakceleryny). W osoczu FVIII krąży niekowalencyjnie połączony z czynnikiem von Willebranda (vWF, *von Willebrand factor*), co przede wszystkim zabezpiecza go przed przedwczesną proteolityczną degradacją przez aktywowane białko C (APC, *activated protein C*) oraz warunkuje jego stabilność w krwiobiegu. Większość znajdującego się w układzie krążenia

FVIII występuje w postaci nieaktywnego proenzymu — dwułańcuchowego polipeptydu, złożonego z łańcucha ciężkiego (domeny A1, A2, B) i łańcucha lekkiego (domeny A3, C1, C2) [5].

Do aktywacji FVIII do FVIIIa w osoczu dochodzi w wyniku hydrolizy wiązań peptydowych w pozycji Arg372, Arg740 i Arg1689, głównie pod wpływem trombiny, a także z udziałem aktywnego czynnika X (Xa). Rola FVIIIa w procesie krzepnięcia krwi polega w szczególności na aktywacji czynnika krzepnięcia IX do IXa w obecności fosfolipidów płytek krwi, co warunkuje wygenerowanie w szlaku wewnątrzpochodnym niezbędnej do utworzenia skrzepu trombiny. Dlatego w sytuacji niedoboru lub braku FVIII w osoczu obserwuje się nadmierną skłonność do krwawień.

Badania osoczowe w diagnostyce hemofilii A

Hemofilię A rozpoznaje się zwykle na podstawie wyników osoczowych testów hemostazy. U pacjentów z HA w badaniach laboratoryjnych obserwuje się przedłużenie czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT, *activated partial thromboplastin time*) oraz zmniejszoną aktywność koagulacyjną czynnika VIII (FVIII:C). Ponadto prawidłowa aktywność i zawartość vWF pozwala wykluczyć ciężką postać vWD.

Fenotyp choroby determinuje stopień niedoboru czynnika krzepnięcia VIII w osoczu. Na tej podstawie wyróżnia się trzy jej postaci: ciężką (FVIII:C < 1 jμ./dl), umiarkowaną (FVIII:C 1–5 jμ./dl) oraz łagodną (FVIII:C od > 5 do 40 jμ./dl). W przypadku nosicieli zmutowanego genu *F8* u części kobiet obserwuje się w badaniach koagulacyjnych prawidłową aktywność FVIII:C w osoczu, natomiast u pozostałych uzyskuje się wartości zmniejszone średnio o połowę (co zwykle jednak wystarcza do sprawnego funkcjonowania hemostazy). Przyjmuje się, że w grupie pacjentek z obniżoną aktywnością FVIII:C w osoczu skaza krwotoczna może ujawnić się w sytuacji, gdy aktywność tego czynnika krzepnięcia wynosi mniej niż 25 jμ./dl.

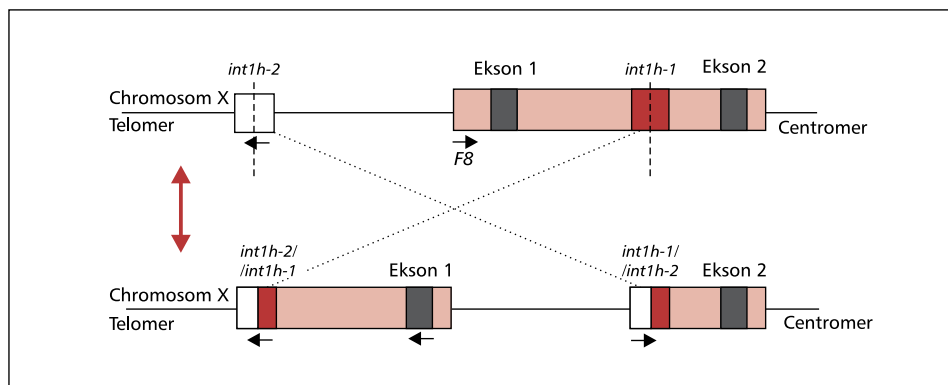
Obecnie uważa się, że diagnostyka HA powinna obejmować zarówno badania koagulacyjne, jak i genetyczne, umożliwiające poznanie mutacji sprawczej tej skazy krwotocznej [6, 7]. Identyfikacja mutacji odpowiedzialnej za HA pozwala wstępnie oszacować ryzyko wystąpienia inhibitora wobec FVIII, ułatwia przeprowadzenie molekularnej diagnostyki nosicielstwa u kobiet z rodzin dotkniętych HA oraz usprawnia diagnostykę prenatalną.

Podłoże molekularne hemofilii A

Sekwencję DNA (NM_000132.3) oraz umiejscowienie genu czynnika VIII (*gene ID: 2157*) w ludzkim genomie poznano w latach 80. ubiegłego stulecia [5, 8, 9]. Dziś także wiadomo, że *F8* jest dość dużym genem, zbudowanym ze 186 tysięcy par zasad (kbp, *kilo base pair*), co stanowi około 0,1% DNA chromosomu X [10]. Gen *F8* zmapowano w dystalnym regionie długiego ramienia chromosomu X, gdzie zajmuje *locus* q28 (ryc. 1A). Reprezentowane przez 26 eksonów DNA kodujące informację genetyczną stanowi około 4% całego genu *F8*, zaś pozostałe 96% zajmują sekwencje intronowe [11]. Wielkość eksonów *F8* waha się w granicach od 69 do 262 bp, przy czym wyjątek stanowią znacznie większe eksony 14 (3106 bp) oraz 26 (1958 bp) [12]. W cząsteczce FVIII ekson 14 koduje dużą część domeny B, natomiast znaczna część eksonu 26 stanowi region niepodlegający translacji w procesie biosyntezy białka (UTR, *untranslated region*). Sekwencje intronowe *F8* mają wielkość 14–32 kbp, a największa z nich buduje intron 22 [3]. Transkrypt genu *F8* jest dość duży i zawiera około 9000 bp, z czego kodujące informację genetyczną DNA zajmuje 7053 bp.

Charakterystyczną cechą genu *F8* jest obecność licznych sekwencji DNA bogatych w cytozynę i guaninę (tzw. wysp CpG) [13]. W intronie 22 tworzą one 9,5 kbp region (*int22h-1*), który występuje w dwóch dodatkowych kopiach (*int22h-2* oraz *int22h-3*) poza genem *F8* (tj. w regionie telomerowym oddalonym o ok. 300 bp oraz 400 bp). Sekwencja nukleotydowa wszystkich trzech regionów homologicznych jest niemal w 98% identyczna, przy czym kopie pozagenowe (*int22h-2* oraz *int22h-3*) są transkrybowane w odwrotnym kierunku, w porównaniu z sekwencją wewnątrz genu (*int22h-1*). Dodatkowo region *int22h-1* zawiera obszar o wielkości 3,5 kbp obfitujący w pary G-C, z czego odcinek o wielkości jednej kbp składa się w 79% z tych zasad [14]. Uwarunkowania te odgrywają istotną rolę w patogenezie HA, zwłaszcza w powstawaniu mutacji inwersyjnych w intronach 1 i 22.

Podobnie między pierwszym i drugim eksonem genu *F8* znajduje się region o wielkości jednej kbp (*int1h-1*), która ma swoją homologiczną kopię pozagenową (*int1h-2*). Region ten znajduje się bliżej telomera chromosomu X, jest oddalony o około 140 kbp od genu *F8* i także jest transkrybowany w przeciwnym kierunku, w porównaniu z sekwencją wewnątrz genu [15].



Rycina 2. Mechanizm powstawania mutacji inwersyjnej w intronie 1 (INV1) genu *F8* (opis w tekście); INV1 — mutacja inwersyjna w intronie 1

Figure 2. The mechanism of inversion mutation in the intron 1 (INV1) *F8* gene (described in the text); INV1 — inversion mutation in the intron 1

Mutacje sprawcze hemofilii A

Molekularne mechanizmy odpowiedzialne za wystąpienie HA są dość dobrze poznane. Wiadomo, że wynikiem odpowiedzialnej za hemofilię mutacji w genie *F8* jest brak syntezy, jej ograniczenie bądź powstanie nieprawidłowego białka FVIII. Zwykle choroba ma cięższy przebieg kliniczny, jeżeli przyczyną są mutacje, w których efekcie dochodzi do utraty większego fragmentu genu lub przedwczesnego wprowadzenia do sekwencji kodonu „stop”, ponieważ zmiany te prowadzą do skrócenia łańcucha białkowego.

Podstawowym celem przeprowadzania badań genetycznych w HA jest identyfikacja mutacji sprawczej w rodzinach dotkniętych chorobą, poznanie drogi dziedziczenia zmutowanego genu w rodzinie oraz potwierdzenie lub wykluczenie stanu nosicielstwa [16]. Ponadto poznanie mutacji sprawczej u chorych na HA umożliwia wstępną ocenę ryzyka wystąpienia inhibitora FVIII w odpowiedzi na wstrzykiwany dożylnie koncentrat czynnika VIII, co może pomóc w wyborze optymalnej, zindywidualizowanej strategii leczenia.

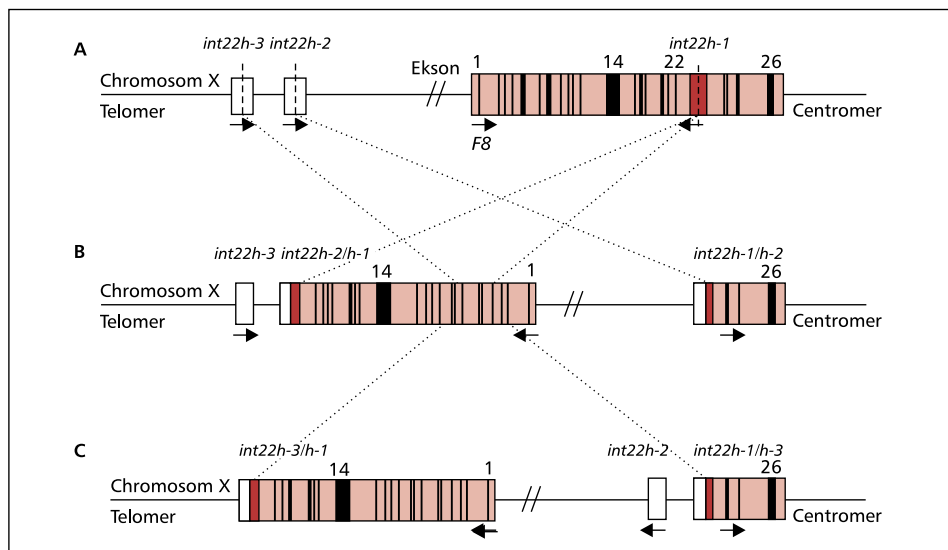
Blisko połowę identyfikowanych mutacji sprawczych w ciężkiej HA stanowią mutacje inwersyjne [17]. Najczęściej, bo w 40–45% przypadków, wykrywa się inwersję w intronie 22 (INV22). Znacznie rzadziej, w 1–5% przypadków, wykrywa się inwersję w intronie 1 (INV1). Poza wymienionymi mutacjami inwersyjnymi zachorowania na HA mogą być wywołane obecnością w genie *F8* mutacji punktowych. Wśród nich znajdują się zarówno substytucje pojedynczych nukleotydów, jak i małe (< 50 bp) delecje, duplikacje lub insercje. Przyczyną HA są także większe rearanżacje geno-

we, w których delecje lub insercje ulegają większe (> 50 bp) fragmenty genu. Ponadto, oprócz wykrywanej z dużą częstością INV22 oraz kilku rzadziej powtarzających się mutacji punktowych, większość wykrywanych zmian w genie *F8* powstaje spontanicznie i ma unikatowy charakter.

Mechanizm powstawania mutacji inwersyjnej w intronie 22 (INV22) genu *F8* opisano w 1993 roku [18, 19]. Inwersja ta jest następstwem homologicznej rekombinacji między regionem znajdującym się wewnątrz intronu 22 genu *F8* (*int22h-1*) i jedną z dwóch identycznych pozagenowych kopii (*int22h-2* lub *int22h-3*) (ryc. 2). Zaś jej wynikiem jest przerwanie ciągłości genu *F8* wskutek dużej inwersji (obrócenia sekwencji DNA) oraz translokacji eksonów 23–26. W zależności od tego, która z pozagenowych kopii genu uczestniczy w *crossing-over*, wyróżnia się inwersję: typu I — dystalną (*int22h-1/int22h-3*, 83% przypadków), typu II — proksymalną (*int22h-1/int22h-2*, 16% przypadków) oraz typu III — mieszaną (oprócz sekwencji *int22h-2* i *int22h-3* obecne są dodatkowe kopie pozagenowe, 1% przypadków) [20].

Druga mutacja inwersyjna występuje w intronie 1 (INV1) genu *F8* i powstaje podczas homologicznej rekombinacji między znajdującym się wewnątrz intronu 1 regionem *in1h-1* oraz pozagenową kopią *in1h-2* [15] (ryc. 3). Konsekwencją tej rearanżacji jest przerwanie ciągłości genu, oddzielenie promotora i eksonu 1 od pozostałych sekwencji *F8*.

Warto nadmienić, że mutacje inwersyjne powstają praktycznie wyłącznie podczas podziału mejotycznego w spermatogenezie, rzadko zaś *de novo* w żeńskich komórkach rozrodczych [17, 20, 21]. Oznacza to, że w 98% przypadków HA pierw-



Rycina 3. Mechanizm powstawania mutacji inwersyjnej w intronie 22 (INV22) genu *F8* (opis w tekście); **A.** Allel prawidłowy (brak INV22); **B.** INV22 typu I (dystalna); **C.** INV22 typu II (proksymalna); INV22 — mutacja inwersyjna w intronie 22

Figure 3. The mechanism of the inversion mutation in the intron 22 (INV22) *F8* gene (described in text); **A.** Normal allele (no INV22); **B.** INV22 type I (distal); **C.** INV22 type II (proximal); INV22 — inversion mutation in the intron 22

szą osobą obciążoną zmutowanym genem hemofilii jest córka mężczyzny, w którego komórkach rozrodczych doszło do mutacji [20]. Dzieje się tak, ponieważ u mężczyzn podczas podziału mejozy sprzyja obecność pojedynczego chromosomu X, zaś obecność dwóch chromosomów X u kobiet temu przeciwdziała [17].

Pierwsze mutacje punktowe w genie *F8* opisano w 1985 roku [22]. Do tej pory w genie *F8* zidentyfikowano ponad 2000 różnych mutacji sprawczych, które są zebrane w internetowych bazach mutacji, na przykład w Bazie Mutacji Genetycznych Człowieka (HGMD, *The Human Gene Mutation Database*; www.hgmd.org) oraz w Bazie Wariantów Genetycznych FVIII (*Factor VIII Variant Database*; <http://www.factorviii-db.org/>). Wśród zamieszczonych tam zmian dominują mutacje zmiany sensu i mutacje nonsensowne (60%). Rzadziej opisywanymi defektami są mutacje splicingowe (7%), małe delecje (16%), insercje lub duplikacje (6%) bądź większe rearanżacje genowe (11%), na przykład delecje większych fragmentów genu. Bez względu na rodzaj mutacji sprawczej największa ich liczba jest wykrywana w eksonie 14 genu *F8*, co tłumaczy dużą liczbę budujących go nukleotydów (3106 bp). Najczęściej podstawianym aminokwasem jest arginina (Arg), ponieważ w czterech z sześciu możliwych opisujących ją kodonów występują pary GC.

Heterogenność mutacji punktowych genu *F8* w dużej mierze dowodzi ich pochodzenia *de novo* [17]. Wśród tych zmian są warianty genetyczne *F8* zidentyfikowane tylko u pojedynczych osób, jak również wykryte nawet w kilkudziesięciu przypadkach (np. c.1834C>T [p.Arg612Cys]; c.6683G>A [p.Arg2228Gln]) [13].

Należy dodać, że inna jest częstość wykrywania poszczególnych typów mutacji sprawczych zależnie od postaci klinicznej choroby. Ciężką HA najczęściej wywołują mutacje inwersyjne, duże delecje, mutacje z przesunięciem ramki odczytu oraz mutacje nonsensowne. W umiarkowanej i łagodnej postaci HA najczęściej spotyka się mutacje zmiany sensu, mutacje splicingowe lub mutacje z przesunięciem ramki odczytu. Oprócz tego fenomenem w nieciężkiej postaci HA jest to, że w około 1/3 przypadków mutacje sprawcze są powodem rozbieżności wyników aktywności FVIII mierzonej metodą koagulacyjną jednostopniową oraz metodą chromogenną [23–25].

Mutacje sprawcze hemofilii A a ryzyko wystąpienia inhibitora

Niektóre mutacje w genie *F8*, wraz z innymi czynnikami środowiskowymi, przyczyniają się do wystąpienia u około 30% chorych najgroźniejszego powikłania leczenia HA, tj. pojawienia się

w krwiobiegu przeciwciał neutralizujących FVIII (tzw. inhibitora FVIII). Inhibitor wielokrotnie częściej pojawia się u pacjentów z ciężką postacią tej skazy niż u osób z umiarkowaną i łagodną postacią choroby [26]. Udowodniono, że częstość występowania przeciwciał anty-FVIII jest 7–10-krotnie większa u pacjentów z obecnym ciężkim defektem genu *F8* (tj. dużą delecją, mutacją nonsensowną czy INV22) niż u chorych z łagodniejszym defektem genu *F8* (mutacją zmiany sensu, małą delecją czy mutacją splicingową [27]. Analiza związku typu wykrywanej mutacji z ryzykiem wystąpienia inhibitora przeprowadzona przez Schwaaba i wsp. [28] wykazała, że u ponad 30% chorych z przeciwciałami wobec FVIII wykrywano duże delecje, mutacje nonsensowne lub mutacje inwersyjne. Najniższe ryzyko wystąpienia inhibitora FVIII dotyczyło chorych z mutacjami zmiany sensu lub małymi delecjami (< 10%). Duże znaczenie w powstawaniu inhibitora ma również miejsce w sekwencji białkowej cząsteczki FVIII, w którym dochodzi do mutacji. Te patogenne zmiany najczęściej identyfikuje się w sekwencjach DNA kodujących domeny A2, A3 oraz C1, C2 [26, 29]. W innym badaniu wykazano, że obecność mutacji w domenie A2 lub C2 zwiększa 4-krotnie ryzyko wytworzenia inhibitora w porównaniu z mutacjami zlokalizowanymi w innych regionach FVIII [30]. Ponadto ryzyko wytworzenia przeciwciał anty-FVIII zależy także od właściwości fizykochemicznych podstawionego w wyniku mutacji aminokwasu [26].

Strategia przeprowadzania badań molekularnych

Strategię postępowania diagnostycznego warunkuje to, czy w badanej rodzinie występuje lub występowała w przeszłości HA, ewentualnie czy poznano mutację odpowiedzialną za jej wystąpienie. Właśnie z tego powodu w badaniach genetycznych HA niezwykle ważną rolę odgrywa dokładnie zebrany wywiad rodzinny. Odmienne jest postępowanie, gdy zachorowanie na hemofilię jest pierwszym przypadkiem w rodzinie (*de novo*), od tego, gdy choroba objawia się po raz kolejny. W przypadku rodziny o nieznaną mutację diagnostykę rozpoczyna się od poszukiwania mutacji inwersyjnych (INV22 oraz INV1) [31]. Na wstępie poszukuje się obecności inwersji w intronie 22, a jeśli wynik tego badania jest negatywny, to wtedy poszukuje się inwersji w intronie 1. W przypadku niewykrycia mutacji inwersyjnych w drugim etapie poszukuje się mutacji sprawczych, sekwencjonując gen *F8*. Jeżeli i tą metodą nie udaje się określić mutacji sprawczej,

to w kolejnym etapie poszukuje się większych rearanżacji (delecji lub duplikacji) [32]. Oczywistym jest również fakt, że diagnostyka molekularna jest znacznie ułatwiona w rodzinach, w których już wcześniej zidentyfikowano mutację sprawczą, gdyż u tych pacjentów badanie genetyczne jest ukierunkowane na wykrycie tej właśnie mutacji. Opisany algorytm dotyczy diagnostyki molekularnej ciężkiej hemofilii, natomiast w przypadku nieciężkiej postaci HA diagnostykę zwykle od razu rozpoczyna się od sekwencjonowania genu *F8*.

Metody molekularne wykorzystywane w diagnostyce hemofilii A

W analizie genetycznej HA „złotym standardem” w wykrywaniu mutacji inwersyjnych jest hybrydyzacja metodą Southerna (*Southern blotting*). Tą techniką można zarówno identyfikować INV1 oraz INV22, łącznie z określeniem jej typu, jak i wykrywać delecje czy duplikacje w intronie 22, a także częściowo mozaikowość somatyczną. Jednak powszechnie wiadomo, że technika ta jest skomplikowana, pracochłonna oraz wymaga stosowania niebezpiecznych dla zdrowia odczynników, co nie sprzyja codziennej praktyce laboratoryjnej [11, 18].

Obecnie do poszukiwania mutacji inwersyjnych w *F8* najczęściej wykorzystuje się dwie metody molekularne będące modyfikacjami reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*). Pierwszą z nich jest metoda *long-PCR* (LD-PCR, *long distance PCR*), opracowana przez Liu i wsp. [14], zaś drugą — modyfikacja odwróconej PCR (IS-PCR, *inverse shifting PCR*), opracowana przez Rosetti i wsp. [33].

Wprowadzenie w 1998 roku metody LD-PCR do diagnostyki molekularnej HA było wydarzeniem przełomowym, gdyż do tego momentu mutacje inwersyjne wykrywano właśnie złożoną i pracochłonną metodą Southerna. Stosowanie metod opartych na PCR jest w tym przypadku trudne ze względu na złożoność genu *F8* oraz wysoką zawartość par GC w sekwencjach intronowych, co znacznie komplikuje amplifikację. Metoda LD-PCR, dzięki zastosowaniu specyficznej mieszaniny polimeraz, pozwala na powielenie dłuższych fragmentów DNA (5–40 kbp) w krótkim czasie. W diagnostyce INV22 produktem reakcji LD-PCR są fragmenty DNA o wielkości 12 kbp, 11 kbp oraz 10 kbp. Fragmenty DNA uzyskiwane u osoby zdrowej to 12 kbp oraz 10 kbp, u chorego mężczyzny — 11 kbp oraz 10 kbp, zaś u nosicielki — 12 kbp, 11 kbp oraz 10 kbp. Natomiast w diagnostyce INV1 produktami reakcji są fragmenty DNA wielkości 1,5 kbp oraz 1 kbp.

U osoby zdrowej uzyskuje się fragment wielkości 1,5 kbp, u chorego mężczyzny — 1 kbp, zaś u nosicielki — 1,5 kbp oraz 1 kbp [15]. W kolejnych latach pojawiły się liczne publikacje, w których opisywano modyfikacje metody LD-PCR oraz jej zastosowanie w diagnostyce HA [34, 35]. Badania te pozwoliły pogłębić diagnostykę molekularną, umożliwiając między innymi określenie typu INV22 oraz wykrywanie większych delecji czy duplikacji znajdujących się w tym rejonie. Powodzenie reakcji LD-PCR jest w dużej mierze uwarunkowane jakością otrzymanej próbki DNA oraz specyficnością zastosowanej mieszaniny polimeraz. Jednak, w odróżnieniu od hybrydizacji metodą Southerna, nie wymaga tak dużego stężenia badanego DNA, co jest istotne zwłaszcza w przypadku diagnostyki prenatalnej [31].

Kolejnym „kamieniem milowym” w diagnostyce molekularnej HA było opracowanie i wdrożenie metody IS-PCR [33]. W tym badaniu powielenie określonych fragmentów DNA w reakcji PCR poprzedza etap trawienia DNA enzymem restrykcyjnym BclI oraz ligacja powstałych fragmentów [36]. Zaletą metody jest to, że produkt reakcji ligacji, będący matrycą do PCR, może być wykorzystany w wykrywaniu zarówno INV22, jak i INV1. W ramach diagnostyki wykonuje się dwie różne reakcje multipleksowego PCR (różniące się zastosowanym zestawem starterów), tj. 1) test diagnostyczny (jakościowy) oraz 2) test uzupełniający (różnicowanie typu INV22). W teście diagnostycznym INV22 produktami reakcji IS-PCR są fragmenty o wielkości 487 bp, 385 bp oraz 333 bp. Przy czym u osoby zdrowej uzyskuje się fragmenty 487 bp, u chorego mężczyzny — 333 bp (typ I) lub 385 bp (typ II), zaś u nosicielki — 487 bp oraz 333 bp (typ I) lub 385 bp (typ II). W teście uzupełniającym INV22 produktami reakcji IS-PCR są fragmenty o wielkości 405 bp, 457 bp oraz 559 bp. U osoby zdrowej uzyskuje się fragmenty 405 bp i 457 bp, u chorego mężczyzny — 457 bp i 559 bp (typ I) lub 405 bp i 559 bp (typ II), natomiast u nosicielki (bez względu na typ INV22) — 405 bp, 457 bp oraz 559 bp [36]. W diagnostyce INV1 produktami reakcji są fragmenty wielkości 304 bp oraz 224 bp. Wówczas przeprowadza się jedną reakcję, w której otrzymuje się u zdrowej osoby produkty wielkości 304 bp, u chorego mężczyzny — 224 bp, zaś u nosicielki — 304 bp i 224 bp. Dwa lata po wprowadzeniu tej metody do diagnostyki HA udoskonalono ją na tyle, że obecnie oprócz identyfikacji oraz określenia typu INV22 umożliwia również wykrycie większych delecji (Del22) czy duplikacji (Dup22) w intronie 22 [11, 36]. Pozwala to na bardziej precyzyjną diagnostykę, zwłaszcza nosicieli HA, i wykrycie

wszystkich większych mutacji w intronie 22. Ponadto IS-PCR umożliwia wykrycie mozaikowości we krwi obwodowej na poziomie od 5% (dla INV22) do 10% (dla INV1). Metoda IS-PCR jest trochę bardziej skomplikowana i czasochłonna w porównaniu z LD-PCR, jednak umożliwia równoczesną diagnostykę INV22 i INV1 oraz nie wymaga bezpośredniej amplifikacji regionów bogatych w pary GC, co czyni ją bardziej powtarzalną. Poza tym IS-PCR, w przeciwieństwie do LD-PCR, nie wymaga wysokiej jakości DNA; pozwala na przykład na użycie częściowo zdegradowanej próbki DNA.

Niegdyś, ze względu na dużą liczbę i heterogenność mutacji w *F8*, badania genetyczne w kierunku nosicielstwa HA u kobiet częściej wykonywano pośrednimi metodami, tj. za pomocą tak zwanej analizy sprzężeń (*linkage analysis*), czyli śledzenia dziedziczenia haplotypów sprzężonych z chorobą [31]. Analizy sprzężeń dokonuje się zwykle z wykorzystaniem reakcji łańcuchowej amplifikacji w połączeniu z analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP, *PCR-restriction fragment length polymorphism*). Warunkiem uzyskania informatywnego wyniku tej analizy jest dysponowanie próbką DNA od probanda. Obecnie w większości laboratoriów postęp technologiczny oraz większa dostępność nowych technik molekularnych umożliwiają stosowanie bezpośrednich metod diagnostycznych, tj. różnych modyfikacji PCR oraz bezpośredniego sekwencjonowania DNA. Jednak w szczególnych przypadkach, w których mimo zastosowania dostępnych narzędzi molekularnych nie udaje się wykryć mutacji sprawczej w rodzinie dotkniętej HA, można podjąć próbę analizy dziedziczenia poszczególnych kopii genu *F8* u kobiet z rodziny chorego. W populacji polskiej do badania stanu nosicielstwa HA wytypowano analizę pięciu wariantów polimorficznych, zlokalizowanych w intronach 1, 13, 22, 18 oraz 24 [37].

W momencie wykluczenia mutacji inwersyjnych w *F8* poszukuje się mutacji punktowych. W niektórych laboratoriach, z powodów ekonomicznych, do wykrywania tych zmian wykorzystuje się najpierw przesiewowe metody molekularne, takie jak na przykład analiza polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA (SSCP, *single strand conformation polymorphism*), analiza elektroforetyczna rozróżniająca konformację DNA (CSGE, *conformation sensitive gel electrophoresis*) lub wysokosprawna denaturująca chromatografia cieczowa (DHPLC, *denaturing high-performance liquid chromatography*) [31]. Procedura ta pozwala na wstępną lokalizację zmiany w genie *F8*, która następnie jest identyfiko-

wana metodą bezpośredniego sekwencjonowania. W wysokospecjalistycznych laboratoriach hemostazy najczęściej przeprowadza się bezpośrednie sekwencjonowanie genu *F8* (zwykle metodą wg Sangera), uwzględniając regiony promotorowe oraz kodujące (26 eksonów) wraz z oskrzydłającymi je sekwencjami intronowymi. Metodę bezpośredniego sekwencjonowania uznaje się za „złoty standard” w diagnostyce molekularnej hemofilii [31]. To metoda dość kosztowna i pracochłonna ze względu na dużą liczbę i wielkość analizowanych fragmentów. Sekwencjonowanie DNA pozwala wprawdzie na identyfikację pojedynczych zmian nukleotydów, małych insercji lub delecji, ale poza jej zasięgiem pozostaje wykrycie dużych rearanżacji genowych (np. delecji czy insercji fragmentu genu).

W celu identyfikacji większych rearanżacji w genie *F8* bardzo często stosuje się technikę multipleksowej amplifikacji sond zależną od ligacji (MLPA, *multiplex ligation-dependent probe amplification*) [32, 38, 39]. Metoda ta jest przeznaczona do wykrywania zmiany liczby kopii DNA, tj. delecji lub duplikacji fragmentu lub wielu eksonów. Metoda MLPA umożliwia przeprowadzenie w jednym badaniu ilościowej oceny kilkudziesięciu różnych sekwencji nukleotydowych DNA poddanych amplifikacji z zestawem specyficznych sond hybrydujących do sekwencji eksonowych (np. zestaw SALSA MLPA P178-B2 *F8* produkowany przez MRC Holland). Ograniczeniem techniki MLPA jest brak możliwości wykrycia delecji/duplikacji obecnych poza regionami reprezentowanymi przez zestaw sond. Ponadto MLPA nie pozwala na identyfikację mutacji inwersyjnych, mutacji punktowych, zrównoważonych translokacji oraz mozaikowości niewielkiego stopnia.

Jedną z najnowocześniejszych metod — CGH do mikromacierzy (aCGH, *array comparative genomic hybridisation*) — jest technika umożliwiająca analizę całego genomu w jednym badaniu z bardzo dużą dokładnością (możliwe jest wykrycie zmian o wielkości nawet 12 kbp). Podobnie jak MLPA umożliwia zidentyfikowanie niezrównoważeń genomu (delecji/duplikacji). Ograniczeniem aCGH jest brak możliwości identyfikacji inwersji, mutacji punktowych, małych delecji, zrównoważonych translokacji oraz mozaikowości niewielkiego stopnia. Komercyjne zestawy sond dla genów kontrolujących hemostazę nie są dostępne, dlatego trwają prace nad zaprojektowaniem specyficznego panelu [40].

W wysokospecjalistycznych laboratoriach genetycznych coraz częściej wykorzystuje się również inną nowoczesną technikę molekularną — sekwencjonowanie nowej generacji (NGS, *next generation sequencing*), co również dotyczy diag-

nostyki hemofilii [41]. Metoda ta umożliwia jednoczasową analizę wielu genów, eksomu lub nawet całego genomu człowieka. Pozwala na wykrycie mutacji punktowych oraz INV22 i INV1, a także zmian znajdujących się w odległych sekwencjach intronowych. Wysoki koszt tego badania oraz nieodzowność profesjonalnej analizy bioinformatycznej uzyskanych danych nie sprzyjają wdrożeniu tej techniki do praktyki laboratoryjnej.

Raportowanie wyników badań genetycznych w HA powinno być zgodne z obowiązującymi zasadami nazewnictwa mutacji opracowanymi przez HGVS (*Human Genome Variation Society*; www.hgvs.org/mutnomen/), przyjmując za nukleotyd +1 w cDNA pierwszy nukleotyd (adeninę) w kodonie startowym (A w kodonie ATG), zaś za kodon +1 w sekwencji białkowej — metioninę (ATG). W zapisach mutacji wykrytych uprzednio należy uwzględnić obecne zasady, dodając 19 reszt aminokwasowych do pozycji zmutowanego kodonu.

Trudności w interpretacji wyników badań genetycznych

Interpretacja uzyskanego wyniku badania genetycznego jest jednoznaczna, jeżeli u pacjenta wykrywa się mutację inwersyjną w intronie 22 lub w intronie 1 oraz w sytuacji zidentyfikowania opisanej już wcześniej i zarejestrowanej w bazie danych zmiany. Trudności z interpretacją uzyskanego wyniku pojawiają się w przypadku wykrycia wariantu genu *F8* dotychczas nieopisywanego. Dzieje się tak dlatego, że mimo zastosowania różnych narzędzi bioinformatycznych (*in silico*) i braku możliwości przeprowadzenia badań funkcjonalnych trudno odpowiedzieć na pytanie, czy wariant ten jest odpowiedzialny za wystąpienie choroby, czy też jest wynikiem naturalnej zmienności genetycznej ludzkiego DNA.

Analizując wynik nosicielstwa HA u kobiet należy uwzględnić fakt, że na podstawie badań genetycznych (DNA z limfocytów krwi obwodowej) nie można wykluczyć u nich zarówno mozaikowości somatycznej, jak i germinalnej [17, 31]. Mozaikowość dotyczy zwłaszcza mutacji pojawiających się *de novo* w rodzinach dotkniętych hemofilią. Opisywano pojedyncze przypadki mozaikowości somatycznej, w których mutacja sprawcza u matki nosicielki jest obecna w części DNA komórek krwi obwodowej oraz w części DNA komórek skóry (fibroblastów) [21]. Mozaikowość germinalna (mozaikowość gonad) to zjawisko, w którym mutacja w *F8* jest obecna w DNA części lub wszystkich komórek rozrodczych, natomiast nieobecna — w DNA pozostałej części komórek

rozrodczych oraz w komórkach somatycznych. Mozaikowość w gonadach kobiety można potwierdzić tylko pośrednio, na przykład w sytuacji, gdy mimo negatywnego wyniku nosicielstwa hemofilii w badaniu z komórek somatycznych matki chorego chłopca kobieta rodzi drugiego chorego syna.

Podobnie jak wszystkie badania diagnostyczne, także badania genetyczne mają ograniczenia wynikające z czułości stosowanych metod laboratoryjnych. Zatem, mimo zastosowania dostępnych technik molekularnych, u 5–10% mężczyzn z HA nie udaje się określić mutacji sprawczej w genie *F8*. Przyczynami niewykrycia zmian w *F8* są między innymi nieprawidłowe rozpoznanie skazy krwotocznej lub zmiany w DNA zlokalizowane daleko w intronach [16, 42]. Z powyższych względów zaleca się, by w pierwszym etapie zweryfikować rozpoznanie i wykluczyć niedobór FVIII powodowany typem 2N VWD lub sprzężonym niedoborem czynników V i VIII [16]. W kolejnych etapach poszukuje się zmian powodujących defektywne składanie transkryptu. Należy podkreślić, że brak identyfikacji mutacji nie jest równoznaczny z wykluczeniem uprzednio dokonanego rozpoznania hemofilii, a największe nadzieje ujawnienia ukrytych wariantów genetycznych wiąże się w nowych technikami badawczymi, na przykład NGS [43].

Badania prenatalne w hemofilii A

Diagnostyka prenatalna stanowi integralną część opieki nad nosicielkami HA i ich krewnymi. Zasadność przeprowadzania inwazyjnych badań prenatalnych u będących w ciąży nosicielek hemofilii pozostaje przedmiotem licznych dyskusji. Część specjalistów jest zdania, że wynik tego badania umożliwi optymalizację samego aktu porodu oraz sposób postępowania z noworodkiem w pierwszym okresie życia [6]. Inni uważają, że hemofilia nie jest na tyle ciężką chorobą (w nielicznych krajach jest wskazaniem do przerwania ciąży), by ponosić związane z badaniami inwazyjnymi ryzyko utraty ciąży (0,5–2%) [44]. Inwazyjną diagnostykę prenatalną zwykle przeprowadza się metodą biopsji trofoblastu (11.–14. tydzień ciąży) lub amniopunkcji (15.–18. tydzień ciąży) [44]. Z uzyskanego materiału izolowane jest DNA, które służy przeprowadzeniu analizy genetycznej. Jeżeli badania te nie są dostępne, to dodatkową opcją jest wykonanie kordocentezy (po 18. tygodniu ciąży) i pobranie krwi pępowinowej, co pozwala określić aktywność FVIII we krwi dziecka. Oprócz tego w rodzinach dotkniętych hemofilią istnieje możliwość przeprowadzenia pomocniczych nieinwazyjnych badań

genetycznych, umożliwiających określenie płci dziecka już w I trymestrze ciąży (badanie wolnego płodowego DNA w krążeniu matki [ffDNA, *free fetal DNA*]) [45]. W przypadku dzieci męzczyzny chorego na HA poznanie płci dziecka w sposób pośredni pozwala wykluczyć lub potwierdzić odziedziczenie zmutowanego genu *F8* (zdrowy syn lub córka nosicielka). Z kolei w przypadku badania krwi nosicielek HA (u których prawdopodobieństwo urodzenia syna chorego na hemofilię wynosi 25%) wykrycie płci żeńskiej może się przyczynić do podjęcia decyzji o zaniechaniu badań inwazyjnych.

Badania genetyczne w hemofilii w Polsce

W Polsce dostępność badań genetycznych w diagnostyce HA jest ograniczona, co prawdopodobnie wynika z ich wysokich kosztów (brak refundacji przez Narodowy Fundusz Zdrowia) oraz trudności technicznych. W naszym kraju pionierskie badania naukowe w diagnostyce molekularnej HA prowadzono do 2009 roku w Zakładzie Biochemii IHT [37, 46–49]. W najbliższym czasie jest planowane wdrożenie kompleksowych badań genetycznych HA w Zakładzie Hemostazy i Chorób Metabolicznych IHT.

Piśmiennictwo

1. Windyga J., Łopaciuk S., Stefańska E. i wsp. Hemofilia i pokrewne skazy krwotoczne w Polsce. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2004; 112: 1197–1202.
2. Pavlova A., Brondke H., Müsebeck J. i wsp. Molecular mechanisms underlying hemophilia A phenotype in seven females. *J. Thromb. Haemost.* 2009; 7: 976–982.
3. Pruthi R.K. Hemophilia: a practical approach to genetic testing. *Mayo Clin. Proc.* 2005; 80: 1485–1499.
4. Wion K.L., Kelly D., Summerfield J.A., Tuddenham E.G., Lawn R.M. Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature* 1985; 317: 726–729.
5. Toole J.J., Knopf J.L., Wozney J.M. i wsp. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* 1984; 312: 342–347.
6. Windyga J. Hemofilie A i B. W: Dmoszyńska A. (red.). *Wielka Interna. Hematologia*. Wydawnictwo Medical Tribune Polska, Warszawa 2011: 608–630.
7. Kemball-Cook G., Gomez K. Molecular basis of hemophilia A. W: Christine A., Lee C.A., Berntorp E.E., Hoots K.W. (red.). *Textbook of hemophilia*. Wydanie II. Wiley-Blackwell, Oxford 2004: 24–32.
8. Gitschier J., Wood W.L., Goralka T.M. i wsp. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984; 312: 326–330.
9. Wood W.L., Capon D.J., Simonsen C.C. i wsp. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* 1984; 312: 330–337.
10. Tantravahi U., Murty V.V.S., Jhanwar S.C. i wsp. A. Physical mapping of the factor VIII gene proximal to two polymorphic DNA probes in human chromosome band Xq28: implications for factor VIII gene segregation analysis. *Cytogenet. Cell Genet.* 1986; 42: 75–79.
11. Rossetti L.C., Radic C.P., Abelleiro M.M., Larripa I.B., De Brasi C.D. Eighteen years of molecular genotyping the hemophilia inversion

- hotspot: from southern blot to inverse shifting-PCR. *Int. J. Mol. Sci.* 2011; 12: 7271–7285.
12. Shen B.W., Spiegel P.C., Chang C.H. i wsp. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood* 2008; 111: 1240–1247.
 13. Graw J., Brackmann H.H., Oldenburg J. i wsp. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat. Rev. Genet.* 2005; 6: 488–501.
 14. Liu Q., Nozari G., Sommer S.S. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood* 1998; 92: 1458–1459.
 15. 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: 168–174.
 16. de Brasi C., El-Maarri O., Perry D.J. i wsp. Genetic testing in bleeding disorders. *Haemophilia* 2014; 20: 54–58.
 17. Oldenburg J., Ananyeva N.M., Saenko E.L. Molecular basis of haemophilia A. *Haemophilia* 2004; 10: 133–139.
 18. Lakich D., Kazazian H.H. Jr, Antonarakis S.E., Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat. Genet.* 1993; 5: 236–241.
 19. Naylor J., Brinke A., Hassock S., Green P.M., Giannelli F. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum. Mol. Genet.* 1993; 2: 1773–1778.
 20. Antonarakis S.E., Rossiter J.P., Young M. i wsp. Factor VIII inversions in severe hemophilia A: results from an international consortium. *Blood* 1995; 86: 2206–2212.
 21. Oldenburg J., Rost S., El-Maarri O. i wsp. De novo factor VIII gene intron 22 inversion in a female carrier presents as a somatic mosaicism. *Blood* 2000; 96: 2905–2906.
 22. Gitschier J., Wood W.L., Tuddenham E.G.D. i wsp. Detection and sequence of mutations in the factor VIII gene of haemophiliacs. *Nature* 1985; 315: 427–430.
 23. Oldenburg J., Pavlova A. Discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII activity assay results can lead to misdiagnosis of haemophilia A phenotype. *Hamostaseologie* 2010; 30: 207–211.
 24. Pavlova A., Delev D., Pezeshkpoor B., Müller J., Oldenburg J. Haemophilia A mutations in patients with non-severe phenotype associated with a discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII activity assays. *Thromb. Haemost.* 2014; 111: 851–861.
 25. Cid A.R., Calabuig M., Cortina V. i wsp. One-stage and chromogenic FVIII:C assay discrepancy in mild haemophilia A and the relationship with the mutation and bleeding phenotype. *Haemophilia* 2008; 14: 1049–1054.
 26. Schwaab R., Pavlova A., Albert T., Caspers M., Oldenburg J. Significance of F8 missense mutations with respect to inhibitor formation. *Thromb. Haemost.* 2013; 109: 464–470.
 27. Oldenburg J., El-Maarri O., Schwaab R. Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. *Haemophilia* 2002; 8: 23–29.
 28. Schwaab R., Brackmann H.H., Meyer C. i wsp. Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb. Haemost.* 1995; 74: 1402–1406.
 29. Gouw S.C., Van Der Bom J.G., Van Den Berg H.M. i wsp. Influence of the type of F8 gene mutation on inhibitor development in a single centre cohort of severe haemophilia A patients. *Haemophilia* 2011; 17: 275–281.
 30. Oldenburg J., Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia* 2006; 12: 15–22.
 31. Keeney S., Mitchell M., Goodeve A.; UK Haemophilia Center Doctors' Organization Haemophilia Genetics Laboratory Network. The molecular analysis of haemophilia A: a guideline from the UK haemophilia centre doctors' organization haemophilia genetics laboratory network. *Haemophilia* 2005; 11: 387–397.
 32. Rost S., Löffler S., Pavlova A., Müller C.R., Oldenburg J. Detection of large duplications within the factor VIII gene by MLPA. *J. Thromb. Haemost.* 2008; 6: 1996–1999.
 33. Rossetti L.C., Radic C.P., Larripa I.B., De Brasi C.D. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. *Clin. Chem.* 2005; 51: 1154–1158.
 34. Bagnall R.D., Giannelli F., Green P.M. Int22h-related inversions causing hemophilia A: a novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection. *J. Thromb. Haemost.* 2006; 4: 591–598.
 35. Poláková H., Zmetáková I., Kádasi L. Long distance PCR in detection of inversion mutations of F8C gene in hemophilia A patients. *Gen. Physiol. Biophys.* 2003; 22: 243–253.
 36. 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: 830–836.
 37. Sawecka J., Skulimowska J., Windyga J., Kościelak J. Ocena przydatności polimorfizmu dwunukleotydowych powtórzeń w intronach 1 i 24 genu czynnika VIII do wykrywania nosicielstwa hemofilii A. *Acta Haematol. Pol.* 2009; 40: 97–101.
 38. Acquila M., Pasino M., Di Duca M. i wsp. MLPA assay in F8 gene mutation screening. *Haemophilia* 2008; 14: 625–627.
 39. Rafati M., Ravanbod S., Hoseini A. i wsp. Identification of ten large deletions and one duplication in the F8 gene of eleven unrelated Iranian severe haemophilia A families using the multiplex ligation-dependent probe amplification technique. *Haemophilia* 2011; 17: 705–707.
 40. Goodeve A.C., Pavlova A., Oldenburg J. Genomics of bleeding disorders. *Haemophilia* 2014; 20; 50–53.
 41. Josephson N.C., Martin B., Nakaya S. i wsp. A next generation sequencing approach for genotyping patients with hemophilia. *J. Thromb. Haemost.* 2013; 11: 260–261.
 42. Pezeshkpoor B., Pavlova A., Oldenburg J., El-Maarri O. F8 genetic analysis strategies when standard approaches fail. *Hamostaseologie* 2014; 34: 167–173.
 43. Pezeshkpoor B., Zimmer N., Marquardt N. i wsp. Deep intronic 'mutations' cause hemophilia A: application of next generation sequencing in patients without detectable mutation in F8 cDNA. *J. Thromb. Haemost.* 2013; 11: 1679–1687.
 44. Kadir R.A., Lee C.A. Obstetrics and gynecology: hemophilia. W: Christine A., Lee C.A., Berntorp E.E., Hoots K.W. (red.). *Textbook of hemophilia*. Wydanie II. Willey-Blackwell, Oxford 2004: 269–277.
 45. Chi C., Hyett J.A., Finning K.M., Lee C.A., Kadir R.A. Non-invasive first trimester determination of fetal gender: a new approach for prenatal diagnosis of haemophilia. *BJOG* 2006; 113: 239–242.
 46. Sawecka J., Skulimowska J., Windyga J., Lopaciuk S., Kościelak J. Prevalence of the intron 22 inversion of the factor VIII gene and inhibitor development in Polish patients with severe hemophilia A. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2005; 53: 352–356.
 47. Sawecka J., Skulimowska J., Kościelak J. Mutacje inwersyjne u pacjentów chorych na ciężką hemofilie A. *Acta Haematol. Pol.* 2000; 31: 47–50.
 48. Sawecka J., Skulimowska J., Windyga J., Kościelak J. Inwersja intronu 1 genu czynnika VIII u pacjentów chorych na ciężką hemofilie A. *Acta Haematol. Pol.* 2006; 37: 61–65.
 49. Skulimowska J., Sawecka J. Diagnostyka molekularna hemofilii A. *Med. Rodz.* 2008; 4: 82–87.