

КОМПЛЕКСНАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕМОФИЛИИ А У РОССИЙСКИХ БОЛЬНЫХ

© 2019 г. Т. С. Бескоровайная¹, *, Т. Б. Миловидова¹, О. А. Щагина¹,
О. П. Рыжкова¹, А. В. Поляков¹

¹Медико-генетический научный центр, Москва, 115522 Россия

*e-mail: t-kovalevskaya@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.12.2018 г.

После доработки 10.03.2019 г.

Принята к публикации 28.03.2019 г.

Гемофилия А (ГА) – это частое X-сцепленное рецессивное заболевание системы свертывания крови. Оно обусловлено мутациями в гене *F8* (локус Xq28), частота составляет 1 на 5000 новорожденных мальчиков. Проведено исследование 117 неродственных семей с входящим диагнозом “гемофилия А” методами IS-PCR, мультиплексной PCR, MPS и методом количественного MLPA анализа. Мутации обнаружены во всех 117 семьях. У двух пробандов выявлены Lof-мутации в компаунд-гетерозиготном состоянии в гене *VWF*, у двух – патогенные варианты в гене *F9*, в одной семье – патогенный вариант в гене *F7*. Из дальнейших расчетов эти пациенты были исключены. Среди 112 семей с мутациями в гене *F8* инверсия интрона 22 выявлена в 40% случаев, инверсия интрона 1 – в 1% случаев, крупные делеции/дупликации – в 6% случаев. Доля точковых мутаций составила 53%: миссенс – 27%, небольших делеций – 10%, сайта сплайсинга – 6%, нонсенс – 5%, небольших дупликаций – 5%. Восемнадцать выявленных мутаций ранее не были описаны. Большинство из них являются Lof-мутациями. Таким образом, для эффективной молекулярно-генетической диагностики гемофилии А необходимо использовать различные методы.

Ключевые слова: гемофилия А, ген *F8*, инверсия, мутация.

DOI: 10.1134/S0016675819080022

Свертывание крови – это процесс, отвечающий за остановку кровотечения при повреждении сосудов. Он заключается в каскаде последовательной активации факторов коагуляции и заканчивается образованием тромба. На каждом этапе этого процесса возможны нарушения, связанные с отсутствием или функциональным дефектом одного или нескольких факторов, что проявляется различными коагулопатиями. Среди них выделяют группу гемофилий. Наиболее частой формой является гемофилия А, частота которой составляет 1 : 5000 новорожденных мальчиков [1]. Заболевание наследуется по X-сцепленному рецессивному типу. Проявляется обильными, порой жизнеугрожающими кровотечениями, которые могут приводить к инвалидизации. В зависимости от активности фактора VIII (антигемофильный глобулин) выделяют несколько степеней тяжести заболевания: менее 1% – тяжелая форма, 1–5% – средней тяжести, 5–40% – легкая (<http://www.ehc.eu>). Пациенты с тяжелой формой гемофилии требуют регулярного внутривенного введения экзогенно фактора VIII.

Антигемофильный глобулин представляет собой мультидоменный белок, синтезируется в эн-

дотелиальных клетках синусоидных капилляров печени и в гепатоцитах, из которых он секретруется в кровеносное русло. В неактивном состоянии фактор VIII циркулирует в крови, связанный с фактором Виллебранда, который предохраняет его от быстрого разрушения [2]. Фактор VIII действует на внутреннем пути свертывания крови, образуя на поверхности активированных тромбоцитов совместно с фактором IX внутренний tenазный комплекс.

Фактор VIII кодируется геном *F8*. Это крупный и сложно устроенный ген, состоящий из 26 экзонов, протяженностью 186 тпн. Ген локализован в теломерной области длинного плеча хромосомы X в локусе Xq28. В нем содержатся длинные интронные последовательности, размер некоторых интронов превышает 14 тпн.

Всего в базе HGMD в гене *F8* описано более 3200 мутаций (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>). Они равномерно распределены по всему гену, представляют собой как точечные изменения последовательности, так и крупные структурные перестройки. В гене описаны две частые мутации – инверсия интрона 22 и инверсия интрона 1, на долю которых у

больных с тяжелой формой гемофилии приходится 45–50 и 1–5% соответственно [3, 4]. Указанные патогенные варианты не встречаются у больных с концентрацией плазменного фактора VIII более 2% [5].

До недавнего времени поиск мутаций гена *F8* был весьма затруднителен и проводилась только косвенная диагностика гемофилии А. Однако в некоторых семьях выполнить данное исследование было невозможно из-за отсутствия биологического материала больного. Кроме того, использование STR-маркеров в пренатальной диагностике и диагностике носительства у родственниц больного имеет ряд рисков, так как зачастую маркеры, используемые в косвенной диагностике, расположены не в гене, а на некотором удалении от него, и в случае рекомбинации хромосомы X в данном локусе есть вероятность получить ошибочный результат. Также существуют коагулопатии, клинически и даже биохимически маскирующиеся под гемофилию А, например, болезнь Виллебранда тип 2N или комбинированный дефицит факторов V и VIII. Данные заболевания имеют другой тип наследования, что может привести к неверной интерпретации результатов косвенной диагностики.

С развитием новых методов, в частности IS-PCR (inverse shifting polymerase chain reaction, инвертированная полимеразная цепная реакция), метода количественного MLPA анализа (multiplex ligation-dependent probe amplification, мультиплексная амплификация лигазносвязанных проб) и метода MPS (massive parallel sequencing, метод массового параллельного секвенирования), стало возможно проводить прямую диагностику гемофилии А, выявляя в большинстве отягощенных семей у больных и носительниц непосредственно мутацию гена *F8*, что позволяет исключить все риски, связанные с косвенной диагностикой.

Целью данной работы является изучение спектра мутаций у российских больных с гемофилией А.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для данного исследования из архива лаборатории ДНК-диагностики Медико-генетического научного центра было отобрано 117 семей с входящим диагнозом “гемофилия А”. В 79 семьях для анализа был пригоден образец ДНК пробанда, еще в 38 семьях исследование проводилось на материале родственниц пробанда, являющихся носительницами заболевания согласно результатам проведенной ранее косвенной ДНК-диагностики или генеалогического анализа. От всех больных или их законных представителей и членов семей получено добровольное информированное согласие на обработку и публикацию данных молекулярно-генетического обследования на условиях анонимно-

сти. Научная тема, в рамках которой проводилась данная работа, одобрена этическим комитетом “Медико-генетический научный центр”.

Выделение ДНК больных и их родственников из цельной крови, забранной в пробирку с антикоагулянтом ЭДТА, проводили с помощью набора реактивов Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) согласно протоколу производителя.

Поиск инверсий интрона 22 и интрона 1 гена *F8* проведен с помощью методов IS-PCR и расширенного IS-PCR согласно протоколам, предложенным в работах L.C. Rossetti et al. [6, 7].

Поиск небольших делеций и инсерций гена *F8*, а также крупных делеций (у пробандов) выполнен с помощью разработанной в лаборатории ДНК-диагностики МГНЦ мультиплексной PCR-системы, включающей в себя кодирующие участки всех 26 экзонов данного гена (табл. 1). Амплификацию исследуемых фрагментов ДНК мультиплексов 1–4 проводили на программируемом термоциклере МС2 фирмы “ДНК-технология” (Россия) в объеме реакционной смеси 25 мкл следующего состава: 0.1–0.2 мкг геномной ДНК, по 0.4 пМ каждого оригинального олигопраймера, по 0.2 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, $MgCl_2$ – 4 мМ, 1.0 ед. активности ДНК-полимеразы Biotaq (“БиоМастер”), 1× буфер для ПЦР (67 мМ Tris-HCl; 16.6 мМ $(NH_4)_2SO_4$; 0.01% Twin-20; pH 8.8), 20–30 мкл минерального масла.

ПЦР проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация при 95°C – 5 мин, далее 30 циклов смены температур: денатурация 94°C – 45 с, отжиг праймеров 62°C – 45 с, элонгация цепи 72°C – 45 с; заключительная элонгация 72°C – 7 мин.

Для оценки результатов амплификации использовали 7%-ный полиакриламидный гель с соотношением акриламида и бисакриламида 29 : 1. После разделения фрагментов гель окрашивали в растворе бромистого этидия (0.1 мкг/мл в 1× TBE) в течение 10 мин, промывали водой. Результаты электрофореза визуализировались с помощью документирующей системы GelDoc фирмы Bio-Rad (США) в УФ-излучении с длиной волны 312 нм. Интерпретацию результатов проводили на основании длин фрагментов, идентифицируемых на электрофорезе, по сравнению с контрольными образцами.

Анализ точковых мутаций генов *F8*, *F9*, *VWF* выполнен методом MPS на секвенаторе нового поколения Ion S5 с использованием customной панели “Coagulum”, включающей кодирующие последовательности данных генов. Размер панели составляет 28150 пн. По данным AmpliSeq™ Coverage Analysis ее расчетное покрытие составляет 95.7%. Для пробоподготовки использована технология ультрамультиплексной ПЦР, сопряженная с

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, применявшиеся для мультиплексного анализа 26 экзонов гена *F8*

Экзон	Последовательность праймеров, 5' → 3'		Размер, пн
Мультиплекс 1			
14.3	F3: GAGAATAGTCCATCAGTCTGGC	R3: CCTTCTACATTTTGCCTAGTGCTC	647
14.1	F1: GAATCTGTGTTATGAGTAACCAGAGTC	R1: CAACTCTGTTGCTGCAGTTGTC	604
18	F: CTCTGGTTCATAGGTGAGAGAGC	R: GTCAAAGTGCAATCTGCATTTAC	400
7	F: CCATTTACAGATTCTCTACTTCATAGC	R: CACACTATATTCTGTACATTGTCC	365
4	F: GTGTACAGTGGATATAGAAAGGAC	R: GATTCAGTTGTTTGTACTTCTCTGC	321
22	F: GTTTCAGGAGGTAGCACATAC	R: GTGTTTGTCCAATATCTGAAATCTGC	296
2	F: GGAAGCATTACTTCCAGCTGC	R: CCTCAAGATTGGGGAATCTGTG	268
3	F: CAGGTTTTCTGGAGTACTATCCC	R: GTTGTAACGCCACCATTACAAAGC	264
6	F: CATGAGACACATGCTTAGCTGAC	R: CTCTGGTGCTGAATTTGGAAGAC	220
5	F: CTCCTCCTAGTGACAATTCCTAC	R: CTATAATCACCTCCTCTTAATAGTAGC	214
Мультиплекс 2			
14.4	F4: GAGAATGTAGTTTTGCCTCAGATAC	R4: GCTGGAAGATGAGAAGAGTTGTC	635
14.6	F6: CCAAGCTATTGGATCCTCTTGC	R6: GTTGGTGTGCATCATCTGGTAAAGTC	557
8	F: CCTAGTCTCTGGTATAGAACAGC	R: GAACTTTTTGAGTATGGGGAAGAG	384
11	F: GTGGCTTGTGTACTCTAATTGAGC	R: CTCAGGTTATAAGGGGACATACAC	329
12	F: GCTAGCTCCTACCTGACAACATC	R: CAATTCATTATTATCTGGACATCAC	301
23	F: GGAAGATATGATTGACAGAAATTGC	R: CTAGAACAGTTAGTCACCCTACC	286
10	F: CACAGTTTTCTTGTTGATCCTAGTC	R: CAACAGCTGGAGAAAGGACCAAC	262
20	F: GAGAAGCTGAATTTTGTGCACTTC	R: GGATTCATTATCTGAGATTCTCCAC	213
Мультиплекс 3			
14.2	F2: CAGTGGGGACATGGTATTTACC	R2: GTCCATAAGCATTCTGTGCATGAATC	631
14.5	F5: CATTACCCATTGCAAAGGTATCATC	R5: GGTGACTTCTCTTGGGATTTCC	601
16	F: GTAAACCCTAAGGACCTTAAGATC	R: CTCCTATTTAAAGCTTCTTATTGCAC	394
17	F: CTCTGGTTCATAGGTGAGAGAGC	R: GTCAAAGTGCAATCTGCATTTAC	341
13	F: CCAAATACTAAATCTGTGATGTGTC	R: GGCTAGTGAAGCATTACAGC	316
24	F: GTATAACTGAGGCTGAAGCATGTC	R: CAGAAGAAACAGTCAAGGCCTTC	290
25	F: GAATTTCTGGGAGTAAATGGTGAC	R: CTTTCTTTCTTTCCAAGGAGACC	267
26	F: GTGACCATTGTCCTGTGACAGC	R: GCTGAGGAGGGAGAGGTGAC	257
21	F: CAAGTGTCTAGGACTAACCCAGC	R: GCTTGCAAGAGGAATAAGTAATGC	215
Мультиплекс 4			
1	F: CACATCCAGTGGGTAAAGTTCC	R: CCTCCAAGCAGACTTACATCC	366
9	F: GTTTTAGAGTTGGATTTGAGCCTAC	R: GTATTTTAGAACTCAAACCTCTCCAGAC	313
15	F: GGCATTTCTACCCACTTGGTAC	R: CCAAAGTGGGAATACATTATAGTCAGC	296
19	F: GCATAAACCAATGTATCTCATGCTC	R: GGAAGAAAGCTGTAAAGAAGTAGGC	253

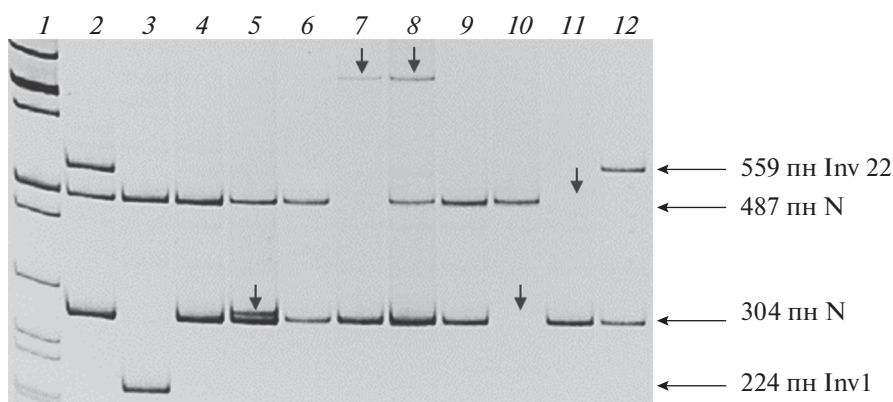


Рис. 1. Электрофореграмма результатов детекции инверсии интронов 1 и 22 (Inv1 и Inv22) гена *F8* методом IS-PCR. 1 – маркер молекулярного веса λ /*Pst*I; 2 – Inv22 в гетерозиготном состоянии; 3 – Inv1 в гемизиготном состоянии; 4, 6, 9 – норма; 5 – выявлен фрагмент аномальной длины в гетерозиготном состоянии у дочери больного, далее в семье выявлена делеция экзонов 15–21; 7, 8 – выявлен фрагмент аномальной длины у пробанда и его матери в гомо- и гетерозиготном состоянии соответственно, далее в семье выявлена делеция экзонов 15–21; 10 – отсутствие у пробанда полосы, соответствующей норме или инверсии интрона 1, далее в семье установлена дупликация экзонов 2–13; 11 – аномальная Inv22 в гемизиготном состоянии (отсутствие полосы, соответствующей норме или инверсии интрона 22, далее методом расширенной IS-PCR выявлена аномальная Inv22); 12 – Inv22 в гемизиготном состоянии. Вертикальными стрелками указаны фрагменты с измененной электрофоретической подвижностью или отсутствующие фрагменты.

последующим секвенированием (AmpliSeq™). Обработка результатов секвенирования проведена с использованием стандартного автоматизированного алгоритма, предлагаемого ThermoFisher Scientific (Torrent Suite™), а также программного обеспечения Gene-Talk (<http://www.gene-talk>). Глубина прочтения всех выявленных вариантов была не менее 200×. Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использованы базы данных dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) и Genome Aggregation Database (<http://gnomad.broadinstitute.org/>). Патогенность вариантов оценивали согласно руководству по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования [8].

Определение числа копий всех 26 экзонов гена *F8* выполнено методом количественного MLPA анализа с использованием набора “SALSA MLPA P178 F8 probemix” (MRC Holland, Амстердам, Голландия) согласно протоколу производителя. Разделение полученных фрагментов проведено на приборе для капиллярного электрофореза 3130 ABI Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Оценка результатов осуществлялась с помощью программы Coffalyser (MRC Holland, Голландия) (<https://www.mlpa.com>).

В одной семье проведено исследование клинического экзота на секвенаторе нового поколения IlluminaNextSeq 500 методом парно-концевого чтения (2 × 75 пн). Для пробоподготовки была использована методика селективного захвата участков ДНК, относящихся к кодирующим областям 6277 генов, описанных на данный момент как клинически значимые (набор SeqCap EZ SuperCap Workflow). Обработка данных секвенирова-

ния проведена с использованием стандартного автоматизированного алгоритма, предлагаемого Illumina, для анализа данных, представленного на сайте <https://basespace.illumina.com>.

Проверка выявленных мультиплексной PCR-системой и методом MPS нуклеотидных вариантов проводилась с помощью секвенирования по Сенгеру на приборе для капиллярного электрофореза 3130 ABI Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку самыми частыми патогенными вариантами у больных с тяжелой формой гемофилии А являются крупные перестройки гена *F8*, диагностику данного заболевания оптимально начинать с поиска инверсий интрона 22 и интрона 1. Для детекции этих мутаций наиболее широкое применение получил метод IS-PCR.

В обследуемой выборке инверсия интрона 22 выявлена в 45 семьях, инверсия интрона 1 – у одного больного, что составило 38%, чуть менее 1% случаев соответственно (рис. 1). Частоты данных инверсий у российских больных практически не отличаются от таковых в других странах [3–5, 9].

Среди семей с инверсией интрона 22 помимо классических инверсий методом IS-PCR был выявлен один случай аномальной инверсии, что проявлялось отсутствием на электрофореграмме фрагментов, соответствующих нормальному или инвертированному интрону 22 (рис. 1). Далее, с помощью метода расширенной IS-PCR, было установлено, что инверсия интрона 22 в данной семье сочета-

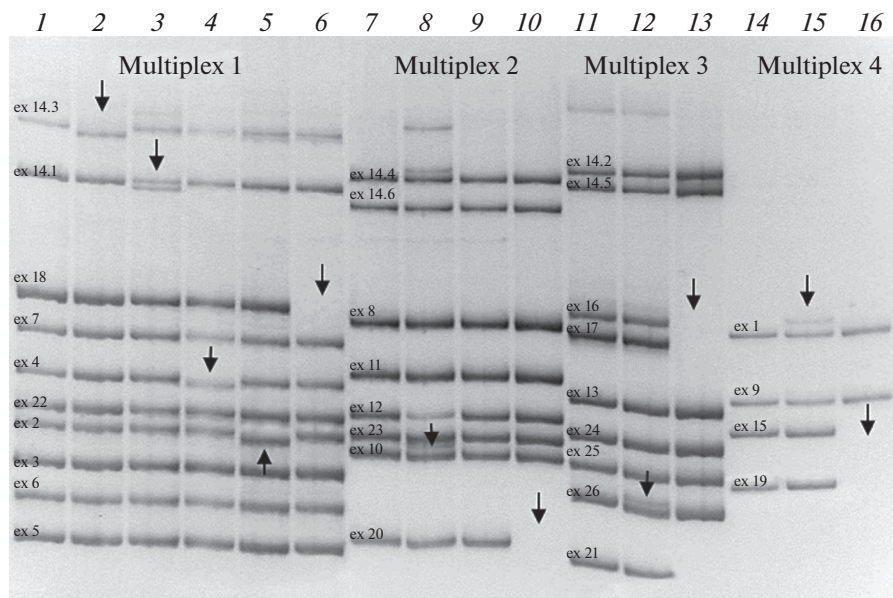


Рис. 2. Электрофореграмма результатов детекции некоторых патогенных вариантов гена *F8* методом мультиплексной PCR. 1, 7, 9, 11, 14 – норма; 6, 10, 13, 16 – делеция экзонов с 15-го по 21-й в гемизиготном состоянии; 2 – с.3409_3410delCT в гемизиготном состоянии; 3 – с.2514_2526del13 в гетерозиготном состоянии; 4 – с.411_412delCA в гемизиготном состоянии; 5 – с.214G>A (p.E72K) в гемизиготном состоянии; 8 – с.1844_1861del18 в гетерозиготном состоянии; 12 – с.6906delT в гетерозиготном состоянии; 15 – с.96dupA в гетерозиготном состоянии. Стрелками указаны фрагменты с измененной электрофоретической подвижностью или отсутствующие фрагменты.

лась с неуточненной перестройкой некодирующего внегенного участка (данные не приведены).

Кроме того, методом IS-PCR еще в трех семьях были выявлены аномальные паттерны, которые характеризовались отсутствием или изменением длины амплифицированных фрагментов, которые соответствовали бы норме, либо инверсии интрона 22 и 1 (рис. 1). Дополнительными методами исследования (мультиплексной PCR системы и количественного MLPA анализа) в данных семьях было установлено наличие крупных структурных перестроек: в двух семьях – делеции экзонов 15–21, в одной семье – дубликации экзонов 2–13. Подобного рода сложные структурные перестройки гена *F8* уже описывались другими исследователями. При этом, предположительно, на первом этапе такой перестройки происходит инверсия, которая приводит к нестабильности данного региона, что обуславливает в дальнейшем делеции и дубликации разных экзонов гена *F8* или вставки других генов в данный локус [10–12]. Причиной таких частых структурных аномалий гена *F8* является наличие в его весьма протяженных интронах большого количества различных повторов и гомологичных участков, что способствует возникновению крупных перестроек во время мейоза. Причем вероятность возникновения инверсии в 10 раз выше в мужских половых клетках, а делеции – в 5 раз выше в женских [13, 14].

Таким образом, суммарная информативность метода IS-PCR с учетом крупных делеций, под-

твержденных методом количественного MLPA анализа, составила 42%. Обнаружение данным методом помимо классических инверсий интронов 1 и 22 гена *F8* еще и аномальных вариантов показало, что данный метод обладает более широкими диагностическими возможностями и позволяет детектировать некоторые крупные структурные перестройки.

В 68 семьях с входящим диагнозом “гемофилия А”, в которых инверсии не выявлены, далее было необходимо провести поиск точковых мутаций гена *F8*. Наиболее эффективным методом в данном случае является метод массового параллельного секвенирования. Однако из-за дороговизны и трудоемкости метода данные пациенты сначала были протестированы с помощью простой и быстрой мультиплексной PCR-системы, включающей в себя кодирующие участки всех 26 экзонов гена *F8*. Данная система позволяет выявлять небольшие делеции, инсерции, некоторые нуклеотидные замены, а также крупные делеции (у пробандов мужского пола). Согласно мировым данным, суммарно на долю небольших делеций, инсерций и крупных делеций в гене *F8* приходится около 20% мутаций [9]. В данном исследовании методом мультиплексной PCR было обнаружено 16 фрагментов с измененной электрофоретической подвижностью, в которых далее с помощью метода секвенирования по Сенгеру были выявлены точковые патогенные варианты (табл. 2, рис. 2) и одна крупная делеция, включающая последова-

Таблица 2. Патогенные варианты, выявленные в гене *F8* с помощью мультиплексной PCR-системы, в выборке больных с входящим диагнозом “гемофилия А”

Экзон/интрон	кДНК	Белок	Домен	Тип мутации
1	c.96dupA [#]	p.W33Mfs*7	A1	Дупликация
2	c.205_206delCT	p.L69Vfs*13	A1	Делеция
2	c.214G>A	p.E72K	A1	Миссенс
4	c.411_412delCA [#]	p.Q139Kfs*6	A1	Делеция
7	c.902dupG [#]	p.Q302Pfs*36	A1	Дупликация
8	c.1087_1100del14 [#]	p.E363*	a1	Делеция
IVS 10	c.1537+2T>C [#]	—	A2	Сайт сплайсинга
12	c.1754T>A [#]	p.I585K	A2	Миссенс
12	c.1804C>G	p.R602G	A2	»
12	c.1844_1861del18 [#]	p.del P615-V620	A2	Делеция
14	c.2514_2526del13 [#]	p.D838Efs*3	B	»
14	c.3409_3410delCT	p.L1137Efs*28	B	»
14	c.3637delA	p.I1213Ffs*5	B	»
14	c.3704_3705delCA	T1235Sfs*5	B	»
14	g.154157084- ?_154158695+?del	?	B	»
25	c.6825T>A	p.Y2275*	C2	Нонсенс
26	c.6906delT [#]	p.Q2303Rfs*11	C2	Делеция

[#] Вариант ранее не описан.

тельность экзона 14. Суммарная информативность мультиплексной PCR-системы с учетом двух крупных делеций, обнаруженных ранее методом IS-PCR, составила 16%.

Далее 51 семье без выявленной мутации было проведено исследование методом массового параллельного секвенирования с использованием кастомной панели, включающей кодирующие последовательности генов *F8*, *F9* и *VWF*. Мутации были установлены в 48 случаях: в 44 семьях выявлены патогенные варианты в гене *F8* (табл. 3), у двух пробандов – в гене *F9*, еще у двух пробандов – в компаунд-гетерозиготном состоянии в гене *VWF* (табл. 4). Суммарная информативность метода MPS с учетом ранее выявленных мультиплексной PCR-системой точковых мутаций и крупных делеций составила 57%.

В трех семьях, у которых с помощью примененных подходов мутации не были выявлены, проведено исследование методом количественного MLPA анализа. В двух случаях обнаружены крупные дупликации гена *F8*: в одной семье – экзон 1–22, во второй семье – сложная структурная перестройка, сопровождающаяся дупликацией экзона 11–14 и 19–26. Таким образом, всего в обследуемой выборке было зарегистрировано три крупные делеции и три крупные дупликации. Информативность метода количественного MLPA

анализа для необследованной выборки больных с входящим диагнозом “гемофилия А” составила 5%.

В одной семье, у которой не были выявлены мутации в исследованных генах, на заключительном этапе молекулярно-генетического обследования проведен поиск патогенных вариантов методом секвенирования клинического экзона. Исследование выполнено на материале матери пробанда, так как биологический материал больного был непригоден для данного анализа. В результате в гене *F7* был выявлен описанный патогенный вариант c.1061C>T (p.A354V) в гетерозиготном состоянии (табл. 4). Вероятно, в данной семье заболевание обусловлено дефицитом именно фактора VII. Однако для однозначного утверждения данного факта необходимо выявить вторую мутацию у больного.

Таким образом, с помощью алгоритма, примененного для обследования семей с входящим диагнозом “гемофилия А”, мутации были выявлены во всех 117 семьях. Совокупная информативность всех примененных методов составила 100%. Причем в 95.7% случаев были выявлены мутации гена *F8*, в 1.7% – мутации гена *F9* гена, еще в 1.7% – мутации гена *VWF* и 0.9% – мутация гена *F7*.

Данный уровень информативности соответствует мировым показателям, величина которых в настоящее время достигает 99% [15]. С развити-

Таблица 3. Патогенные варианты, выявленные в гене *F8* методом MPS с использованием кастомной панели, в выборке больных с входящим диагнозом “гемофилия А”

Экзон/интрон	кДНК	Белок	Домен	Тип мутации
3	c.295G>T	p.V99F	A1	Миссенс
3	c.341C>A	p.P114H	A1	»
3	c.362G>T	p.G121V	A1	»
3	c.362G>T	p.G121V	A1	»
4	c.410C>T	p.T137I	A1	»
4	c.577G>A	p.G193R	A1	»
IVS 6	c.788-1G>A	—	A1	Сайт сплайсинга
7	c.901C>T	p.R301C	A1	Миссенс
7	c.901C>A	p.R301S	A1	»
8	c.1171C>T	p.R391C	a1	»
9	c.1406G>A	p.G469E	A2	»
9	c.1423G>A	p.E475K	A2	»
11	c.1751A>G	p.Q584R	A2	»
12	c.1798G>A	p.E600K	A2	»
13	c.1912G>T [#]	p.G638C	A2	»
14	c.2114G>T	p.G705V	A2	»
14	c.2440C>T	p.R814*	B	Нонсенс
14	c.3380G>A	p.W1127*	B	»
14	c.3637delA	p.I1213Ffs*5	B	Делеция
14	c.3637dupA	p.I1213Nfs*28	B	Дупликация
14	c.3689T>A [#]	p.L1230*	B	Нонсенс
14	c.3709dupA [#]	p.T1237Nfs*4	B	Дупликация
14	c.4379dupA	p.N1460Kfs*2	B	»
14	c.5122C>T	p.R1708C	a3	Миссенс
14	c.5122C>T	p.R1708C	a3	»
14	c.5122C>T	p.R1708C	a3	»
IVS 14	c.5219+1G>A	—	A3	Сайт сплайсинга
15	c.5251A>G	p.K1751E	A3	Миссенс
15	c.5321A>T	p.H1774L	A3	»
15	c.5336G>A	p.G1779E	A3	»
17	c.5603C>T	p.S1868L	A3	»
IVS 17	c.5815+1G>A [#]	—	A3	Сайт сплайсинга
18	c.5878C>T	p.R1960*	A3	Нонсенс
18	c.5879G>A	p.R1960Q	A3	Миссенс
18	c.5961dupA	p.E1988Rfs*3	A3	Дупликация
20	c.6179G>T	p.G2060V	C1	Миссенс
IVS 21	c.6274-2A>G [#]	—	C1	Сайт сплайсинга
22	c.6371A>G	p.Y2124C	C1	Миссенс
23	c.6496C>T	p.R2166*	C1	Нонсенс
23	c.6506G>A	p.R2169H	C1	Миссенс
23	c.6544C>T	p.R2182C	C1	»
IVS 23	c.6574+1G>T	—	C2	Сайт сплайсинга
25	c.6876_6877delCT	p.L2292fs stopcodon lost	C2	Делеция
IVS 25	c.6901-2A>C [#]	—	C2	Сайт сплайсинга

[#] Вариант ранее не описан.

Таблица 4. Патогенные варианты, выявленные в генах *F9*, *VWF* и *F7* методом MPS с использованием кастомной панели и клинического экзема, в выборке больных с входящим диагнозом “гемофилия А”

Ген	Экзон/интрон	кДНК	Белок	Домен	Тип мутации
<i>F9</i>	IVS 1	c.88+1G>A	—	Pro-peptide	Сайт сплайсинга
	8	c.1069G>A	p.G357R	Serine protease	Миссенс
<i>VWF</i>	18	c.2435delC	p.P812Rfs*31	D'	Делеция
	30	c.5306_5309delAAAT [#]	p.Q1769Pfs*12	A3	»
	42	c.7175_7176delAT [#]	p.Y2392*	B3	»
	42	c.7214_7220del7 [#]	p.C2405Lfs*54	B3	»
<i>F7</i>	9	c.1061C>T	p.A354V	Serine protease	Миссенс

[#] Вариант ранее не описан.

ем технологий доля больных с гемофилией А, у которых не выявлена мутация, сокращается. В литературе отсутствие патогенных вариантов у таких больных объясняется тем, что мутации могут находиться в регуляторных областях или глубоко в интронах [16, 17]. Данные варианты могут быть обнаружены только с помощью дорогостоящего анализа генома, однако интерпретация клинической значимости таких вариантов весьма затруднительна, так как сложно объяснить механизм, посредством которого выявленное изменение нуклеотидной последовательности влияет на структуру кодируемого данным геном белка. Отсутствие мутации у матерей пробандов может быть также обусловлено возникновением патогенного варианта в половых клетках *de novo* или же мать может иметь мозаицизм с очень низкой долей клона, несущего патогенный вариант. Кроме того, описаны мутации в других генах, приводящие к фенотипу, схожему с гемофилией А. Например, комбинированный дефицит факторов V и VIII, обусловленный отсутствием или функциональным дефектом внутриклеточных белков-транспортеров этих факторов, кодируемых генами *MCFD2* и *LMAN1* [18], или болезнь Виллебранда тип 2N, вызванная такими мутациями гена *VWF*, при которых нарушается связывание фактора VIII с фактором Виллебранда [19].

Доли различных типов мутаций в гене *F8* в обследованной выборке оказались следующими: Inv22 – 40%, миссенс-мутации – 27%, небольшие делеции – 10%, мутации сайта сплайсинга – 6%, нонсенс-мутации и маленькие дупликации – по 5%, крупные делеции и дупликации – по 3%, Inv1 – 1% (рис. 3). Подавляющее большинство в данной выборке составляют мутации, приводящие к тяжелому течению гемофилии А, так как значительно нарушают строение и, следовательно, функциональную активность антигемофильного глобулина. Распределение долей различных типов мутаций в целом соответствует таковому, описанному в литературе для больных с тяжелой формой

ГА (рис. 3). Следовательно, можно предположить, что в нашу выборку вошли в основном больные с тяжелой формой течения заболевания.

Практически все выявленные точковые варианты гена *F8* уникальны и встретились в выборке 1 раз. Только трансверсия с.362G>T (p.G121V) и транзиция с.5122C>T (p.R1708C) встретились 2 и 3 раза соответственно. Если выявленную дважды трансверсию можно рассматривать как случайное событие, то транзиция с.5122C>T, вероятно, является часто повторяющимся вариантом, так как на ее долю в базе “Factor VIII gene (*F8*) Variant Database” (<http://www.factorviii-db.org>) приходится около 0.6% от всех случаев заболевания.

В результате исследования выявлено 18 ранее не описанных патогенных вариантов (табл. 5). Большинство из них являются Lof-мутациями (lost of function). Особый интерес представляют впервые выявленные миссенс-варианты p.I585K и p.G638C. В данных позициях уже описаны как патогенные другие аминокислотные замены – p.I585R, p.I585T и p.G638D, p.G638S, p.G638V соответственно. Все ранее описанные варианты зарегистрированы у больных с тяжелой формой гемофилии А, однако аминокислотная замена p.I585T встречалась также у больных со средней степенью тяжести заболевания (<http://www.factorviii-db.org>). Оба кодона находятся в домене A2, отвечающего за связывание активированного фактора IX. Поэтому любые изменения в пространственной конформации домена могут в той или иной степени нарушать указанную функцию. В двух миссенс-мутациях, выявленных в данном исследовании, новые аминокислоты отличаются от аминокислот в нормальной белковой цепи размером, зарядом и гидрофобностью, что влияет на структуру белка. Так, нейтральный изолейцин в 585-м положении, находящийся в сайте связывания фактора IX, заменяется на более крупный положительно заряженный лизин. Это приводит к его отталкиванию от соседних аминокислотных остатков, что изменяет конформацию домена и

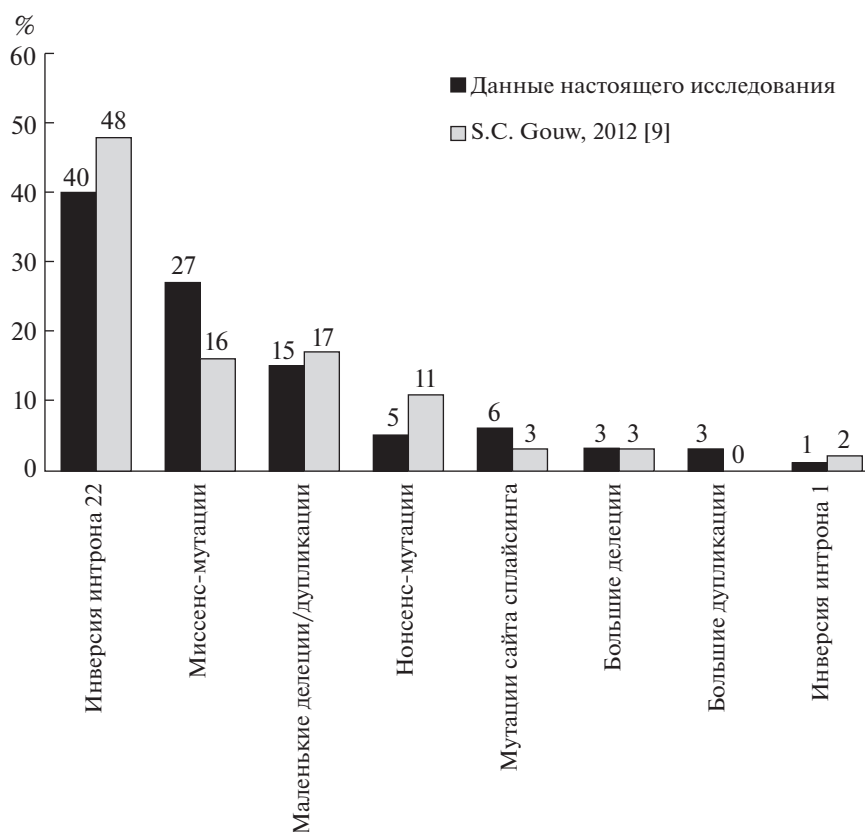


Рис. 3. Долевое распределение мутаций в гене *F8* в выборке больных с входящим диагнозом “гемофилия А” в настоящем исследовании и больных с тяжелой формой гемофилии А в мета-анализе S.C. Gouw [9].

нарушает взаимодействие с фактором IX [20, 21]. Замена глицина, расположенного в глубине домена A2, на больший по размеру цитозин в позиции 638 также может изменять строение домена и приводить к нарушению связывания факторов VIII и IX.

Таким образом, в результате исследования среди семей с направляющим диагнозом у пробанда “гемофилия А” были обнаружены больные с мутациями не только в гене *F8*, но и в генах факторов VII, IX и Виллебранда. Данный факт подтверждает сложность правильной постановки диагноза больному на клиническом этапе обследования. Только молекулярно-генетический анализ позволяет провести дифференциальную диагностику клинически схожих заболеваний. Установление типа мутации также дает возможность предсказать риск развития у больного с ГА такого серьезного осложнения, как выработка антител к экзогенному фактору VIII. Известно, что самый высокий риск у больных с крупными делециями (до 75%), а самый низкий – у больных с миссенс-мутациями (9%) [22].

В данном исследовании впервые проведено полное молекулярно-генетическое обследование выборки российских больных с входящим диагно-

зом “гемофилия А”. Несмотря на разнообразие типов мутаций, которые встретились в гене фактора VIII, и то, что в выборке оказались больные с другими клинически схожими коагулопатиями благодаря сочетанию разных методов, патогенные варианты были выявлены во всех обследованных семьях. Наибольшую долю в гене *F8* составили мутации, приводящие к тяжелому течению заболевания. Результаты исследования показали, что без использования молекулярно-генетических методов дифференциальная диагностика различных типов коагулопатий иногда затруднительна. Выявление причины заболевания крайне важно для проведения прямой предимплантационной или пренатальной диагностики в семье. Изучение молекулярно-генетических основ гемофилии А позволяет предсказывать риск развития осложнений у больного и подбирать оптимальное лечение, способствует развитию новых технологий терапии.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Таблица 5. Определение патогенности новых вариантов, выявленных в генах *F8* и *VWF*, согласно критериям, приведенным в руководстве по интерпретации данных, полученных методом массового параллельного секвенирования [8]

кДНК	Белок	Критерий	Классификация варианта
Ген <i>F8</i>			
c.96dupA	p.W33Mfs*7	PVS1, PM2, PP4	Патогенный
c.411_412delCA	p.Q139Kfs*6	PVS1, PM2, PP4	»
c.902dupG	p.Q302Pfs*36	PVS1, PM2, PP4	»
c.1087_1100del14	p.E363*	PVS1, PM2, PP4	»
c.1537+2T>C	—	PVS1, PM2, PP4	»
c.1754T>A	p.I585K	PM2, PM5, PP2, PP4	»
c.1844_1861del18	p.del P615-V620	PM1, PM2, PM4, PP4	Вероятно патогенный
c.1912G>T	p.G638C	PM2, PM5, PP2, PP3, PP4	»
c.2514_2526del13	p.D838Efs*3	PVS1, PM2, PP4	Патогенный
c.3689T>A	p.L1230*	PVS1, PM2, PP4	»
c.3709dupA	p.T1237Nfs*4	PVS1, PM2, PP4	»
c.5815+1G>A	—	PVS1, PM2, PP4	»
c.6274-2A>G	—	PVS1, PM2, PP4	»
c.6901-2A>C	—	PVS1, PM2, PP4	»
c.6906delT	p.Q2303Rfs*11	PVS1, PM2, PP4	»
Ген <i>VWF</i>			
c.5306_5309delAAAT	p.Q1769Pfs*12	PVS1, PM2, PP4	»
c.7175_7176delAT	p.Y2392*	PVS1, PM2, PP4	»
c.7214_7220del7	p.C2405Lfs*54	PVS1, PM2, PP4	»

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mannucci P.M., Tuddenham E.G. The hemophilias – from royal genes to gene therapy // *N. Engl. J. Med.* 2001. V. 344. № 23. P. 1773–1779. <https://doi.org/10.1056/nejm200106073442307>
- Orlova N.A., Kovnir S.V., Vorobiev I.I. et al. Blood clotting factor VIII: From evolution to therapy // *Acta Naturae.* 2013. V. 5. № 2. P. 19–39.
- Schroder J., El-Maarri O., Schwaab R. et al. Factor VIII intron-1 inversion: Frequency and inhibitor prevalence // *J. Thromb. Haemost.* 2006. V. 4. № 5. P. 1141–1143. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01884.x>
- 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. V. 99. № 1. P. 168–174.
- Kumar P., Faridi N.J., Husain N. et al. Study of intron 22 inversion mutation in north India with review // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2013. V. 24. № 2. P. 120–124. <https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e3283574f40>
- 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. V. 51. № 7. P. 1154–1158. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.046490>
- 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. V. 6. № 5. P. 830–836. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.02926.x>
- Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б. и др. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) // *Мед. генетика.* 2017. № 7. С. 4–17.
- Gouw S.C., van den Berg H.M., Oldenburg J. et al. F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: Systematic review and meta-analysis // *Blood.* 2012. V. 119. № 12. P. 2922–2934. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-379453>
- Fujita J., Miyawaki Y., Suzuki A. et al. A possible mechanism for Inv22-related F8 large deletions in severe hemophilia A patients with high responding factor VIII inhibitors // *J. Thromb. Haemost.* 2012. V. 10. № 10. P. 2099–2107. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04897.x>
- Sanna V., Ceglia C., Tarsitano M. et al. Aberrant F8 gene intron 1 inversion with concomitant duplication and deletion in a severe hemophilia A patient from South-

- ern Italy // *J. Thromb. Haemost.* 2013. V. 11. № 1. P. 195–197.
<https://doi.org/10.1111/jth.12061>
12. Zimmermann M.A., Oldenburg J., Muller C.R., Rost S. Unusual genomic rearrangements in introns 1 and 22 of the F8 gene // *Haemostaseologie*. 2011. V. 31 Suppl. 1. P. S69–S73.
 13. Becker J., Schwaab R., Moller-Taube A. et al. Characterization of the factor VIII defect in 147 patients with sporadic hemophilia A: Family studies indicate a mutation type-dependent sex ratio of mutation frequencies // *Am. J. Hum. Genet.* 1996. V. 58. № 4. P. 657–670.
 14. Rossiter J.P., Young M., Kimberland M.L. et al. Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells // *Hum. Mol. Genet.* 1994. V. 3. № 7. P. 1035–1039.
 15. Bastida J.M., Gonzalez-Porrás J.R., Jimenez C. et al. Application of a molecular diagnostic algorithm for haemophilia A and B using next-generation sequencing of entire F8, F9 and VWF genes // *Thromb. Haemost.* 2017. V. 117. № 1. P. 66–74.
<https://doi.org/10.1160/th16-05-0375>
 16. Pezeshkpoor B., Zimmer N., Marquardt N. et al. Deep intronic “mutations” cause hemophilia A: application of next generation sequencing in patients without detectable mutation in F8 cDNA // *J. Thromb. Haemost.* 2013. V. 11. № 9. P. 1679–1687.
<https://doi.org/10.1111/jth.12339>
 17. Inaba H., Shinozawa K., Amano K., Fukutake K. Identification of deep intronic individual variants in patients with hemophilia A by next-generation sequencing of the whole factor VIII gene // *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2017. V. 1. № 2. P. 264–274.
<https://doi.org/10.1002/rth2.12031>
 18. Zhang B., McGee B., Yamaoka J.S. et al. Combined deficiency of factor V and factor VIII is due to mutations in either LMAN1 or MCFD2 // *Blood*. 2006. V. 107. № 5. P. 1903–1907.
<https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3620>
 19. Casonato A., Galletta E., Sarolo L., Daidone V. Type 2N von Willebrand disease: Characterization and diagnostic difficulties // *Haemophilia*. 2018. V. 24. № 1. P. 134–140.
<https://doi.org/10.1111/hae.13366>
 20. Plantier J.L., Saboulard D., Pellequer J.L. et al. Functional mapping of the A2 domain from human factor VIII // *Thromb. Haemost.* 2012. V. 107. № 2. P. 315–327.
<https://doi.org/10.1160/th11-07-0492>
 21. Venkateswarlu D. Structural insights into the interaction of blood coagulation co-factor VIIIa with factor IXa: A computational protein-protein docking and molecular dynamics refinement study // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. V. 452. № 3. P. 408–414.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.078>
 22. Oldenburg J., Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX // *Haemophilia*. 2006. V. 12. Suppl. 6. P. 15–22.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2006.01361.x>

Complex Molecular Diagnostics of Haemophilia A in Russian Patients

T. S. Beskorovainaya^{a,*}, T. B. Milovidova^a, O. A. Schagina^a,
O. P. Ryzhkova^a, and A. V. Polyakov^a

^aResearch Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia

*e-mail: t-kovalevskaya@yandex.ru

Haemophilia A (HA) is a frequent X-linked recessive blood clotting disorder. HA is caused by mutations in the *F8* gene (locus Xq28) and affects 1 of 5000 newborn males. The aim of the study was to determine the spectrum of the *F8* gene mutations in the Russian patients with haemophilia A. Samples from 117 unrelated families with an incoming diagnosis of “haemophilia A” were tested by IS-PCR, multiplex PCR, MPS technology and quantitative MLPA analysis. Mutations were found in all 117 cases. Lof-mutations in the *VWF* gene in compound-heterozygous state were detected in two patients, two patients had pathogenic variants in the *F9* gene, and one – in one the *F7* gene. From further calculations these patients were excluded. Intron 22 inversion was detected in 40% of cases, intron 1 inversion – in 1% of cases, gross deletion/duplication – in 6% of cases. Point mutations account was 53%: missense – 27%, small deletions – 10%, splice site – 6%, nonsense – 5%, small duplications – 5%. Eighteen mutations have not been previously described. Most of them are Lof-mutations. Thus, it’s necessary to use different methods for the effective molecular diagnostics of haemophilia A.

Keywords: haemophilia A, gene *F8*, inversion, mutation.