



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Haematologica Polonicajournal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem

Praca oryginalna/Original research article

Wykrywanie mutacji inwersyjnych (INV22 oraz INV1) w genie F8 metodą IS-PCR u polskich chorych na ciężką hemofilię A



Detection of inversion mutations (INV22 and INV1) in F8 gene using IS-PCR method in Polish patients with severe hemophilia A

Edyta Odnoczko^{1,*}, Ewa Stefańska-Windyga², Beata Baran¹,
Magdalena Górską-Kosicka³, Joanna Sowińska³, Ksenia Bykowska¹,
Jerzy Windyga^{1,3}

¹Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie, kierownik: prof. zw. dr hab. n. med. Jerzy Windyga, Warszawa, Polska

²Przychodnia Specjalistyczna, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie, kierownik: Ewa Stefańska-Windyga, Warszawa, Polska

³Klinika Zaburzeń Hemostazy i Chorób Wewnętrznych, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie, kierownik: prof. zw. dr hab. n. med. Jerzy Windyga, Warszawa, Polska

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 17.06.2015

Zaakceptowano: 22.09.2015

Dostępne online: 01.10.2015

Słowa kluczowe:

- hemofilia A
- badania genetyczne
- gen F8
- mutacje inwersyjne
- IS-PCR

Keywords:

- Hemophilia A
- Genetic testing
- F8 gene
- Inversion mutations
- IS-PCR

A B S T R A C T

Hemophilia A is a genetically determined bleeding disorder, caused by deficiency, lack or dysfunction of plasma coagulation factor VIII. Approximately in 45–50% of severe haemophilia A patients excessive bleeding tendency is caused by the occurrence of inversion mutation in the intron 22 (INV22) F8 gene and in about 1–5% – inversion mutation in the intron 1 (INV1). In this paper we present the results of the study aimed to assess the prevalence of INV22 and INV1 in severe HA patients in Poland and to estimate the incidence of FVIII inhibitor in patients with INV1 or INV22 mutations. Moreover, the role of genetic testing in the diagnosis of hemophilia A as well as molecular method used in the current study to detect the inversion mutations in the F8 gene was discussed.

© 2015 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

* Adres do korespondencji: Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. I. Gandhi 14, 02-776 Warszawa, Polska. Tel.: +48 022 349 65 48; fax: +48 022 349 61 59.

Adres email: eodnoczko@ihit.waw.pl (E. Odnoczko).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.achaem.2015.09.001>

0001-5814/© 2015 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

Wstęp

Hemofilia A (HA) (OMIM #306700) jest wrodzoną skazą krwotoczną spowodowaną całkowitym lub częściowym brakiem bądź zaburzeniem funkcji czynnika krzepnięcia VIII (*factor VIII*; FVIII). HA objawia się nadmierną skłonnością do krwawień, których nasilenie w dużej mierze jest podyktowane stopniem niedoboru FVIII. Chorobę zwykle rozpoznaje się na podstawie wyników pomiaru aktywności koagulacyjnej FVIII (FVIII:C) w osoczu. W zależności od stopnia niedoboru FVIII wyróżnia się 3 postaci HA: a) ciężką, gdy FVIII:C wynosi mniej niż jedna jednostka międzynarodowa (*International Unit*; IU)/dl, b) umiarkowaną, gdy FVIII:C mieści się w przedziale 1–5 IU/dl oraz c) łagodną, gdy FVIII:C wynosi >5–50 IU/dl [1].

Przeciętna częstość występowania HA, niezależnie od rasy czy grupy etnicznej, to 1:5000 urodzonych mężczyzn lub 1:10 000 osób ogólnej populacji [2, 3]. W badaniu epidemiologicznym przeprowadzonym w 2004 roku w Polsce częstość występowania hemofilii A i B oszacowano łącznie na 1:5600 mężczyzn [4]. W Ogólnopolskim Rejestrze Wrodzonych Skaz Krwotocznych prowadzonym w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii (IHiT) w Warszawie znajduje się obecnie ponad 2200 mężczyzn z HA, z czego blisko 60% stanowią osoby z ciężką postacią choroby (dane z dn.15.05.2015).

Hemofilia A jest chorobą uwarunkowaną genetycznie, która dziedziczy się w sposób recesywny sprzężony z płcią. Oznacza to, że objawy skazy krwotocznej występują głównie u hemizygotycznych mężczyzn, zaś kobiety będące heterozygotycznymi nosicielkami mutacji genowej w większości przypadków nie wykazują objawów choroby.

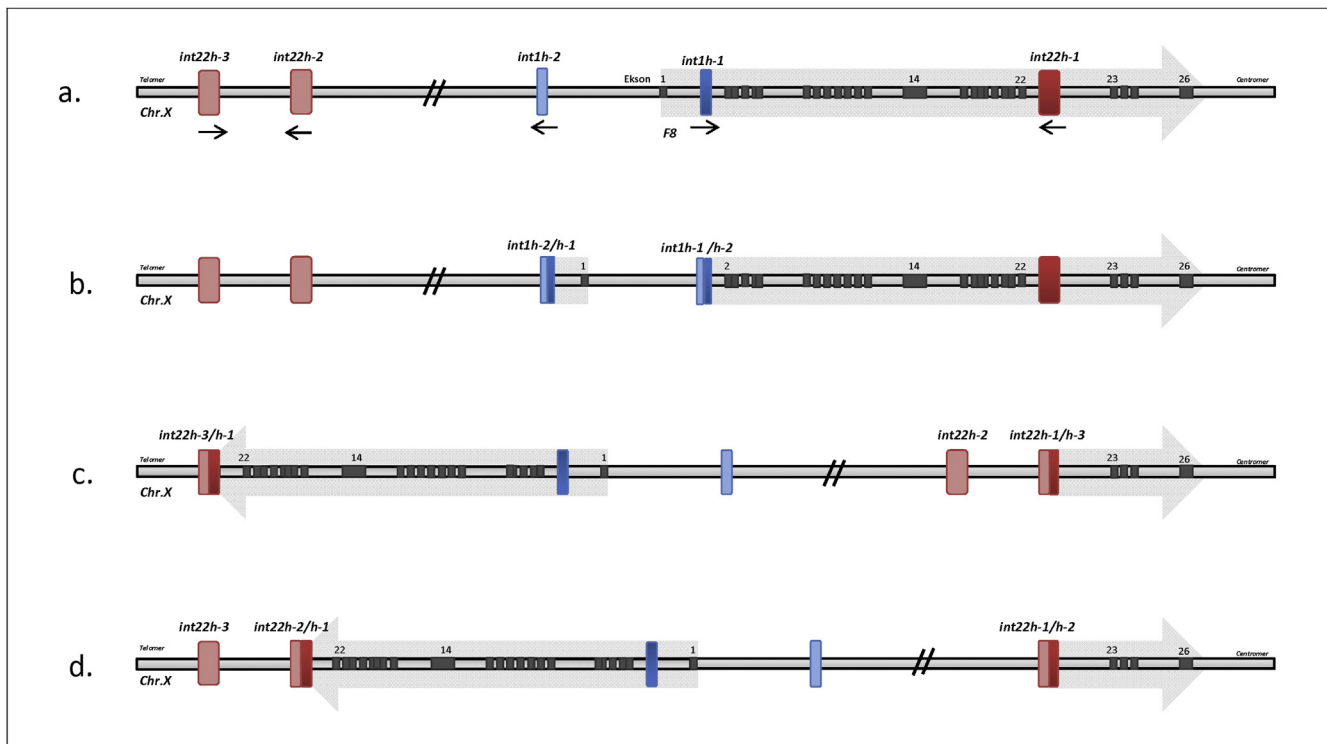
Gen kodujący FVIII (F8; Gene ID: 2157; NM_000132.3) znajduje się na długim ramieniu chromosomu X (Xq28), gdzie zajmuje blisko 186 kilo par zasad (kilobase pair; kbp) genomowego DNA [5, 6]. Reprezentowane przez 26 eksonów DNA kodujące informację genetyczną stanowi około 4% całego genu F8, zaś pozostałe 96% zajmują sekwencje intronowe. Wielkość eksonów F8 waha się w granicach od 69 bp (ekson 5) do 3106 bp (ekson 14) [7, 8]. Sekwencje intronowe F8 mają równie zróżnicowaną wielkość, aż 6 z 25 ma wielkość od 14 kbp do 32 kbp, przy czym największym spośród nich jest intron 22 (IVS22) [3]. Charakterystyczną cechą genu F8 jest obecność w jego strukturze licznych powtarzających się sekwencji DNA bogatych w cytozynę i guaninę (tzw. wysp CpG) [9]. Duże skupienia CpG obecne są w IVS22, gdzie tworzą 9,5 kbp region homologiczny (*int22h-1*). Region ten występuje w 2 dodatkowych kopiach (*int22h-2* oraz *int22h-3*) poza genem F8 w obszarze telomerycznym chromosomu X [10]. Sekwencja nukleotydowa wszystkich trzech regionów homologicznych jest niemal w 99% identyczna, przy czym sekwencja regionów *int22h-1* oraz *int22h-2* jest transkrybowana w odwrotnym kierunku niż sekwencja *int22h-3*. Dodatkowo region *int22h-1* zawiera obszar o wielkości 3,5 kbp szczególnie obfitujący w pary CG, z czego odcinek o wielkości jednej kbp składa się aż w 79% z tych zasad [11]. W tym rejonie stwierdzono również obecność dwóch wewnętrznych genów F8A i F8B, których znaczenie biologiczne w hemostazie do dziś nie zostało wyjaśnione [3, 12]. Analogicznie, między pierwszym

a drugim eksonem genu F8 (w odległości około 15 kbp od eksonu 1) znajduje się region o wielkości 1041 bp (*int1h-1*), który ma swoją homologiczną kopię pozagenową (*int1h-2*). Kopia ta, oddalona o około 140 kbp w kierunku telomeru chromosomu X, jest także transkrybowana w przeciwnym kierunku niż sekwencja wewnątrz genu [13].

Opisane wyżej uwarunkowania odgrywają istotną rolę w patogenezie HA, gdyż sprzyjają powstawaniu mutacji inwersyjnych w intronie 22 (INV22) oraz w intronie 1 (INV1) genu F8. Ponadto, w nielicznych przypadkach wynikiem rekombinacji z zaangażowaniem regionu *int22h-1* może być również powstanie innych większych rearanżacji w intronie 22, tj. delecji (Del22) czy duplikacji (Dup22) [13, 14]. Mechanizm powstawania mutacji INV22 oraz INV1 jest bardzo zbliżony. W obu przypadkach są one następstwem nieallelicznej rekombinacji homologicznej pomiędzy sekwencją DNA znajdującą się w intronie F8 (odpowiednio 22 lub 1) a homologiczną kopią pozagenową (Ryc. 1). Powstała rearanżacja genu F8 prowadzi do nieodwracalnego przerwania jego ciągłości, co w rezultacie uniemożliwia powstanie funkcjonalnego białka [15]. W przypadku INV22, rekombinacja homologiczna zachodzi pomiędzy regionem znajdującym się wewnątrz intronu 22 (*int22h-1*) i jedną z dwóch identycznych pozagenowych kopii (*int22h-2* lub *int22h-3*) [16, 17]. Skutkiem tej rearanżacji jest obrócenie i zmiana biegunowości sekwencji DNA oraz translokacja 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 (dodatkowe kopie pozagenowe; 1% przypadków) [18, 19]. Podobnie INV1, powstająca podczas homologicznej rekombinacji między znajdującym się wewnątrz intronu 1 regionem *int1h-1* oraz pozagenową kopią *int1h-2*, prowadzi w konsekwencji do oddzielenia promotora i eksonu 1 od pozostałych sekwencji F8 [13]. Śledząc genezę mutacji inwersyjnych, warto podkreślić, że powstają one głównie podczas podziału mejotycznego komórek rozrodczych męskich, rzadko zaś *de novo* w komórkach rozrodczych żeńskich [20, 21].

Wśród mutacji odpowiedzialnych za wystąpienie ciężkiej postaci HA zdecydowanie najczęściej wykrywane są właśnie duże inwersje. W około 45–50% przypadków identyfikuje się INV22, a w około 1–5% przypadków – INV1 [13, 16, 20]. W pozostałych przypadkach ciężkiej HA heterogenność mutacji sprawczych (ponad 1200 różnych wariantów F8) sprawia, że mogą one występować właściwie we wszystkich rejonach F8 [22]. Zrozumiałe jest zatem, że w praktyce diagnostykę molekularną u pacjentów z ciężką postacią HA rozpoczyna się od poszukiwania w F8 mutacji inwersyjnych (odpowiednio INV22, a w sytuacji wyniku negatywnego – INV1).

Współcześnie uważa się, że diagnostyka HA powinna być uzupełniana o badania genetyczne, umożliwiające poznanie mutacji sprawczej. Znajomość defektu molekularnego F8 pozwala na wstępną ocenę ryzyka wytworzenia przeciwciał neutralizujących FVIII (tzw. inhibitora FVIII) oraz ułatwia rozpoznanie stanu nosicielstwa. Mutacje sprawcze wraz z czynnikami środowiskowymi przyczyniają się do wytwarzania (*incidence*) inhibitora FVIII przez około 20–30% chorych z ciężką HA [23, 24].



Ryc. 1 – Schemat struktury genu F8 i jego otoczenia oraz mechanizm powstawania mutacji inwersyjnych; a) allel prawidłowy (brak inwersji); b) inwersja w intronie 1 (INV1); c) inwersja w intronie 22 (INV22) typu I (dystalna); d) inwersja w intronie 22 (INV22) typu II (proksymalna)

Fig. 1 – Scheme of the F8 gene structure and its environment and the mechanism of inversion mutations; a) the normal allele (not inverted); b) the inversion in intron 1 (INV1); c) the inversion in intron 22 (INV22) type I (distal); d) the inversion in intron 22 (INV22) type II (proximal)

Celem obecnego badania jest określenie częstości występowania mutacji inwersyjnych (INV22 i INV1) w populacji chorych na ciężką HA w Polsce oraz oszacowanie częstości wykrywania inhibitora FVIII u pacjentów z INV22 lub INV1.

Material i metody

Do badania włączano kolejno zgłaszających się, niespokrewnionych pacjentów z ciężką HA, którzy znajdowali się w Rejestrze Wrodzonych Skaz Krwotocznych IHiT. Po uzyskaniu pisemnej świadomej zgody na udział w badaniu od każdego pacjenta pobrano próbki obwodowej krwi żyłnej. Rozpoznanie ciężkiej HA ustalono na podstawie pomiaru aktywności FVIII w osoczu metodą koagulacyjną jednostopniową (wartości referencyjne 50–150 IU/dl), zaś ewentualną obecność inhibitora wobec ludzkiego FVIII określano stosując test Bethesda (wartości referencyjne <0.5 jednostki Bethesda [Bethesda Unit; BU]/ml).

Do badań molekularnych izolowano DNA genomowe z leukocytów krwi obwodowej standardową metodą wysalania [25]. Mutacje inwersyjnych INV22 i INV1 w F8 poszukiwano zmodyfikowaną metodą odwróconego PCR (Inverse Shifting PCR, IS-PCR), opracowaną pierwotnie przez Rossetti i wsp. [26] z późniejszymi modyfikacjami [27–30]. Genomowe DNA (2 µg) trawiono, stosując 20 U enzymu restykcyjnego

BclI (Promega) przez 4 h w temperaturze 50°C. Uzyskane fragmenty DNA oczyszczano standardową metodą precypitacji etanolem w obecności 3 M octanu sodu. Ligację powstałych lepkich końców prowadzono z użyciem 5U T4 DNA Ligase (Promega) przez 16 h w temperaturze 15°C. Otrzymane produkty cyrkularyzacji oczyszczano jak poprzednio. Dla każdej próbki DNA pacjenta do badania obecności INV22 przeprowadzono dwie reakcje multipleksowego PCR (tzw. test diagnostyczny i test uzupełniający). Amplifikację fragmentów DNA prowadzono z użyciem dwóch zestawów starterów specyficznych dla kopii wewnątrzgenowej (intra-genic; I) i kopii pozagenowych (extragenic; E), tj. odpowiednio 22-[ID+1U+2U+3U] oraz 22-[ED+1U+2U+3U] [27]. Jednocześnie produkty reakcji ligacji wykorzystywano do badania obecności INV1, przy czym fragmenty DNA powielano z użyciem jednego zestawu specyficznych starterów 1-[ID+1U+2U+3U] [27]. PCR do wykrywania INV22 lub INV1 prowadzono w objętości 25 µl o składzie: 1 x bufor do PCR, 2,5 mM MgCl₂, 2U Taq DNA polimerazy, 4 × 200 µM dNTP, 0,6 µM każdego startera oraz 6 µl DNA. Reakcje amplifikacji prowadzono w termocyklerze I-Cycler (Bio-Rad) w następujących warunkach: 94°C–2 min; [94°C–30 s, 56°C–1 min, 72°C–1 min] x 30, 72°C – 5 min. Rozdział produktów IS-PCR prowadzono w odniesieniu do markera wielkości 100 bp DNA Ladder (Promega) w 2% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny przy 90 V przez około 2 h.

Wyniki

Badaniami objęto 56 mężczyzn z ciężką HA w wieku 18–71 lat (średnia 39 ± 13 , mediana 37). Obecność inhibitora wobec FVIII stwierdzono u 8/56 (14%) badanych pacjentów, a jego maksymalne historyczne miano zawierało się w przedziale 5–7800 BU/ml (Tab. I).

W teście diagnostycznym INV22 u pacjentów bez tej mutacji uzyskano produkt PCR wielkości 487 bp, u pacjentów z obecną mutacją typu I (dystalna) – 333 bp, zaś typu II (proksymalna) – 385 bp. W teście uzupełniającym INV22 u pacjentów bez tej mutacji uzyskano produkt PCR wielkości 405 bp i 457 bp, a u pacjentów z obecną mutacją: typu I – 457 bp i 559 bp lub typu II – 405 bp i 559 bp. Łącznie INV22 zidentyfikowano u 29/56 (52%) niespokrewnionych pacjentów. Obecność INV22 typu I stwierdzono u 25/29 (86%), zaś typu II – u 4/29 (14%). U 5/29 pacjentów (17%) z INV22 typu I wykryto obecność inhibitora FVIII, którego miano zawierało się w przedziale 5–144 BU/ml. U 23/56 mężczyzn z nieobecną INV22 badano obecność INV1. U pacjentów bez INV1 uzyskano produkt PCR wielkości – 304 bp, a u pacjentów z obecną INV1 (kontrola pozytywna) – 224 bp. Mutacji INV1 nie wykryto u żadnego pacjenta.

Omówienie

Zasadność wykonywania badań genetycznych umożliwiających zidentyfikowanie mutacji sprawczej u pacjentów z ciężką HA jest ważna co najmniej z dwóch powodów: 1) pozwala wstępnie ocenić ryzyko wytworzenia inhibitora FVIII i 2) ułatwia ustalenie stanu nosicielstwa w rodzinach dotkniętych chorobą. Ponieważ blisko połowa przypadków ciężkiej HA jest spowodowana mutacjami inwersyjnymi

w F8, logiczne jest rozpoczynanie badań molekularnych od poszukiwania obecności tych defektów.

Niegdyś do wykrywania INV22 w F8 wykorzystywano głównie metodę hybrydyzacji według Southerna, którą zastosowano także w polskich badaniach prowadzonych przez Sawecką i wsp. [31, 32]. Znana od 2005 roku i udoskonalona trzy lata później metoda IS-PCR jest alternatywą dla skomplikowanej i pracochłonnej metody Southerna [26, 27]. Zarówno metodę Southerna, jak i IS-PCR charakteryzuje podobna czułość, gdyż obie umożliwiają identyfikację INV22 (łącznie z określeniem jej typu) oraz wykrycie delekcji czy duplikacji obejmującej IVS22. Ponadto wybór metody IS-PCR w obecnym badaniu jest podyktowany szeregiem innych zalet; IS-PCR umożliwia równoczesną diagnostykę INV22 i INV1 (wykorzystuje ten sam produkt reakcji ligacji do PCR), nie wymaga bezpośredniej amplifikacji regionów bogatych w pary GC (przez co procedura jest bardziej powtarzalna) oraz nie ogranicza się do stosowania wysokiej jakości DNA (możliwość stosowania próbek nawet częściowo zdegradowanych) [33].

Podłoże genetyczne ciężkiej HA w Polsce było przedmiotem nielicznych badań. Dotychczas przeprowadzone przez Sawecką i wsp. badania molekularne objęły łączną grupę 113 pacjentów z ciężką postacią choroby [31, 32, 34]. Wykazana w obecnym badaniu częstość występowania INV22 (52%) jest bardzo zbliżona do częstości stwierdzonej we wcześniejszym polskim badaniu (50,5%) [31]. Szeroko zakrojone badania europejskie wykazały, że prevalencja INV22 wynosi od 45% (na przykład w Niemczech lub Anglii) do nawet 52–54% (na przykład na Węgrzech, we Włoszech, w Hiszpanii i Portugalii) [13, 24, 35–38]. Najczęściej wykrywanym typem INV22 w obecnym badaniu był typ I (86%), dużo rzadziej zidentyfikowano typ II (14%), co jest zbliżone z wynikami uzyskanymi w uprzednio prowadzonym badaniu w polskiej (typ I – 82%; typ II – 18%) i innych populacjach (typ I – 84%; typ II – 16%) [18, 31].

Badania przeprowadzone w innych krajach Europy wykazały, że częstość występowania INV1 u pacjentów z ciężką HA wynosi 1–5% [13, 39]. Ponieważ w obecnym badaniu u żadnego pacjenta nie zidentyfikowano tego defektu, a uprzednio częstość występowania INV1 w Polsce oszacowano na 0,9% (1/113), w celu sformułowania wiążących wniosków niezbędne jest przeprowadzenie badań w większej populacji polskich chorych na ciężką HA [34].

W obecnym badaniu u 8 spośród 56 (14%) niespokrewnionych chorych na ciężką HA wykryto inhibitor FVIII. W grupie 29 pacjentów z wykrytą INV22 u 5 (17%) stwierdzono obecność inhibitora FVIII. Ze względu na stosunkowo małą liczebnie grupę przebadanych pacjentów trudno wyciągnąć jednoznaczne wnioski, ale trzeba przyjąć za innymi autorami, że INV22 należy do mutacji wyraźnie zwiększających ryzyko wystąpienia inhibitora FVIII w odpowiedzi na wstrzykiwany dożylnie czynnik VIII. Szacuje się, że częstość występowania inhibitora FVIII jest 7–10-krotnie wyższa u pacjentów z obecnym „ciężkim” defektem molekularnym F8 (tj. dużą delecją, mutacją nonsensowną, INV22) w porównaniu z pacjentami z „łagodnym” defektem (mutacją zmiany sensu, małą delecją, defektem składania transkryptu) [23, 40]. Metaanaliza 30 badań przeprowadzonych w grupie 1029 pacjentów z HA powiklaną inhibitorem wykazała, że ryzyko wystąpienia inhibitora FVIII jest największe w przypadku dużych delekcji,

Tabela I – Prewalencja mutacji inwersyjnych (INV22 i INV1) oraz inhibitora FVIII w badanej populacji
Table I – Prevalence of the inversion mutations (INV22 and INV1) and FVIII inhibitor in the studied population

Wskaźnik	Wyniki
Liczba badanych pacjentów z ciężką hemofilią A (FVIII:C < 1 IU/dl)	56
Liczba pacjentów z obecnym inhibitorem FVIII	8 (14%)
Wiek (lata)	18–71 (średnia 39 ± 13 , mediana 37)
INV22	29/56 (52%)
Typ I (dystalna)	25/29 (86%)
Typ II (proksymalna)	4/29 (14%)
Obecny inhibitor FVIII	5/29 (17%)
Miano inhibitora FVIII	5–144 BU/ml
INV1	0
INV22 – inwersja w intronie 22 genu F8; INV1 – inwersja w intronie 1 genu F8; FVIII – czynnik krzepnięcia VIII; IU – jednostka międzynarodowa	
INV22 – inversion in intron 22 of the F8 gene; INV1 – inversion in intron 1 of the F8 gene; FVIII – coagulation factor VIII; IU – International Unit	

mutacji nonsensownych i pośrednie w przypadku INV22, INV1 oraz mutacji splicingowych, zaś najmniejsze w przypadku małych delecji/insercji i mutacji zmiany sensu [41]. Jednak ryzyko powstania alloprzeciwciał wobec FVIII u pacjentów z HA powodowaną INV22 lub INV1 jest dużo mniejsze (około 20–30%) niż na przykład w przypadku niektórych dużych delecji obejmujących wiele eksonów F8 (około 90%) [12, 24]. Ponieważ u większości pacjentów z INV22 inhibitor nie występuje, aktualnie prowadzone są badania, których celem jest poszukiwanie innych niż mutacja sprawcza w F8 czynników ryzyka (zarówno genetycznych, jak i środowiskowych) powstawania inhibitora FVIII [42].

Dotychczas w naszym kraju dostępność badań genetycznych w diagnostyce HA była znacznie ograniczona. Pionierskie badania naukowe w diagnostyce molekularnej tej choroby realizowane były do 2009 roku w Zakładzie Biochemii IHiT [31, 32, 34, 43]. Rezultatem aktualnie przeprowadzonego badania jest wprowadzenie w naszym ośrodku nowoczesnej metody służącej do identyfikowania mutacji inwersyjnych w F8. Kolejnym celem jest wdrożenie w Zakładzie Hemostazy i Chorób Metabolicznych IHiT innych metod molekularnych w diagnostyce HA, obejmujących sekwencjonowanie poszczególnych eksonów genu F8, jak i badanie obecności większych rearanżacji genowych. Wśród najnowocześniejszych metod szczególnie obiecująca jest sekwencjonowanie nowej generacji (*Next Generation Sequencing*; NGS). I tak, na przykład, technikę tę zastosowano u polskiego chorego na ciężką HA, dzięki czemu zidentyfikowano delecję genu F8 i genu BRCC3, co zaowocowało opisaniem nowego zespołu chorobowego: hemofilii A i angiopatii moyamoya (*SHAM syndrome*) [44].

Wdrożenie rutynowego oznaczania mutacji inwersyjnych (INV22 oraz INV1) w F8 oraz realizacja opisanych powyżej zamierzeń pozwoli na kompleksową diagnostykę genetyczną hemofilii A w naszym kraju.

Wkład autorów/Authors' contributions

EO – koncepcja pracy, analiza statystyczna, interpretacja danych, akceptacja ostatecznej wersji, przygotowanie piśmiennictwa. JW – koncepcja pracy, akceptacja ostatecznej wersji. ES-W, BB, MG-K, JS, KB – zebranie danych.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Fundusz Badań Własnych Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

PIŚMIENNICTWO/REFERENCES

- [1] Windyga J, Chojnowski K, Klukowska A, et al. Polskie zalecenia postępowania we wrodzonych skazach krwotocznych na tle niedoboru czynników krzepnięcia. Część I: Zasady postępowania w hemofilii A i B. *Acta Haematologica Polonica* 2008;39(3):537–564.
- [2] Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias – from royal genes to gene therapy. *N Engl J Med* 2001;344(23):1773–1779.
- [3] Oldenburg J, Pezeshkpoor B, Pavlova A. Historical review on genetic analysis in hemophilia A. *Semin Thromb Hemost* 2014;40(8):895–902.
- [4] Windyga J, Lopaciuk S, Stefańska E, Klukowska A. Hemofilia i pokrewne skazy krwotoczne w Polsce. *Pol Arch Med Wew* 2004;112:1197–1202.
- [5] Tantravahi U, Murty VVVS, Jhanwar SC, et al. 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. *Cytogene Cell Genet* 1986;42:75–79.
- [6] Keeney S, Cumming T, Jenkins PV, et al. Clinical utility gene card for: haemophilia A. *Eur J Hum Genet* 2011;19(11).
- [7] Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, et al. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood* 2008;111(3):1240–1247.
- [8] Kemball-Cook G, Gomez K. Molecular Basis of hemophilia A. W: Christine A, Lee CA, Berntorp EE, Hoots KW, reds. *Textbook of Hemophilia*. Third Edition, Willey-Blackwell; 2014. p. 23–32.
- [9] Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J, et al. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat Rev Genet* 2005;6(6):488–501.
- [10] Bagnall RD, Giannelli F, Green PM. 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(3):591–598.
- [11] Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood* 1998;92(4):1458–1459.
- [12] Oldenburg J, El-Maarri O. New insight into the molecular basis of hemophilia A. *Int J Hematol* 2006;83(2):96–102.
- [13] Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 2002;99(1):168–174.
- [14] De Brasi CD, Bowen DJ. Molecular characteristics of the intron 22 homologs of the coagulation factor VIII gene: an update. *J Thromb Haemost* 2008;6(10):1822–1824.
- [15] Sauna ZE, Lozier JN, Kasper CK, et al. The intron-22-inverted F8 locus permits factor VIII synthesis: explanation for low inhibitor risk and a role for pharmacogenomics. *Blood* 2015;125(2):223–228.
- [16] Lakich D, Kazazian Jr HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature Genet* 1993;5:236–241.
- [17] Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green PM, Giannelli F. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum Molec Genet* 1993;2:1773–1778.
- [18] Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, et al. Factor VIII inversions in severe hemophilia A: results from an international consortium. *Blood* 1995;86:2206–2212.
- [19] Bagnall RD, Giannelli F, Green PM. Polymorphism and hemophilia A causing inversions in distal Xq28: a complex picture. *J Thromb Haemost* 2005;3(11):2598–2599.

- [20] Oldenburg J, Ananyeva NM, Saenko EL. Molecular basis of haemophilia A. *Haemophilia* 2004;10:133-139.
- [21] Oldenburg J, Rost S, El-Maarri O, et al. De novo factor VIII gene intron 22 inversion in a female carrier presents as a somatic mosaicism. *Blood* 2000;96(8):2905-2906.
- [22] Rallapalli PM, Kembal-Cook G, Tuddenham EG, Gomez K, Perkins SJ (2014)- Manuscript under Preparation. <http://www.factorviii-db.org/>.
- [23] Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, et al. Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb Haemost* 1995;74:1402-1406.
- [24] Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia* 2006;12(Suppl 6):15-22.
- [25] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215.
- [26] Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. *Clin Chem* 2005;51(7):1154-1158.
- [27] Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22 h and int1 h hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost* 2008;6(5):830-836.
- [28] He ZH, Chen SF, Chen J, Jiang WY. A modified I-PCR to detect the factor VIII Inv22 for genetic diagnosis and prenatal diagnosis in haemophilia A. *Haemophilia* 2012;18(3):452-456.
- [29] 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;10(10):2099-2107.
- [30] Roozafzay N, Kokabee L, Zeinali S, Karimipoor M. Evaluation of intron 22 and intron 1 inversions of the factor 8 gene using an inverse shifting PCR method in severe haemophilia A patients. *Science Asia* 2013;(39):174-178.
- [31] Sawecka J, Skulimowska J, Windyga J, et al. 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 (Warszawa)* 2005;53(4):352-356.
- [32] Sawecka J, Skulimowska J, Kościelak J. Mutacje inwersyjne u pacjentów chorych na ciężką hemofilię A. *Acta Haematologica Polonica* 2000;31(1):47-50.
- [33] Rossetti LC, Radic CP, Abelleyro MM, et al. Eighteen years of molecular genotyping the hemophilia inversion hotspot: from southern blot to inverse shifting-PCR. *Int J Mol Sci* 2011;12(10):7271-7285.
- [34] Sawecka J, Skulimowska J, Windyga J, Kościelak J. Inwersja intronu 1 genu czynnika VIII u pacjentów chorych na ciężką hemofilię A. *Acta Haematologica Polonica* 2006;37(1):61-65.
- [35] Casana P, Cabrera N, Cid AR, et al. Severe and moderate hemophilia A: identification of 38 new genetic alterations. *Haematologica* 2008;93(7):1091-1094.
- [36] David D, Ventura C, Moreira I, et al. The spectrum of mutations and molecular pathogenesis of hemophilia A in 181 Portuguese patients. *Haematologica* 2006;91(6):840-843.
- [37] Andrikovics H, Klein I, Bors A, et al. Analysis of large structural changes of the factor VIII gene, involving intron 1 and 22, in severe hemophilia A. *Haematologica* 2003;88(7):778-784.
- [38] Margaglione M, Castaman G, Morfini M, et al. The Italian AICE-Genetics hemophilia A database: results and correlation with clinical phenotype. *Haematologica* 2008;93(5):722-728.
- [39] Guillet B, Lambert T, d'Oiron R, et al. Detection of 95 novel mutations in coagulation factor VIII gene F8 responsible for hemophilia A: results from a single institution. *Hum Mutat* 2006;27(7):676-685.
- [40] Oldenburg J, El-Maarri O, Schwaab R. Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. *Haemophilia* 2002;8(Suppl 2):23-29.
- [41] Gouw SC, van den Berg HM, Oldenburg J, et al. F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood* 2012;119(12):2922-2934.
- [42] Astermark J, Altisent C, Batorova A, et al. Non-genetic risk factors and the development of inhibitors in haemophilia: a comprehensive review and consensus report. *Haemophilia* 2010;16(5):747-766.
- [43] 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 Haematologica Polonica* 2009;40(1):97-101.
- [44] Janczar S, Fogtman A, Koblowska M, et al. Novel severe hemophilia A and moyamoya (SHAM) syndrome caused by Xq28 deletions encompassing F8 and BRCC3 genes. *Blood* 2014;123(25):4002-4004.