

## Генетична диагностика при хемофилия А и В – приложение в клиничната практика

Атанас Банчев<sup>1,2,3</sup>, Анна Павлова<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Експертен център за хемофилия, таласемия и други редки доброкачествени хематологични заболявания,

УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“, София

<sup>2</sup> Медицински факултет, Медицински университет – София

<sup>3</sup> Национална специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания, София

<sup>4</sup> Лаборатория по молекулярна хемостазиология,

Институт по експериментална хематология и трансфузионна медицина, Бон, Германия

### Резюме

Хемофилия А и В са редки вродени, X-свързани заболявания, причинени от липса или дефицит на коагуляционен фактор VIII (FVIII) или IX (FIX). Тежестта на заболяването зависи от степента на намаляването на нивата на FVIII или FIX, което се определя от вида на патогенните варианти в гените, кодиращи двата фактора (*ген за F8 и F9*).

Молекулярно-генетичният анализ намира широко приложение при наследствените нарушения на кръвосъсирването. Резултатите от генетичния анализ позволяват генетично консултиране на засегнатите семейства и предоставят възможност да се открие връзката между генотипа и фенотипа на болестта. През последните десетилетия генетичният анализ при хемофилия се подобрява значително. Достъпни са множество нови техники и модификации, както и софтуери за анализ, които превръщат генетичния анализ и интерпретацията на данните в по-бързи и по-точни. Напредъкът в стратегиите за откриване на генетични варианти улеснява идентифицирането на патологични варианти при до 97% от пациентите.

**Ключови думи:** хемофилия А, хемофилия В, генетична диагностика

## Genetic diagnosis in hemophilia A and B – application in clinical practice

Atanas Banchev<sup>1,2,3</sup>, Anna Pavlova<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Expert Center for Hemophilia, Thalassemia and Other Rare Benign Hematological Diseases, University Hospital

“Queen Giovanna – ISUL”, Sofia

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, Medical University of Sofia

<sup>3</sup> National Specialized Hospital for Active Treatment of Hematological Diseases, Sofia

<sup>4</sup> Laboratory of Molecular Hemostaseology, Institute of Experimental Hematology and Transfusion Medicine, Bonn, Germany

### Abstract

Hemophilia A and B are rare congenital, X-linked disorders caused by the absence or deficiency of coagulation factor VIII (FVIII) or IX (FIX). The severity of the disease depends on the degree of reduction in the levels of FVIII or FIX, which is determined by the type of pathogenic variants in the genes encoding the two factors (*gene for F8 and F9*).

Molecular genetic analysis is widely used in hereditary blood coagulation disorders. The results of the genetic analysis allow genetic counseling of the affected families and provide an opportunity to discover the relationship between the genotype and the phenotype of the disease. In recent decades, genetic analysis in hemophilia has improved significantly. Numerous new techniques and modifications, as well as software, are available that make genetic analysis and data interpretation faster and more accurate. Advances in genetic variant detection strategies facilitate the identification of pathologic variants in up to 97% of patients.

**Keywords:** hemophilia A, hemophilia B, genetic diagnosis

### Кореспонденция:

Доц. г-р Атанас Банчев, гм

e-mail: [bantshev@gmail.com](mailto:bantshev@gmail.com)

### Correspondence:

Assoc. Prof. Atanas Banchev, MD, PhD

e-mail: [bantshev@gmail.com](mailto:bantshev@gmail.com)

## Въведение

Хемофилия А (НА) и хемофилия В (НВ) са редки нарушения на кръвосъсирването, причинени от генетични дефекти в гените, кодиращи коагулационен фактор VIII (FVIII) и фактор IX (FIX), водещи до недостатъчност или пълна липса на един от двата коагулационни протеина. Класификацията на тежестта на хемофилията се основава на количеството остатъчна активност на FVIII или FIX и е силно зависима от унаследените генетични изменения. Тежката форма се определя от ниво на фактора <math>< 1 \text{ IU/dl } (\%)</math> от нормалното, умерената форма като ниво на фактора 1-5 IU/dl (%), а леката форма с ниво на фактора >5 и <math>< 40 \text{ IU/dl } (\%)</math> [1].

Хемофилията е водещ модел на заболяване в областта на човешката молекулярна генетика; следователно идентифицирането на причинните генетични дефекти при засегнатите лица е важно за семейното консултиране и има прогностична стойност за склонността към кървене и риска от инхибиране. Генетичните тестове увеличават броя на семействата с идентифициран дефект и подобряват тестовете за носителство и пренатална диагностика. В този обзор ще бъдат разгледани ролята и мястото на молекулярно-генетичния анализ в диагностичния алгоритъм за хемофилия и ще бъдат подчертани ползите за клиничната практика, особено с въвеждането на секвенирането от следващо поколение (NGS) в рутинните условия.

## 1. Унаследяване

Тъй като гените *F8* и *F9* са разположени върху X-хромозомата, те са обект на уникалния модел на унаследяване на гените, свързани с X-хромозомата, който засяга почти изключително мъжете [2]. Такъв мъж се нарича хемизиготен и има пълния фенотип на заболяването. Жените носят два алела за гените на X хромозомата, така че дефектът в единия алел може да бъде компенсирани от нормалния алел и тези хетерозиготни носители в повечето случаи остават здрави. През 1961 г. Мери Лион предполага, че в клетките на женските бозайници една от двете X-хромозоми се инактивира случайно в ранен ембрионален стадий, така че и мъжките, и женските индивиди имат една активна X-хромозома. Тази хипотеза осигурява по-добро разбиране на основните механизми, отговорни за X-свързаните заболявания [3-4]. X-хромозомата на мъжа се предава на дъщерите му, а Y хромозомата – на синовете му. Ако засегнат мъж има дете от здрава жена, нито един от неговите потомци от мъжки пол няма да бъде засегнат, но всички негови потомци от женски пол ще бъдат носители, наречени облигатни носителки. Благодарение на X-свързаното унаследяване на болестта и в комбинация с подробна семейна анамнеза е възможно да се идентифицират облигатните носителки. Ако жена носителка има дете от здрав мъж,

всяко мъжко потомство има 50% шанс да бъде засегнато, а женското потомство има 50% шанс да бъде носител. По този начин болестта може да се предаде от засегнати мъже на внуци от мъжки пол чрез дъщерята носителка.

Приблизително 30-50% от случаите както при НА, така и при НВ, се описват като „спорадични“, въпреки че се предполага, че трябва да има фамилна анамнеза [5]. Проявата на заболяването без фамилна анамнеза може да се обясни с възможността за поява на *de novo* генетичен дефект в гените *F8/F9* или при засегнатото дете, или при жена, родила момче с хемофилия. Нерядко фамилната анамнеза остава неизвестна поради липса на информация или поради появата на малко раждания от мъжки пол в семейството. Майчиният мозаицизъм също може да допринесе за появата на такива случаи [6]. Ето защо отрицателната семейна анамнеза не е достатъчна за изключване на хемофилия, когато клиничната картина подсказва склонност към прекомерно кървене.

В редки случаи жени също могат да имат симптоматична хемофилия, обозначавани като „жени с хемофилия“. Тези жени се диагностицират като страдащи от хемофилия, като нивата на FVIII са сравними с тези на мъжете. В литературата са описани около 250 жени и момичета с тежък или умерен фенотип [7-8]. Фенотипът на тези жени може да е резултат от комплексни генетични причини, които могат да бъдат обобщени по следния начин: 1) хомозиготност при жената (два еднакви алела за хемофилия, дължащи се на родство); 2) съставна хетерозиготност (два различни алела за хемофилия, унаследени от всеки родител); 3) хемизиготност (един алел за хемофилия и липса на нормален алел поради хромозомни аберации, както при синдрома на Търнър или мозаичния синдром на Търнър), която е носител на мутирал алел; 4) хетерозиготност с инактивирана X-хромозома (инактивация в полза на алел за хемофилия) [9-11]; 5) генетични причини, различни от хемофилията – жените с понижени нива на FVIII могат да имат и комбиниран дефицит на фактор V (FV) и FVIII – аутозомно-рецесивно заболяване, характеризиращо се с леко понижени нива както на FVIII, така и на FV, причинено от вариации в гените *LMAN1* и *MCFD2* [12].

## 2. Молекулярна основа на НА и НВ – гени и вариации *F8/F9*

НА и НВ са моногенни нарушения, породени от патогенни варианти в гените *F8* или *F9*, разположени съответно в *Hq28* и *Hq27* на X-хромозомата [13]. Генът *F8* е изключително голям (приблизително 180 kb) и структурно сложен (26 екзона), докато генът *F9* е значително по-малък (приблизително 34 kb) и структурно по-прост, съдържащ само осем екзона. Освен това генът *F8* съдържа два вложени гена, *F8A* и *F8B*, в областта на интрон 22, които до голяма степен допринасят

значително за появата на най-често срещания генетичен дефект при тежката форма на НА – инверсия на интрон 22.

Молекулярната основа на НА и НВ е изключително разнообразна и е характеризирана при няколко хиляди пациенти. Въпреки че се срещат с различна честота при НА и НВ, почти всички видове генетични промени се откриват както в *гените F8*, така и в *F9* – точкови варианти, делеции, инсерции и пренареждания/инверсии. Хемофилията е едно от малкото генетични заболявания, при които се наблюдава добра корелация между генотипа и фенотипа. Видът на генетичните дефекти силно корелира с активността на остатъчния фактор в плазмата, склонността към кървене и тежестта на симптомите при пациентите с хемофилия.

### Спектър на генетичните варианти при НА

Видът на генетичния дефект в *гена F8* предсказва тежестта на заболяването. Дефектите, които водят до значително прекъсване/отсъствие на протеина FVIII или промяна на основен функционален участък, известни като нулеви варианти (инверсии на интрон 22 и интрон 1, големи делеции, безсмислени варианти, малки делеции без А и варианти на мястото на сплайс), водят до тежко заболяване. Втората група обобщава ненулевите варианти, които се добавят към missense варианти и допринасят за умерен или лек фенотип в повечето случаи.

НА проявява хетерогенност, като патогенни варианти са идентифицирани в целия ген. В зависимост от локализацията си патогенните варианти могат да повлияят на експресията на протеина FVIII чрез различни механизми. Те могат да пречат на свързването на FVIII с различни лиганди от каскадата на коагулацията и да доведат до намалена функция или пълна липса на синтез на FVIII или да повлияят на транспорта през клетката, активността и стабилността на FVIII. Базата данни с варианти на Европейската асоциация по хемофилия и сродни заболявания (EAHAD) е регистрирала повече от 3000 причинно-следствени генетични изменения в *гена F8*. Като цяло най-разпространеният тип генетични дефекти при всички степени на заболяването са missense вариантите. Докато при леките/умерените фенотипи се наблюдава най-висока честота на missense типа, при тежките фенотипи те са много по-слабо представени. Тежките фенотипи на НА са по-често свързани с нулеви варианти. Общото разпространение на генетичните варианти при НА може да се обобщи по следния начин: мисенс варианти (45%), нонсенс варианти (8%), инверсии (29%), малки делеции (6%), дупликации (3%), инсерции (2%) и големи делеции (7%). Въпреки че повечето генетични дефекти са неравномерно разпределени по протежение на *F8*, могат да бъдат идентифицирани четири горещи точки, които са причина за повтаряща се поява на генетични промени: двете горещи

точки на инверсии; горещите точки на CpG динуклеотиди, причинени от спонтанно деаминиране на 5-метилцитозина, предизвикано от метилиране [14-15], и малки делеции и инсерции, причинени от грешки при приплъзване на полимеразата в серии от аденинови нуклеотиди (А участъци) [16]. Тази подгрупа от малки делеции/дупликации, разположени в участъци от аденини, се свързва с облекчен фенотип на тежка НА и редки кръвоизливи. Ендогенното възстановяване на рамката на четене чрез полимеразни грешки по време на репликацията на ДНК/транскрипцията на РНК, което води до малки количества ендогенен протеин FVIII, би могло да обясни наблюдаваните явления [17].

### Инверсии на интрон 22 и интрон 1:

Два интронни участъка на *гена F8*, интрон 1 и интрон 22, са от особен интерес поради честото им участие в патологични инверсии в резултат на рекомбинация с хомоложни участъци извън *гена F8*. Районът, който е хомоложен на интрон 1 (int1h2), е разположен на ~140 kb към теломера и е с обратна ориентация. Интрахроматидната или интрахромозомната хомоложна рекомбинация на тези два региона води до инверсия, която измества екзон 1 на *гена F8* с ~140 kb към теломера [18]. Тази инверсия е причина за 1-4% от всички тежки случаи на НА.

Най-често срещаната инверсия обаче включва интрон 22. Приблизително 45% от тежките случаи на НА се дължат на интрахромозомна инверсия в интрон 22, която се появява поради два региона, хомоложни на последователностите в интрон 22, които са разположени приблизително 500 kb теломерно спрямо *гена F8* [19-20]. Това инверсионно събитие възниква спонтанно в мъжките зародишни клетки с 10 пъти по-висока честота на този тип вариант, отколкото при жените [21].

Съобщени са няколко груби комплексни пренареждания в *F8* и поради силно увреждащия им характер тези дефекти се свързват с тежък фенотип на хемофилия [22-23].

### Спектър на генетичните варианти на НВ

НВ е и генетично хетерогенна, с преобладаване на missense варианти, без общо инверсионно събитие, аналогично на инверсиите в *гена F8*. Те съставляват ~65% от всички уникални генетични варианти при НВ. Патогенните дефекти се срещат в целия *ген F9*, включително промотора и 3'UTR, но с най-висока концентрация в най-големия екзон 8. Патогенните варианти nonsense представляват по-голямата част от случаите с тежка форма на НВ, докато вариантите missense съставляват по-голямата част от патогенните дефекти при леки/умерени фенотипи. Съобщава се и за генетични варианти като nonsense (18%), малки делеции (9%), малки инсерции (2%), сплайс варианти (6%) и

големи делеции (5%). Останалите 60 % включват варианти missense. Понастоящем в базата данни за варианти на FIX EAHAD се съобщават повече от 1000 уникални варианта.

**Хемофилия В Leyden:** Макар и рядко, заслужава да се отбележи съществуването на конкретен уникален вариант на HB, който първоначално се представя с тежък или умерен фенотип (в зависимост от варианта), последван от нормализиране на нивата на FIX в пубертета – хемофилия В Leyden [24]. Молекулярният механизъм вероятно включва варианти в промоторната област на *F9*, които нарушават местата за свързване с един от трите транскрипционни фактора – HNF (чернодробен ядрен фактор 4a), C/EBP (CCAAT enhancer-binding protein) или ONECUT1/2. Първоначално се е смятало, че това очевидно „излекуване“ на HB с възрастта е свързано с повишаването на нивата на растежния хормон след пубертета. Подобен молекулярен механизъм все още не е идентифициран при пациенти с HB [25].

### 3. Генетични анализи

При хемофилия молекулярните изследвания остават единственият начин за поставяне на точна диагноза, като се преодолява вариативността и противоречивите данни, получени от другите методи, основани на количественото определяне на факторите на кръвосъсирването. Освен това генетичните анализи повишават диагностичната прецизност, особено при по-леките фенотипове на кръвене, като допринасят за вземането на правилни решения за лечение.

Генетичната диагностика на хемофилията е фокусирана предимно върху откриването на носители [26], като се използва генетичен маркер, който се ко-сегрегира с хемофилия в семейството. За проследяване на засегнатата хромозома и прогнозиране на статуса на носителство при жените се прилага анализ на полиморфизма с дължина на рестрикционния фрагмент (RFLP). Въпреки че това е бил единственият подход за характеризиране на HA в семейството, процедурата не е успешна в много случаи поради липса на информация за анализирания полиморфизъм, висок дял на спорадични случаи, липса на индексни пациенти и необходимост от няколко членове на семейството за сегрегационен анализ [27]. Освен това анализите на RFLPs са извършени чрез Southern blotting – трудоемък и отнемащ време метод.

Човешкият ген *F8* е клониран и характеризиран през 1982 г. През 1991 г. Higuchi и сътр. извършват първия систематичен анализ на пълния кодиращ регион на *F8*, като използват денатурираща градиентна гел-електрофореза (DGGE) като метод за скрининг на варианти, но при около половината от тежко засегнатите пациенти не е открит причинно-следствен вариант. [28]. Малко след това е

открита инверсията на интрон 22 на *F8*, на която се дължат около 45% от тежките случаи на HA. Първоначално анализите се извършват с помощта на Southern blotting и PCR, докато не се установява опростен вариант на инверсен-PCR (inverse shifting-PCR, IS-PCR) [29-30].

Навлезането на технологиите за секвениране, които позволяват директно характеризиране на вариациите, спомага за преодоляване на много от ограниченията на предишните техники. Директното секвениране, Sanger или NGS, увеличи чувствителността на скрининговите техники и понастоящем е златният стандарт за молекулярно-генетичен анализ.

Секвенирането по Sanger е първият прилаган метод, който включва амплификация на гените *F8/F9* чрез полимеразна верижна реакция (PCR) като къси ДНК сегменти (200-1000 нуклеотида), последвана от секвениране и погравняване на получените последователности с консенсусната последователност на човешкия геном с помощта на специален софтуер. Понастоящем секвенирането по Sanger се счита за отнемащ време и скъп метод с ниска производителност.

През последните години NGS се превръща в достъпен в диагностичните лаборатории и започна да се използва за генетичен анализ на нарушения на кръвосъсирването. Внедряването на NGS в рутинната диагностика позволява паралелен анализ на голям брой гени, което значително намалява работното натоварване и разходите в сравнение със секвенирането по Sanger и осигурява резултат в рамките на кратък и ясно определен период от време [31-33]. Освен това техниката NGS позволява анализ на големи делеции и дупликации, без да е необходим конвенционален анализ на генната гоза с помощта на мултиплексна лигационно-зависима амплификация със сонда (MLPA). Тъй като правилната интерпретация и патогенността, точкуването на вариантите, открити чрез технологията NGS, са от решаващо значение за диагностицирането и подходящото генетично консултиране, са предложени стандарти и насоки за интерпретация и класификация на генните варианти. Идентифицираните генетични вариации се категоризират като „патогенни“, „вероятно патогенни“, „с несигурно значение“, „вероятно доброкачествени“ и „доброкачествени“ въз основа на доказателства за набор от критерии и силата на тези критерии [34].

Понастоящем секвенирането на коагулационните гени *F8* или *F9* при пациенти с хемофилия и определянето на статуса на носителство е сравнително тривиална процедура, която позволява адекватно генетично консултиране, когато това е необходимо от медицинска гледна точка. Включването на NGS в рутинния диагностичен алгоритъм подобри молекулярното изследване от гледна точка на бързина, разходи и ефективност [35].

При пациенти с тежка форма на HA молекулярната диагностика започва със скрининг за инверсии на интрон 22 и интрон 1, последван от директно секвениране на кодиращите области и местата на сплайсинг на *F8* при пациенти, отрицателни за инверсии. При пациенти с лека/средно тежка форма на HA и HB генетичният анализ започва директно с откриване на молекулярни дефекти чрез директно секвениране.

Прилагането на NGS в условията на рутинна диагностика на HA/HB има както силни страни, така и ограничения [36]. Невъзможността на NGS да открива груби генетични пренареждания, като например големи инверсии, които обикновено изискват специфични техники за анализ, може да се счита за ограничение. Когато се изключат интронните 1/22 инверсии, такива големи аномалии са изключително редки и в повечето случаи включват делеция или дупликация на един или повече екзони, които могат да бъдат открити с еквивалентна ефективност чрез NGS в сравнение с MLPA [37].

Въпреки че NGS е от голяма полза за пациентите с хемофилия и техните семейства, неизбежното откриване на генетични варианти, които не са свързани с хемофилията, т.нар. непоискани, случайни или вторични находки, представлява потенциално предизвикателство. Това е сложен въпрос с много интерфериращи фактори, включващи етични въпроси [38]. Все по-широкото използване на NGS тества поражда загриженост относно сложността на интерпретацията на вариантите и етичните последици от откриването на непоискани находки, като например варианти в гените *RUNX1*, *ETV6* и *ANKRD26*, които са свързани с повишен риск от левкемия. Много е важно да се отбележи, че при използване на полигенни панелни анализи при пациенти с HA/HB те трябва да бъдат информирани за възможността за неочаквани находки и да им се даде възможност да изберат дали да бъдат информирани за такива варианти [39]. Въпросът за това кои генетични варианти в гени, унаследени съвместно с тези в гена *F8/F9*, трябва да се съобщават и кои не, остава спорен. Това е сложен въпрос с много обръкращи фактори, включително етични въпроси. В днешно време съществува консенсус, че ако не е известно тези варианти да са свързани с някакъв фенотип, не представляват по-нататъшно безпокойство. Ако тези варианти са свързани с клиничен фенотип, особено с тежък такъв, тогава тези случайни находки се превръщат в релевантни и трябва да бъдат докладвани.

Успеваемостта при идентифицирането на патогенни варианти при наследствени нарушения на кръвостъпването зависи, както от вида на извършения молекулярен анализ, така и от генетичната хетерогенност на заболяването. Въпреки забележителните подобрения в технологиите

за скрининг, процентът на откриване на причинни дефекти в гените *F8* и *F9* е приблизително 95%. Все още в 5% от случаите на пациенти с намалени нива на FVIII/FIX генетичният дефект остава неясен [40]. Липсващите 5% може да се дължат отчасти на фенотипно погрешно диагностициране на HA и болестта на фон Вилебранг тип 2N (VWD 2N), тъй като клиничната картина е доста сходна. В редки случаи комбинираният дефицит на FV/FVIII се свързва с патогенни варианти в гените *MCFD2* и *LMAN1*, които допринасят за ниските нива на FVIII. Спорадични случаи на множествен дефицит на витамин К-зависими фактори на кръвостъпването (VKCFDs), включващи протромбин, FVII, FIX и FX, могат да бъдат погрешно диагностицирани като HB [41]. Патогенните варианти на HA/HB извън областта на гените *F8/F9* може да останат неоткриваеми при настоящите процедури за изследване. Въпреки че са необходими допълнителни молекулярни и информатични изследвания, очаква се NGS да изясни случаите без „открити“ генетични промени в гените *F8/F9*, което ще доведе до по-добро разбиране на корелацията генотип/фенотип и до по-ефективни клинични грижи.

#### 4. Генетично консултиране и репродуктивни възможности

##### Генетично консултиране

Като вродено заболяване хемофилията има значително медицинско, психологическо и емоционално въздействие както върху засегнатите мъже, така и върху жените носители. Възможността за предаване на генетичните нарушения на потомството може да доведе до чувство за вина и самообвинение у родителите и може да окаже силно влияние върху вземането на репродуктивни решения [42-43]. Генетичното консултиране като процес, който предоставя на индивидите и семействата информация за начина на унаследяване на генетичните нарушения и им помага да вземат информирани медицински и лични решения, се е превърнало в неразделна част от цялостната грижа за хемофилията. То е от изключителна важност за момичетата и жените, които носят заболяването и са емоционално обременени по време на вземането на репродуктивни решения. Генетичното консултиране при хемофилия включва четири основни аспекта: идентифициране на жени, които са изложени на повишен риск да имат хемофилия или да я предадат на потомството; предоставяне на знания за генетичните аспекти на заболяването и последиците от него за потомството; пренатална диагностика; реимплантационна генетична диагностика. Освен това, тъй като тежестта на хемофилията остава стабилна в рамките на отделното семейство, партньорите могат да основават решението си на собствения си опит със заболяването [44].

В днешно време в семействата с хемофилия рутинно се идентифицира причинния генетичен вариант, след което се провежда генетично консултиране, определяне на статуса на носителство при жените в риск, така че в засегнатите семейства да могат да се вземат информирани репродуктивни решения. Големи проучвания, изследващи нагласата на жени от семейства с хемофилия за забременяване и раждане на деца, показват доста противоречиви мнения, които твърдо зависят от опита на жените с хемофилия в техните семейства. Качеството на живот в семейството с хемофилия оказва силно влияние върху това решение. В семействата, които са имали задоволително качество на живот, жените са били по-склонни да имат собствени деца в сравнение с жените, идващи от семейства, които са срещали трудности с приемането и управлението на заболяването [45-47]. Като цяло жените са искали да бъдат добре информирани, преди да вземат решение за репродукция.

Генетичното консултиране е от съществено значение, тъй като то предлага на жените възможността да бъдат професионално информирани за съществуващата вероятност да имат син с хемофилия и за настоящите процедури за превенция. Точното познаване на генетичния дефект в семейството позволява да се извърши пренатална диагностика на различни етапи: върху зародишната линия на жената-носител за предимплантационна генетична диагностика (PGD), върху хорионни власинки през първия триместър на бременността или върху амниоцити в по-късните етапи на бременността [48-50]. Оптималният момент за определяне на генетичния риск, изясняване на статуса на носителство и обсъждане на наличието на пренатално/преимплантационно генетично изследване е преди бременността. Мъжете с хемофилия също се нуждаят от генетично консултиране, включително обучение за генетиката на заболяването им, риска от засегнати внуци и възможността дъщерите им да имат симптоми на кървене. Поради това е уместно да се предложи генетично консултиране (включително обсъждане на потенциалните рискове за потомството и възможностите за репродукция) както на мъжете, така и на жените носители на хемофилия.

Специално внимание се изисква при консултирането на семейства с новооткрита хемофилия без фамилен анамнез за заболяването, особено когато майката не е носителка. В тези случаи заболяването може да се дължи или на *de novo* варианти в гените F8/F9, или на наличието на мозаицизъм при майката [51-52]. Мозаицизмът е наличието на клетъчни линии с различни генотипове в различни тъкани на индивида. Тя може да бъде соматична или специфична за зародишната линия, или и двете; и двете могат да окажат влияние върху репродуктивните резултати. В този случай патогенният вариант присъства само в някои от

клетките на зародишната линия и поради това не може да бъде открит в периферните бели кръвни клетки, които обикновено се използват за извършване на генетичен анализ [53-54]. Възможността за мозаицизъм в семейство на пациент с хемофилия без фамилен анамнез никога не може да бъде изключена. Генетичното консултиране трябва да се извършва с изключителна предпазливост и родителите трябва да бъдат информирани, че съществува възможност да имат второ дете с хемофилия, дори ако собственият им генетичен тест е отрицателен.

### **Пренатална диагностика**

Пренаталната диагностика се използва предимно за насочване на акушерското лечение и за да се даде възможност на родителите да бъдат психологически подготвени за отглеждането на засегнато дете [55]. Пренаталното изследване обикновено е показано при семейства с тежки или умерени форми на хемофилия, докато при семейства с лек фенотип такива индикации са редки. Познаването на състоянието на плода може да насочи решенията за управление по време на раждането, включително избягване на процедури и инструменти, които могат да причинят травма на новороденото, като например форцепс или вакуум-асистирана екстракция при вагинални раждания и раждания с цезарово сечение. Молекулярно-генетичното изследване на рискови роднини от женски пол за определяне на генетичния им статус е най-информативно, ако патогенният вариант е идентифициран при пробанда.

В семейства с тежка хемофилия понякога се извършва пренатална диагностика с цел прекъсване на бременността в случай на засегнато дете [45]. Множество проучвания разкриват, че изборът по отношение на пренаталната диагностика отново се основава на опита с клиничната тежест, усложненията и лечението на хемофилията в семейството. Религиозните убеждения и опитът на членовете на семейството в областта на пренаталната диагностика също биха могли да повлияят на вземането на решение. При някои жени има притеснения относно пренаталната диагностика, когато се вземат предвид потенциалните рискове от процедурата и страхът, когато резултатите станат известни [45, 56]. Би могло да се разкрие от емоционално облекчение и щастие при потвърждаване на очакването на здраво дете до тъга, разочарование, тежест на последващите решения при диагностициране на засегнато дете.

Пренаталната диагноза от биопсия на хорионните вили или амниоцентеза е широко достъпна. Тя може да бъде извършена между 11-ата и 14-ата гестационна седмица и дава възможност за ранна генетична диагностика с последваща възможност за прекъсване на бременността.

Има случаи, в които бременни жени се подлагат на пренатална диагностика, за да бъдат информирани дали могат да очакват плод от мъжки пол, засегнат от хемофилия. В тази ситуация майките трябва да бъдат добре информирани за свързания с процедурата риск (спонтанни аборти). Пренаталната диагностика чрез амниоцентеза може да се използва за установяване на наличието на заболяването при мъжки плод, но тя се извършва в гестационна възраст, която може да е извън границата за доброволно прекъсване на бременността.

Напоследък неинвазивното изследване на клетките на плода, намиращи се в майчината плазма, се извършва още през 10-та седмица от бременността, въпреки че е по-успешно на по-късен етап от бременността [57]. Тези тестове могат да намалят броя на жените, които се подлагат на инвазивни процедури, когато прекъсването на бременността не е техен избор, но все още не осигуряват окончателна диагноза.

Подобренията в грижите и клиничните резултати при хемофилия са съпроводени не само с напредък в методите за пренатална диагностика, но и в отношението към решенията за провеждане на пренатални диагностични тестове за хемофилия. Преимплантационната генетична диагностика и неинвазивните пренатални тестове са сред най-новите методи за пренатална диагностика, които са на разположение на двойките. Преимплантационната генетична диагностика предлага възможност за подбор на незасегнати ембриони, но предполага бременността да настъпи чрез процедури за ин витро оплождане. Едно обширно проучване показва, че носителите на хемофилия имат положително отношение към предимплантационната генетична диагностика, с изключение на тези, които я отхвърлят въз основа на религиозни убеждения. Инвазивните тестове за пренатална диагностика стават все по-рядко срещани и често се провеждат по-скоро за подпомагане на психологическата подготовка, отколкото за подпомагане на избора за прекъсване на бременността, ако плодът е засегнат от тежка форма на хемофилия.

### **5. Ползи от генетичните изследвания в клиничната практика**

Поставянето на окончателна молекулярна диагноза е важно по различни причини. Понастоящем молекулярната диагностика на HA и HB позволява да се предвиди вероятността за развитие на инхибитори, свързани със специфични патогенни варианти, и отговора на индукцията на имунен толеранс (ITI). Тя дава възможност на клинициста да адаптира клиничното лечение и да обсъди прогнозата с пациента. Идентифицирането на специфичен за семейството генетичен вариант позволява тестване за носителство на роднини от женски пол. Без генетично изследване може да е трудно да се установи точната причина за кръвене при лек

фенотип със сходни клинични и лабораторни характеристики (HA срещу VWD 2N).

### **Прогнозиране на риска за образуване на инхибиторни антитела**

Алоантителата (инхибиторите) срещу FVIII или FIX представляват основното усложнение при лечението на хемофилия, тъй като правят неефективна класическата субституираща терапия. Инхибиторите се срещат с честота от 20-30% при тежка форма на HA и приблизително 3-5% от тези с тежка форма на HB [58-59]. Честотата на образуване на инхибитори варира в зависимост от различни фактори на околната среда (режим на лечение, вид на концентрата) и генетични фактори (раса/етническа принадлежност, фамилна анамнеза, вид на генетичния дефект) [60]. Вариантът на гена F8 е с основен принос към генетичните рискови фактори за развитие на инхибитор [61-62]. Връзката между генетичния вариант и развитието на инхибитор е добре установена. Вариантите, за които се предвижда, че водят до пълна липса на FVIII, са свързани с по-висок риск, докато вариантите, които водят до известен синтез на протеина, са свързани с по-нисък риск. Освен това пациентите, носещи големи многодомени делеции, са изложени на най-висок риск (до 80%), докато пациентите, носещи missense варианти, са с най-нисък риск (по-малко от 5%). Рискът от развитие на инхибитор е по-висок при пациенти с делеции от повече от един при пациенти с делеции от един екзон или по-малко. Интересно е, че всички групи видове генетични варианти са свързани със среден риск от 17-41%.

Молекулярният анализ може да предскаже риска от развитие на инхибитори не само при тежка форма на HA, но и при лека форма на HA. Добре известно е, че някои missense варианти се свързват с появата на инхибитори при лека HA, докато това никога не е съобщавано при пациенти с лека HB [63]. Алтернативен патологичен механизъм може да е в основата на развитието на инхибитори при тези пациенти. Някои missense варианти могат да променят имуногенността на протеина FVIII и да предизвикат инхибиторен отговор срещу променения епитоп [64]. По-голямото разпространение на по-малко тежки генетични варианти (missense) при HB и по-рядкото наличие на скъсен протеин в сравнение с HA може отчасти да обясни по-малкото разпространение на инхибитори при тежката HB. Инхибитори при нетежката HB почти липсват [65-66].

Идентифицирането на лежащия в основата генетичен вариант, особено при HB, е важно не само за прогнозиране на риска от образуване на инхибитори, но и на възможността за възникване на анафилактична реакция след инфузионна заместителна терапия [62].

## Носители

Поради рецесивния X-свързан модел на унаследяване, жените в семейства с хемофилия могат да бъдат хетерозиготни за генетичния дефект, наричани „носители на хемофилия“. Познанието на статуса на носител на майката и генотипа, свързан с тежестта на заболяването, може да помогне при оценката на личния риск от кървене на майката и при планирането на лечението. Приблизително една трета от носителите на хемофилия кървят и се нуждаят от лечение. При тях се наблюдават повече спонтанни и провокирани кръвоизливи, отколкото при ненаследниците, и са изложени на по-висок риск от продължително кървене след операции, изваждане на зъби и тонзилектомия. Рискът е най-висок при хората с най-ниски нива на фактора на кръвосъсирване.

Поради феномена на инактивация на X-хромозомата, родословният анализ и нивата на съсирващите фактори FVIII или FIX сами по себе си не са достатъчни за диагностициране на носителство на хемофилия. Въпреки че генетичното изследване не е задължително за жени, които са задължителни носителки, то е единственият начин за идентифициране на носителките. Генетичното изследване на носителки е сложен въпрос. Въпреки че е важно от съображения за безопасност да се знаят нивата на предполагаемото носителство, то поражда редица етични и културни проблеми. Основните опасения включват разкриване на генетична тайна, психосоциална стигма, емоционално бреме от бъдещи увреждания и пренатално нарушаване на правото на живот, ако се извърши изкуствен аборт.

## Тежка хемофилия с лек фенотип на кървене

Въпреки че тежестта на хемофилията се определя от общите прояви на кървене, индивидуалният клиничен фенотип варира във всяка група. Въпреки това тежестта и честотата на кървенето могат да бъдат различни при хемофилици с една и съща факторна активност и генетичен дефект [67]. Лека склонност към кървене се съобщава при 10-15% от пациентите с тежка форма на хемофилия. Основата за тази хетерогенност в клиничната изява на тежката хемофилия все още не е достатъчно изяснена. Едно от възможните обяснения е естеството и местоположението на генетичния дефект. Малките делеции/инсерции в рамките на полиА-секвенцията на екзон 14 на F8 теоретично се свързват с нулеви варианти и FVIII:C от <1%, но фенотипът на хемофилията е свързан с намалена склонност към кървене [16]. Доказателството, че някои генетични варианти F8/F9 са независими предиктори на лек модел на кървене при тежки хемофилици, може да има значение за лечението на пациентите, тъй като би повлияло на избора и времето на започване на профилактиката и/или приемането на индивидуални схеми за повишаване на дозата. Тези констатации са в допълнение

към по-ниския риск от развитие на инхибитори, свързан с по-малко тежки генни дефекти, и засилват препоръката за ранна молекулярна диагностика с цел планиране на различни терапевтични стратегии при децата.

Друго възможно обяснение за смекчаване на фенотипа на кървене при тежка хемофилия включва ефекта на генетичните варианти в други гени. Предполага се, че лекото хиперкоагулационно състояние, свързано с тромбофилни варианти с повишена функционалност, като FV Leiden или протромбин G20210A, може да предпази хемофилиците от прекомерно кървене; клиничното значение на тези варианти обаче все още е спорно [68]. Предполага се, че други коагулационни аномалии, свързани с естествените антикоагуланти (дефицит на антитромбин, протейн С, протейн S), тромбоцитни нарушения и фибринолитични фактори, модулират фенотипа на кървене [69-72]. С прилагането на NGS в рутинната диагностика идентифицирането на такова съвпадащо унаследяване е доста лесно поради използването на панели от множество гени. Такива констатации трябва да се интерпретират внимателно и могат да предоставят повече доказателства за изясняване на това явление.

## Диференциална диагноза между лека/умерена хемофилия А и VWD

Фенотипите на кървене при VWD са хетерогенни и повечето от формите могат да бъдат разграничени от HA чрез измерване на нивата на антигена и активността на VWF. Тези функционални тестове обаче често показват значителна междулабораторна вариабилност и не може да се постигне окончателна диагноза. Отдиференцирането на VWD-2N от леката/умерената HA е от решаващо значение за ефективно генетично консултиране и терапия [73]. Тези важни открития предизвикват промяна в терапевтичния подход и генетичното консултиране [74]. Въз основа на тези и публикуваните преди това резултати е необходимо да се обмисли VWD 2N при пациенти с нисък FVIII:C в контекста на неуспеха да се идентифицира хемофилен вариант, съотношение на активността на FVIII:C/VWF < 0,9 или неадекватен отговор на лечение с рекомбинантен FVIII [35, 75]. Едновременните генетични анализи на F8/VWF с NGS предоставят достатъчно категорична диагноза в такива случаи.

## Несъответствие между анализите на активността на фактор VIII

Независимо от сценария, който води до съмнение за хемофилия, окончателната диагноза се поставя чрез измерване на остатъчната активност на съсирване на FVIII и FIX (FVIII:C и FIX:C). Тези измервания могат да се извършат



с помощта на едностепенни или хромозомни коагулационни тестове. Резултатите от различните тестове за FVIII:C обикновено са еквивалентни при пациенти с ХА, въпреки че няколко доклада разкриват системни несъответствия в тестовете за FVIII:C при една трета от пациентите с нетежка ХА като част от фенотипа на ХА. Това явление става клинично значимо, когато засяга диагностицирането на НА или оценката на тежестта на заболяването [76-77]. Съобщените данни потвърждават, че несъответствието в анализа на FVIII:C е доста често срещано явление при нетежка форма на ХА и има генетичен произход. Профилът на генетичните дефекти, свързани с несъответствието на FVIII:C, е свързан с класа на missense дефектите. Всички генетични варианти, свързани с явленията на несъответствие, при които едноетапният анализ показва по-високи стойности от хромозомния анализ, са локализирани в домейните A1, A2 и A3 на границата между субединиците (A1-A2, A1-A3, A2-A3). Тези дефекти водят до намалена стабилност на домейна A2 в активирания протеин FVIII, което води до дестабилизиране на протеина FVIII и преждевременна загуба на кофакторната активност. Несъответствията, характеризирани се с по-висок FVIII:C, измерен чрез хромозомен анализ, включват генетични дефекти, засягащи местата за свързване на тромбина, VWF или FIX.

### Заклучение

При хемофилията молекулярното изследване остава единственият начин за поставяне на точна диагноза, като се преодолява вариабилността и непоследователността на данните, получени от конвенционалните методи, основани на количественото определяне на факторите на кръвосъсирването. Разбирането на основните молекулярни механизми при хемофилията допринася за клиничните грижи, като предоставя информация, водеща до усъвършенстване на лечението, по-добро тестване и по-точна информация за пациентите и семействата. Генетичните изследвания са показани за семейно планиране, тестване на носителство и пренатална диагностика.

### Благодарност

Научният труд е публикуван във връзка с проект „Грант 2023“ на МУ – София с договор 198/03.08.2023 г.

### Библиография

1. Blanchette VS, Key NS, Ljung LR, et al. Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2014; 12: 1935–1939.
2. Verntorp E, Shapiro AD. Modern haemophilia care. *Lancet* 2012; 379: 1447–1456.
3. Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus*

- L.). *Nature* 1961; 190: 372–373.
4. Harper PS, Mary Lyon and the hypothesis of random X chromosome inactivation. *Hum Genet* 2011; 130: 169–174.
5. Fischer K, Ljung R, Platokouki H, et al. Prospective observational cohort studies for studying rare diseases: the European PedNet Haemophilia Registry. *Haemophilia* 2014; 20: e280-6.
6. Gomez K, Laffan M, Keeney S, et al. Recommendations for the clinical interpretation of genetic variants and presentation of results to patients with inherited bleeding disorders. A UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation Good Practice Paper. *Haemophilia* 2019; 25: 116–126.
7. Miller CH, Bean CJ. Genetic causes of haemophilia in women and girls. *Haemophilia* 2021; 27: e164-e179.
8. Pavlova A, Brondke H, Musebeck J, et al. Molecular mechanisms underlying hemophilia A phenotype in seven females. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 976–982.
9. Acquila M, Caprino D, Biccocchi P, et al. A skewed lyonization phenomenon as cause of hemophilia A in a female patient. *Blood* 1995; 85: 599–600.
10. Bennett CM, Boye E, Neufeld EJ. Female monozygotic twins discordant for hemophilia A due to nonrandom X-chromosome inactivation. *Am J Hematol* 2008; 83: 778–780.
11. Radic CP, Rossetti LC, Abelleiro MM, et al. Phenotype-genotype correlations in hemophilia A carriers are consistent with the binary role of the phase between F8 and X-chromosome inactivation. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 530–539.
12. Palla R, Peyvandi F, Shapiro AD. Rare bleeding disorders: diagnosis and treatment. *Blood* 2015; 125: 2052–2061.
13. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984; 312: 326–330.
14. Youssoufian H, Wong C, Aronis S, et al. Moderately severe hemophilia A resulting from Glu----Gly substitution in exon 7 of the factor VIII gene. *Am J Hum Genet* 1988; 42: 867–871.
15. El-Maarri O, Olek A, Balaban B, et al. Methylation levels at selected CpG sites in the factor VIII and FGFR3 genes, in mature female and male germ cells: implications for male-driven evolution. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1001–1008.
16. Oldenburg J, Schroder J, Schmitt C, et al. Small deletion/insertion mutations within poly-A runs of the factor VIII gene mitigate the severe haemophilia A phenotype. *Thrombosis and haemostasis* 1998; 79: 452–453.
17. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* 2017; 58: 235–263.
18. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, et al. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 2002; 99: 168–174.
19. Naylor JA, Buck D, Green P, et al. Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1217–1224.
20. Lakich D, Kazazian, H. H., Jr., Antonarakis SE, et al. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* 1993; 5: 236–241.
21. Rossiter JP, Young M, Kimberland ML, et al. Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1035–1039.
22. Tavassoli K, Eigel A, Horst J. A deletion/insertion leading to the generation of a direct repeat as a result of slipped mispairing and intragenic recombination in the factor VIII gene. *Hum Genet* 1999; 104: 435–437.
23. Vidal F, Farssac E, Tusell J, et al. First molecular characterization of an unequal homologous alu-mediated recombination event responsible for hemophilia. *Thrombosis and haemostasis* 2002; 88: 12–16.
24. Briët E, van Leeuwen-Cornelisse IS, van der Vlerk D, et al. Hemofilie B

- Leyden. *Ned Tijdschr Geneesk* 1986; 130: 1324–1327.
25. Funnell APW, Crossley M. Hemophilia B Leyden and once mysterious cis-regulatory mutations. *Trends Genet* 2014; 30: 18–23.
26. Schwaab R, Oldenburg J, Higuchi M, et al. Haemophilia A: carrier detection by DNA analysis. *Blut* 1988; 57: 85–90.
27. Lin S-Y, Su Y-N, Hung C-C, et al. Mutation spectrum of 122 hemophilia A families from Taiwanese population by LD-PCR, DHPLC, multiplex PCR and evaluating the clinical application of HRM. *BMC Med Genet* 2008; 9: 53.
28. Higuchi M, Kazazian, H. H., Jr., Kasch L, et al. Molecular characterization of severe hemophilia A suggests that about half the mutations are not within the coding regions and splice junctions of the factor VIII gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 7405–7409.
29. Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, et al. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. *Clin Chem* 2005; 51: 1154–1158.
30. Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, et al. 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.
31. Lu JT, Campeau PM, Lee BH. Genotype-phenotype correlation--promiscuity in the era of next-generation sequencing. *N Engl J Med* 2014; 371: 593–596.
32. Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, Boer EN de, et al. Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum Mutat* 2013; 34: 1035–1042.
33. Bastida JM, Del Rey M, Lozano ML, et al. Design and application of a 23-gene panel by next-generation sequencing for inherited coagulation bleeding disorders. *Haemophilia* 2016; 22: 590–597.
34. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17: 405–424.
35. Bastida JM, González-Porras JR, Jiménez 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. *Thrombosis and haemostasis* 2017; 117: 66–74.
36. Ver Donck F, Downes K, Freson K. Strengths and limitations of high-throughput sequencing for the diagnosis of inherited bleeding and platelet disorders. *J Thromb Haemost* 2020.
37. Zhao M, Wang Q, Wang Q, et al. Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives. *BMC Bioinformatics* 2013; 14 Suppl 11: S1.
38. Wolf SM. The Continuing Evolution of Ethical Standards for Genomic Sequencing in Clinical Care: Restoring Patient Choice. *J Law Med Ethics* 2017; 45: 333–340.
39. Ver Donck F, Labarque V, Freson K. Hemostatic phenotypes and genetic disorders. *Res Pract Thromb Haemost* 2021; 5: e12637.
40. Pezeshkpoor B, Pavlova A, Oldenburg J, et al. F8 genetic analysis strategies when standard approaches fail. *Hamostaseologie* 2014; 34: 167–173.
41. Czogalla KJ, Watzka M, Oldenburg J. VKCFD2 - from clinical phenotype to molecular mechanism. *Hamostaseologie* 2016; 36: S13-S20.
42. McLintock C. Women with bleeding disorders: Clinical and psychological issues. *Haemophilia* 2018; 24 Suppl 6: 22–28.
43. Lavery S. Preimplantation genetic diagnosis of haemophilia. *Br J Haematol* 2009; 144: 303–307.
44. Punt MC, Aalders TH, Bloemenkamp KWM, et al. The experiences and attitudes of hemophilia carriers around pregnancy: A qualitative systematic review. *J Thromb Haemost* 2020; 18: 1626–1636.
45. Gillham A, Greyling B, Wessels T-M, et al. Uptake of Genetic Counseling, Knowledge of Bleeding risks and Psychosocial Impact in a South African Cohort of Female Relatives of People with Hemophilia. *J Genet Couns* 2015; 24: 978–986.
46. Lippe C von der, Frich JC, Harris A, et al. „It was a lot Tougher than I Thought It would be“. A Qualitative Study on the Changing Nature of Being a Hemophilia Carrier. *J Genet Couns* 2017; 26: 1324–1332.
47. Kadir RA, Sabin CA, Goldman E, et al. Reproductive choices of women in families with haemophilia. *Haemophilia* 2000; 6: 33–40.
48. Laurie AD, Hill AM, Harraway JR, et al. Preimplantation genetic diagnosis for hemophilia A using indirect linkage analysis and direct genotyping approaches. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 783–789.
49. Ljung RC. Prenatal diagnosis of haemophilia. *Haemophilia* 1999; 5: 84–87.
50. Cutler J, Chappell LC, Kyle P, et al. Third trimester amniocentesis for diagnosis of inherited bleeding disorders prior to delivery. *Haemophilia* 2013; 19: 904–907.
51. Ljung RC, Sjörin E. Origin of mutation in sporadic cases of haemophilia A. *Brit J Haematol* 1999; 106: 870–874.
52. Leuer M, Oldenburg J, Laverne JM, et al. Somatic mosaicism in hemophilia A: a fairly common event. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 75–87.
53. Kasper CK, Buzin CH. Mosaics and haemophilia. *Haemophilia* 2009; 15: 1181–1186.
54. Lannoy N, Hermans C. Genetic mosaicism in haemophilia: A practical review to help evaluate the risk of transmitting the disease. *Haemophilia* 2020; 26: 375–383.
55. Mårtensson A, Tedgård U, Ljung R. Prenatal diagnosis of haemophilia in Sweden now more commonly used for psychological preparation than termination of pregnancy. *Haemophilia* 2014; 20: 854–858.
56. Boardman FK, Young PJ, Warren O, et al. The role of experiential knowledge within attitudes towards genetic carrier screening: A comparison of people with and without experience of spinal muscular atrophy. *Health Expect* 2018; 21: 201–211.
57. Hudcová I, Jiang P, Davies J, et al. Noninvasive detection of F8 int22h-related inversions and sequence variants in maternal plasma of hemophilia carriers. *Blood* 2017; 130: 340–347.
58. van den Berg HM, Fischer K, Carcao M, et al. Timing of inhibitor development in more than 1000 previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood* 2019; 134: 317–320.
59. Male C, Andersson NG, Rafowicz A, et al. Inhibitor incidence in an unselected cohort of previously untreated patients with severe hemophilia B: a PedNet study. *Haematologica* 2020; 106: 123–129.
60. Astermark J. FVIII inhibitors: pathogenesis and avoidance. *Blood* 2015; 125: 2045–2051.
61. 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.
62. Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia* 2006; 12 Suppl 6: 15–22.
63. Eckhardt CL, Loomans JI, van Velzen AS, et al. Inhibitor development and mortality in non-severe hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 1217–1225.
64. Castaman G, Fijnvandraat K. Molecular and clinical predictors of inhibitor risk and its prevention and treatment in mild hemophilia A. *Blood* 2014; 124: 2333–2336.
65. Male C, Andersson NG, Rafowicz A, et al. Inhibitor incidence in an unselected cohort of previously untreated patients with severe hemophilia B: a PedNet study. *Haematologica* 2020; 106: 123–129.
66. Bardi E, Astermark J. Genetic risk factors for inhibitors in haemophilia A. *Eur J Haematol* 2015; 94 Suppl 77: 7–10.
67. Pavlova A, Oldenburg J. Defining severity of hemophilia: more than

- factor levels. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39: 702–710.
68. Lee DH, Walker IR, Teitel J, et al. Effect of the Factor V Leiden Mutation on the Clinical Expression of Severe Hemophilia A. *Thromb Haemostasis* 2000; 83: 387–391.
69. Preisler B, Pezeshkpoor B, Banchev A, et al. Familial Multiple Coagulation Factor Deficiencies (FMCFDs) in a Large Cohort of Patients-A Single-Center Experience in Genetic Diagnosis. *JCM* 2021; 10: 347.
70. Escuriola Ettingshausen C, Halimeh S, Kurnik K, et al. Symptomatic onset of severe hemophilia A in childhood is dependent on the presence of prothrombotic risk factors. *Thrombosis and haemostasis* 2001; 85: 218–220.
71. van Dijk K, van der Bom JG, Fischer K, et al. Phenotype of severe hemophilia A and plasma levels of risk factors for thrombosis. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1062–1064.
72. Shetty S, Vora S, Kulkarni B, et al. Contribution of natural anticoagulant and fibrinolytic factors in modulating the clinical severity of haemophilia patients. *Brit J Haematol* 2007; 138: 541–544.
73. Boylan B, Rice AS, Staercke C de, et al. Evaluation of von Willebrand factor phenotypes and genotypes in Hemophilia A patients with and without identified F8 mutations. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 1036–1042.
74. Gupta M, Lillicrap D, Stain AM, et al. Therapeutic consequences for misdiagnosis of type 2N von Willebrand disease. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 57: 1081–1083.
75. Mazurier C, Goudemand J, Hilbert L, et al. Type 2N von Willebrand disease: clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14: 337–347.
76. Pavlova A, Delev D, Pezeshkpoor B, et al. Haemophilia A mutations in patients with non-severe phenotype associated with a discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII activity assays. *Thrombosis and haemostasis* 2014; 111: 851–861.
77. Keeling DM, Sukhu K, Kemball-Cook G, et al. Diagnostic importance of the two-stage factor VIII:C assay demonstrated by a case of mild haemophilia associated with His1954-->Leu substitution in the factor VIII A3 domain. *Br J Haematol* 1999; 105: 1123–1126.