

ГЕМОФИЛИЯ А СРЕДНЕЙ ТЯЖЕСТИ У ДЕВОЧКИ С НЕСБАЛАНСИРОВАННОЙ ЛАЙОНИЗАЦИЕЙ ХРОМОСОМЫ X

Skewed X-chromosome inactivation in heterozygous female with moderate hemophilia A

Бескоровая Т. С.¹, Аbruкова А. В.², Миронович О. Л.¹,
Близнец Е. А.¹, Миловидова Т. Б.¹, Щагина О. А.¹, Саваскина Е. Н.²,
Поляков А. В.¹

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия

² БУ Чувашской Республики «Президентский перинатальный центр» Минздрава Чувашской Республики, Чувашская Республика, г. Чебоксары, Россия

Beskorovainaya T. S.¹, Abruкова A. V.², Mironovich O. L.¹,
Bliznets E. A.¹, Milovidova T. B.¹, Shchagina O. A.¹, Savaskina E. N.²,
Polyakov A. V.¹

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

² Presidential perinatal centre, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты молекулярно-генетического обследования девочки с клиническими признаками гемофилии А средней тяжести — это первое в России описание молекулярных причин гемофилии у пациентки женского пола. Пробанд является дочерью больного гемофилией А тяжелой степени, у которого обнаружена частая мутация гена *F8* — инверсия интрона 22 (Inv22). У пациентки была выявлена мутация Inv22, унаследованная от отца. Также у нее обнаружены три доброкачественных варианта гена *F8* в гетерозиготном состоянии: с. 1010-27G>A, с. 3780C>G (р. D1260E), с. 3864A>C (р. S1288=). В образцах геномной ДНК, полученных из крови и буккального эпителия пациентки, выявлена экстремально смещенная лайонизация хромосом X — 95:5% и 85:15% соответственно. В работе показано, что наблюдаемый смещенный паттерн лайонизации характеризуется преобладанием клонов клеток с неактивной материнской хромосомой X и транскрипционно активной отцовской хромосомой, несущей дефектный ген *F8*. Редко встречающееся сочетание гетерозиготного носительства мутации в гене *F8* с экстремально смещенной лайонизацией хромосомы X обусловило развитие у девочки клиники гемофилии А.

Ключевые слова: гемофилия; *F8*; инверсия интрона 22; лайонизация хромосомы X

ABSTRACT

This molecular genetic study of a girl with moderate hemophilia A is the first Russian report describing the cause of hemophilia in a female patient. The proband's father suffers from severe hemophilia A and has a common *F8* gene mutation, specifically an inversion of intron 22 (Inv22). Along with the Inv22 mutation inherited from her father, the girl was also found to be heterozygous for three benign mutations in the *F8* gene: c.1010-27G>A, c.3780C>G (p.D1260E), and c.3864A>C (p.S1288=). A dramatically skewed X-chromosome inactivation was detected in the proband's blood and buccal epithelium samples (95:5% and 85:15% respectively). The maternal X-chromosome was selectively inactivated. The paternal X-chromosome with the mutant *F8* gene remained active, and thus caused hemophilia A in a heterozygous female.

Keywords: haemophilia; *F8* gene; intron 22 inversion; skewed X-inactivation

For citation: Beskorovainaya T. S., Abruкова A. V., Mironovich O. L., Bliznets E. A., Milovidova T. B., Shchagina O. A., Savaskina E. N., Polyakov A. V. Skewed X-chromosome inactivation in heterozygous female with moderate hemophilia A. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2018; 63(1):184–190 (in Russian) doi: 10.25837/HAT.2018.79..2..009

For correspondence: Beskorovainaya Tatiana S., MD, PhD, researcher, DNA diagnostics laboratory, Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115478, Russian Federation
E-mail: t-kovalevskaya@yandex.ru

Для цитирования: Бескоровайная Т. С., Абрикова А. В., Миронович О. Л., Блинец Е. А., Миловидова Т. Б., Шагина О. А., Саваскина Е. Н., Поляков А. В. Гемофилия А средней тяжести у девочки с несбалансированной лайонизацией хромосомы X. Гематология и трансфузиология. 2018; 63(1):184–190
doi: 10.25837/HAT.2018.79..2..009

Для корреспонденции: Бескоровайная Татьяна Сергеевна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, г. Москва, Россия

Электронная почта: t-kovalevskaya@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.12.17

Принята к печати 16.05.18

Information about authors:

Beskorovainaya T. S., <https://orcid.org/0000-0001-5656-2561>;
Abrukova A. V., <https://orcid.org/0000-0002-2225-2773>;
Mironovich O. L., <https://orcid.org/0000-0003-0351-1271>;
Bliznets E. A., <https://orcid.org/0000-0002-5339-5566>;
Milovidova T. B., <https://orcid.org/0000-0002-0050-6947>;
Shchagina O. A., <https://orcid.org/0000-0003-4905-1303>;
Savaskina E. N., <https://orcid.org/0000-0002-1176-8993>;
Polyakov A. V., <https://orcid.org/0000-0002-0105-1833>.

Financial disclosure. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 13 Dec 2017

Accepted 16 May 2018

Введение

Гемофилия А — это самая частая наследственная патология среди нарушений свертывания крови. Заболевание наследуется по X-сцепленному рецессивному типу, встречается с частотой 1:5000 новорожденных мальчиков [1, 2]. Данная форма гемофилии обусловлена мутациями гена *F8*, которые в различной степени влияют на синтез, строение и функционирование фактора свертывания VIII (FVIII). В зависимости от активности фактора выделяют несколько степеней тяжести заболевания: менее 1% — тяжелая, 1–5% — средней тяжести, 5–40% — легкая [3]. Самая частая мутация в гене *F8* — это инверсия интрона 22 (Inv22), которая является причиной 40–50% случаев тяжелой формы гемофилии А [4, 5]. Женщины, являющиеся гетерозиготными носительницами мутации гена *F8*, — матери больных мальчиков, их сестры, дочери больных отцов — обычно не имеют клинических проявлений заболевания, уровень активности FVIII в их плазме составляет не менее 50%.

Крайне редко гемофилия, как и другие X-сцепленные рецессивные заболевания, проявляется и у женщин, что обусловлено одной из следующих причин:

- наличием мутаций в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии [6, 7];
- наличием мутации в гемизиготном состоянии при синдроме Шерешевского—Тернера [8];

или

- наличием двух мутантных аллелей, унаследованных от одного родителя в случае однородительской дисомии [9];
- у гетерозиготных носительниц патогенного варианта симптомы заболевания могут проявляться при неравной лайонизации хромосом X [10].

В 50% случаев причиной дефицита активности FVIII у пациенток с гемофилией А является гетерозиготное носительство патогенной мутации гена *F8* в сочетании

со смещенной (несбалансированной) лайонизацией хромосомы X [11]. Лайонизация хромосомы X — это процесс инактивации одной из хромосом X у плода женского пола млекопитающих в раннем эмбриогенезе, в результате которого утрачивается транскрипционная активность одной из двух хромосом для дозовой компенсации экспрессии X-сцепленных генов [12]. В каждой клетке этот процесс независим, и выбор, какая из двух хромосом X будет инактивироваться, происходит случайным образом. В итоге женский организм становится мозаичным: в половине клеток неактивна хромосома X отцовского происхождения, в другой половине — материнского. Соотношение указанных клонов клеток обычно близко к 1:1, что является численным показателем лайонизации хромосомы X [13]. Иногда вследствие ряда причин наблюдается несбалансированная лайонизация в сторону одной из клеточных линий. Смещенным считается соотношение клонов более 75:25% и экстремально смещенным — соотношение более 95:5% [13]. Несбалансированный паттерн инактивации хромосомы X в отдельных тканях выявляется у 14% здоровых новорожденных девочек, а также возникает с возрастом и к шестидесяти годам наблюдается у почти половины женщин без клинических проявлений [14]. Однако сочетание такого смещенного паттерна лайонизации с носительством на транскрибируемой хромосоме X патогенного варианта приводит к развитию X-сцепленного рецессивного заболевания.

Оценить вклад остальных этиологических факторов в патогенез гемофилии А у женщин весьма сложно, так как X-сцепленные рецессивные заболевания проявляются у них крайне редко. Поэтому консультирование таких пациенток затруднительно из-за недостаточности систематизированных данных о течении заболевания, его осложнениях, генетических факто-

рах и методах лечения женщин с тяжелой и средне-тяжелой формой гемофилии. В статье представлено первое в России описание молекулярно-генетического исследования девочки с гемофилией А средней степени тяжести.

Материалы и методы

В данной работе проведено генетическое обследование девочки, облигатной носительницы гемофилии А. Пациентка имеет клинические проявления гемофилии средней степени тяжести. От родителей девочки было получено информированное согласие на проведение исследования.

Показатели коагулограммы пациентки и ее родителей: протромбиновый индекс (ПТИ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК), международное нормализованное отношение (МНО), агрегация тромбоцитов, концентрация фибриногена и D-димеров, активность FVIII, FIX, vWF, антитромбина III, протеина С определяли на автоматическом анализаторе STA Compact («F. Hoffman-la-Roche Ltd.», Швейцария).

Цитогенетическое исследование проводили методом G-дифференциального окрашивания метафазных хромосом лимфоцитов периферической крови.

Выделение ДНК из цельной крови, забранной в пробирку с антикоагулянтом ЭДТА, проводили с помощью набора реактивов Wizard® Genomic DNA Purification Kit («Promega», США) согласно протоколу производителя.

Поиск инверсии интрона 22 гена *F8* проводили с помощью медицинской технологии: «Система детекции инверсии интрона 22 гена *F8*», являющейся модификацией метода IS-PCR (Inverse Shifting-PCR), предложенного L. Rossetti [15, 16].

Секвенирование по Сенгеру ПЦР-продуктов, полученных с праймеров, комплементарных последовательности гена *F8*, фланкирующих экзоны 1–26, проводили на приборе для капиллярного электрофореза 3130 ABI genetic analyzer («Applied Biosystems», США). Показатели частоты минорного аллеля полиморфных вариантов гена *F8* были взяты из баз данных dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) и Genome Aggregation Database (<http://gnomad.broadinstitute.org>).

Анализ гена *vWF* проведен на секвенаторе нового поколения Ion S5. Для пробоподготовки использована технология ультрамультиплексной ПЦР, сопряженная с последующим секвенированием (AmpliSeq™). Анализ проведен с использованием кастомной панели Coagulum, включающей кодирующие последовательности генов: *FVII*, *FIX*, *vWF*. По данным AmpliSeq™ Coverage Analysis, расчетное покрытие панели составляет 95,7%. Обработка результатов секвенирования проведена с использованием стандартного автоматизированного алгоритма, предлагаемого ThermoFisher Scientific (Torrent Suite™), а также программного обеспечения Gene-Talk. Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использованы базы данных dbSNP и Genome Aggregation Database. Патогенность вариантов оценивали согласно руководству по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования [17].

Для исследования паттерна лайонизации проводили анализ, предложенный Allen et al. [18], заключающийся в определении паттерна метилирования X-сцепленного полиморфного повтора HUMARA — (CAG)_n в экзоне 1 гена *AR* — методом метилчувствительной количественной флуоресцентной ПЦР (QF-PCR) с последующим фрагментарным анализом на генетическом анализаторе 3130 ABI genetic analyzer («Applied Biosystems», США). Далее определяли процентное соотношение количества клеток, несущих инактивированную хромосому материнского либо отцовского происхождения (XCI ratio) по формуле, предложенной Bolduc et al [14].

Для исследования паттерна лайонизации проводили анализ, предложенный Allen et al. [18], заключающийся в определении паттерна метилирования X-сцепленного полиморфного повтора HUMARA — (CAG)_n в экзоне 1 гена *AR* — методом метилчувствительной количественной флуоресцентной ПЦР (QF-PCR) с последующим фрагментарным анализом на генетическом анализаторе 3130 ABI genetic analyzer («Applied Biosystems», США). Далее определяли процентное соотношение количества клеток, несущих инактивированную хромосому материнского либо отцовского происхождения (XCI ratio) по формуле, предложенной Bolduc et al [14].

Результаты

Приводим описание клинического наблюдения случая гемофилии А средней тяжести у девочки с несбалансированной лайонизацией хромосомы X.

Пациентка — девочка, 9 лет, от 1-й беременности (угроза прерывания, многоводие). Роды срочные в 38–39 нед, оперативные (первичная слабость родовой деятельности). Масса тела при рождении составила 3378 г, рост 52 см. Оценка по шкале Апгар 8–9 баллов. В раннем неонатальном периоде была конъюгационная желтуха. Выписана домой в удовлетворительном состоянии. Росла и развивалась соответственно возрасту.

Манифестация заболевания произошла в 2 года 11 мес в виде дважды возникших в результате прикусывания длительных кровотечений из слизистой языка. При изучении анамнеза установлено, что с началом самостоятельной ходьбы отмечались частые синяки. Была госпитализирована в гематологическое отделение для уточнения диагноза. При поступлении общее состояние было средней тяжести, обусловлено геморрагическим синдромом. Пациентка правильного телосложения, умеренного питания, кожа бледная, в области верхних и нижних конечностей, на теле и в правой паховой области имелись множественные экхимозы, на языке — единичная петехиальная сыпь. Костно-суставная система без видимой патологии. Периферические лимфатические узлы не пальпировались. В легких выслушивалось пуэрильное дыхание, хрипов не было, ЧД 25 мин⁻¹, тоны сердца ясные ритмичные, ЧСС 102 мин⁻¹.

Данные общего анализа крови: гемоглобин 147 г/л, эритроциты $4,46 \times 10^{12}$ /л, лейкоциты $6,2 \times$

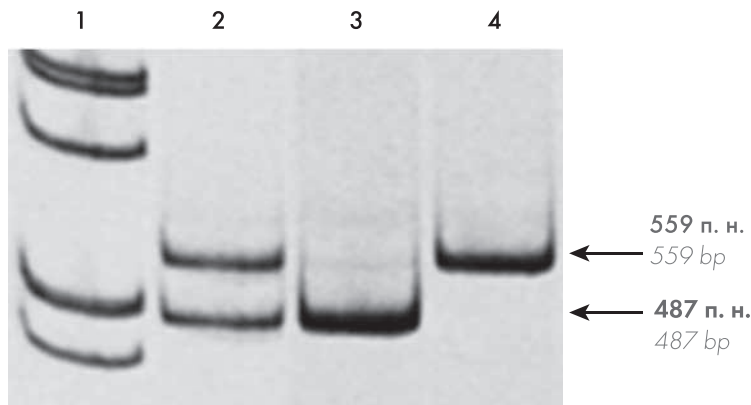


Рисунок 1. Электрофореграмма результатов детекции инверсии интрона 22 гена *F8* у пробанда, ее матери и отца. Фрагмент 478 п. н. соответствует нормальному строению гена *F8*, фрагмент 559 п. н. — инверсии интрона 22 гена *F8*. Дорожка 1 — маркер молекулярных весов λ /PstI; дорожка 2 — пробанд: Inv22 в гетерозиготном состоянии; дорожка 3 — мать пробанда: норма; дорожка 4 — отец пробанда: Inv22 в гемизиготном состоянии.

Figure 1. The electrophoretogram with the results of the *F8* gene intron 22 inversion detection in proband, her mother and father. The fragment of 478 bp corresponds to the normal *F8* gene, the fragment of 559 bp — to the *F8* gene intron 22 inversion. Line 1 — molecular weight marker λ /PstI; line 2 — proband: Inv22 in heterozygous state; line 3 — proband's mother: normal; line 4 — proband's father: Inv22 in hemizygous state.

10⁹/л, тромбоциты 180 × 10⁹/л, цветной показатель 0,95; СОЭ 2 мм/ч.

Коагулограмма: ПТИ 80%, АЧТВ 78 с, фибриноген 2,6 г/л, РФМК 14 мг/100 мл, антитромбин III 88%, МНО 1,32, протеин С 58%, D-димеры 0,25 мкг/мл, FVIII 3,64% (в контроле через 1 день 4,53%), FIX 68,6%, vWF 59%. Агрегация тромбоцитов (лазерный анализатор Биола LA 230-2) — спонтанная, с ристомидином, коллагеном, АДФ 5 мкМ, адреналином — нарушений не выявлено.

В последующем анализе: активность FVIII 0,8%, после введения концентрата FVIII 18%; активность FIX 88%, после введения концентрата FVIII 168%; активность vWF 100%, после введения концентрата FVIII 159%. В настоящее время больная получает заместительную терапию концентратом FVIII; ее регулярно наблюдает гематолог.

Наследственность пациентки отягощена — отец болен гемофилией А тяжелой степени (имеет выраженные клинические проявления, активность FVIII < 1%). Мать клинически здорова, в коагулограмме: АЧТВ 25,9 с, ПВ 10,7 с, ТВ 14,7 с, фибриноген 3 г/л, РФМК 8 мг/100 мл, МНО 0,95, активность FVIII 70,6%, активность FIX 196%, активность vWF 41%. Агрегация тромбоцитов (лазерный анализатор Биола LA 230-2) — спонтанная, с ристомидином, коллагеном, АДФ 5 мкМ, адреналином — нарушений не выявлено.

Молекулярно-генетическое обследование больной девочки проводили с целью установления причины

проявления клинических признаков гемофилии А и прогноза для будущего потомства матери пациентки.

Обсуждение

При цитогенетическом исследовании установлено, что кариотип обследуемой соответствовал нормальному женскому — 46, XX. Ни численных, ни структурных хромосомных аномалий не обнаружено. Методом ПЦР у девочки была выявлена унаследованная от отца инверсия интрона 22 в гетерозиготном состоянии (рис. 1). Обнаружение гетерозиготного носительства инверсии позволило исключить наличие однородительской дисомии по хромосоме X. При нормальном кариотипе возникновение клинических проявлений у пациентки женского пола возможно при наличии либо второй мутации гена *F8*, возникшей *de novo* или унаследованной от матери, либо смещенной инактивации X-хромосомы.

Для поиска других мутаций гена *F8* методом прямого автоматического секвенирования по Сенгеру у пациентки проведен анализ нуклеотидной последовательности всех 26 экзонов гена. Выявлены три доброкачественных варианта в гетерозиготном состоянии: с. 1010-27G>A (rs7058826), с. 3780C>G (p. D1260E) (rs1800291) и с. 3864A>C (p. S1288=) (rs1800292) (рис. 2), встречающиеся среди здорового населения с частотой минорного аллеля 12,2, 19,3 и 13,9% соответственно. Аллели с. 1010-27A и с. 3780G унаследованы девочкой от матери. Ранее показано, что у мужчин доброкачественный вариант с. 3780G приводит к снижению активности FVIII на 6—11% [19, 20]. Незначительное влияние этого аллеля на концентрацию FVIII также было подтверждено с помощью функционального анализа [21]. Однако присутствие в гене *F8* только данной нуклеотидной замены у пробандов мужского пола не приводило к развитию гемофилии А. Таким образом, значительное снижение концентрации FVIII у анализируемой в настоящей работе девочки не может объясняться наличием в гене *F8* инверсии интрона 22 на одной X-хромосоме и доброкачественных вариантов с. 1010-27A и с. 3780G на второй хромосоме.

Так как у матери пробанда было выявлено снижение активности vWF (41%) и при первом обращении у ребенка активность этого фактора составляла 59%, необходимо также было исключить у больной девочки сочетание двух наследственных коагулопатий. Для этого у родителей девочки провели поиск мутаций гена *vWF* методом массового параллельного секвенирования. Патогенных и вероятно патогенных вариантов не обнаружено.

Для определения паттерна лайонизации хромосом X в геномной ДНК методом метилчувствительной QF-PCR у пациентки, ее матери и отца было проведено определение метилирования высокополиморфного повтора (CAG)_n в экзоне 1 гена андрогенового рецептора *AR* (рис. 3). Рядом с этим повтором находятся два сайта узнавания для метилчувствительного фермента

рестрикции *HpaII*, который может расщеплять нуклеотидную последовательность неметилированной, то есть активной X-хромосомы. Таким образом, после обработки ферментом ПЦР-продукт экзона 1 гена *AR* возможно получить только с инактивированной X-хромосомы.

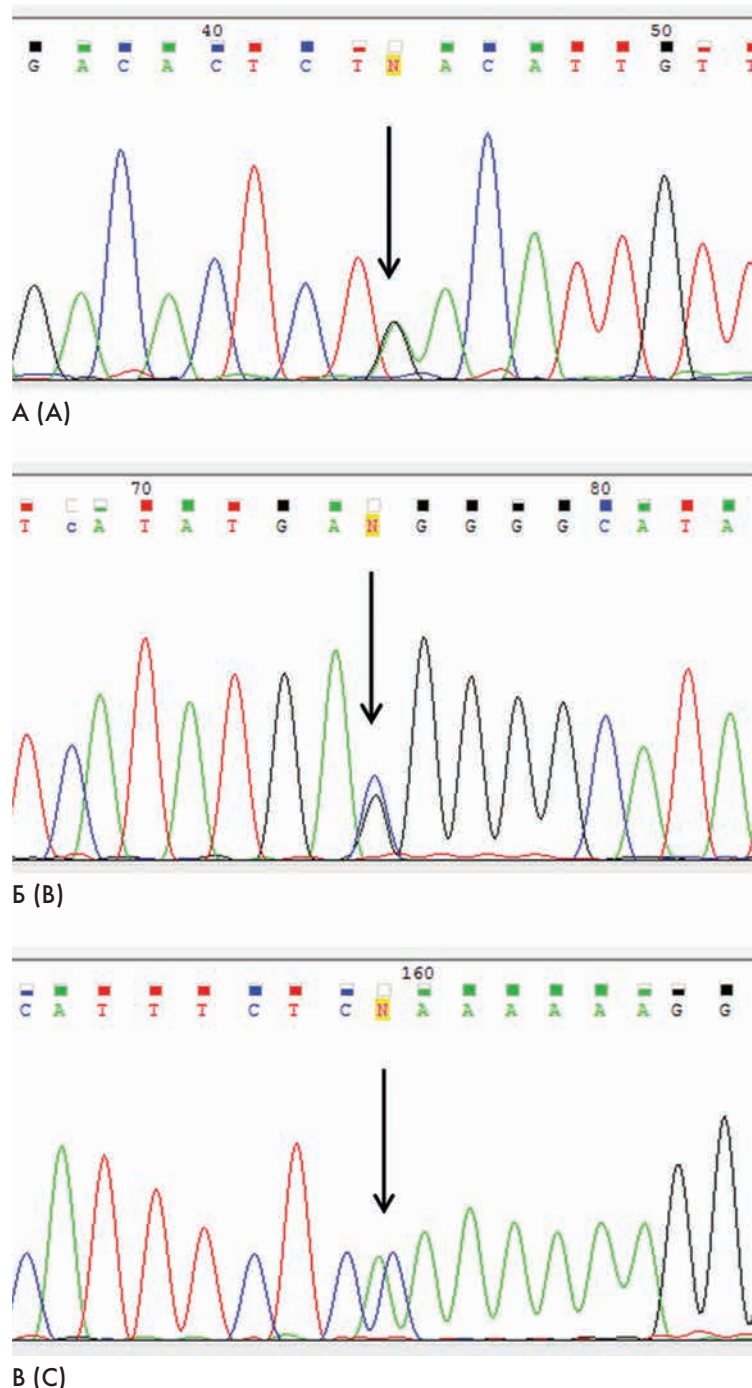


Рисунок 2. Фрагменты электрофореграмм экзонов 8 и 14 гена *F8* пробанда, содержащие доброкачественные варианты с. 1010-27G>A (А), с. 3780C>G (р. D1260E) (Б) и с. 3864A>C (р. S1288=) (В) в гетерозиготном состоянии.

Figure 2. Proband's *F8* gene exons 8 and 14 electrophoregrams that contain the benign variants c. 1010-27G>A (A), c. 3780C>G (p. D1260E) (B) and c. 3864A>C (p. S1288=) (C) in a heterozygous state.

У пациентки в лейкоцитах периферической крови, а также в клетках буккального эпителия наблюдалась экстремально смещенная лайонизация хромосом X — 95:5% и 85:15% соответственно. Согласно полученным результатам, наблюдаемый паттерн лайонизации характеризуется преобладанием клонов клеток с неактив-

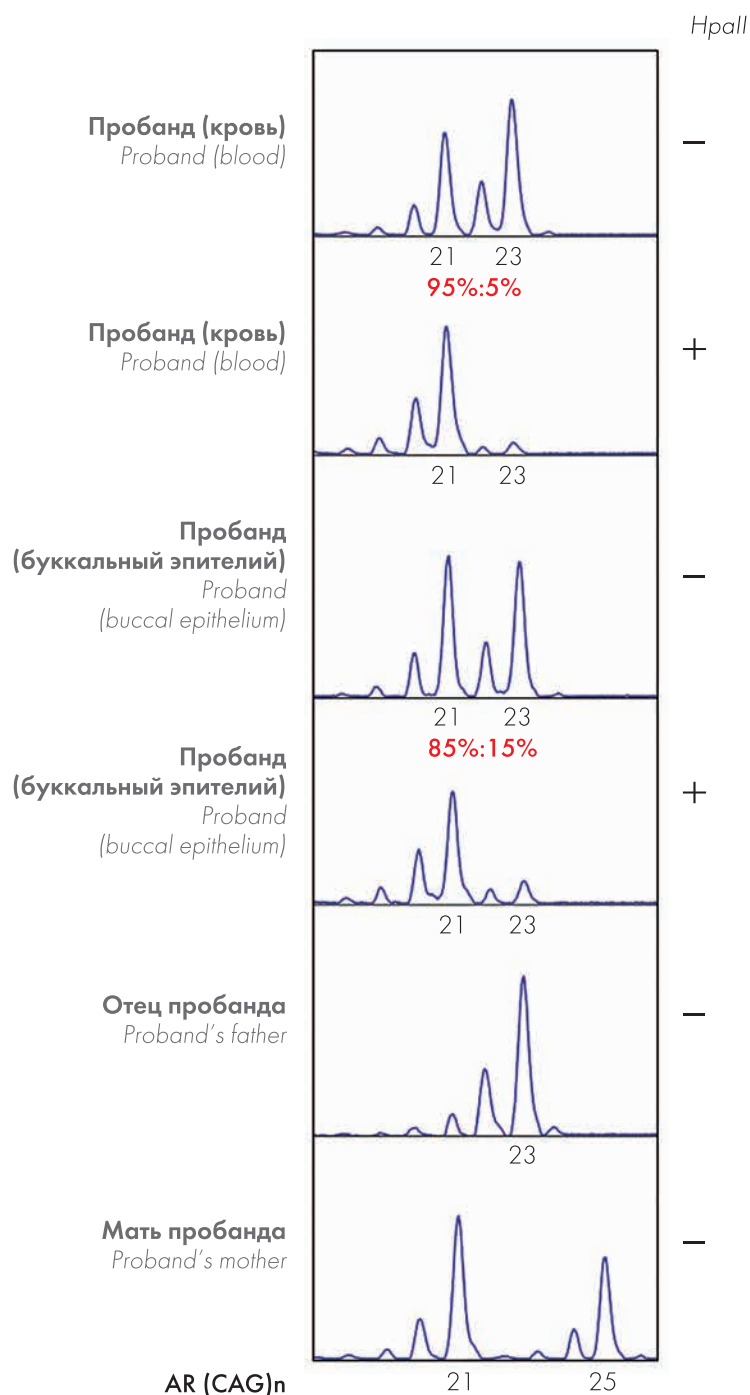


Рисунок 3. Аллели и паттерн метилирования X-сцепленного полиморфного повтора HUMARA — (CAG)_n в экзоне 1 гена *AR* до и после обработки метилчувствительным ферментом рестрикции *HpaII* у пробанда, матери и отца пробанда.

Figure 3. Alleles and methylation pattern of X-linked polymorphic repeat HUMARA — (CAG)_n in exon 1 of AR gene before and after processing with methyl-sensitive restriction enzyme *HpaII* in proband, her mother and father.

ной материнской хромосомой X (аллель 21 на рис. 3) и транскрипционно активной отцовской хромосомой, несущей дефектный ген *F8* (аллель 23 на рис. 3).

В литературе описаны три основных вероятных механизма, приводящих к смещению паттерна лайонизации. Первый механизм — это влияние в раннем эмбриогенезе, на стадии 8—16-клеточной бластоцисты, стохастических факторов на выбор того, какая из хромосом X инактивируется в конкретной клетке. Во-вторых, выбор, какая из хромосом X инактивируется, может зависеть от наличия дополнительной мутации в генах, регулирующих процесс лайонизации. Так, ранее были описаны семьи со сдвигом инактивации у женщин из нескольких поколений. У некоторых из них были найдены мутации в промоторной области гена *XIST*, кодирующего нетранслируемую РНК, участвующую в формировании гетерохроматина на цис-хромосоме X [22, 23]. Третий механизм заключается в сдвиге исходно равной лайонизации в течение следующих стадий эмбриогенеза или постнатально в результате отрицательного отбора клеток, несущих дополнительную мутацию гена на хромосоме X, значительно снижающую жизнеспособность клетки [24, 25].

Мутации, приводящие к нарушению процесса метилирования, могут находиться в генах как в цис-, так и в транс-положении, как на X-хромосоме, так и на аутосомах. К сожалению, далеко не все механизмы этого явления до конца ясны и не все гены, ответственные за него, известны.

Таким образом, описан клинический случай гемофилии А у девочки, обусловленный унаследованной от отца мутацией Inv22 гена *F8* и несбалансированной лайонизацией с преобладанием клона клеток с активной хромосомой X, несущей инверсию. Три доброкачественных варианта в гене *F8*, также выявленные у пациентки, не играют роли в проявлении клинической картины заболевания. Дать прогноз для будущего потомства матери пациентки весьма затруднительно, так как точная причина смещенного паттерна лайонизации X-хромосомы неизвестна. На сегодняшний день только рождение ребенка мужского пола может гарантировать данной семье здоровое потомство без гемофилии А. Для прогноза развития гемофилии у девочек в подобных семьях нужны дополнительные исследования механизмов возникновения смещенной лайонизации хромосомы X.

Информация об авторах

Бескоровая Татьяна Сергеевна (Beskorovainaya T. S.), кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, г. Москва, Россия, t-kovalevskaya@yandex.ru

Абрукова Анна Викторовна (Abrukova A. V.), кандидат медицинских наук, врач-генетик высшей категории, Бюджетное учреждение Чувашской Республики «Президентский перинатальный центр» Министер-

ства здравоохранения Чувашской Республики, 428018, Чувашская Республика, г. Чебоксары, Россия, metra2009@yandex.ru

Миронович Ольга Леонидовна (Mironovich O. L.), научный сотрудник лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, г. Москва, Россия, mironovich_333@mail.ru

Близнец Елена Александровна (Bliznets E. A.), кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, г. Москва, Россия, bliznetzelena@mail.ru

Миловидова Татьяна Борисовна (Milovidova T. B.), кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, г. Москва, Россия, tatiana_milovidova@mail.ru

Щагина Ольга Анатольевна (Shchagina O. A.), кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, г. Москва, Россия, schagina@dnalab.ru

Саваскина Екатерина Николаевна (Savaskina E. N.), врач-генетик высшей категории, Бюджетное учреждение Чувашской Республики «Президентский перинатальный центр» Министерства здравоохранения Чувашской Республики, 428018, Чувашская Республика, г. Чебоксары, Россия, metra2009@yandex.ru

Поляков Александр Владимирович (Polyakov A. V.), доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией ДНК-диагностики ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, г. Москва, Россия, polyakov@med-gen.ru

Литература

3. Европейский Консорциум гемофилии. Доступно в интернете по адресу: <http://www.ehc.eu/ru/геморрагические-заболевания/гемофилия/>
16. Бескоровая Т. С., Миловидова Т. Б., Щагина О. А., Поляков А. В. ДНК-диагностика гемофилии А с использованием новой медицинской технологии «Система детекции инверсии интрона 22 гена F8» в группе больных из Российской Федерации. Медицинская генетика 2016; 15:23—29.
17. Рыжкова О. П., Кардымон О. Л., Прохорчук Е. Б. и др. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS). Медицинская генетика 2017; 16:4—17.

Остальные источники см. в References.

References

1. Antonarakis S. E., Kazazian H. H., Tuddenham E. G. Molecular etiology of factor VIII deficiency in hemophilia A. Hum Mutat 1995; 5:1—22.
2. Mannucci P. M., Tuddenham E. G. The hemophilias — from royal genes to gene therapy. N Engl J Med 2001; 344:1773—1779. Review. Erratum in: N Engl J Med 2001; 345:384.
3. European Haemophilia Consortium. Available at: <http://www.ehc.eu/bleeding-disorders/haemophilia/> (in Russian).
4. Lakich D., Kazazian H. H. Jr, Antonarakis S. E. et al. Inversions disrupting the factor VIII gene are common cause of severe haemophilia A. Nat Genet 1993; 5:236—241.

5. Naylor J., Brinke A., Hassock S. et al. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum Mol Genet* 1993; 2:1773–1778.
6. David D., Morais S., Ventura C. et al. Female haemophilic homozygous for the factor VIII intron 22 inversion mutation, with transcriptional inactivation of one of the factor VIII alleles. *Haemophilia* 2003; 9:125–130.
7. Cai X. H., Wang X. F., Dai J. et al. Female hemophilia A heterozygous for a de novo frameshift and a novel missense mutation of factor VIII. *J Thromb Haemost* 2006; 4:1969–1974.
8. Williams V. K., Suppih R., Coppin B. et al. Investigation of inflicted injury in a young girl reveals mild haemophilia A and Turner's syndrome. *Int J Lab Hematol* 2012; 34:98–101.
9. Quan F., Janas J., Toth-Fejel S. et al. Uniparental disomy of the entire X chromosome in a female with duchen muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 1997; 60:160–165.
10. Renault N. K., Dyack S., Dobson M. J. et al. Heritable skewed X-chromosome inactivation leads to haemophilia A expression in heterozygous females. *Eur J Hum Genet* 2007; 15:628–637.
11. Di Michele D. M., Gibb C., Lefkowitz J. M. et al. Severe and moderate haemophilia A and B in US females. *Haemophilia* 2014; 20:e136–143.
12. Lyon M. F., Rastan S. Parental source of chromosome imprinting and its relevance for X chromosome inactivation. *Differentiation* 1984; 26:63–67.
13. Minks J., Robinson W. P., Brown C. J. A skewed view of X chromosome inactivation. *J Clin Invest* 2008; 118:20–23.
14. Bolduc V., Chagnon P., Provost S. et al. No evidence that skewing of X chromosome inactivation patterns is transmitted to offspring in humans. *J Clin Invest* 2008; 118:333–341.
15. Rossetti L. C., Radic C. P., Larripa I. B. et al. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. *Clin Chem* 2005; 51:1154–1158.
16. Beskorovainaya T. S., Milovidova T. B., Shchagina O. A., Polyakov A. V. DNA diagnostics in Russian hemophilia patients with new medical technology «Detection system for F8 intron 22 inversion». *Russian Journal of Medical Genetics (Meditsinskaya genetika)* 2016; 15:23–29 (in Russian).
17. Ryzhkova O. P., Kardymon O. L., Prokhorchuk E. B. et al. Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants. *Russian Journal of Medical Genetics (Meditsinskaya genetika)* 2017; 16:4–17 (in Russian).
18. Allen R. C., Zoghbi H. Y., Moseley A. B. et al. Methylation of Hpa II and Hha I sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992; 51:1229–1239.
19. Scanavini D., Legnani C., Lunghi B. et al. The factor VIII D1241E polymorphism is associated with decreased factor VIII activity and not with activated protein C resistance levels. *Thromb Haemost* 2005; 93:453–456.
20. Nossent A. Y., Eikenboom J. C., Vos H. L. et al. Haplotypes encoding the factor VIII 1241 Glu variation, factor VIII levels and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2006; 95:942–948.
21. Pahl S., Pavlova A., Driesen J. et al. Effect of F8 B domain gene variants on synthesis, secretion, activity and stability of factor VIII protein. *Thromb Haemost* 2014; 111:58–66.
22. Plenge R. M., Hendrich B. D., Schwartz C. et al. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. *Nat Genet* 1997; 17:353–356.
23. Pugacheva E. M., Tiwari V. K., Abdullaev Z. et al. Familial cases of point mutations in the XIST promoter reveal a correlation between CTCF binding and pre-emptive choices of X chromosome inactivation. *Hum Mol Genet* 2005; 14:953–965.
24. Plenge R. M., Stevenson R. A., Lubs H. A. et al. Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders. *Am J Hum Genet* 2002; 71:168–173.
25. Clerc P., Avner P. Random X-chromosome inactivation: skewing lesson for mice and men. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16:246–253.