

STRESZCZENIE

Uwarunkowany genetycznie niedobór bądź zaburzenie funkcji czynnika VIII (factor VIII, FVIII) prowadzi do skazy krwotocznej – hemofilii A (OMIM 306700). Hemofilia A (HA) dziedziczy się w sposób recesywny sprzężony z płcią i wykrywana jest u 1 na 5-10 tys. męskich noworodków, niezależnie od rasy czy grupy etnicznej. Badania epidemiologiczne przeprowadzone w Polsce w 2004 roku pozwoliły oszacować łączną częstość występowania hemofilii A i B na 1:5600 mężczyzn.

Chociaż badania nad hemofilią mają długą historię, sięgającą pierwszej połowy XIX wieku, to wiele pytań dotyczących diagnostyki, sposobu leczenia oraz monitorowania przebiegu choroby pozostaje bez wyczerpującej odpowiedzi. Co więcej, ze względu na dramatyczny przebieg kliniczny, wyrażający się samoistnymi krwawieniami do stawów i mięśni oraz ciężkimi krwotokami narządowymi, uwaga badaczy skupia się głównie na ciężkiej hemofilii, podczas gdy postaci umiarkowana i łagodna pozostają jakby w jej cieniu, będąc dużo rzadziej tematem badań naukowych. Jednym z ciekawych zjawisk obserwowanych w łagodnej i umiarkowanej hemofilii A jest występowanie istotnych różnic osoczowej aktywności czynnika VIII mierzoną metodą koagulacyjną jednostopniową w porównaniu do metody chromogennej. W większości laboratoriów hemostazy na świecie, nawet tych najbardziej uznanych, do pomiaru FVIII wykorzystuje się wyłącznie metodę koagulacyjną jednostopniową. Zastosowanie tylko jednej metody pomiarowej FVIII może jednak prowadzić do błędów diagnostycznych, ponieważ nie wiadomo, która z obu metod lepiej odzwierciedla fizjologiczną rolę czynnika VIII w hemostazie.

W Polsce, jak dotąd nie badano związku mutacji sprawczej w genie *F8* z wynikiem oznaczeń aktywności czynnika VIII obiema metodami, jak również nie poddawano analizie przebiegu klinicznego łagodnej i umiarkowanej hemofilii A.

Celami obecnej pracy są: a) analiza podłoża genetycznego umiarkowanej i łagodnej hemofilii A w grupie pacjentów znajdujących się w ogólnopolskim rejestrze wrodzonych skaz krwotocznych; b) analiza porównawcza związku mutacji sprawczej w genie *F8* z oznaczaniem aktywności czynnika VIII metodą koagulacyjną jednostopniową vs metodą chromogenną c) analiza związku aktywności czynnika VIII mierzoną metodą koagulacyjną jednostopniową vs chromogenną z generacją trombiny w badanej populacji chorych oraz odniesienie uzyskanych wyników do parametrów generacji trombiny u zdrowych osób grupy porównawczej z prawidłową aktywnością czynnika VIII w osoczu; d) ocena związku mutacji sprawczej hemofilii A z wybranymi parametrami klinicznymi opisującymi nasilenie skazy krwotocznej; e) celem dodatkowym jest zaproponowanie laboratoryjnego algorytmu rozpoznawania umiarkowanej i łagodnej hemofilii A.

Badanie przeprowadzono w grupie 60 pacjentów z 56 rodzin, w wieku 13 – 79 lat. Pacjenci zostali włączeni do badania na podstawie danych pochodzących z Ogólnopolskiego Rejestru Chorych na Hemofilię i Pokrewne Skazy Krwotoczne, prowadzonego w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii (IHIT) w Warszawie. Diagnostyka oraz klasyfikacja ciężkości hemofilii pacjentów znajdujących się w wyżej wymienionym rejestrze odbywa się na podstawie wyników pomiaru aktywności czynnika VIII wykonywanych metodą koagulacyjną jednostopniową. Wśród włączonych do badania znalazło się 17 (28,3%) chorych na umiarkowaną hemofilię A oraz 43 (71,7%) pacjentów z hemofilią łagodną.

Przeprowadzone badania obejmowały wykonanie testów przesiewowych hemostazy, oraz przeprowadzenie testów specjalistycznych, na które złożyło się oznaczenie: aktywności czynnika VIII metodami koagulacyjną jednostopniową (FVIII:C koag) i chromogenną (FVIII:C ch), zawartości antygeny czynnika VIII (FVIII:Ag), generacji trombiny (TGA), zawartości antygeny czynnika von Willebranda (VWF:Ag), aktywności czynnika von Willebranda jako kofaktora ristocetyny (VWF:RCo), zdolności wiązania czynnika von Willebranda z czynnikiem VIII (VWF:FVIII:B), aktywności czynników krzepnięcia IX, XI, oraz XII. W przypadku wykrycia obecności krążącego antykoagulantu w teście korekcji APTT (termin „test dodatni” oznacza brak korekcji), ilościowego pomiaru miana inhibitora czynnika VIII dokonywano metodą Bethesda w modyfikacji Nijmegen. Sprawdzone również obecność powszechnie występujących mutacji odpowiedzialnych za wrodzoną trombofilię (c.1691G>A genu czynnika V oraz c.20210G>A genu protrombiny). U wszystkich pacjentów objętych badaniem przeprowadzono analizę sekwencyjną genu kodującego czynnik VIII (*F8*). Dodatkowo, w uzasadnionych przypadkach tj. przy podejrzeniu obecności choroby von Willebranda typu 2N, przeprowadzono sekwencjonowanie eksonów 18-24 w genie czynnika von Willebranda (*VWF*).

W grupie 60 pacjentów z rozpoznaną umiarkowaną i łagodną hemofilią A na podstawie wykonanych przed laty (dane historyczne) pomiarów aktywności FVIII metodą koagulacyjną jednostopniową, analiza molekularna genu *F8* i eksonów 18-24 genu *VWF* pozwoliła na weryfikację rozpoznania w 9 przypadkach, w tym: a) identyfikację 5 mutacji sprawczych, w tym jednej dotychczas nieopisaną, odpowiedzialnych za występowanie ciężkiej postaci hemofilii A; b) identyfikację dwóch mutacji sprawczych odpowiedzialnych za występowanie typu 2N choroby von Willebranda; c) wykluczenie skazy krwotocznej u dwóch osób, u których nie wykryto mutacji sprawczej w *F8* i *VWF* i u których aktywność FVIII mierzona obydwoma metodami (koagulacyjną jednostopniową i chromogenną) mieściła w zakresie wartości referencyjnych.

W grupie 51 chorych z potwierdzoną wynikami oznaczeń FVIII:C chr i FVIII:C koag umiarkowaną i łagodną hemofilią A, będących członkami 48 rodzin, metodą sekwencjonowania DNA zidentyfikowano 31 różnych mutacji sprawczych, w tym pięć dotychczas nieopisanych. W 3

przypadkach przeprowadzona analiza sekwencyjna genu *F8* oraz eksonów 18-24 genu *VWF* nie pozwoliła zidentyfikować mutacji sprawczej, pomimo istotnego zmniejszenia osoczowej aktywności FVIII. Trzy mutacje sprawcze (p.Cys267Tyr, c.5219+3A>G, p.Arg1800His, p.Ser2082Asn), odpowiedzialne za występowanie umiarkowanej hemofilii A wiązały się ze skłonnością do występowania krwawień do stawów. Wykrycie tych mutacji niesie istotne konsekwencje kliniczne albowiem może wskazywać na zasadność zastosowania długoterminowej profilaktyki krwawień.

Wyniki obecnego badania wskazują na powszechne (49%) występowanie zjawiska rozbieżności wyników FVIII:C chr i FVIII:C koag w polskiej populacji chorych na umiarkowaną i łagodną hemofilię A. W obecnym badaniu zjawisko rozbieżności wyników aktywności czynnika VIII oznaczonej metodą koagulacyjną jednostopniową vs chromogenną było związane z 15 różnymi mutacjami. Dzięki obecnemu badaniu, zjawisko rozbieżności wyników FVIII:C chr i FVIII:C koag przypisano po raz pierwszy dziewięciu mutacjom, których do tej pory nie wiązano z tym zjawiskiem. Zastosowanie w obecnej pracy metody chromogennej obok koagulacyjnej jednostopniowej w pomiarze FVIII:C, doprowadziło do weryfikacji rozpoznania hemofilii A z łagodnej na umiarkowaną u 11 chorych oraz z umiarkowanej na ciężką u dwóch chorych.

Wyniki obecnej pracy wskazują na istnienie korelacji między maksymalnym stężeniem trombiny (Cmax) a aktywnością FVIII. Jednoczesny pomiar FVIII:C koag lub FVIII:C chr i Cmax trombiny pozwala na odróżnienie chorych na łagodną hemofilię A od zdrowych osób. Test generacji trombiny wydaje się być użytecznym narzędziem laboratoryjnym, znajdującym zastosowanie w procesie diagnostycznym umiarkowanej i łagodnej hemofilii A. Szczególnie w przypadku aktywności FVIII:C oscylującej wokół 50 IU/dl, wynik Cmax trombiny może pomóc w podjęciu decyzji o potwierdzeniu bądź wykluczeniu łagodnej hemofilii A.

Wyniki obecnego badania pozwoliły na opracowanie laboratoryjnego algorytmu rozpoznawania umiarkowanej i łagodnej hemofilii A. Wprowadzenie oznaczenia aktywności FVIII dwiema metodami – koagulacyjną jednostopniową i chromogenną oraz analiza molekularna, umożliwiająca poznanie mutacji sprawczej w *F8* wpłyną na poprawę wykrywalności oraz precyzyjniejsze przewidywanie przebiegu klinicznego łagodnej i umiarkowanej hemofilii A.