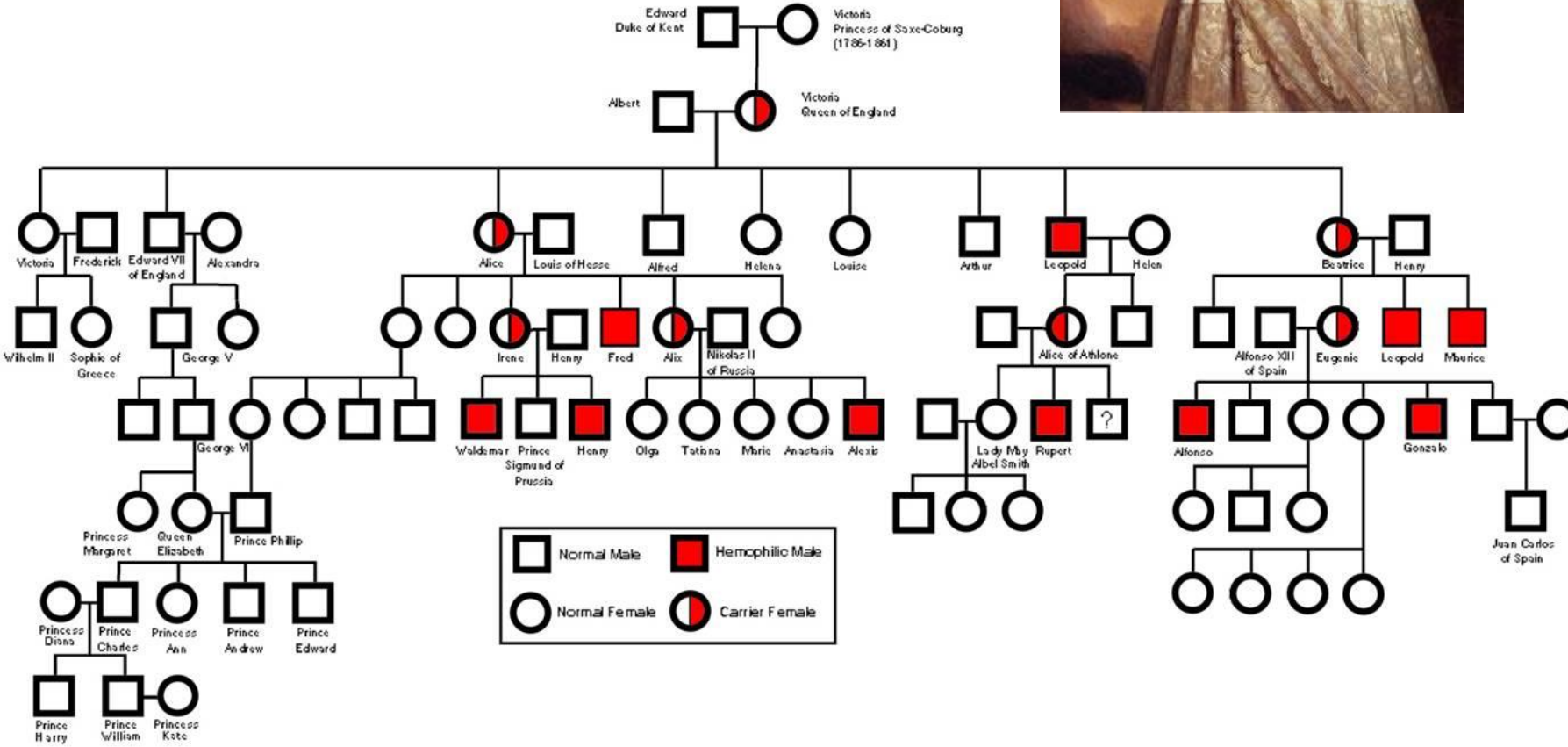


Molekulární diagnostika hemofílie typu A

Iveta Valášková







[Czar Nicholas II](#) of Russia and his family, photographed c. 1916, showing his wife Alexandra (who was a carrier of hemophilia), his four daughters, and (in the foreground) his son Alexis, perhaps the most famous European royal with hemophilia.



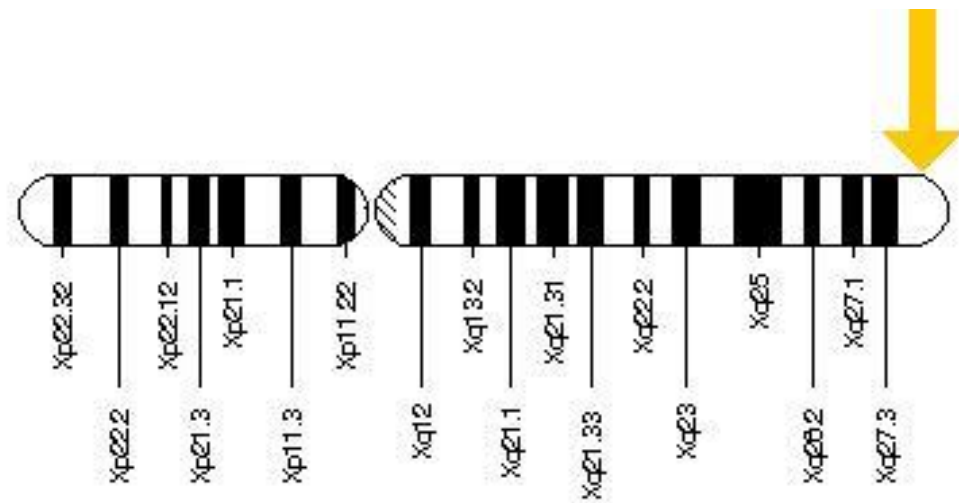
Nejproslulejší hemofilik - ruský carevič Nikolaj

Hemofílie typu A

X – vázaná choroba (Xq28)

Incidence 1/5 – 10 000 narodených chlapců

Porucha tvorby a funkce faktoru VIII



Hemofílie typu A

dělení dle tíže defektu FVIII nebo FIX
(normální hladina FVIII i FIX = 50-150%)

těžká (<1%)

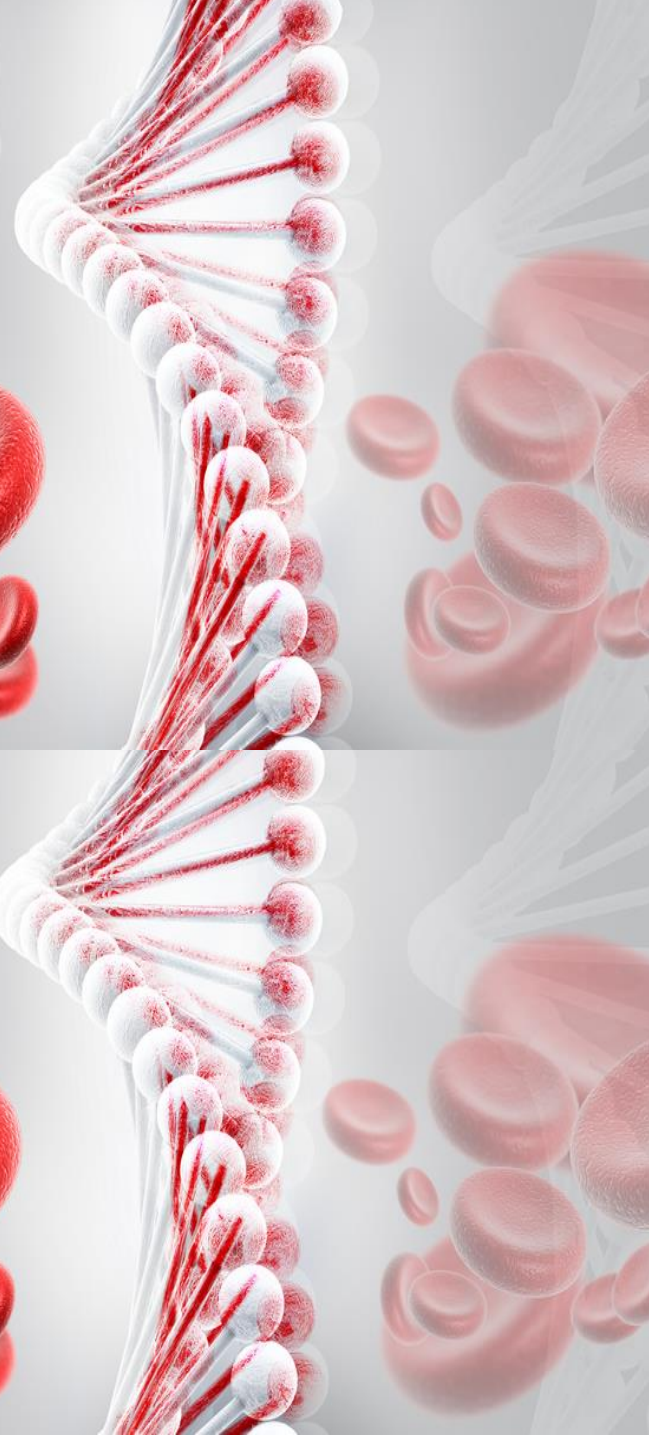
spontánní krvácivé projevy
do kloubů více než 1x měsíčně
do svalů zhruba 2 x ročně

středně těžká (1-5%)

krvácení do kloubů a svalů i po malých úrazech

lehká (5-40%)

krvácení při chirurgickém či stomatologickém
zákroku,
po úrazech

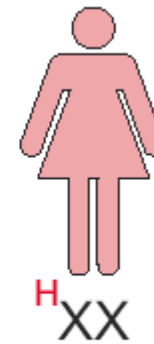


Hemofílie typu A

X- recesivní dědičnost

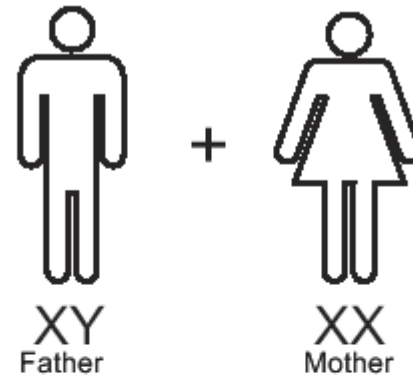


Man with
hemophilia

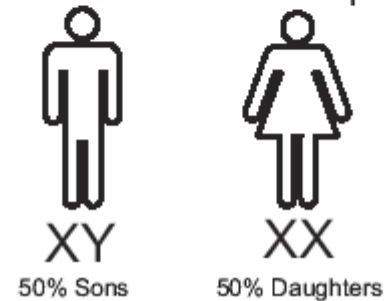


Women carrier
of hemophilia

Hemofílie typu A

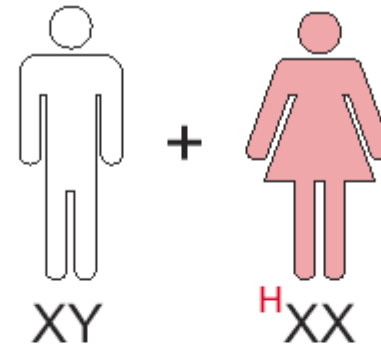


Possible outcomes for each pregnancy



Hemofílie typu A

X- recesivní dědičnost



Father unaffected
by hemophilia

Mother carrier
of hemophilia

Possible outcomes for each pregnancy



XY

25%
Son without
Hemophilia



XX

25%
Daughter not
a Carrier



HXY

25%
Son with
Hemophilia



HXX

25%
Daughter Carrier
of hemophilia

Hemofílie typu A



^HXY
Father with
hemophilia

+



XX
Mother unaffected
by hemophilia

Possible outcomes for each pregnancy

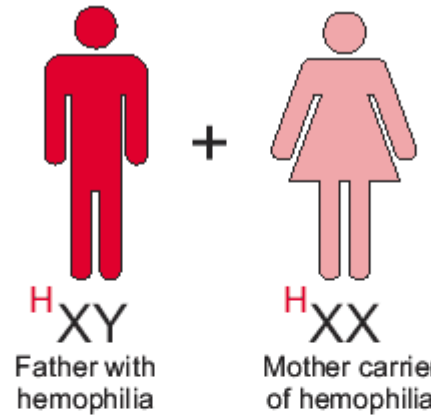


XY
No Sons
will have
Hemophilia

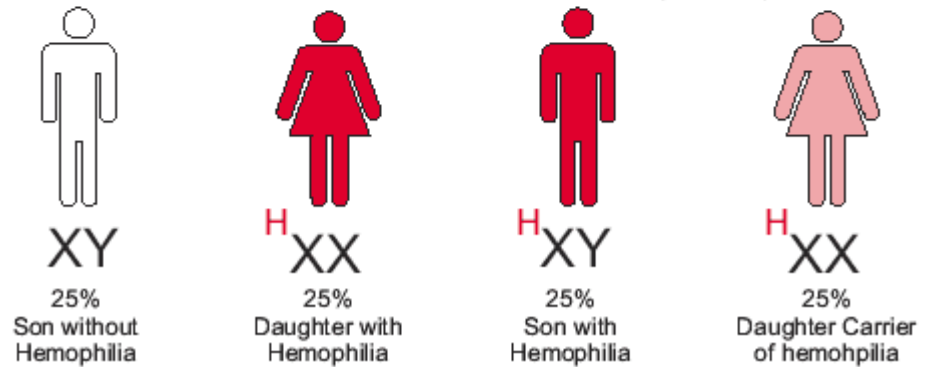


^HXX
All Daughters
will be
Carriers

Hemofílie typu A



Possible outcomes for each pregnancy



Hemofílie typu A

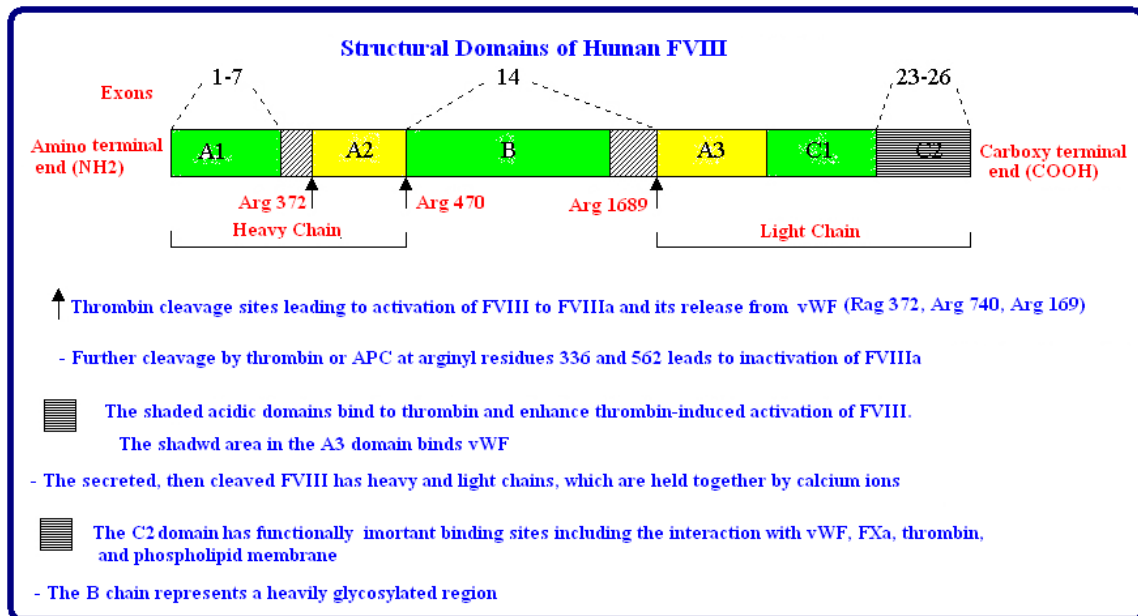
Faktor VIII

Multidoménový glykoprotein

Těžký a lehký řetězec

Aktivace trombinem

2332 aa



Hemofílie typu A

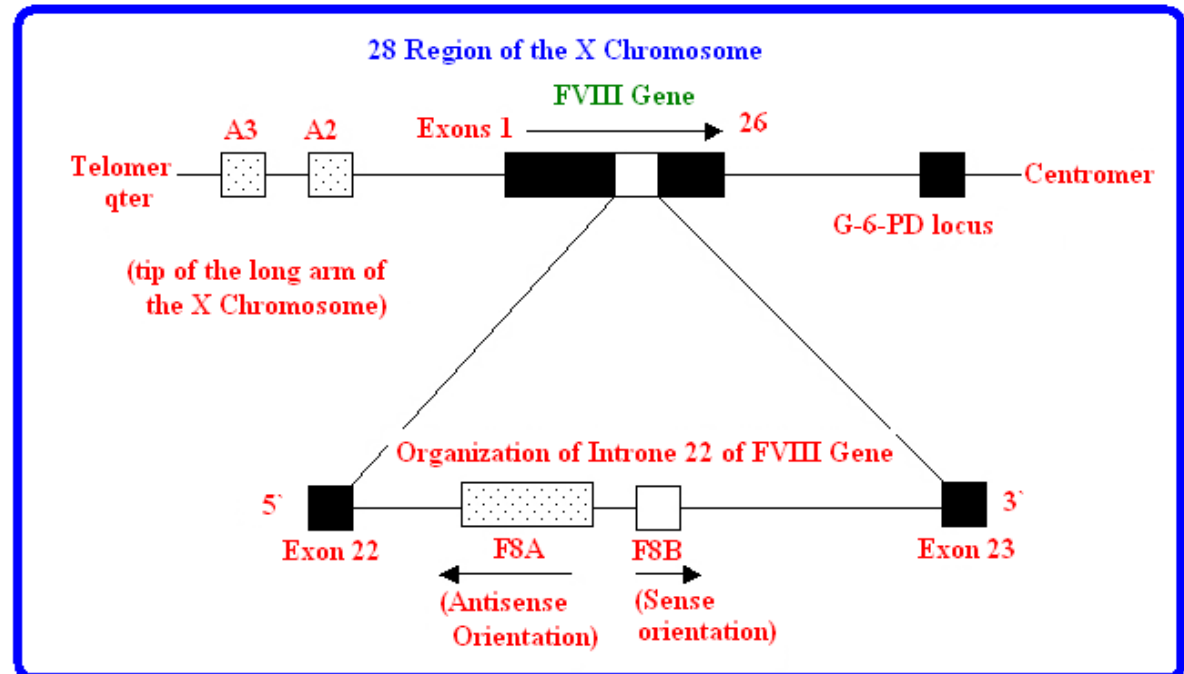
Gen pro Faktor VIII

2332 aa

186 kb

26 exonů (9kb)

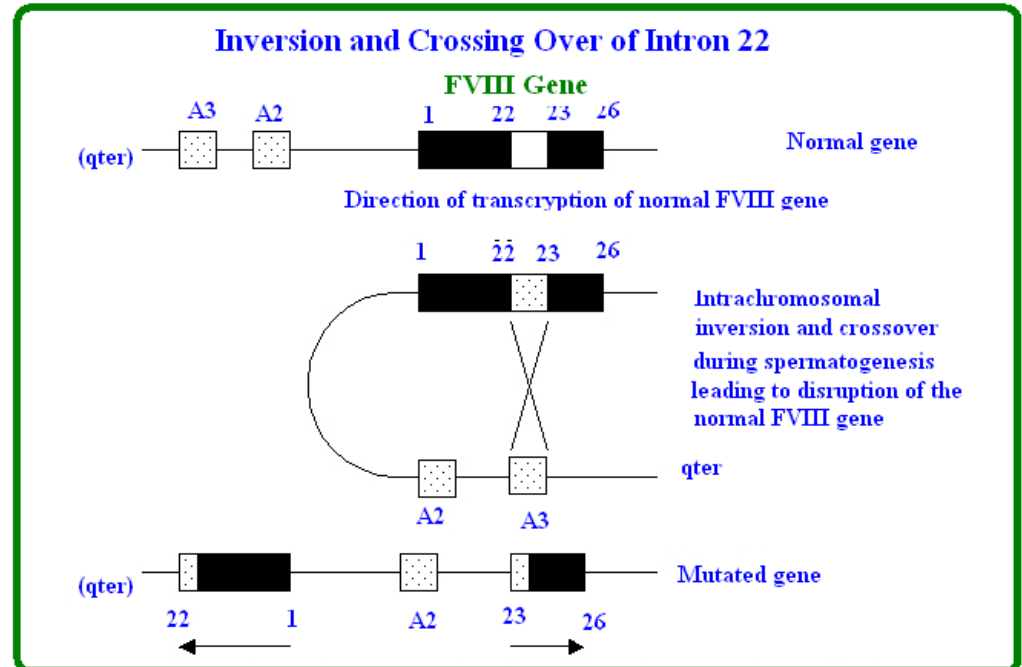
Mutace: inverze, inserce, substituce, delece



Hemofílie typu A

Gen pro Faktor VIII

45% pacientů – inverze v intronu 22



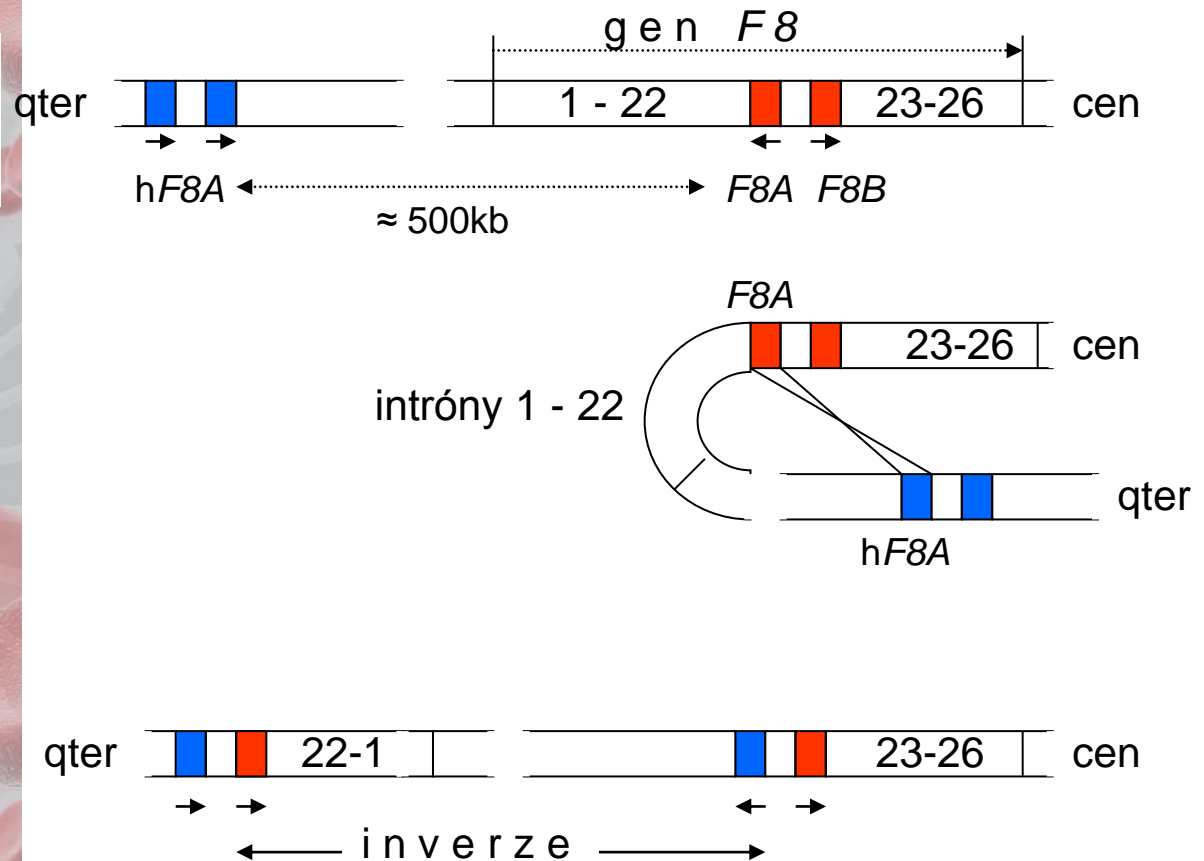
Hemofílie typu A

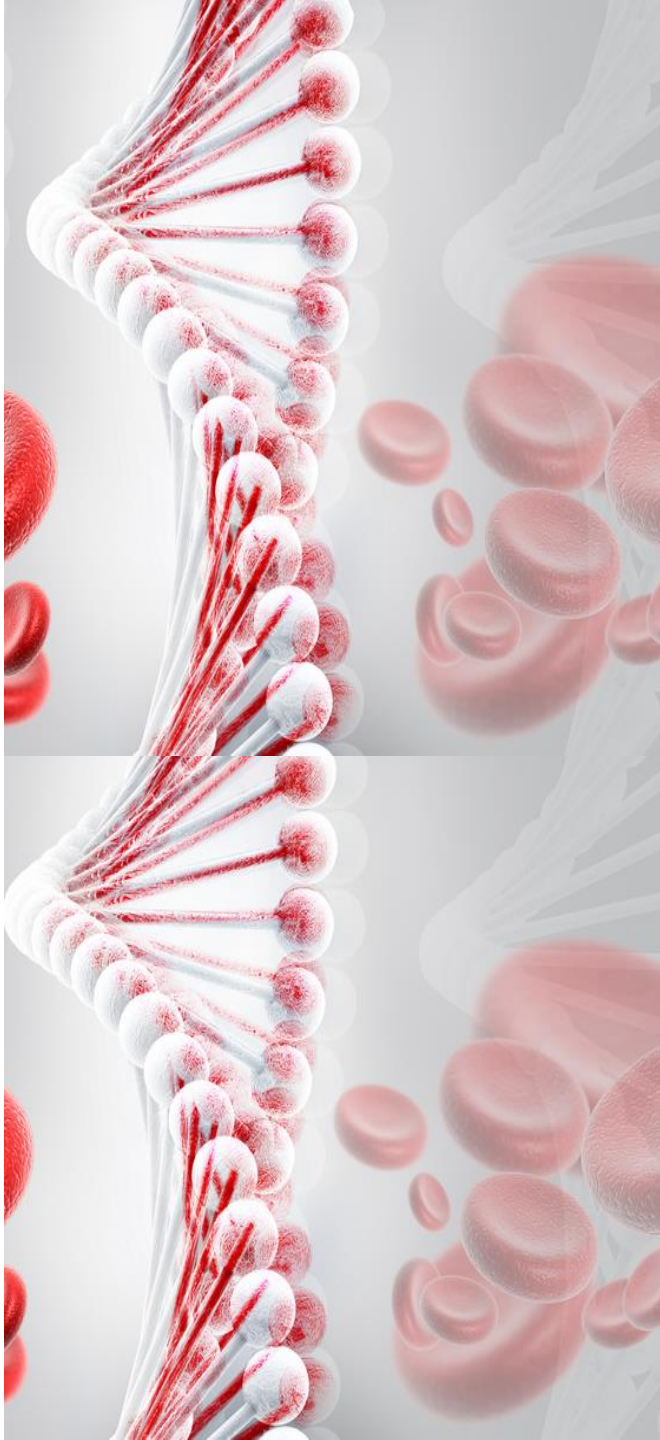
Gen pro Faktor VIII

v intronu 22 jsou sekvence *F8A* a *F8B*; 500kb před genem je homologní *F8A* (*hF8A*)

interchromatidová rekombinace mezi *F8A* a *hF8A*

inverze části *F8* genu





Hemofílie typu A

Molekulární diagnostika

Metody:

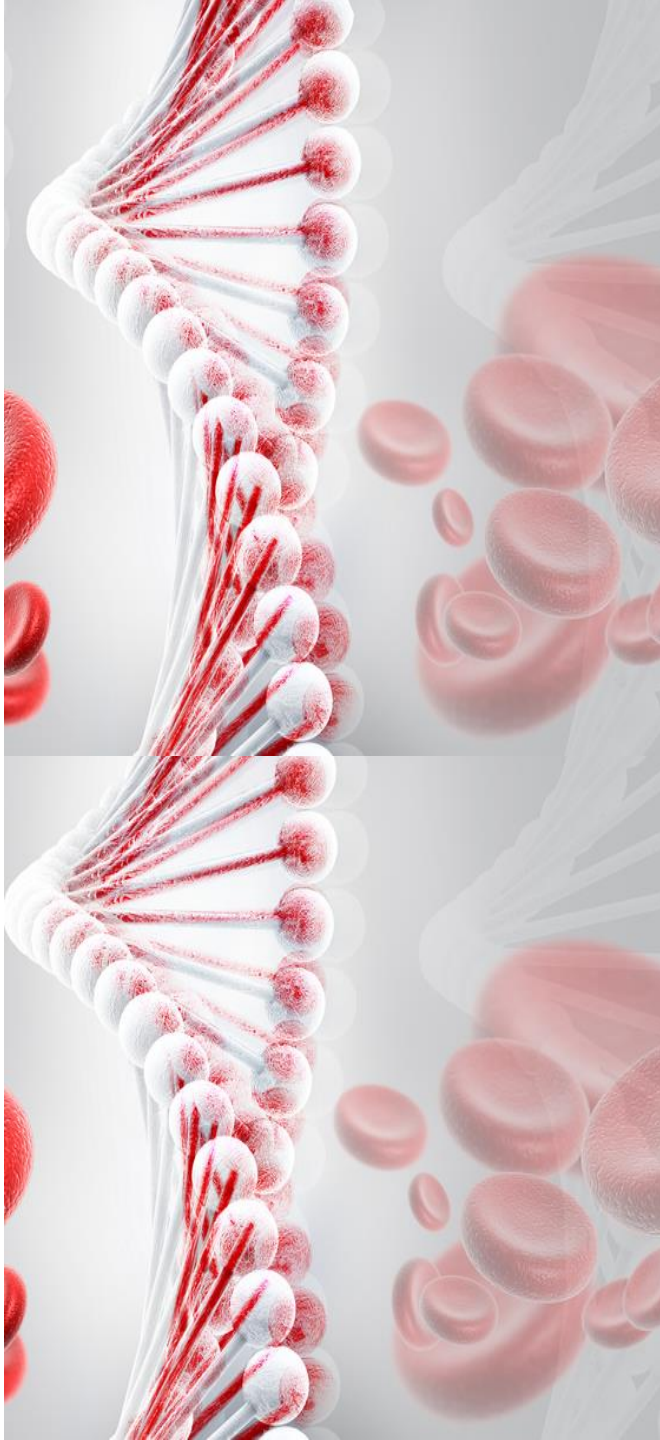
Nepřímá diagnostika

IS-PCR

MLPA

Sekvenování

NGS

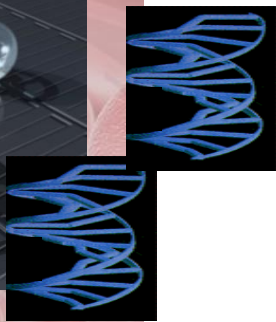


Hemofílie typu A

Nepřímá diagnostika

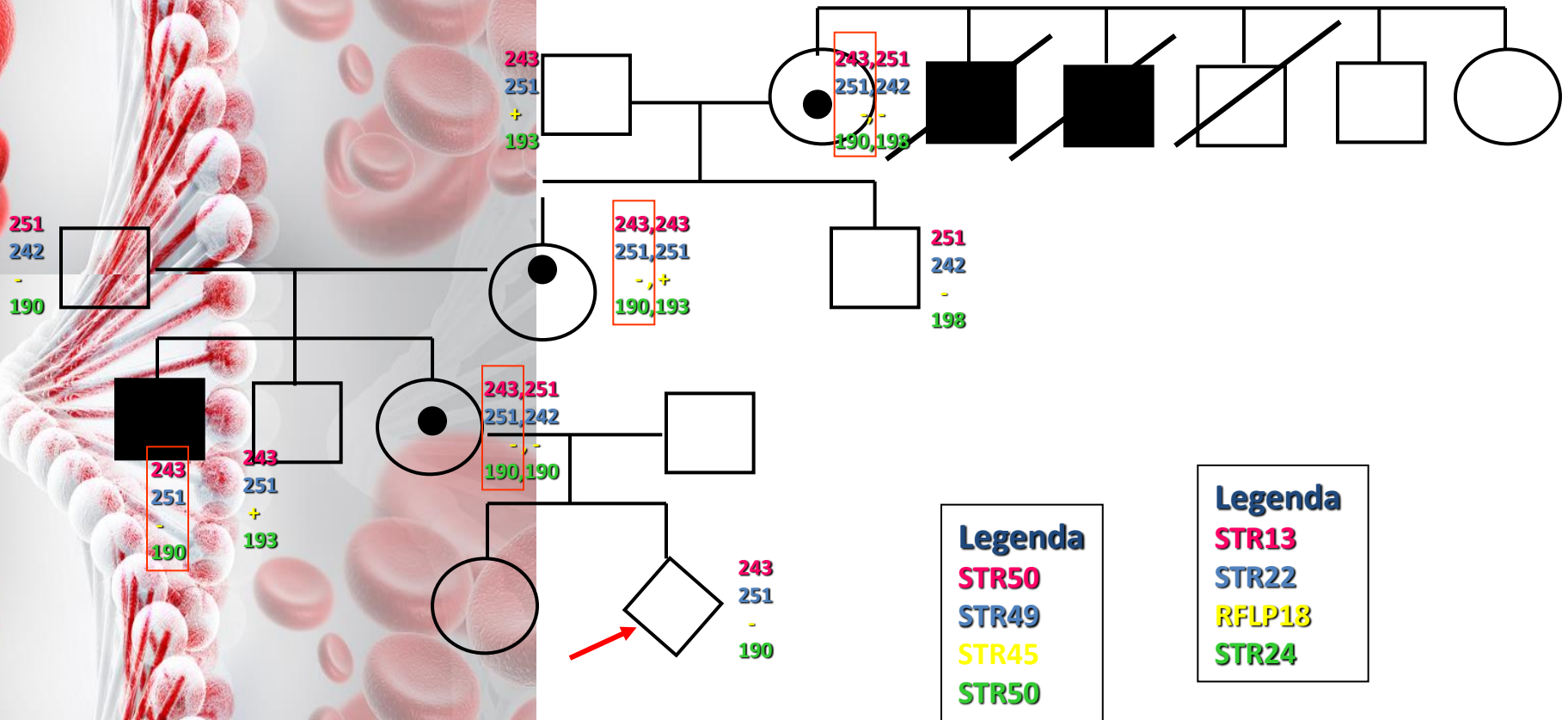
Hemofilie typu A

Nepřímá diagnostika



Hemofílie typu A

Nepřímá diagnostika



Legenda
STR13
STR22
RFLP18
STR45
STR24

Legenda
STR50
STR49
STR45
STR50

■ neznámá mutace

□ haplotyp v asociaci s neznámou mutací



Hemofílie typu A

Inverzní PCR IS-PCR (Inverse Shifting PCR)

Detekce inverze v intronu 1,22

Hemofílie typu A

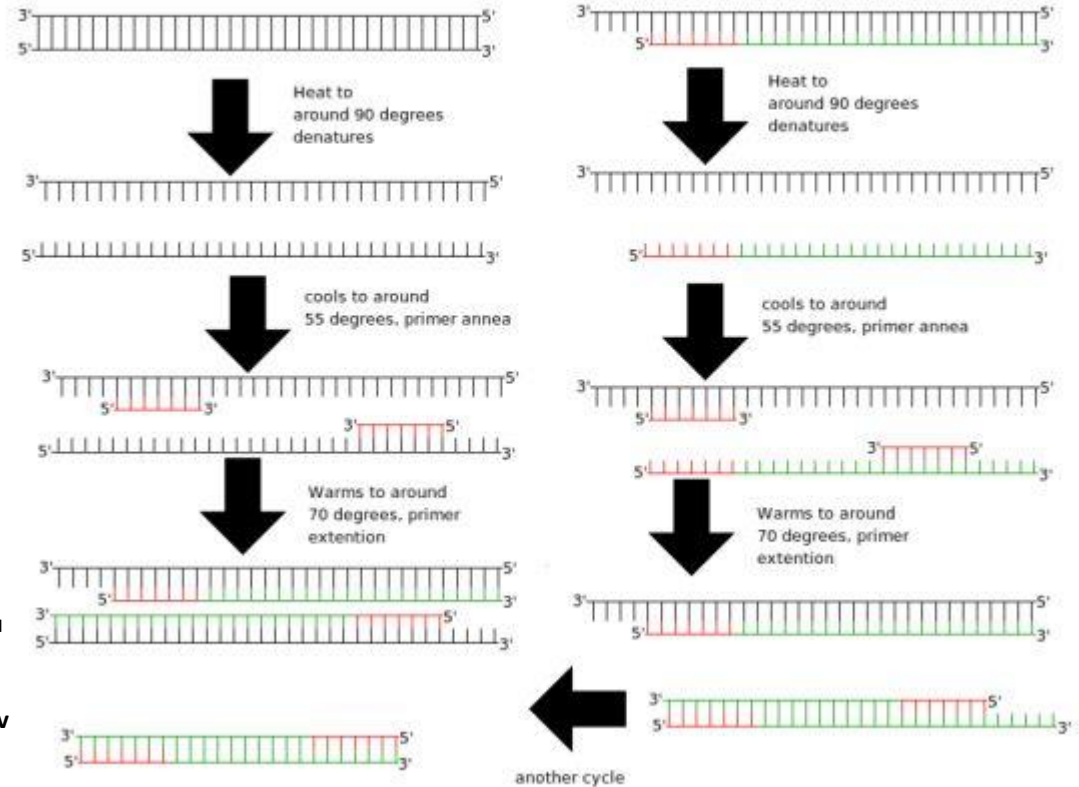
IS-PCR

Metoda IS – PCR vychází z původní metody I – PCR.

I - PCR
(Inverse Polymerase Chain Reaction)

- rychlá metoda umožňující in vitro amplifikaci DNA sekvencí, které se nacházejí kolem oblasti se známou sekvencí (Ochman *et al.*, 1988)
- využívá principy klasické PCR s tím rozdílem, že použité primery nejsou orientovány „dovnitř“ jak tomu běžně bývá, ale naopak „ven“ ze známé sekvence
- templátem těchto reverzních primerů jsou restriční fragmenty, které byly znovu ligovány aby tak utvořili kružnice

Polymerase Chain Reaction: PCR



Typická PCR amplifikace využívá oligonukleotidové primery, které hybridizují k protilehlým řetězcům. Primery pak bývají orientovány tak, aby směr jejich prodlužování mířil dovnitř, kde se mezi oběma primery nachází požadovaná sekvence.

Jelikož je pak produkt jednoho primeru zároveň templátem pro primer opačný, následuje po opakování cyklů denaturace, nasedání primerů a jejich prodlužování exponenciální namnožení kopií oblasti ohraničené těmito primery. Při takto sestavené PCR jsou však oblasti za těmito primery v podstatě nedostupné, jelikož se množí pouze lineárně.

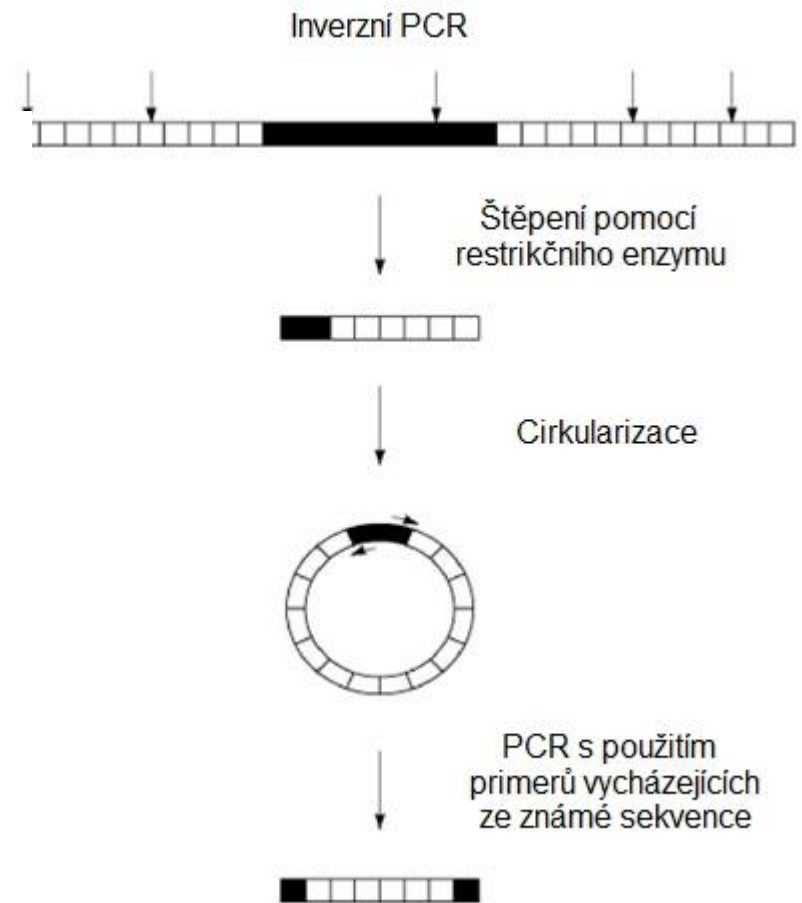
Hemofílie typu A

IS-PCR

Metoda IS – PCR vychází z původní metody I – PCR.

I-PCR však umožňuje namnožení sousedících oblastí, a to v obou směrech od známé sekvence. Důležitý je výběr restriktivního enzymu tak, aby vznikaly fragmenty požadované délky, které zároveň nebudou mít restriktivní místo ve známé části sekvence, kam nasedají navržené primery.

Tato metoda byla poprvé použita v roce 1988 pro určení místa začlenění inzerční sekvence v bakterii *E. coli* (a od té doby našla mnoho využití.)

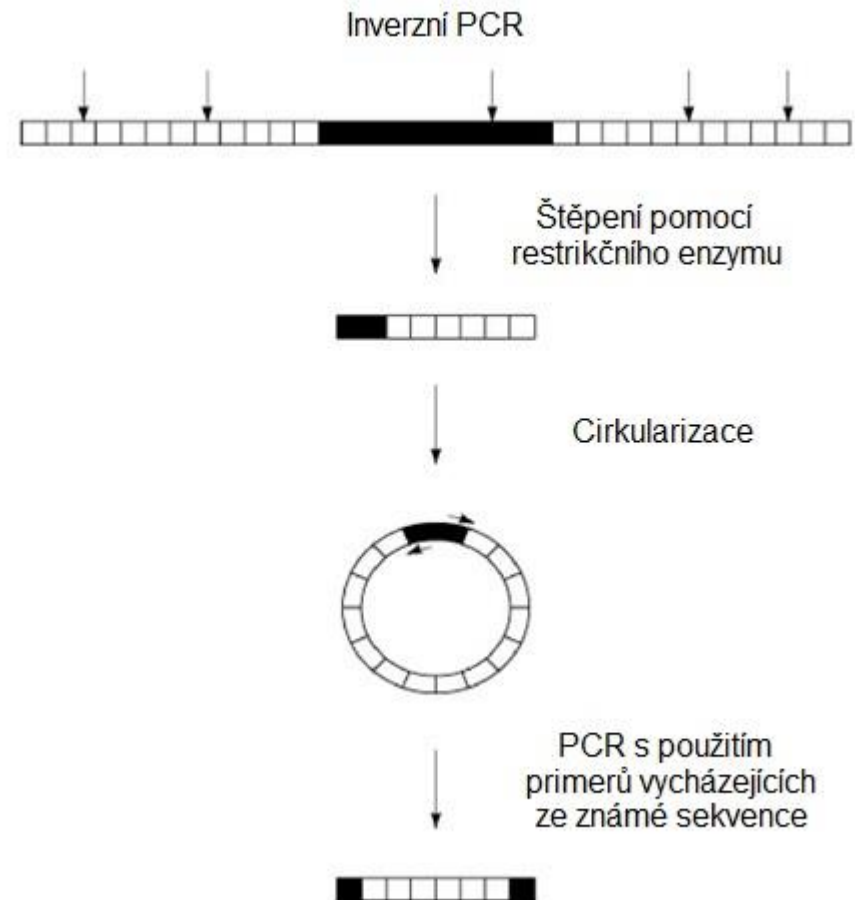


Hemofílie typu A

IS-PCR

Metoda IS – PCR vychází z původní metody I – PCR.

- úsek DNA, na kterém je černě vyznačená známá sekvence
- tato DNA je štěpena restriktivním enzymem (*místa štěpení jsou označena šipkami*) tak, že jeden z fragmentů obsahuje část známé sekvence a dále sekvenci zájmu.
- následně probíhá ligace za takových podmínek, abychom docílili vzniku spojených kružnicových molekul.
- dalším krokem je provedení PCR, kde primery nasedají na zn a jsou orientovány „od sebe“, jak je naznačeno šipkami.
- vzniklé produkty pak tedy obsahují neznámou sekvenci ohra na rozdíl od původní situace, kde byla známá sekvence obklo sekvencí neznámou.



Hemofílie typu A

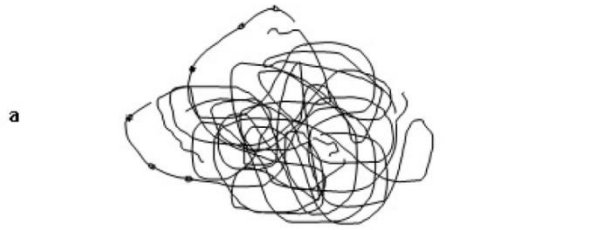
IS-PCR

vychází ze stejné metodiky s tím, že v posledním kroku je namísto klasické PCR použita multiplexní PCR se sadou několika primerů, přičemž využití jednotlivých primerů a následně také délka jednotlivých fragmentů je závislá na tom, zda proběhla ve zkoumané DNA inverze.

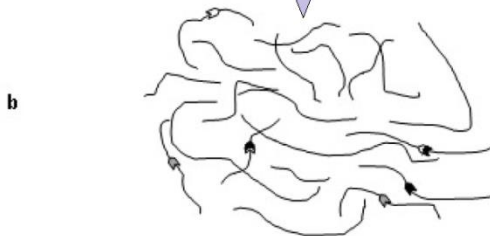
- v případě inverze v intronu 22 budou mít
 - fragmenty bez inverze délku 487 bp
 - fragmenty s inverzí délku 385 bp nebo 333 bp podle typu inverze.
- v případě inverze v intronu 1 budou mít
 - fragmenty bez inverze délku 304 bp
 - fragmenty s inverzi délku 224 bp.

Hemofílie typu A

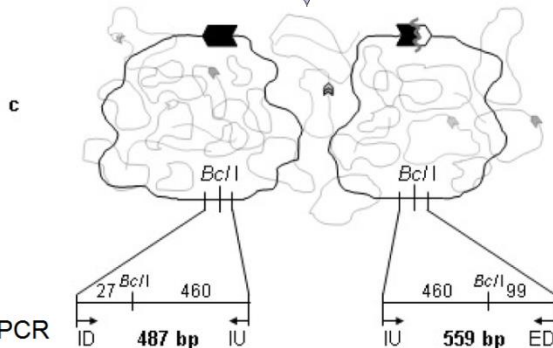
IS-PCR



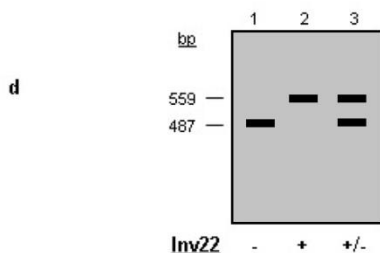
restrikce pomocí *Bcl*I



cirkularizace fragmentů



analýza PAGE



- a. reprezentuje celogenomovou DNA,
b. která je rozštěpena pomocí restriktázy *Bcl*I na kratší fragmenty.

- c. tyto fragmenty se pak za účasti DNA T4 ligázy vážou ke svým vlastním koncům a jsou cirkularizovány.

vzniklé kružnice jsou pak použity jako templaty pro multiplex PCR.

výsledné fragmenty, které se liší délkou podle využití primerů, jsou pak rozděleny elektroforézou.

- d. na gelu je pak možné zjistit jejich délku.

-v **případě diagnostiky inverze 22,**

fragmenty bez inverze délka 487 bp, po využití primerů IU a ID (sloupec 1),

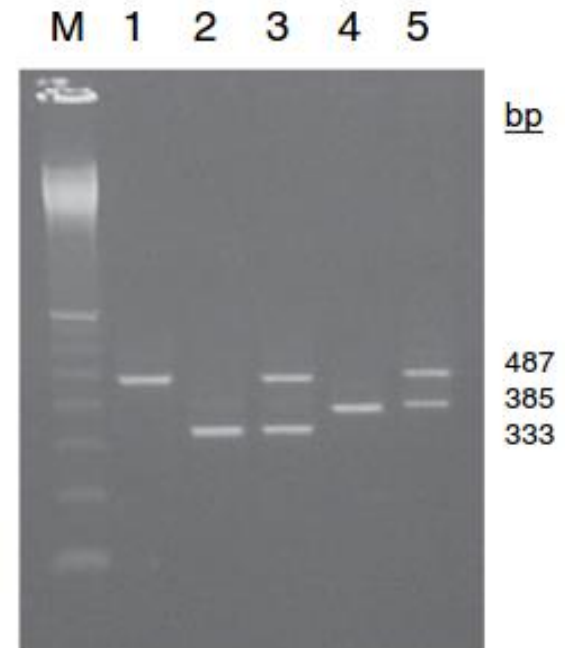
fragmenty s inverzí délka 559 bp, díky využití primerů IU a ED (sloupec 2).

heterozygotní sestava u ženy přenašečky přítomny oba typy fragmentů (sloupec 3).

Hemofílie typu A

IS-PCR

- 1) štěpení pomocí *BclI*
- 2) ligace T4DNA ligázou
- 3) IS PCR za účasti 4 typů primerů
- 4) PAGE
- 5) vyhodnocení
 - 1) Zdravý jedinec
 - 2) Inv22 typ I
 - 3) Přenašečka inv 22 typ I
 - 4) Inv 22 typ II
 - 5) Přenašečka inv 22 typ II



Hemofílie typu A

MLPA

(multiplex ligation-dependent probe amplification)

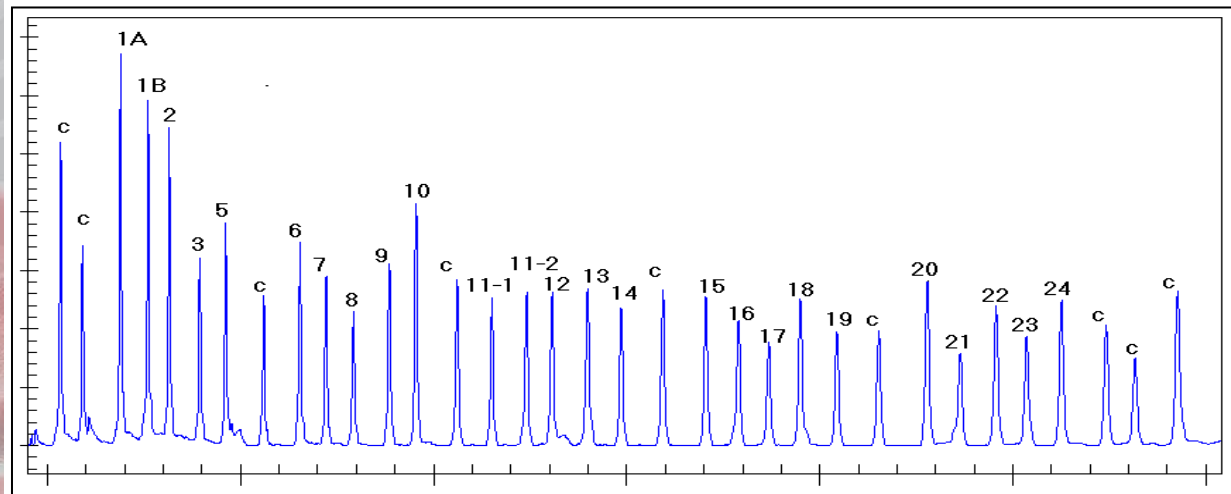
Umožňuje hodnocení duplikací a delecí jednotlivých exonů



Hemofílie typu A

MLPA

Porovnání relativního množství produktu vůči kontrole



Hemofílie typu A

Sekvenování

Sekvenování všech 26 exonů + promotorové sekvence

Celkem 37 ampliconů

Porovnávání výsledků s databází



Hemofílie typu A

Sekvenování





Hemofílie typu A

Sekvenování nové generace
(„next-generation sequencing“, NGS)

Příprava knihovny

MASTR

(Multiplex Amplification of Specific Targets for Resequencing)

The image features a vertical illustration on the left side of the page. It depicts a human spine with a series of vertebrae and intervertebral discs, rendered in a semi-transparent, light blue and white style. To the right of the spine, there are several red blood cells, shown as biconcave discs in various shades of red and pink, some appearing to float or move. The overall background is a light, neutral tone.

Hemofílie typu A

Léčba

Přibližně 400 000 lidí na světě trpí hemofilií.
V Česku se jedná o zhruba 1 000 osob.

Základem léčby hemofílie je injekční aplikace koncentráту srážecího faktoru.
jenže 15–20 % z nich si proti nim časem vytvoří protilátky.
Proto je třeba vyvíjet stále nová léčiva.

S myšlenkou preventivního dodávání srážecích faktorů
už od raného dětství přišli jako první švédští lékaři před více než 40 lety.
Cílem zde není léčba, ale předcházení krvácení, a proto je léčba podávána i tehdy,
když pacient fyzicky nekrváčí.

Takové preventivní podávání srážecích faktorů může mít pro hemofilika velký význam.

Plazmatické srážecí faktory

- z plazmy dárců (z plazmy derivovaný (pdFVIII, pdFIX)
- poprvé použity v roce 1965

Rekombinantní faktory

- metodou genového inženýrství (rekombinantní deriváty, rFVIII, rFIX).
- poprvé použity v roce 1989
- v průběhu výrobního procesu se v podstatě nesetkají s lidskou bílkovinou (platí zejména pro preparáty tzv. „třetí a vyšší generace“).

Oba typy preparátů mají v léčbě hemofílie srovnatelnou účinnost.
Rozdíl mezi plazmatickými a rekombinantními přípravky tedy není v účinku při léčbě,
ale ve způsobu jejich výroby a ve vlastnostech s tím souvisejících

The image features a vertical illustration of a human spine on the left side, with red blood cells scattered around it. The spine is shown in a light, almost translucent style, with the vertebrae and intervertebral discs clearly visible. The red blood cells are depicted as various shades of red and pink, some appearing as simple discs and others as more complex, textured spheres. The overall background is a light, neutral color, creating a clean and medical aesthetic.

Hemofílie typu A

Léčba

Přibližně 400 000 lidí na světě trpí hemofilií.
V Česku se jedná o zhruba 1 000 osob.

Základem léčby hemofílie je injekční aplikace koncentráту srážecího faktoru.
jenže 15–20 % z nich si proti nim časem vytvoří protilátky.
Proto je třeba vyvíjet stále nová léčiva.

S myšlenkou preventivního dodávání srážecích faktorů
už od raného dětství přišli jako první švédští lékaři před více než 40 lety.
Cílem zde není léčba, ale předcházení krvácení, a proto je léčba podávána i tehdy,
když pacient fyzicky nekrváčí.

Takové preventivní podávání srážecích faktorů může mít pro hemofilika velký význam.

Plazmatické srážecí faktory

- z plazmy dárců (z plazmy derivovaný (pdFVIII, pdFIX)
- poprvé použity v roce 1965

Rekombinantní faktory

- Rekombinanty zaručují, že nejsou infikovány žádným z dosud známých virů.
- V sedmdesátých a osmdesátých letech 20. století postihla hemofilickou populaci, zejména v USA a západní Evropě, nákaza virem HIV, jímž byly v době neznalosti viru tehdejší krevní deriváty často kontaminovány. U nás, protože se užívaly téměř výhradně zdroje plazmy z tuzemských odběrů, se nakazilo jen 17 hemofiliků.
Jiné je to s přenosem hepatitidy, zejména hepatitidy typu C. Případy nákazou prostřednictvím aplikace léčebných derivátů, se vyskytly.

The image features a vertical illustration of a human spine on the left side, with red blood cells scattered around it. The spine is shown in a light, almost translucent style, with the vertebrae and intervertebral discs clearly visible. The red blood cells are depicted as various shades of red and pink, some appearing as simple discs and others as more complex, textured spheres. The overall background is a light, neutral color, providing a clean and professional look for the medical information presented.

Hemofílie

Léčba

Profylaktická léčba hemofílie

Primární profylaxe

Dlouhodobá pravidelná profylaktická léčba u středně těžkých a těžkých forem hemofílie

U středně těžkých a těžkých forem hemofílie se v rámci léčby často přistupuje k preventivnímu podávání srážecích faktorů i v době, kdy nejsou patrné žádné známky krvácení

Důvodem je:

- snaha eliminovat jakékoli spontánní krvácení do kloubů,
- odvrátit vážné a nevratné poškození pohybového aparátu,
- zabránit i do budoucna kloubním změnám a tím i jejich deformitám a nepohyblivosti.

Profylaktická léčba je v ČR nabízena všem dětem s těžkými projevy hemofílie.

Většinou se jedná o děti s hladinou FVIII pod 1 %, ale někdy mohou častými krváceními trpět i děti s hladinou vyšší. Rozhodující je projev – „fenotyp“, nikoli hladina faktoru daná genetickým postižením, „genotypem“ onemocnění.

Podle údajů z registru Českého národního hemofilického programu dostává profylaktickou léčbu zhruba třetina všech dětských hemofiliků v ČR.

Dávky srážecího faktoru se většinou aplikují 2× až 3× týdně.

Dlouhodobá pravidelná profylaktická léčba se u těžkých hemofiliků v současnosti zahajuje ihned po prvním závažném krvácení a neměla by být zahájena později než ve 2 letech, tedy ještě dříve, než může dojít k vážnějšímu poškození kloubů.

Profylaxe sekundární

Dočasná k pokrytí rizikových období u méně vážných forem hemofílie

U méně vážných forem hemofílie může preventivní léčba trvat v řádu týdnů nebo měsíců.

Zahajuje se v případě opakovaného krvácení do některého z kloubů nebo vnitřních orgánů, po operacích a v období neobvyklé fyzické aktivity nebo psychického stresu.

Jednorázová profylaxe (jedna injekce)

Předpokládá se vznik ojedinělého krvácení

– např. před plánovanou velkou fyzickou zátěží a/nebo událostí, která by ke krvácení mohla vést, včetně některých lékařských výkonů, intenzivní rehabilitace a podobně...



Hemofílie

Léčba

- Koncentráty faktoru VIII.
- Koncentráty faktoru IX.
- Léky proti inhibitorům.
- Jiné koagulační produkty.
- Směsi koncentrátů VIII a IX.

Souhrnně je v těchto soupisech v současnosti zapsáno 31 léčivých přípravků, které jsou ve vývoji nebo před uvedením na trh. I kdyby nebyly všechny dány do praxe, je jejich vývoj nadějí pro budoucnost hemofiliků a jejich rodin.

Kam vývoj směřuje?

Produkty s prodlouženým poločasem.

Tzv. prodlužování poločasu přípravků je největším pokrokem v léčbě hemofilie od zavedení virologicky bezpečných koncentrátů v 80. letech 20. století. Léčebný účinek přetrvá déle a může se prodloužit doba mezi jednotlivými injekcemi. To jednak výrazně zvýší pohodlí klientů, ale také zmírní pokles hladin faktoru v krvi před další dávkou.

Profylaxe je v současné době přizpůsobena tomu, aby hladina chybějícího srážecího faktoru neklesala pod jedno procento.

S novým mechanismem účinku.

Nově vyvíjené produkty mají být založeny na zcela jiném fungování a tím mít citelnější dopad na stavění i prevenci krvácení.

To je obzvláště důležité u hemofiliků s inhibitory (protilátkami proti srážecím faktorům), pro které nejsou dnešní produkty tak účinné jako pro hemofiliky bez inhibitorů.