



<https://10.34883/PI.2022.8.1.015>
УДК 575.224.232.4:577.214.337]-053.2(476)



Любушкин А.В.✉, Гурьянова И.Е., Дмитриев Е.В., Полякова Е.А., Вертелко В.Р.,
Алейникова О.В.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

Частота встречаемости инверсии 22 интрона гена фактора VIII среди пациентов детского возраста в Республике Беларусь

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн – Любушкин А.В., Гурьянова И.Е., Дмитриев Е.В.; сбор и обработка данных – Любушкин А.В., Дмитриев Е.В.; анализ и интерпретация данных – Любушкин А.В., Гурьянова И.Е., Дмитриев Е.В., Полякова Е.А., Вертелко В.Р.; подготовка рукописи – Любушкин А.В., Гурьянова И.Е., Дмитриев Е.В., Полякова Е.А.; окончательное одобрение статьи – Любушкин А.В., Гурьянова И.Е., Дмитриев Е.В., Алейникова О.В.

Подана 11.12.2021

Принята: 01.02.2022

Контакты: aleksandr.liubushkin@gmail.com

Резюме

Гемофилия А – наиболее распространенное тяжелое нарушение свертываемости крови, вызванное отсутствием или снижением активности фактора свертывания крови VIII вследствие генетических аномалий в гене F8. Примерно у половины пациентов с тяжелой формой гемофилии А выявляется инверсия 22 интрона гена F8. Взаимосвязь между инверсией 22 интрона и тяжестью заболевания обусловлена ее влиянием на формирование полноразмерного транскрипта мРНК, что приводит к формированию усеченного и нефункционирующего белка FVIII и, как следствие, тяжелой гемофилии А.

Обнаружение мутаций играет важную роль в прогнозировании осложнений проводимой заместительной терапии, поскольку генетические аномалии, приводящие к дефектному белку FVIII, связаны с 20–80%-ным риском образования ингибиторов у пациентов с тяжелой формой гемофилии А.

Целью настоящего исследования было провести молекулярно-генетическую диагностику инверсии 22 интрона гена F8 и оценить ее частоту встречаемости среди пациентов с тяжелой формой гемофилии А в Республике Беларусь. В исследование был включен 71 пациент с тяжелой формой гемофилии А. У 21,1% (n=15) пациентов в анамнезе имелись данные об образовании ингибиторов к фактору VIII. Анализ инверсии 22 интрона был выполнен с использованием метода инвертированной полимеразной цепной реакции. В результате исследования инверсия 22 интрона гена F8 была детектирована у 46,5% пациентов с тяжелой формой гемофилии А. У 39,5% пациентов наблюдалась инверсия 22 интрона 1-го типа, у 7% – инверсия 22 интрона 2-го типа. Среди пациентов с инверсией 22 интрона ингибиторы вырабатывались в 36,4% случаев.

Ключевые слова: гемофилия А, ген F8, молекулярно-генетическая диагностика, генетические нарушения, инверсия 22 интрона, ингибиторы

Liubushkin A., Guryanova I., Dmitriev E., Polyakova E., Vertelko V., Aleinikova O.
Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
Minsk, Belarus

Prevalence of Intron 22 Inversion of the Factor VIII Gene among Pediatric Patients in Belarus

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept and design – Liubushkin A., Guryanova I., Dmitriev E.; data collection and processing – Liubushkin A., Dmitriev E.; data analysis and interpretation – Liubushkin A., Guryanova I., Dmitriev E., Polyakova E., Vertelko V.; preparation of the manuscript – Liubushkin A., Guryanova I., Dmitriev E., Polyakova E.; final approval of the article – Liubushkin A., Guryanova I., Dmitriev E., Aleinikova O.

Submitted: 11.12.2021

Accepted: 01.02.2021

Contacts: aleksandr.liubushkin@gmail.com

Abstract

Hemophilia A is the most common severe bleeding disorder caused by a lack or decreased activity of coagulation factor VIII due to genetic abnormalities in the F8 gene. In about half of patients with severe hemophilia A, the intron 22 inversion of the F8 gene is detected. The relationship between intron 22 inversion and the severity of the disease is due to its effect on the formation of a full-length mRNA transcript, which leads to the formation of a truncated and non-functioning protein FVIII and subsequently to severe hemophilia A. The detection of mutations plays an important role in predicting the complications of substitution therapy, as far as genetic abnormalities, leading to a defective protein FVIII are associated with a 20–80% risk of inhibitor development in patients with severe hemophilia A.

The aim of this study was to carry out molecular genetic diagnostic of intron 22 inversion of the F8 gene and to assess the frequency of occurrence among patients with severe hemophilia in Belarus. The study included 71 patients with severe hemophilia A. 21.1% (n=15) of patients had a history of the formation of inhibitors to factor VIII. Analysis of intron 22 inversion was performed using inverse polymerase chain reaction. In result of the study, intron 22 inversion of the F8 gene was detected in 46.5% of patients with severe hemophilia A. In 39.5% of patients, the intron 22 inversion of type 1 was observed, in 7% of patients, the intron 22 inversion of type 2 was observed. Among patients with 22 intron inversion, inhibitors were produced in 36.4% of patients.

Keywords: hemophilia A, gene F8, molecular genetic diagnostics, genetic defects, intron 22 inversion, inhibitors

■ ВВЕДЕНИЕ

Гемофилия А – это наследственно обусловленное заболевание системы гемостаза, характеризующееся дефицитом фактора свертывания крови VIII (FVIII), возникающим в результате гетерогенных мутаций в гене, кодирующий белок фактора VIII (F8, OMIM 300841). Фактор VIII является одним из крупнейших циркулирующих факторов



свертывания крови и в плазме находится в комплексе с фактором фон Виллебранда, который необходим для сохранения его стабильной структуры. Гемофилия А возникает в результате широкого спектра генетических аномалий в гене F8, приводящих как к количественным, так и качественным изменениям в белке FVIII [1, 2]. Дефицит FVIII приводит к развитию различных клинических проявлений. Поскольку заболевание наследуется по X-сцепленному рецессивному типу, женщины являются носителями дефектного гена и клиническими проявлениями страдают редко [3, 4]. Но приблизительно в 30% случаев гемофилия А возникает в результате *de novo* мутаций, вследствие чего семейная история болезни отсутствует [4]. Распространенность гемофилии А в мире составляет 1 случай на 5000–10 000 новорожденных мальчиков [2].

Ген фактора VIII картирован на теломерном конце X-хромосомы в локусе q28 и включает 25 интронов и 26 экзонов, кодирующих 2332 аминокислотных остатка [5]. Белок FVIII секретируется в виде гетеродимера с тяжелой (домены A1-A2-B) и легкой (домены A3-C1-C2) цепями, которые связаны друг с другом ионами двухвалентных металлов [6]. Различные домены играют важную роль в функционировании FVIII, поскольку каждый домен содержит специфические сайты связывания для различных компонентов каскада свертывания крови. Генетические дефекты могут влиять на такие сайты взаимодействия, приводя к развитию гемофилии А [7].

В настоящее время известно, что генетические изменения в гене F8 происходят в результате обширного спектра генетических нарушений, включающих крупные перестройки, делеции и инсерции, точечные мутации (миссенс и нонсенс), а также мутации в сайтах сплайсинга. Все типы генетических нарушений в гене F8 могут приводить к развитию тяжелой формы заболевания. Однако при гемофилии А существует одна наиболее клинически значимая мутация – инверсия 22 интрона (Inv22) гена F8 – крупная перестройка гена с участием интрона 22, общепринято ответственная примерно за половину всех случаев тяжелой формы гемофилии А [3, 5]. Данная генетическая перестройка связана с тем, что в 22 интроне гена F8 локализуется фрагмент длиной 9,5 т.п.н., обозначаемый как int22h-1, имеющий два почти идентичных внегенных гомолога – int22h-2 и int22h-3, расположенных на 500 и 600 т.п.н. дистальнее гена F8 соответственно [8, 9]. Инверсия 22 интрона происходит в результате внутривнутрихромосомной гомологичной рекомбинации между участком int22h-1 с одним из своих внегенных гомологов – int22h-2 или int22h-3 [9, 10]. В зависимости от того, с каким из внегенных гомологов int22h-2 или int22h-3 произошла рекомбинация, выделяют инверсию 22 интрона 2-го типа или инверсию 22 интрона 1-го типа соответственно [11]. В результате перестройки происходит отделение части гена, затрагивающей 1–22 экзоны с последующим изменением их ориентации по отношению к оставшимся 23–26 экзонам гена F8 [8, 9]. Кроме того, сообщается, что рекомбинация между int22h-1 с одним из своих гомологов – int22h-2 или int22h-3 – может приводить к возникновению крупных патогенных делеций (Del22), а также предположительно непатогенных дупликаций (Dup22), в отличие от классической инверсии [10].

Инверсия 1 интрона гена F8 (Inv1) является еще одной крупной генетической перестройкой, выявляемой у 2–5% пациентов с тяжелой формой гемофилии А. Патогенетический механизм, связанный с Inv1, включает гомологичную рекомбинацию между областью int1h-1 в интроне 1 и экстрагенной областью int1h-2, расположенной приблизительно на 140 т.п.н. дистальнее гена F8 [1, 9]. Обе инверсионные

перестройки препятствуют образованию полноразмерной матричной РНК (мРНК) фактора VIII, приводя к отсутствию белка FVIII, что впоследствии обуславливает тяжелый фенотип гемофилии А [1, 9].

В настоящее время известно, что образование аллоантител (ингибиторов) против фактора VIII является наиболее серьезным осложнением при заместительной терапии гемофилии А, которое в свою очередь в основном является осложнением тяжелой формы гемофилии А. У пациентов с тяжелой формой заболевания риск развития ингибиторов составляет около 20–80%, в то время как при гемофилии А легкой и средней степени тяжести ингибиторы вырабатываются только у 5% пациентов [12]. Хотя общепризнано, что основной причиной образования ингибиторов является представление нового или иммунологически измененного антигена FVIII в иммунной системе пациента, патогенез образования ингибиторов до конца не изучен. В последнее десятилетие были продемонстрированы данные о том, что генетические события являются определяющими факторами в развитии ингибиторов [12].

При тяжелой гемофилии А генетические дефекты, приводящие к усеченному белку FVIII или его отсутствию, связаны с самым высоким риском образования ингибиторов, достигающим 80% у пациентов с большими мультидоменными делециями. Однако для остальных грубых генетических дефектов риск образования ингибиторов находится в пределах 20–40%. Инверсия 22 интрона наряду с нонсенс-мутациями и крупными делециями (также известными как нулевые мутации) связана с высоким риском развития ингибиторов [5, 11]. Альтернативный патологический механизм может лежать в основе развития ингибиторов у пациентов с легкой формой гемофилии А. Определенные миссенс-мутации могут изменять иммуногенность белка FVIII, вызывая ответ ингибитора против измененного эпитопа [12].

Многие вопросы образования ингибиторов остаются не изученными, поскольку только у 20% пациентов с крупными генетическими дефектами, такими как инверсия 22 интрона, вырабатываются ингибиторы, а у 80% – нет [12]. Кроме того, в настоящее время непонятно, почему пациенты с гемофилией А с разными типами нулевых мутаций демонстрируют различную частоту развития ингибиторов (88% для больших мультидоменных делеций, в сравнении с 25% для однодоменных делеций и 20% для инверсии 22 интрона), хотя все нулевые мутации приводят к отсутствию синтеза полноразмерного FVIII [12].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести молекулярно-генетическую диагностику инверсии 22 интрона гена F8 и оценить ее частоту встречаемости среди пациентов с тяжелой формой гемофилии А в Республике Беларусь.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование был включен 71 пациент с клиническим диагнозом «гемофилия А». Все пациенты находились на обследовании и лечении в ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии» в период 2018–2021 гг. В соответствии с уровнем FVIII:C все пациенты имели тяжелую форму (FVIII:C <1% от нормы) гемофилии А (100%, n=71), при этом у 21,1% (n=15) пациентов в анамнезе имелись данные о развитии ингибиторов к FVIII. Возраст пациентов варьировал от 1 месяца до 18 лет, медиана составила 7 лет. От всех пациентов и/или их официальных опекунов было



получено информированное согласие на проведение молекулярно-генетического исследования.

Материалом для исследования послужила периферическая кровь с антикоагулянтом K_2 ЭДТА. Кровь подвергалась лизису эритроцитов для последующего получения цельной суспензии лейкоцитов. Геномную ДНК выделяли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции из полученной суспензии лейкоцитов. Идентификация инверсии 22 интрона гена F8 проводилась с использованием протокола инвертированной полимеразной цепной реакции (ПЦР), описанного Rossetti et al. [13, 14] с небольшими модификациями. На первом этапе проводили рестрикцию 1000 нг геномной ДНК с использованием фермента FastDigest BclI (Thermo Fisher Scientific, США) в объеме 20 мкл при 37 °C в течение 30 минут. Фрагментированную ДНК экстрагировали фенол-хлороформной смесью с последующей преципитацией 96% и 70% этанолом. Лигирование полученных фрагментов проводили с 3 единицами T4 ДНК-лигазы (Invitrogen, США) в общем объеме 400 мкл при 15 °C в течение 16–17 часов. Лигированные образцы очищали смесью фенол-хлороформа, преципитацию проводили 96%-ным и 70%-ным этанолом. Полученные фрагменты растворяли в 30 мкл стерильной воды.

На втором этапе проводили ПЦР с использованием праймеров, ранее разработанных Rossetti et al. [14], представленных в табл. 1.

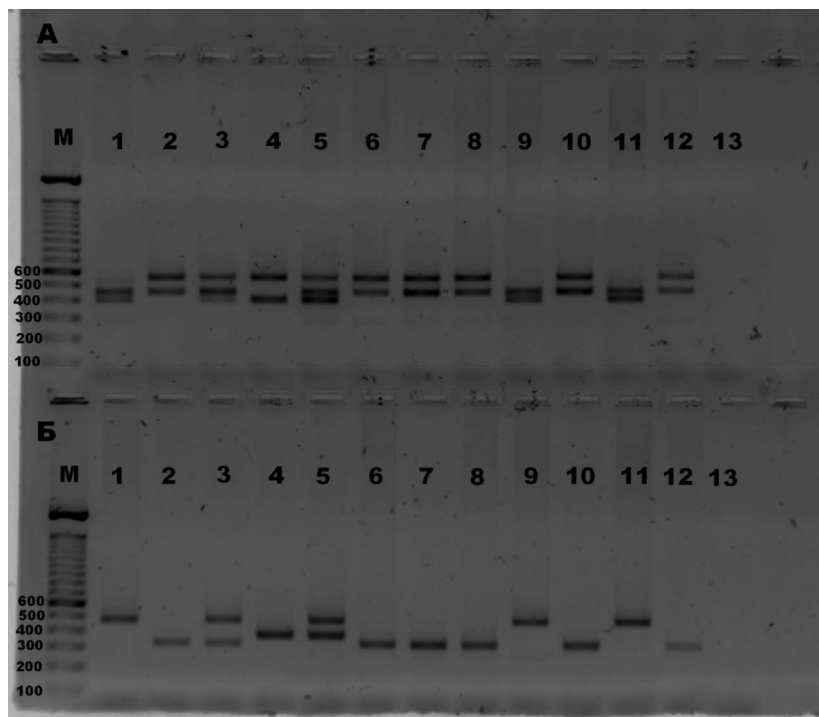
Для характеристики всех возможных перестроек, связанных с гомологами 22 интрона, проводили два ПЦР-теста – диагностический и дополнительный, которые различались составом праймером. В состав диагностического теста ПЦР входили праймеры – IU, 2U, 3U и ID, а для дополнительного – IU, 2U, 3U и ED. Реакционную смесь готовили в объеме 25 мкл, содержащем 6 мкл лигированных фрагментов ДНК, 2 mM dNTP (Qiagen, Германия), 1,25U DreamTaq Hot Start DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, США), 10X DreamTaq Buffer (Thermo Fisher Scientific, США), 10% DMSO и 12,5 pmol каждого праймера (Праймтех, Беларусь). ПЦР проводили с использованием амплификатора BioRad C1000 (США) в соответствии с применяемым к полимеразе DreamTaq Hot Start DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, США) протоколом. Для детекции продуктов амплификации использовали 1,5% агарозный гель. Визуализацию проводили в системе гель-документирования (BioRad Gel Doc XR+, США). Интерпретацию результатов исследования проводили на основании размера фрагментов контролей и образцов пациентов, обнаруженных методом электрофореза в агарозном геле.

Таблица 1
Дизайн праймеров для скрининга инверсии 22 интрона
Table 1
Primers design for intron 22 inversion screening

Название	Последовательность (5'→3')	Кол-во нуклеотидов	Т _{отжига} °C
IU	CCTTTCAACTCCATCTCCAT	20	56
2U	ACGTGTCTTTTGGAAGTC	20	
3U	CTCACATTGTGTTCTGTAGTC	22	
ID	ACATACGGTTAGTCACAAGT	21	
ED	TCCAGTCACTTAGGCTCAG	19	

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведения исследования инверсия 22 интрона была обнаружена у 46,5% (n=33) пациентов с тяжелой формой гемофилии А. В зависимости от типа инверсии 22 интрона распределение было следующее: у 39,5% (n=28) пациентов наблюдалась инверсия 22 интрона 1-го типа, а у 7% (n=5) пациентов – инверсия 22 интрона 2-го типа. Результаты детекции инверсии 22 интрона представлены на рисунке.



Электрофореграмма результатов анализа инверсии 22 интрона Electropherogram of intron 22 inversion analysis

Примечания: А – дополнительный тест для детекции Inv22: М – маркер молекулярных масс (100 kb); 1 – контроль дикого типа (405 и 457 п.н.); 2 – контроль гомозиготной Inv22 типа 1 (457 и 559 п.н.); 3 – контроль гетерозиготной Inv22 типа 1 (405, 457 и 559 п.н.); 4 – контроль гомозиготной Inv22 типа 2 (405 и 559 п.н.); 5 – контроль гетерозиготной Inv22 типа 2 (405, 457 и 559 п.н.); 6, 7, 8, 10, 12 – образцы с Inv22 типа 1; 9, 11 – образцы, в которых Inv22 не обнаружена; 13 – отриц. контроль. Б – диагностический тест для детекции Inv22: М – маркер молекулярных масс (100 kb); 1 – контроль дикого типа (487 п.н.); 2 – контроль гомозиготной Inv22 типа 1 (333 п.н.); 3 – контроль гетерозиготной Inv22 типа 1 (333 и 487 п.н.); 4 – контроль гомозиготной Inv22 типа 2 (385 п.н.); 5 – контроль гетерозиготной Inv22 типа 2 (385 и 487 п.н.); 6, 7, 8, 10, 12 – образцы с Inv22 типа 1; 9, 11 – образцы, в которых Inv22 не обнаружена; 13 – отриц. контроль.

Notes: A – complementary test for the detection of Inv22: M – molecular weight marker (100 kb); 1 – wild-type control (405 and 457 bp); 2 – control of homozygous Inv22 type 1 (457 and 559 bp); 3 – control of heterozygous Inv22 type 1 (405, 457 and 559 bp); 4 – control of homozygous Inv22 type 2 (405 and 559 bp); 5 – control of heterozygous Inv22 type 2 (405, 457 and 559 bp); 6, 7, 8, 10, 12 – samples with Inv22 type 1; 9, 11 – samples in which Inv22 was not detected; 13 – neg. control. B – diagnostic test for the detection of Inv22: M – molecular weight marker (100 kb); 1 – wild-type control (487 bp); 2 – control of homozygous Inv22 type 1 (333 bp); 3 – control of heterozygous Inv22 type 1 (333 and 487 bp); 4 – control of homozygous Inv22 type 2 (385 bp); 5 – control of heterozygous Inv22 type 2 (385 and 487 bp); 6, 7, 8, 10, 12 – samples with Inv22 type 1; 9, 11 – samples in which Inv22 was not detected; 13 – neg. control.



Таблица 2
Распространенность ингибиторов к FVIII среди пациентов с инверсией 22 интрона
Table 2
Prevalence of FVIII inhibitors among patients with intron 22 inversion

Наличие инверсии 22 интрона	Наличие ингибиторов к FVIII (n=71)	
	Присутствуют	Отсутствуют
Выявлена	n=12	n=21
Не выявлена	n=3	n=35

Высокая частота встречаемости инверсии 22 интрона гена F8, обнаруженная среди пациентов с тяжелой формой гемофилии А в нашем исследовании, согласуется с ее распространенностью в различных популяциях и подтверждается рядом исследований [9, 18]. Широкая вариация распространенности инверсии 22 интрона в различных исследованиях (10,5–50%) [9], вероятно, связана с генетическим разнообразием в разных популяциях, а в некоторой степени – с различными методами ее обнаружения с различной чувствительностью и специфичностью [5]. Поскольку инверсия 22 интрона является наиболее частой генетической перестройкой при гемофилии А, первым этапом генетической диагностики целесообразно выполнять скрининг на наличие данного генетического дефекта. Во всем мире известны различные молекулярно-генетические подходы для диагностики инверсии 22 интрона гена F8, включающие саузерн-блоттинг, ПЦР длинных фрагментов (Long distance PCR) и инвертированную ПЦР (Inverse PCR). Метод инвертированной ПЦР является наиболее быстрым и способен выявлять все структурные варианты, связанные с гомологами 22 интрона [14–17].

Различные исследования демонстрируют, что основным генетическим фактором развития ингибиторов при гемофилии А является тип мутации гена, кодирующий белок FVIII. Поскольку инверсия 22 интрона является наиболее распространенной и крупной генетической перестройкой при тяжелой форме гемофилии А, ее рассматривают как генетический фактор риска развития ингибиторов при тяжелой гемофилии А [9, 12, 18].

В нашем исследовании среди пациентов с детектированной инверсией 22 интрона (n=33) ингибиторы к FVIII вырабатывались у 36,4% (n=12) пациентов (таб. 2).

Согласно мировым данным, частота развития ингибиторов при инверсии 22 интрона варьирует от 5 до 51% [9]. Полученные в ходе исследования данные указывают на то, что инверсия 22 интрона является наиболее частым генетическим нарушением среди пациентов с тяжелой ингибиторной формой гемофилии А.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование демонстрирует, что в Республике Беларусь, как и в других странах мира, инверсия 22 интрона гена F8 является наиболее частым генетическим нарушением, приводящим к развитию гемофилии А, на долю которого приходится 46,5% пациентов с тяжелой формой гемофилии А. Среди пациентов с выявленной инверсией 22 интрона ингибиторы вырабатывались у 36,4% пациентов. Исходя из того, что инверсия 22 интрона является наиболее распространенным генетическим нарушением среди пациентов с тяжелой формой гемофилии А, скрининг на наличие данного генетического дефекта следует выполнять в качестве первой

линии генетической диагностики. Определение генетической причины гемофилии А не только позволяет проводить генетическое консультирование семей, но и способствует повышению уровня диагностики заболевания и предоставляет важную информацию, необходимую для выбора типа терапии и определения прогноза при гемофилии А.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Faridi N. J., Kumar P., Husain N. (2012) Prevalence of Intron 1 Inversion of Cases With Hemophilia A in North Indian Population. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, vol. 18, no 6, pp. 599–603.
2. Caesar M., Abu Arra, Samarah F., Nael Sudqi Abu Hasan (2020) Factor VIII Intron 22 Inversion in Severe Hemophilia A Patients in Palestine. *Scientifica*, vol. 20, pp.1–7.
3. Iqbal W., Raza M., Khan M.S. (2013) Intron 22 Inversions in Severe Hemophiliacs. *American Journal of Medicine and Medical Sciences*, vol. 3, no 6, pp. 190–196.
4. Jayandharan G.R., Srivastava A. (2011) Hemophilia: Genetics, Diagnosis and Treatment. *J Genet Syndr Gene Ther*, vol. 1, pp. 1–12.
5. Sherief L.M. et al. (2020) Factor VIII inhibitor development in Egyptian hemophilia patients: does intron 22 inversion mutation play a role? *Italian Journal of Pediatrics*, vol. 46, pp. 1–7.
6. Roozafzaya N. et al. (2013) Evaluation of intron 22 and intron 1 inversions of the factor 8 gene using an inverse shifting PCR method in severe haemophilia A patients. *ScienceAsia*, vol. 39, pp. 174–178.
7. Tantawy A.G. (2010) Molecular genetics of hemophilia A: Clinical perspectives. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, vol. 11, pp. 105–114.
8. Pan Tzu-Yu et al. (2014) Separation of intron 22 inversion type 1 and 2 of hemophilia A by modified inverse-shifting polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis. *Talanta*, vol. 130, pp. 328–335.
9. Abdulqader Aven M. Raouf et al. (2020) Identification of the Intron 22 and Intron 1 Inversions of the Factor VIII Gene in Iraqi Kurdish Patients With Hemophilia A. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, vol. 26, pp.1–7.
10. Abou-Elewh H. et al. (2011) Genotyping of intron 22-related rearrangements of F8 by inverse-shifting PCR in Egyptian hemophilia A patients. *Ann Hematol*, vol. 90, pp. 579–584.
11. Sawecka J. et al. (2005) Prevalence of the intron 22 inversion of the factor VIII gene and inhibitor development in Polish patients with severe hemophilia A. *Arch Immunol Ther Exp*, vol. 53, pp. 352–356.
12. Oldenburg J., Pavlova A. (2006) Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia*, vol. 12, pp. 15–22.
13. Rossetti L.C. (2005) Genotyping the Hemophilia Inversion Hotspot by Use of Inverse PCR. *Clinical Chemistry*, vol. 51, no 7, pp. 1154–1158.
14. Rossetti L.C. et al. (2008) Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 6, pp. 830–836.
15. Beskorovainaya T.S. et al. (2019) Complex Molecular Diagnostics of Haemophilia A in Russian Patients. *Genetics*, vol. 55, no 8, pp. 944–954.
16. Sarkarga F. (2016) Genotyping of Intron 22 and Intron 1 Inversions of Factor VIII Gene Using an Inverse-Shifting PCR Method in an Iranian Family with Severe Haemophilia A. *Iran J Ped Hematol Oncol*, vol. 6, no 6, pp. 182–189.
17. Kloppeers Jean F., Janse van Rensburg Walter J. (2017) Rapid identification of the intron 22 inversion in haemophilia. *Haemophilia*, vol. 23, no 1, pp. 55–57.
18. Mantilla-Capacho J.M. et al. (2007) Frequency of Intron 1 and 22 Inversions of Factor VIII Gene in Mexican Patients With Severe Hemophilia A. *American Journal of Hematology*, vol. 82, pp. 283–287.