Монголд оношлогдсон Гемофили А, Б өвчний зарим тохиолдлуудад *F8, F9* генийн мутацийг илрүүлсэн дүн

М.Пүрэвдорж[1], И.Пүрэвдорж[1], Б.Мөнхцэцэг[1], Т.Тунгалагтамир[1], Л.Содномцогт[2], С.Mannhalter[3], П.Эрхэмбулган[1,4]

[1]АШУҮИС, Био-анагаахын сургууль, Молекул биологи-Удамзүйн тэнхим
[2]Тархи сэтгэц судлалын хүрээлэн
[3]Венийн Анагаах ухааны их сургууль
[4]Нийслэлийн Эрүүл Мэндийн Газар
Цахим шуудан: purevdorj.m@mnums.edu.mn, Утас: 88065768

Түлхүүр үг:
Гемофили А
Гемофили Б
F8
F9
Монгол
Генийн мутаци

Товч утга:
Үндэслэл: Гемофили А, Б өвчин Х-хромосомын ноёлогдогч генээр удамшин дамждаг, цус бүлэгнэлтийн VIII, IX факторын хомсдолын шалтгаант цусархагшлын шинжээр илрэх моногенийн шалтгаант эмгэг юм. Ийм өвчнөөр эрэгтэй хүн өвдөж, эмэгтэй хүн шинж тэмдэггүй далд тээгч болно. Пробандад уг өвчний эмгэг аллелийг тодорхойлсноор нэгдүгээрт тухайн гэр бүл дэх мутацийг хэв шинжийг тодорхойлох, хоёрдугаарт садан төрлийн эмэгтэйчүүдэд далд тээгчийг илрүүлэх, улмаар пренаталь оношилгоог хийх, цус алдалтын эрсдлээс сэргийлэх, ингибитор үүсэх эрсдлийг тодорхойлох зэрэг олон талын ач холбогдолтой. **Зорилго:** Монголд оношилогдсон гемофили-А, Б-тэй хүмүүсийн дунд *F8*, *F9* генийн мутацийг илрүүлэх. **Арга, аргачлал:** Уг судалгаанд 2013 оноос 2022 оны хооронд УНТЭ, ЭХЭМҮТ-ийн цусны эмгэг судлалын тасаг, АШУҮИС-ийн БАС-ийн Молекул биологи-Удамзүйн тэнхмийн “Удамзүйн зөвлөгөө өгөх кабинет”-аар үйлчлүүлж буй Гемофили А, Б оноштой хүмүүсийг хамруулсан. Мутац илрүүлэхдээ полимеразын гинжин урвал (ПГУ), урт бүтээгдэхүүнт-ПГУ, нуклеотидын дараалал тогтоох Sequence шинжилгээний аргыг ашиглав. **Үр дүн:** Судалгаанд Гемофили А (ГА)-гийн 27 гэр бүлийн 32 өвчтөн (хүнд хэлбэр 30, хүндэвтэр 1, хөнгөн хэлбэр 1), Гемофили Б (ГБ)-гийн 8 өвчтөн (хүнд хэлбэр 6, хөнгөн 2), нийт 40 хүн хамрагдсан. Үүнээс Эмнэлзүй-удам судлалын анализаар Гемофили А – гийн 5 гэр бүл, Гемофили Б-гийн 2 хүн тус бүр удмын өгүүлэмжтэй. Гемофили А-тай хүмүүсийн 90% (29/32)-д *F8* генийн эмгэг мутаци илэрсэн. Хүндэвтэр ГА-тай нэг тохиолдолд полиморфизм, хөнгөн хэлбэрийн ГА-тай 1 хүнд 7-р интрон дахь нэг суурийн гээгдэл тус тус илэрсэн. Хүнд хэлбэрийн ГА-тай 25 гэр бүлийн 56% (14 гэр бүлийн 16 хүнд)-д интрон-22 инверси, 12%(3 гэр бүлийн 4 хүнд)-д интрон-1 инверси, хоёр хүнд (8%) *F8* генийн нэг болон олон экзоны гээгдэл, 2 гэр бүлийн 3 хүнд миссенс, 2 хүнд нэг суурийн гээгдэл илэрсэн. Эдгээр эмгэг мутациас c.2240del мутаци нь *F8* генийн мутацийн бүртгэлийн санд бүртгэгдээгүй буюу шинэ мутаци болохыг тодорхойлсон юм. Хүнд хэлбэрийн ГБ-тэй 6 тохиолдолд нийт 5 мутаци илэрсэн. Үүнээс c.187_188del болон c.1314_1314del гэсэн 2 мутаци нь *F9* генийн мутацийн бүртгэлийн санд бүртгэгдээгүй байсан тул эдгээр нь шинэ мутаци болох нь тодорхойлогдлоо. Хөнгөн хэлбэрийн ГБ-тэй 2 хүнд ямар нэгэн мутаци илэрсэнгүй. **Дүгнэлт:** Хүнд хэлбэрийн гемофили А-ийн тохиолдлын дунд интрон-22 болон интрон-1 инверси мутаци өндөр давтамжтай илэрч байна. *F8* генийн c.2240del, *F9* генийн c.187_188del болон c.1314_1314del мутаци нь өмнө нь бүртгэгдэж байгаагүй бөгөөд эдгээр нь Гемофили өвчний хүнд хэлбэрийн фенотипийг үүсгэх шалтгаан болж байна.

Үндэслэл: Гемофили А (ГА) нь цус бүлэгнэлтийн VIII фактор, гемофили Б (ГБ) нь IX факторын хомсдолын шалтгаант, цусархагийн шинжээр илэрдэг удамшлын эмгэгүүд юм. Удамших хэлбэрийн хувьд Гемофили А, Б нь Х-хромосомын рецессивээр удамшдаг учраас эрэгтэйчүүд өвдөж, эмэгтэйчүүд эмгэг генийн гетерозигот (X^AX^a) тээгч болдог. Давтамжын хувьд Гемофили А нь 5000 эрэгтэй амьд төрөлтөнд 1, гемофили Б нь 30000 эрэгтэй амьд төрөлтөнд 1 тохиолддог.[1] Сийвэнгийн бүлэгнэлтийн VIII факторын *F8* ген, IX факторыг *F9* ген кодлох бөгөөд эдгээр факторын түвшин 1% (1ОУН/дл)-иас буурвал хүнд хэлбэр, 1-5% (1-5ОУН/дл) болвол хүндэвтэр, 6-30% (3-30ОУН/дл) болвол хөнгөн хэлбэр гэж ангилна. Хүнд хэлбэрийн ГА-тай хүмүүсийн 40-45%-д интрон-22 инверси[2] 5% орчимд нь интрон-1 инверси[3], 3-5%-д *F8* генийн том хэмжээний гэгдэл илэрдэг.[4] Одоогоор *F8* генийн 3052-3358 орчим[5], *F9* генд үүссэн 1244 мутаци олон улсын цахим нэгдсэн эх сурвалжид бүртгэгджээ.[6]

Манай орны хувьд гемофили-А болон Б өвчтэй 130 гаруй хүн байдаг ч мутацийн давтамж, төрөл зүйлийн онцлог байдлыг тодорхойлсон судалгаа хараахан хийгдээгүй байна. Хэдийгээр гемофилийг эмнэлзүйн шинж тэмдэг, сийвэн дэх FVIII, IX факторын түвшин, коагулограммын үзүүлэлтээр оношилдог ч пробандад Молекул генетикийн шинжилгээ давхар хийх нь мутацийн өвөрмөц төрөл зүйлийг тодорхойлох, далд тээгч гетерозигот генотиптэй эмэгтэйг илрүүлэх, пренаталь оношилгоонд ашиглах, өвчтөнд ингибитор үүсэх эрсдлийг үнэлэг зэрэг маш олон талын ач холбогдолтой байгаа нь энэхүү судалгааны үндэслэл болж байна.[4,7,8]

Зорилго: Монголд оношилогдсон гемофили-А, Б-тэй хүмүүсийн дунд *F8*, *F9* генийн мутацийг илрүүлэх.

Арга, аргачлал: Судалгааны ёс зүйн зөвшөөрлийг ЭМШУИС-ийн Анагаахын Ухааны Ёс Зүйн Хяналтын Салбар Хороо-ны 2013 оны 6 дугаар сарын 21-ний өдрийн хурлаар хэлэлцэж 13-17/1А тоот ёс зүйн зөвшөөрөл авсан. Судалгаанд 2013-2021 оны хооронд Улаанбаатар хотын Эх хүүхдийн Эрүүл Мэндийн Үндэсний Төв, Улсын Нэгдүгээр Төв Эмнэлэг-ийн Цусны эмгэг судлалын тасаг, АШУҮИС-ийн Молекул биологи-Удамзүйн тэнхимийн дэргэдэх Удамзүйн зөвлөгөө өгөх кабинетаар үйлчлүүлсэн Гемофили-А, Б оноштой хүмүүсийг хамруулсан. Судалгаанд хамрагдсан хүмүүсийн захын венийн судаснаас EDTA агуулсан нэг удаагийн ариун хуруу шилэнд 5-7мл орчим цусыг авч Qiagen Blood mini kit (Cat# 51104, Germany) цомгийг ашиглан геномын ДНХ-ийг ялгасан. Гемофилм А-тай хүнд *F8* генд мутаци илрүүлэхдээ эхний шатанд интрон-22 болон интрон-1 инверсийг тодорхойлсон. Дээрх мутаци сөрөг гарвал цэгэн мутаци, жижиг делеци, уншигдах хүрээ өөрчлөгдөх мутаци, нонсенс, индел мутацийг илрүүлсэн. Гемофили Б-тэй хүнд *F9* генийн мутаци илрүүлэхдээ нуклеотидын дарааллыг шууд тодорхойлсон. *F8*, *F9* генийн экзон тус бүрт өвөрмөц праймер ашиглан Sequence ПГУ-ыг Big dye® terminator v3.1 cycle sequencing kit (Cat no: 4337455) цомог ашиглан үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу хийж гүйцэтгэсэн. Sequence ПГУ-ын дараа Qi-aquick PCR purification kit (Cat no: 28104) цомгоор бүтээгдэхүүнээ цэвэршүүлж ABI Genetic Analyzer 3130XL (Foster City, California, USA) нуклеотидийн дараалал тогтоох машинд уншуулав.

Экзон ПГУ, ПГУ-ын бүтээгдэхүүн цэвэршүүлэх, нуклеотидийн дараалал тогтоох ПГУ-ыг АШУҮИС-ийн Био-анагаахын сургуулийн “Молекул биологи-Удамзүй”н тэнхимийн Молекул биологийн судалгааны лаборатори, Мөн Био-анагаахын хүрээлэнгийн Молекул биологийн лабораторит тус тус хийсэн. Нуклеотидийн дараалал тогтоох шинжилгээг уншуулахдаа Улсын Мал Эмнэлгийн Төв лабораторийн молекул биологийн лабораторит хийсэн.

Үр дүн: Гемофили А судалгаанд 27 гэр бүлийн 1-53 насны 32 хүн (m±SD: 18±11), Гемофили Б оноштой 2-33 насны 8 тохиолдол (m±SD: 9±11), нийт 40 хүн хамрагдсан. Эмнэлзүйн удам судлалын шинжилгээгээр нийт Гемофили А гийн 5 тохиолдол, Б-гийн нийт 2 тохиололд тус тус удмын өгүүлэмжтэй байв. *F8* генийн мутацийн илрүүлгийн шинжилгээгээр хүнд хэлбэрийн Гемофили А-гийн 25 гэр бүлийн 29 хүнд нь генийн эмгэг мутаци илэрсэн. Үлдсэн 3 гэр бүлд SNP буюу полиморфизм, Интрон 7 дахь 1 азотлог суурийн гээгдэл болон нэг хүнд огт мутаци илрээгүй (Хүснэгт 1).

Хүснэгт 1. Гемофили А-тай хүмүүст илэрсэн мутацийн төрөл ба хүндийн зэрэг

Мутацийн төрөл (а.х-н өөрчлөлт)	Экзон, интрон / домайн	Тохиолдол/ гэр бүл (тоогоор)	Хүндийн зэрэг/ FVIII:C
Интрон-22 инверси	Интрон 22	16 / 14	Хүнд/1%
Интрон-1 инверси	Интрон 1	4 / 3	Хүнд/1%
Том делеци			
- Нэг экзоны гээгдэл: 3-экзон	- A1 домайн	1 /1	Хүнд/1%
- Олон экзоны гээгдэл: 1-13р экзон	- A1, A2, B	1 / 1	Хүнд/1%
Миссенс			
- c.902G>A (p.Arg301His)	- 7-р экзон / A1	2 / 1	Хүнд/1%
- c.2003T>C (p.Leu668Pro)	- 13-р экзон / A2	2 /1	Хүнд/1%
- c.6544C>T (p.Arg2182Cys)	- 23-р экзон / C1	1 / 1	Хүнд/1%
Хүрээ өөрчлөгдөх мутаци (Frameshift)			
- c.2240del* (p.Ala747Aspfs*4)	- 14-р экзон / B	1 / 1	Хүнд/1%
- c.3637dupA (p.Ile1213Asn fs*28)	- 14-р экзон / B	1 / 1	Хүнд/1%
Полиморфизм c.3864A>C (p.Ser1288=)	14-р экзон / B	1 / 1	Хүндэвтэр/5%
Интрон дахь вариант c.1010-106del*	7-р интрон	1 / 1	Хөнгөн/15%
Мутаци илрээгүй	-	1 / 1	Хүнд
Нийт		32 /27	

Товчлол: *а.х-амин хүчил, FVIII:C, бүлэгнэлтийн VIII факторын идэвхи, *F8 генийн мутацийн бүртгэлийн санд бүртгэгдээгүй*

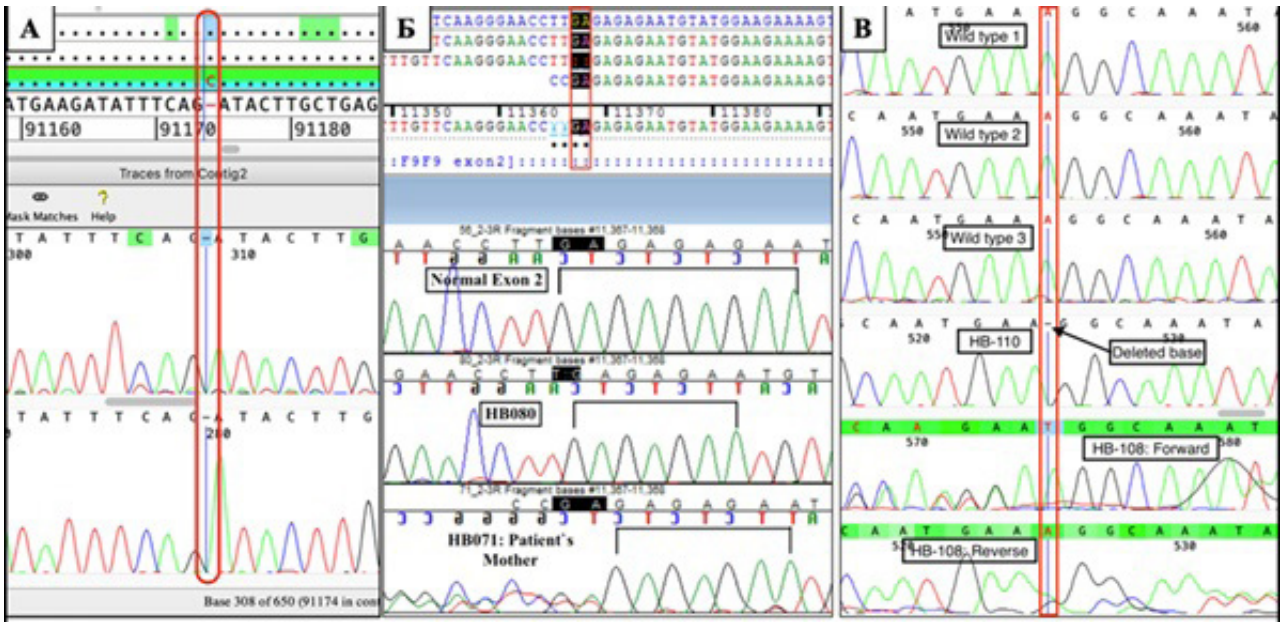
Гемофили-А хүнд c.2240del мутаци илэрсэн бөгөөд энэ нь *F8* генийн мутацийн бүртгэлийн санд хараахан бүртгэгдээгүй байсан тул бид энэхүү мутацийг шинэ мутаци гэж тодорхойлсон болно. Энэхүү мутацийн улмаас *F8* генийн уураг кодлогч бүсийн 2240 дэх байршил дахь цитозин гээгдсэнээр уншигдах хүрээ өөрчлөгдөж 747-р байршил дахь Аланин амин хүчил Аспарагинаар солигдоно. Үүнээс гадна 4 амин хүчлийн дараа буюу уургийн амин хүчлийн 751 дээр зогс кодон үүссэнээр бүлэгнэлтийн VIII хүчин зүйл нийлэгжихээ болино. Гемофили Б-гийн *F9* генийн мутацийн шинжилгээгээр 8 тохиолдлын 6-д нь эмгэг мутаци илэрсэн бөгөөд эдгээр нь бүгд хүнд хэлбэрийн гемофили Б байв. Харин хөнгөн хэлбэрийн Гемофили Б-тэй 2 хүнд огт мутаци илрээгүй (Хүснэгт 2).

Хүснэгт 2. Гемофили Б-тэй хүмүүст илрүүлсэн *F9* генийн мутац

Код	Хүндийн зэрэг† /FIX:C	Илэрсэн вариант	Амин хүчлийн өөрчлөлт	Экзон/домайн
HB-018	Хүнд/<1%	c.344 A>G	p.Tyr115Cys	4/EGF1
HB-056	Хөнгөн/16%	илрээгүй	Мутаци илрээгүй	
HB-057	Хүнд/<1%	c.464G>C	p.Cys155Ser	5/EGF2
HB-059	Хөнгөн/15%	илрээгүй	Мутаци илрээгүй	
HB-060	Хүнд/<1%	c.223C>T	p.Arg75stop	2/GLA
HB-080	Хүнд/<1%	c.187_188del¶	p.Glu63Metfs*7	2/GLA
HB-085	Хүнд/<1%	c.223C>T	p.Arg75stop	2/GLA
HB-110	Хүнд/<1%	c.1314_1314delA¶	p.Gly439Alafs*44	8/Serine protease

Тайлбар: *¶ F9 генийн мутацийн бүртгэлийн системд бүртгэгдээгүй буюу шинэ мутаци*

Хөнгөн хэлбэрийн гемофили Б-тэй хоёр хүнд *F9* генийн ямар нэгэн мутаци илэрсэнгүй. HB-080, HB-110 дугаартай хүнд хэлбэрийн Гемофили Б-тэй 2 хүнд илэрсэн мутаци нь мутацийн бүртгэлийн олон улсын системд бүртгэгдээгүй. Шинээр илрүүлсэн мутацийн секвенсийн шинжилгээний үр дүнг 1-р зурагт харуулсан байна (Зураг 1: А; Б; В).



Зураг 1. Судалгааны хүрээнд *F8*, *F9* генд шинээр илрүүлсэн мутацийн секвенс шинжилгээний үр дүн.
А) *F8* генийн c.2240del мутацийн улмаас гээгдсэн Цитозин (С) азотлог суурийн байршлыг улаанаар хүрээлсэн Б) НВ-080 дугаартай хүнд хэлбэрийн гемофили Б оноштой хүнд илэрсэн шинэ мутаци c.187_188del. Хэвийн экзон (Normal exon-2)-д Гуанин аденин (ГА) динуклеотид 4 байгаа бол НВ-080-д 3 болсон байна. В) НВ-110 дугаартай гемофили Б-тэй хүнд илэрсэн c.1314_1314delA мутаци. Сумаар заасан хэсэг нь мутаци үүссэн байршил заав.

Хэлцэмж: Бид энэхүү судалгааг 2013-2022 оны хооронд эмнэлэгт суурилсан тохиолдлын судалгааны аргаар гемофили А, Б-тэй нийт 40 хүн хамруулсан. Үүнээс 90% (36)-ийг нь хүнд хэлбэр эзэлж байгаа нь давтамж болон, хүнд хэлбэрийн гемофилитэй хүмүүст цус алдалтын тохиолдол их байдагтай холбоотойгоор эмнэлэгт хандах давтамж их байдагтай холбоотой байж болно.[4] Судалгаагаар хүнд хэлбэрийн гемофили А-тай хүмүүсийн 96% (24/25)-д нь *F8* генийн мутаци илэрсэн. Интрон-1 болон интрон-22 инверси нь хүнд хэлбэрийн Гемофили А өвчний шалтгаан болдог бөгөөд улс орон бүрт харилцан адилгүй давтамжтай илэрчээ. Тухайлбал: Австри 47%[9], Франц 46%[10], Итали 46%[11], Хятад 47.8%[12], Солонгос 33%[13]-тай тус тус илэрч байжээ. Бидний судалгаагаар энэхүү мутаци хүнд хэлбэрийн ГА-тай тохиолдлын 56% (14/25) илэрч байгаа ч үүнийг лавшруулан олон хүнд судлах шаардлагатай.

Хүнд хэлбэрийн ГА-тай тохиолдлын 12% (3/25)-д интрон 1 инверси, мөн 2 тохиолдолд (8%)-д нь *F8* генийн том делеци илэрсэн. Нийт гемофили А-тай хүмүүсийн 72%-д нь эдгээр генийн том хэмжээний гээгдэл илэрчээ. Нэг азотлог суурийн өөрчлөлтийн c.2240del мутаци нь шинээр илэрсэн мутаци болохыг тодорхойлов. Энэхүү мутаци нь био-информатикийн шинжилгээгээр *F8* генийн мРНХ-ийн задралд хүргэх өндөр эрсдэлтэй болохыг тодорхойлсон. Хүндэвтэй хэлбэрийн ГА-тай хүнд илэрсэн c.3864A>C (p.Ser1288=) полиморфизм нь ГА-ын эмгэг жамд нөлөө үзүүлэхгүй бөгөөд харьцангүй эрүүл хүн амын дунд аллелийн давтамж нь ойролцоогоор 33%-тай тодорхойлогдож байжээ. Миссенс c.902G>A, c.6544C>T, c.3637dupA мутацууд нь харьцангуй элбэг судлагдсан бөгөөд өвчтөнд үзүүлэх нөлөө болон хүндийн зэргийг харьцуулахад нь бидний судалгааны үр дүн бусад судалгааны үр дүнтэй дүйж байна.[14-16] Хүнд хэлбэрийн ГА-тай нэг хүнд ямар нэгэн мутаци илрээгүй нь магадгүй *F8* генийн промотор хэсгийн мутаци, генийн дупликацитай, эсвэл интрон хэсгийн мутацитай холбоотой байж болох юм.

Гемофили Б тэй хүмүүсийн дунд илэрсэн c.223C>T, c.344 A>G, c.464G>C зэрэг мутацууд харьцангуй сайн судлагдсан бөгөөд өвчтөнд илэрсэн фенотип, хүндийн зэрэг нь өмнөх судлаачдын үр дүнтэй ижил байв.[17-19] Хөнгөн хэлбэрийн ГБ-тэй 2 хүнд *F9* генийн мутаци илрээгүй нь уг генийн промотор хэсгийг шалгах шаардлагатай харуулж байна. Учир нь *F9* генийн бид энэхүү судалгаагаар *F9* генийн промотор хэсгийг шалгаагүй бөгөөд ховор тохиолдолд энэ төрлийн мутаци нь хөнгөн хэлбэрийн гемофили Б-г үүсгэнэ.[20] Хүнд ГБ-тэй хоёр тохиолдолд илрүүлсэн c.187_188del болон c.1314_1314delA мутаци хэдийгээр био-информатикийн анализаар хүнд хэлбэрийн гемофилийн шалтгаан болж чадахыг тодорхойлж байгаа ч уургийн анализ, мРНХ-ийн тодорхойлох шинжилгээгээр баталгаажуулбал эдгээр мутаци гемофили Б-гийн эмгэг жамд хэрхэн нөлөөлж байгааг тодорхойлоход туслах юм.

Дүгнэлт: Хүнд хэлбэрийн гемофили А-ийн тохиолдлын дунд интрон-22 болон интрон-1 инверси мутаци өндөр давтамжтай илэрч байна. Шинээр тодорхойлогдсон *F8* генийн c.2240del, *F9* генийн c.187_188del болон c.1314_1314del мутаци нь Гемофили өвчний хүнд хэлбэрийг үүсгэж байна.

Талархал: Энэхүү судалгаанд оролцсон хүмүүс болон АШУҮИС-ийн Био-анагаахын сургуулийн Молекул биологи-Удамзүйн тэнхмийн хамт олон, мөн судалгааны лабораторийн ажилд тусалсан Д.Отгонсүрэн, У.Удвал, Б.Очбадрах, шавь Д.Хонгорзул, Б.Пүрэвбуян, Д.Даваадулам нар,

мөн судалгааг хийхэд зааж зөвлөсөн Jing-Sung Lee профессор нарт талархал илэрхийлье.

Ном зүй:

1. *Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. Haemophilias A and B. Lancet (London, England). 2003;361(9371):1801-9. doi:10.1016/s0140-6736(03)13405-8*
2. *Lakich D, Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. Nature genetics. 1993;5(3):236-41. doi:10.1038/ng1193-236*
3. *Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. Blood. 2002;99(1):168-74.*
4. *Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2020;26 Suppl 6(1-158. doi:10.1111/hae.14046*
5. *European Association for Haemophilia and Allied Disorders. Coagulation Factor Variant Databases. Accessed August, 2022. https://F8-db.eahad.org*
6. *The Human Genome Mutation Database. F9 gene. Updated 2022. https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=F9*
7. *Theophilus BD, Enayat MS, Williams MD, Hill FG. Site and type of mutations in the factor VIII gene in patients and carriers of haemophilia A. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2001;7(4):381-91.*
8. *Bardi E, Astermark J. Genetic risk factors for inhibitors in haemophilia A. European journal of haematology. 2015;94 Suppl 77(7-10. doi:10.1111/ejh.12495*
9. *Reitter S, Sturn R, Horvath B, et al. Spectrum of causative mutations in patients with haemophilia A in Austria. Thrombosis and haemostasis. 2010;104(1):78-85. doi:10.1160/th09-11-0795*
10. *Repessé Y, Slaoui M, Ferrandiz D, et al. Factor VIII (FVIII) gene mutations in 120 patients with hemophilia A: detection of 26 novel mutations and correlation with FVIII inhibitor development. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2007;5(7):1469-76. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02591.x*
11. *Riccardi F, Tagliaferri A, Martorana D, et al. Spectrum of F8 gene mutations in haemophilia A patients from a region of Italy: identification of 23 new mutations. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2010;16(5):791-800. doi:10.1111/j.1365-2516.2010.02228.x*
12. *Guo Z, Yang L, Qin X, Liu X, Zhang Y. Spectrum of Molecular Defects in 216 Chinese Families With Hemophilia A: Identification of Noninversion Mutation Hot Spots and 42 Novel Mutations. Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis. 2018;24(1):70-78. doi:10.1177/1076029616687848*
13. *You CW, Son HS, Kim HJ, Woo EJ, Kim SA, Baik HW. Mutation analysis of factor VIII in Korean patients with severe hemophilia A. International journal of hematology. 2010;91(5):784-91. doi:10.1007/s12185-010-0593-x*
14. *Ma GC, Chang SP, Chen M, Kuo SJ, Chang CS, Shen MC. The spectrum of the factor 8 (F8) defects in Taiwanese patients with haemophilia A. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2008;14(4):787-95. doi:10.1111/j.1365-2516.2008.01687.x*
15. *Chuansumrit A, Sasanakul W, Sirachainan N, et al. Association of factor VIII and factor IX mutations, HLA Class II, tumour necrosis factor-α and interleukin-10 on inhibitor development among Thai haemophilia A and B patients. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2017;23(6):e518-e523. doi:10.1111/hae.13344*
16. *Casaña P, Cabrera N, Cid AR, et al. Severe and moderate hemophilia A: identification of 38 new genetic alterations. Haematologica. 2008;93(7):1091-4. doi:10.3324/haematol.12344*
17. *Knobloch O, Zoll B, Zerres K, Brackmann HH, Olek K, Ludwig M. Recurrent mutations in the factor IX gene: founder effect or repeat de novo events. Investigation of the German haemophilia B population and review of de novo mutations. Human genetics. 1993;92(1):40-8. doi:10.1007/bf00216143*
18. *Kwon MJ, Yoo KY, Kim HJ, Kim SH. Identification of mutations in the F9 gene including exon deletion by multiplex ligation-dependent probe amplification in 33 unrelated Korean patients with haemophilia B. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia. 2008;14(5):1069-75. doi:10.1111/j.1365-2516.2008.01796.x*
19. *Belvini D, Salviato R, Radossi P, et al. Molecular genotyping of the Italian cohort of patients with hemophilia B. Haematologica. 2005;90(5):635-42.*
20. *Shen G, Gao M, Cao Q, Li W. The Molecular Basis of FIX Deficiency in Hemophilia B. International journal of molecular sciences. 2022;23(5):doi:10.3390/ijms23052762*

Mutation spectrum of *F8, F9* gene in Mongolian patients with Hemophilia A, B

Purevdorj M[1], Purevdorj I[1], Munkhtsetseg B[1], Tungalagtamir T[1], Sodnomtsogt L[2], Mannhalter Ch[3], Erkhembulgan P[1,4]

[1]Department of Molecular biology and Genetics, School of Bio-medicine, MNUMS, Ulaanbaatar, Mongolia
[2]Institute of Neuroscience and Psychology, Mongolian Academy of Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia
[3] Department of Laboratory Medicine, Medical University of Vienna, Vienna, Austria
[4]Health Department of Ulaanbaatar
E-mail: purevdorj.m@mnums.edu.mn, Tel: +976-88065768

Abstract:
Background: Identifying pathogenic variants in the *F8, F9* gene in patients with hemophilia A (HA) and Hemophilia B (HB) is crucial for improving genetic counseling, understanding genotype–phenotype correlations, assessing inhibitor risk, and establishing family-specific mutation profiles.
Aim: To detect mutations in the F8 and F9 genes among people with hemophilia A and B diagnosed in Mongolia.
Materials and Methods: Long-distance PCR were used to detect intron-22 and intron-1 inversions. Sanger sequencing identified nucleotide substitutions, deletion, and insertion in *F8* and *F9* gene.
Results: Thirty-two male patients with HA (30 severe, one moderate, and one mild) from 27 unrelated families, eight patients with Hemophilia B were analyzed. Among 25 families with severe HA, pathogenic variants were found in 24 families (95.6%). Large structural rearrangements were detected in 22 patients from 19 families, including intron-22 inversion in 16 cases of 14 families, intron-1 inversion in four cases from three families, and two large deletions found in two unrelated families. In one severe case, no pathogenic variant was identified in the entire *F8* gene. Small scale changes were identified in the remaining patients, including missense in three families and two frameshift variants, all associated with severe phenotype. We found novel c.2240del variant and classified as pathogenic. A known polymorphism (c.3864A>C) was identified in one patient with moderate HA, while a novel intronic deletion (c.1010-106delA) was detected in a patient with mild disease. Two families had a history of HB. A total of five different variants (c.223C>T; c.344A>G; c.464G>C; c.187_188del; and c.1314_1314delA) were identified in six patients with severe HB. Of these, two (c.187_188del and c.1314_1314delA) were novel. No variant in the entire *F9* was found in two patients with mild HB. Nonsense c.223C>T (p.Arg75*) mutation was detected in two unrelated patients.
Conclusion: Intron-22 (56%) and intron-1 (12%) inversions were detected in families with severe HA. A novel c.2240del variant was also identified in association with a severe phenotype. The novel variants c.187_188del and c.1314_1314delA of *F9* can cause severe Hemophilia B.

Keywords: Hemophilia A, Hemophilia B, *F8, F9*, Mongolia, mutation