

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra obecné zootechniky a etologie



**Hemofilie u psů a možnost využití psa jako modelu pro
studium analogického onemocnění u člověka**

Bakalářská práce

Autor práce: Veronika Marvanová

Vedoucí práce: Ing. Barbora Hofmanová, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma: "Hemofile u psů a možnost využití psa jako modelu pro studium analogického onemocnění u člověka" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Podpis _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Barboře Hofmanové, Ph.D. za odborné vedení, ochotnou pomoc, trpělivost a cenné rady, které mi při vypracování bakalářské práce věnovala.

Hemofilie u psů a možnost využití psa jako modelu pro studium analogického onemocnění u člověka

Souhrn

Tato práce se zabývá hemofilií psa a možnostmi aplikace poznatků získaných z léčby psů na léčbu člověka. Hemofilie je onemocněním vhodným k výzkumu moderních způsobů léčby, protože je známa po staletí a díky tomu je velmi důkladně prozkoumána. Jako dědičná na pohlaví vázaná porucha koagulace krve, která bývá běžně zaléčena substituční terapií, se hodí pro zkoumání genetických determinant a dnes významně přispívá k rozvoji nejmodernějších způsobů léčby.

Hemofilie je u psů i lidí zapříčiněna genovou mutací, která způsobuje absenci či nefunkčnost koagulačního faktoru VIII, nebo FIX. Tyto se u zdravého jedince účastní koagulační kaskády a umožňují tvorbu krevní sraženiny. Mutace způsobující hemofilii má tedy za následek zvýšený výskyt krvácení vzniklého spontánně, nebo po neadekvátním traumatu a pacienti trpí tvorbou hematomů, ztrátou krve, nebezpečným vnitřním krvácením, nebo pohybovými obtížemi a dalšími přidruženými problémy.

Fakt, že existují přirozeně nemocní psi trpící touto nemocí, u kterých je navíc možné srovnávat je s lidmi i přes rozdílný karyotyp díky vazbě na pohlavní chromozom, ve spojitosti s touhou lidí tyto psy léčit jen potvrzuje vhodnost hemofilie pro studium. Proto se pes, jako model objevuje u všech významných objevů týkajících se léčby hemofilie. Například u zrodu substituční terapie krevní plasmou a jejími koncentráty, kde studie na psech potvrdily bezpečnost a účinnost přípravků, nebo v posledních letech, kdy byla díky těmto modelům umožněna bezpečná aplikace genové terapie na člověka.

Hemofilie by se tak mohla v brzké době i díky psím modelům stát jednou z prvních geneticky podmíněných nemocí, jejíž projevy bude možno genovou terapií trvale napravit.

Klíčová slova: pes, hemofilie, dědičnost, terapie, zvířecí model

Hemophilia in dogs and use of a dog as a model for analogous disease in human

Summary

This compilation deals about hemophilia in dogs and options, how to apply findings obtained from studies on dogs to cure people. Hemophilia is suitable for research of modern healing methods, because it has been known for centuries and thanks to this it's thoroughly researched. As a hereditary, sex-linked coagulation disorder, which is normally cured by replacement therapy, is hemophilia ideal model for examining the genetics determinants and nowadays it significantly helps in development of modern methods of treatment.

Hemophilia in dogs and humans is caused by gene mutation, which brings the absence or dysfunction of coagulation factor VIII or FIX. These factors in a healthy individual participates on coagulation cascade and on blood clot creation. Hemophilia mutations increase incidence of spontaneous hemorrhage, or hemorrhage after minor trauma, and patients suffer by hematomas, blood loss, dangerous internal bleeding, difficulties in movement and other related problems.

The fact, that hemophiliac dogs naturally occurs, in addition with possibility to compare them with people despite the differences in karyotype, because of binding to sex chromosome, and finally in connection with people desire to treat these dogs, just confirms that hemophilia in dogs is suitable for studying. This explain why dog models were involved in all significant discoveries in hemophilia treatment. For example, dogs assisted in development of replacement therapy with plasma and plasma concentrates, where studies confirmed safety and efficacy of these substances. Within recent years dog models enables safety transfer of gene therapy to human patients.

Thanks to these studies hemophilia possibly become the first genetically conditioned disorder, which would be permanently cured by gene therapy.

Keywords: dog, hemophilia, heredity, therapy, animal model

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Cíl práce	8
3. Literární rešerše	9
3.1 Obecná charakteristika.....	9
3.2 Historie	9
3.2.1 Historie hemofilie	10
3.2.2 Historie léčby	11
3.2.3 Historie psa jako modelu pro studium hemofilie	12
3.3 Koagulace krve.....	13
3.3.1 Hemokoagulace u zdravého psa.....	13
3.3.2 Hemokoagulace u hemofilického psa.....	14
3.4 Klinické projevy hemofilie	15
3.4.1 Příčiny krvácení.....	15
3.4.2 Symptomatologie	15
3.5 Genetické aspekty hemofilie	17
3.5.1 Dědičnost	17
3.5.1.1 Základní chromozomální charakteristika	17
3.5.1.2 Principy dědičnosti znaků vázaných na pohlaví	17
3.5.1.3 Dědičnost v chovech, pravděpodobnost přenosu na potomstvo	18
3.5.2 Genetická determinace	19
3.5.2.1 Sekvence DNA	19
3.5.2.2 Mutace způsobující hemofilii	19
3.6 Metody léčby hemofilie.....	21
3.6.1 První experimenty.....	21
3.6.2 Substituční terapie.....	21
3.6.2.1 Substituce krevní plasmou a jejími koncentráty	21
3.6.2.2 Kryoprecipitát.....	22
3.6.2.3 Koncentráty plasmy v 70. a 80. letech 20. století	22
3.6.2.4 Desmopresin	23
3.6.2.5 Rekombinantní faktory.....	23
3.6.3 Genová terapie hemofilie psa.....	24
3.6.3.1 Metody genového transferu	25
3.6.3.2 Dělení metod genové terapie dle cílových tkání.....	27
3.6.4 Genová terapie hemofilie u člověka	29

3.6.4.1 Nevirová genová terapie hemofilie A.....	29
3.6.4.2 Genová terapie hemofilie B pomocí AAV vektoru	31
4. Závěr	34
5. Seznam použité literatury.....	35
5.1 Internetové zdroje.....	38

1. Úvod

Hemofilie se řadí mezi nejvýznamnější dědičné poruchy srážení krve. Z těchto onemocnění je hemofilie nejfrekventovanější, její výskyt je celosvětový a týká se jak psů většiny plemen, tak i lidí. Dalším důležitým faktem je, že hemofilie je známa lidstvu po dlouhou dobu a dnes jsou již dobře prozkoumány systémy a principy, na kterých nemoc funguje. Ve spojení s dalšími vlastnostmi je proto hemofilie vhodná a bezpečná pro výzkum léčebných metod.

Dnes je běžně možné projevy hemofilie korigovat a tím nemocnému psu ulevit od projevů krvácení, ale taková léčba je obtěžující a nákladná a navíc doživotní, protože není možné napravit stav trvale. V konečném důsledku léčba i napomáhá šíření hemofilie, protože nemocný pes se díky dnešní péči dožije pohlavní dospělosti a předá genetickou mutaci potomkům. Pro chovatele ale stále zůstává větší hrozbou bezpříznaková přenašečka hemofilie, která má významný vliv na nemocnost potomků, ale její včasná identifikace je zatím nemožná.

Pro tuto práci je ale nejdůležitější vztah mezi hemofilii u psa a u člověka. První podstatný fakt je, že koagulace krve funguje u psa i člověka na stejném principu. Za druhé jsou geny kritických koagulačních proteinů u obou druhů vázány na pohlavní chromozom, což umožňuje zanedbat rozdílný počet somatických chromozomů. Proto lze hemofilii u psa a člověka považovat téměř za ekvivalentní a je možné věnovat se této problematice jako celku.

2. Cíl práce

Cílem této práce je přehledně shrnout problematiku hemofilie psů, objasnit význam psa jako modelu pro výzkum a studium této nemoci a podstatné poznatky dát do souvislosti s hemofilii u člověka. Tato práce se bude zabývat historií hemofilie, její dědičností, patogenitou, klinickými příznaky, diagnózou a v neposlední řadě všemi dosud známými – již klinicky používanými i teprve testovanými - způsoby léčby.

3. Literární řešerše

3.1 Obecná charakteristika

Hemofilie je onemocnění, které se vyskytuje ve dvou formách, A a B. V obou případech se jedná o genetickou, na chromozom X vázanou poruchu hemokoagulace, neboli „poruchu srážení krve“ (Nichols et al., 2009). To znamená, že nemocný pes trpí různými typy krvácení (subkutánním, intramuskulárním, u psů velmi často intraartikulárním krvácením, tvorba hematomů) buď spontánně, nebo po neadekvátním traumatu (Mischke, 2012).

Jelikož je tato vada vázána na pohlavní chromozom X, tak se viditelné příznaky objevují pouze u pacientů samčího pohlaví a samice většinou zůstávají bezpříznakovými přenašečkami (Mischke, 2012)

Viditelné příznaky hemofilie jsou způsobeny nedostatkem funkčního koagulačního proteinu (Kaufman et Powell, 2013). Tento protein, také nazývaný „faktor“, se v těle pacienta s hemofilií buď vůbec nesyntetizuje, nebo se ho tvoří málo, anebo je tvořen faktorem nefunkčním, protože genetická informace pro jeho tvorbu nesená na chromozomu X je poškozená. U hemofilie typu A, ve zkratce hemA, je takto zasažena genetická informace pro faktor VIII a u hemofilie B, neboli hemB, je vadný gen pro faktor IX. (Nichols et al., 2009).

Onemocnění může mít různou intenzitu závažnosti, která je závislá na zbytkovém množství kritického faktoru v krevním oběhu. Obecně pro oba typy hemofilie a pro psy i lidské pacienty platí, že při zbytkovém množství faktoru 5-25% oproti zdravému jedinci jsou projevy hemofilie mírné. Při zbytkovém množství menším, než 1% pak nastávají nejtěžší projevy nemoci (Nichols et al., 2009; Mischke, 2012; Roth et al., 2001).

3.2 Historie

Hemofilie byla u lidí pozorována po staletí, ale o jejích příčinách a souvislostech se vědělo jen velice málo. Skrovné informace o principech nemoci byly doplněny a zpřesněny až ve 40. letech 20. století. To je také jeden z prvních popsání momentů, kdy byl k výzkumu použit nemocný pes, jako model (Mueller et Flotte, 2008). Od té doby bylo o hemofilii objeveno mnoho. Byla objasněna dědičnost mutací, principy koagulační kaskády a neustále jsou vyvíjeny nové způsoby terapie za účelem snížení mortality a morbidit. V poslední době se výzkumy zaměřují na vyvinutí léčby s dlouhotrvajícím účinkem pomocí moderních technologií, jako je například genová terapie. V neposlední řadě je podstatné, že hemofilie má

pro výzkum vhodné vlastnosti a případný úspěch nových technologií a postupů by v budoucnu mohl být aplikován u komplikovanějších chorob.

3.2.1 Historie hemofilie

Příznaky poruch srážení krve se u lidí vyskytovaly odedávna. Často vedly ke krvácení do vnitřních prostor, poškození kloubů, nebo intrakraniálnímu krvácení, až smrti. Hemofilie jako taková – na pohlaví vázaná genetická porucha - byla poprvé popsána před více než 1700 lety v Talmudu (Kaufman et Powell, 2013).

První „moderní“ popisy ale pocházejí až z 19. století (Schramm, 2014), kdy výzkum spočíval v pozorování pacientů s těžkou formou dědičné poruchy srážení krve, a v provádění primitivních laboratorních testů (Saito et al., 2011). Díky tomu ale byly poprvé přesněji klasifikovány genetické zákonitosti nemoci a hemofilie byla deklarována jako dědičná krevní porucha vázaná na chromozom X (Kaufman et Powell, 2013).

Nově popsaná nemoc v té době získala na proslulosti hlavně díky Královně Viktorii. Ta vládla Spojenému království Velké Británie a Irska v letech 1837 až 1901 a jako přenašečka hemofilie B nakazila své potomky (Kaufman et Powell, 2013). Dva její synové trpěli příznaky hemofilie a její dvě dcery byly přenašečkami. Jako členové anglické královské rodiny poté uzavřeli sňatky s jinými aristokraty a hemofilie se tak rozšířila do Ruského, Španělského a Pruského královského dvora. (Iltis, 1948). Tato rozšířená forma těžké hemofilie B je také známá pod názvem „Royal disease“, v překladu „Královská nemoc“ (Rogaev et al., 2009).

Významným mezníkem v historii hemofilie se stal rok 1905, kdy byla publikována „Klasická teorie koagulace krve“, která byla sumarizací všech dosud známých poznatků. Podle této teorie se koagulace krve účastní pouze čtyři faktory, a to trombokináza z poškozené tkáně, protrombin, fibrinogen a kalcium (Saito et al., 2011).

Na tuto teorii navázali další vědci a povědomí o mechanismech koagulace krve rostlo spolu s následnými objevy. V roce 1911 byl v lidské plasmě identifikován koagulační faktor VIII. a v roce 1937 byla objasněna jeho role v koagulační kaskádě (Kaufman et Powell, 2013). V průběhu 40. a 50. let 20. století byla koagulační kaskáda doplněna o zbylé srážecí faktory, mimo jiné o faktor IX, jehož deficit způsobuje hemofilii B (Saito et al., 2011). Další objevy už se příliš netýkaly nemoci jako takové, ale spíš možností léčby hemofilie.

3.2.2 Historie léčby

Historie léčby hemofilie se začíná psát v roce 1840, kdy bylo poprvé zaznamenáno, že kompletní krevní transfuze úspěšně zmírňuje průběh krvácivého záchvatu spojeného s hemofilii (Nichols et al., 2009; Kaufman et Powell, 2013). To byla po dlouhou dobu jediná možnost léčby.

Zlom nastal v roce 1936, kdy Patek a Stetson objevili látku, jež se nacházela v krevní plasmě zdravého člověka, ale nebyla přítomna v plasmě člověka s hemofilii. Navíc bylo ověřeno, že objevená substance i v malém množství úspěšně zkracuje čas koagulace hemofilické krve. Tento objevený protein byl později nazván antihemofilickým faktorem, antihemofilickým globulinem a poté faktorem VIII (Saito et al., 2011).

Když bylo ověřeno, v které složce krve se nachází účinná látka, byla ve 40. letech poprvé použita k terapii samotná krevní plasma. (Kaufman et Powell, 2013). Koncem 50. let se objevily první koncentráty derivované z plasmy, které byly dále používány pro substituční terapii „klasické hemofilie“ – typu A (Saito et al., 2011). Bylo je však také potřeba podávat injekčně a relativně často, kvůli krátkému poločasu rozpadu.

V polovině 60. let byl vyvinut takzvaný kryoprecipitát (Kaufman et Powell, 2013), ale přestože byl i v menším množství účinnější, pro složitost a nákladnost výroby nebyl masivně rozšířen (Mischke, 2012).

Nadále se k léčbě používaly hlavně injekčně podávané koncentráty proteinů derivované z plasmy, díky kterým existovala v 70. letech možnost domácí léčby pacientů. V 80. letech tyto koncentráty umožnily jeden z prvních úspěšných chirurgických zákroků u pacienta s hemofilii (Saito et al., 2011). Tyto produkty vyráběné z lidské plasmy však nesly obrovské riziko přenosu infekce a jejich masivní distribuce měla tragické následky (Nichols et al., 2009). Mezi pacienty s hemofilii byly tímto způsobem masivně rozšířeny nemoci jako hepatitis typu B i C, nebo HIV (De Brasi et al., 1995; Saito et al., 2011).

Paralelně s probíhajícími výzkumy bylo ve 2. polovině 20. století zjištěno, že při smíšení vzorků plasmy dvou hemofilických pacientů a zpětné aplikaci se příležitostně vyskytne terapeutický účinek. To vedlo k objevení dvou typů hemofilie, dnes známých jako hemofilie A a B. Dále bylo popsáno, které faktory u kterého typu chybí a tyto proteiny byly separovány pro studium (Kaufman et Powell, 2013).

V 80. letech došlo k jednomu z nepodstatnějších pro léčbu významných pokroků, a to k objasnění genové sekvence kódující vznik srážecích faktorů VIII a IX. Za prvé rozdílná velikost dvou objevených genů objasnila důvody různé prevalence hemofilie A a B (Kaufman

et Powell, 2013), a za druhé se objevila možnost srážecí faktory podle DNA uměle syntetizovat. Takto vytvořené rekombinantní faktory nenesou takové riziko přenosu krevních patogenů, jako faktory derivované z lidské plasmy (Nichols et al., 2009). Zůstává u nich sice nadále nutnost opakovaného injekčního podávání, ale jako nejefektivnější a nejdostupnější způsob léčby se rekombinantní faktory používají dodnes (Saito et al., 2011).

3.2.3 Historie psa jako modelu pro studium hemofilie

Zvířecí modely obecně byly odjakživa potřebné pro genetické testování lidských dědičných chorob a pro vývoj léků, ale ze všech zvířat byla pro akademické účely nejvíce používána laboratorní myš (Tsai et al., 2007). Pes ale sehrál podstatnou roli při objevování základních informací o hemofilii i ostatních koagulačních poruchách už ve 40. letech. Tehdy byla skupina nemocných psů se závažnou poruchou hemokoagulace poprvé použita pro výzkum. Díky tomu byly vyvinuty spolehlivější metody testování a poprvé byl umožněn racionální přístup k diagnostice poruch, jako je hemofilie (Nichols et al., 2009).

I přes značné úspěchy poté přestal být pes používán jako model na další desítky let. Až v polovině 90. let 20. století se trend obrátil a bylo publikováno několik podstatných důvodů, proč je pes vhodnějším modelem ke studiu, než laboratorní myš. Příkladem může být přirozený výskyt dědičných nemocí, existence inbredních populací s vysokým počtem nemocných jedinců, člověku mnohem bližší velikost, nebo fakt, že psům se dostává běžné lékařské péče stejně, jako lidem (Tsai et al., 2007).

Hlavním impulzem, který rozšířil možnost užití psa k výzkumu, byly v 90. letech významné pokroky v mapování genomové sekvence psa (Tsai et al., 2007). Díky tomu byly zaznamenány desítky úspěchů ve výzkumu i v léčbě hemofilie. Psí modely například napomohly při vývoji bezpečných a funkčních koagulačních faktorů pro substituční terapii, a nedávno pomohly prokázat i profylaktický účinek při preventivním podávání těchto faktorů (Nichols et al., 2009).

V poslední době hraje pes, jako model pro výzkum, nenahraditelnou roli při vývoji moderních způsobů léčby, jako je například genová terapie. High (2005) publikovala studii, kde popisuje, jak byla u psa s hemofilií pomocí různých strategií genového přenosu získána terapeutická hladina kritického koagulačního faktoru. I dnes tedy psí modely přispívají k významným objevům a mají potenciál k dalšímu využití.

3.3 Koagulace krve

Koagulace, neboli srážení krve, je jedním z nejdůležitějších mechanismů hemostázy. Působí zde desítky elementů a takzvané „srážecí faktory“, které fungují na principu kaskády. Aktivace dalších faktorů je v kaskádě přímo závislá na aktivaci faktorů předchozích. Vrcholem koagulační kaskády je vytvoření trombu, neboli krevní sraženiny, která v místě zranění zabraňuje ztrátám krve (Nichols et al., 2009).

3.3.1 Hemokoagulace u zdravého psa

U zdravého psa se výše popsaného procesu srážení účastní třináct koagulačních faktorů, které jsou společně s trombinem, fibrinem a trombocyty zodpovědné za vznik trombu (Mischke, 2012).

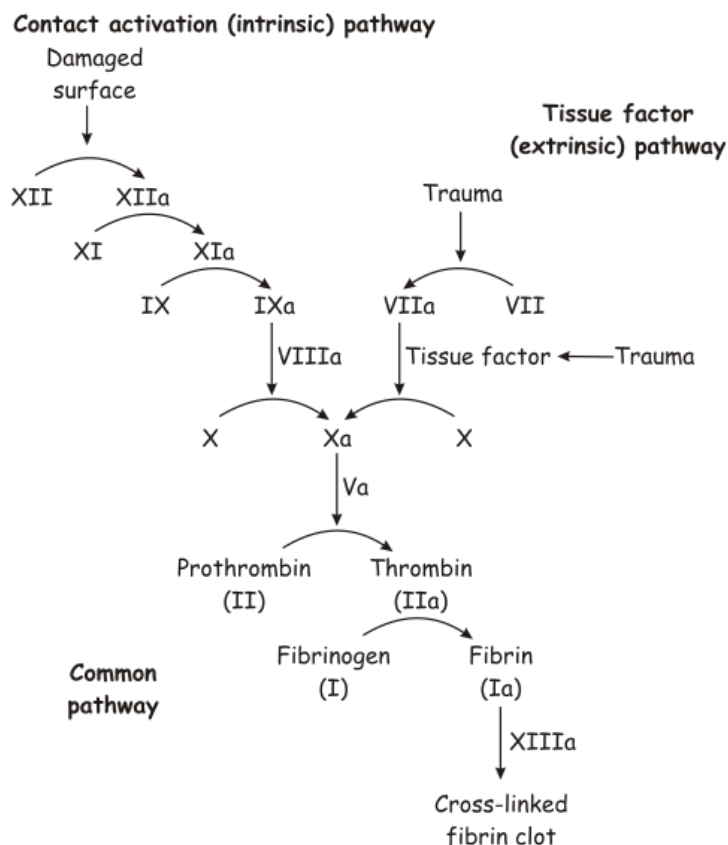
Koagulační faktory se označují římskými číslicemi I až XIII v pořadí, v jakém byly objeveny. Pokud je daný faktor aktivován, přidává se za jeho zkratku malé písmeno „a“ (tedy například „FVIIa“ značí aktivovanou formu faktoru VII).

Existují dvě cesty, jak aktivovat faktor X a tím i další prvky kaskády. První je takzvaná „vnější cesta“, která začíná kontaktem FVII běžně přítomného v plasmě s FIII, (také tkáňovým faktorem TF, neboli tromboplastinem), který se běžně vyskytuje ve tkáni a je vylučován, když je tkáň porušena. Komplex TF:FVIIa poté způsobí aktivaci FIX, který společně s FVIIIa aktivuje FX a tím zajistí i pokračování kaskády.

Druhá cesta „vnitřní“ je iniciována kontaktem krve s negativně nabitým nesmáčivým povrchem, jakým jsou například obnažená kolagenní vlákna. Ve spolupráci s dalšími bílkovinami se kaskádovitě aktivují faktory XII, XI a IX. Faktor IXa poté ve spolupráci FVIIIa aktivují FX.

Od okamžiku aktivace FX jsou další reakce společné pro obě cesty. FXa společně s FVa, kationty vápníku a fosfolipidy způsobí přeměnu FII na FIIa (protrombinu na trombin). Trombin se poté stává činitelem zodpovědným za přeměnu fibrinogenu na nerozpustnou fibrinovou síť a také aktivuje FXIII, který fibrin stabilizuje. Společně s trombocyty se takto vytvoří hemostatická zátka, neboli tromb.

(Nichols et al., 2009)



Znázornění koagulační kaskády

File:Coagulation_simple.svg. Wikipedia, The free encyclopedia. 22th April 2007 [cit. 2015-10-05]. Dostupné z <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Coagulation_simple.svg>

3.3.2 Hemokoagulace u hemofilického psa

Oba faktorové glykoproteiny FVIII a FIX působí v kaskádě blízko sebe a po předchozích reakcích umožňují aktivaci faktoru X (Madhok et al., 1991). Deficit i jednoho z nich způsobí, že faktor X aktivován není, nebo nedostává dostatečné podněty. To zapříčiní, že kaskáda není dokončena a nedojde tak k přeměně fibrinogenu na nerozpustnou fibrinovou síť, která za normálních okolností plní funkci opory a stabilizuje krevní sraženinu (Mischke, 2012). U pacienta, který tedy trpí deficitem jednoho z faktorů, se tromb buď vůbec nevytvoří, nebo se vytvoří za významně delší čas (Nichols et al., 2009).

3.4 Klinické projevy hemofilie

Vzhledem k místu působení obou zmiňovaných koagulačních faktorů v systému srážení krve jsou si i klinické projevy hemofilie typu A a B velice podobné. U takto zasažených psů i lidí pak dochází ke krvácení po minimálním traumatu, u těžších případů i spontánně (Mischke, 2012).

Jak uvedli Lawn a Vehat (1986) „Když těžce hemofilicky nemocný pacient není léčen, může trpět vnitřním krvácením i po minimálním nárazu a pravděpodobně zemře v mladém věku na následky krvácivé krize.“ Dnes je již ovšem díky dostupným způsobům léčby téměř nemožné nalézt pacienta s hemofilií, který by nebyl nikdy léčen (Mingozzi et High, 2013).

3.4.1 Příčiny krvácení

Jak je uvedeno výše, k nástupu krvácení může u psa s hemofilií dojít velmi snadno. První pozorované problémy často bývají při výměně mléčného chrupu za trvalý, nebo při zastřihávání drápků. Z běžných chirurgických intervencí pak může velké problémy způsobovat kupírování ocasu štěnat, nebo později kastrace (Mischke, 2012).

Extrémní případy těžce nemocných štěnat se však ani nemusí žádného z předchozích případů dožít. Mívají spontánní fatální příhody už v prvních dnech po narození, pokud vůbec přežijí následky přetnutí pupeční šňůry (Johnstone et Norris, 1984).

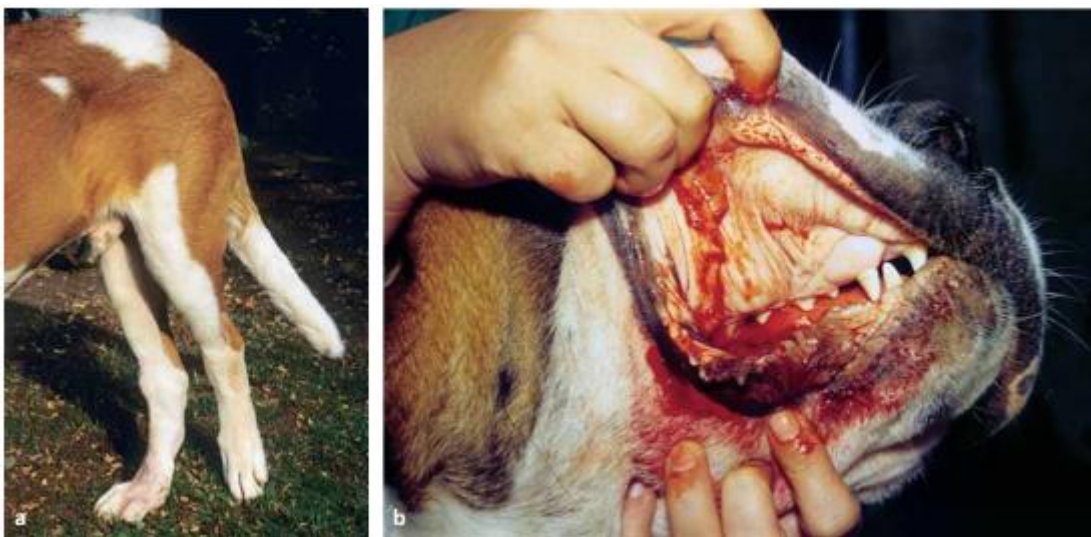
3.4.2 Symptomatologie

U hemofilického psa může být pozorováno krvácení do podkoží, krvácení mezi svalové fascie i přímo do svalů a jiných měkkých tkání. Mohou se tvořit proleženiny a rozšířené hematomy. Vzácněji se pak vyskytuje krvácení z nosu, hemoptýza neboli vykašlávání krve a gastrointestinální krvácení (Mischke, 2012).

Sekundárním pozorovatelným projevem může být i obtížná pohyblivost a kulhavost takového psa. Například Johnstone a Norris (1984) popisují případ pětiměsíčního německého ovčáka, který vykazoval takové příznaky, a postmortálně u něj byla diagnostikována hemofilie. Pohybové poruchy způsobené hemofilií mohou mít několik příčin. Může jít o krvácení do svalu, který následkem toho kontrahuje a po opakované příhodě dojde k jeho degeneraci. Mimo svaly může ale takové krvácení i nevratně poškodit místní periferní nervovou pletěň.

Dále je u psů velmi časté intraartikulární krvácení, jinými slovy krvácení do kloubu (Mischke, 2012). Při vniknutí krve do kloubního prostoru dochází ke změně složení synovie. Po opakovaném krvácení se na periferii kloubu vytváří takzvaný „pannus“, neboli klkovitě zbytnělá synoviální membrána prostoupená cévami a vazivem. Zvláště v těchto místech je následně poškozována chrupavka (Madhok et al., 1991).

Míra poničení kloubu je závislá na zátěži, proto jsou tyto problémy častější u mohutných plemen psů, u kloubů zadní končetiny a na dominantní straně. U těžších a neléčených případů může pravidelné intraartikulární krvácení vést až k degenerativní artritidě. Takto zasažený kloub bývá oteklý, velmi bolestivý a často je držen ve flexi (Madhok et al., 1991).



6měsíční bernardýn s hemofilií B

- a) těžká kulhavost na levou zadní nohu z důvodu akutního krvácení do kloubu
- b) krvácení při výměně zubů

Mischke (2012)

Nejzávažnějším projevem hemofilie je však krvácení do tělních dutin, které může být až fatální, není-li včas zpozorováno. Úplným extrémem je pak krvácení do CNS – do míšního kanálu, nebo intrakraniálního prostoru, které bylo pozorováno u pacientů s nejtěžší formou hemofilie a prakticky se neslučovalo se životem (Mischke, 2012).

3.5 Genetické aspekty hemofilie

Oba typy hemofilie jsou na pohlavní chromozom X vázané dědičné genetické choroby. Pochopení genetických principů, na kterých nemoc funguje, je nutným základem pro porozumění příčinám a následkům takové nemoci, ale i pro další studium a vývoj léčebných metod.

3.5.1 Dědičnost

Vzhledem ke své genetické determinaci, která bude podrobněji vysvětlena dále, je chybný gen způsobující hemofilii předáván při páření nemocného zvířete další generaci. Jak uvádí Tsai et al. (2007), jedná se o gonozomálně recesivní formu genetického onemocnění, neboli onemocnění nedominantní, vázané na pohlavní chromozom. Dědičnost hemofilie je proto specifická a její pochopení umožňuje vysledovat šíření onemocnění v populaci.

3.5.1.1 Základní chromozomální charakteristika

Obecně platí, že v jádře každé somatické buňky psa, člověka i většiny dalších savců, se od každého chromozomu nachází dvě identické kopie, takzvané homologní chromozomy, přičemž na takových chromozomech se vyskytují stejné geny. Každý z těchto chromozomů ale může od stejného genu nést různou formu neboli alelu. Celkově zde tedy platí, že jeden gen je v jádru somatické buňky přítomen v podobě dvou alel (Snustad et Simmons, 2009).

Oba kritické geny, pro tvorbu FIX a FVIII, jsou však vázané na gonozom X (De Brasi et al., 1995; Manno et al., 2003; Mischke, 2012). Ten se u samice nachází také dvakrát, ale u samce se vyskytuje pouze jeden. V jeho buňce je tedy přítomna od každého genu neseného na chromozomu X pouze jedna alela (Lawn et Vehat, 1986). Pro účely této práce bude bráno v potaz pouze to, zda je tato alela „zdravá“ – genetická informace není poškozena mutacemi, nebo je to alela s genetickou mutací způsobující hemofilii.

3.5.1.2 Principy dědičnosti znaků vázaných na pohlaví

Jako u savce platí u psa, stejně, jako u člověka, pohlavní systém XY. Samice zde zastupuje pohlaví homogametické – její karyotyp obsahuje dva chromozomy X. Pokud nebereme v úvahu průběh crossing – overů, které zde nejsou významné, je možné jeden chromozom X považovat za pocházející od matky a druhý od otce (Lawn et Vehat, 1986).

Samec je oproti tomu zástupcem heterogametického pohlaví – v jeho karyotypu se nachází jeden chromozom X od jeho matky a jeden chromozom Y od otce (Graves, 2006).

Zde se rýsuje objasnění zevních projevů hemofilie u samce a u samice. Jelikož na chromozomu Y se nacházejí jiné geny, než na chromozomu X (Graves, 2006), má samec pouze jednu alelu nesoucí informaci pro tvorbu koagulačního faktoru. Samec je tedy buď kompletně zdravý, když je alela nepoškozená, nebo má fenotypové projevy hemofilie, pokud je jeho alela defektní (Mischke, 2012). U samice však dochází k tomu, že každý její chromozom X nese svou alelu kritického genu (Graves, 2006). Mohou tedy nastat tři různé stavy:

1. Samice má na obou chromozomech X nepoškozenou alelu pro koagulační faktor, je tedy kompletně zdravá
2. Jeden z chromozomů X nese defektní alelu. Jelikož je však hemofilie recesivní onemocnění, poškozená alela je v pozadí za zdravou alelou druhého chromozomu a organismus ji nepoužívá k transkripci. Tudíž zde nedochází k žádným fenotypovým projevům hemofilie, ale defektní alela je předávána dalším generacím. Takové samice jsou nazývány přenašečkami a v chovech je třeba věnovat jim pozornost.
3. Oba chromozomy X mají poškozenou kritickou alelu. Takové kompletně hemofilické samice jsou extrémem a raritou inbredních populací plemen s úzkou genetickou základnou. Je výjimkou, pokud se takové samice vůbec narodí a nedojde ke spontánnímu potratu. Když porod přežijí, trpí těmi nejtěžšími projevy hemofilie a umírají ve velmi nízkém věku. Reprodukce je u takových samic téměř vyloučena.

(Lawn et Vehat, 1986)

3.5.1.3 Dědičnost v chovech, pravděpodobnost přenosu na potomstvo

Na základě předchozích údajů je možné určit pravděpodobnost narození hemofilického potomka, pokud je znám stav jeho rodičů. Zde mohou nastat čtyři různé kombinace:

1. Matka zdravá, otec zdravý: jejich potomstvo bude s největší pravděpodobností zdravé, je zde minimální riziko spontánního vzniku mutace způsobující hemofilii
2. Matka zdravá, otec trpící hemofilií: všichni synové tohoto páru budou zdraví, všechny dcery budou přenašečkami

3. Matka přenašečka, otec zdravý: 50% synů bude mít hemofilii a stejně tak 50% dcer bude přenašeček. U obou pohlaví je šance 1:1, že se narodí zdravý jedinec, nebo nositel defektní alely
4. Matka přenašečka, otec s hemofilií: zde mohou nastat se stejnou pravděpodobností 25% 4 varianty: zdravý syn, syn s hemofilií, dcera přenašečka a dcera s hemofilií. Poslední případ může mít zkreslené statistiky, jelikož většinou dochází k potratům a hemofilické nemocné samice se téměř nevyskytují. (Mischke, 2012).

3.5.2 Genetická determinace

3.5.2.1 Sekvence DNA

Aby bylo vůbec možno určit konkrétní příčiny vzniku hemofilie na molekulární úrovni, je nutné znát sekvenci DNA neboli přesné pořadí nukleotidů stěžejních genů. Gen pro FVIII psa byl izolován z chromozomu X pomocí cDNA týmem Ch. Camerona (1998) a sekvenci genu pro psi FIX publikoval Evans et al. (1989).

V nově objasněné genové sekvenci psa byla nalezena i odpověď na různou prevalenci hemofilie typu A, a typu B. Důvodem, proč je hemA u psů 4 až 5 krát častější, než hemB, je to, že gen kódující faktor VIII je mnohem delší a tím i náchylnější ke vzniku mutací, než gen pro FIX (Mischke, 2012).

3.5.2.2 Mutace způsobující hemofilii

S objasněním genových sekvencí šly ruku v ruce i objevy prvních známých mutací, neboli patologických změn sekvence DNA, způsobujících hemofilii. Existují různé druhy mutací, přičemž nemocný pes může mít jednu, ale i několik z nich najednou. Takové kombinované mutace často vedou k vážným a těžkým projevům hemofilie (De Brasi et al., 1995).

V kontrastu s tím je ale vhodné si uvědomit i evoluční hledisko hemofilických mutací. Takto těžce postižení jedinci se jen zřídka dožívali pohlavní dospělosti, tudíž nemohli poškozenou genetickou informací ovlivnit další generace. Evolučně tedy měly tyto mutace samy o sobě tendenci se vymýtit (Mischke, 2012).

Přesto je dnes hemofilie k nalezení u desítek plemen psů prakticky po celém světě. Důvodů k tomu je hned několik. Například šlechtění psů pomocí příbuzenské plemenitby při úzké genetické základně, navíc ještě ve spojení s moderními možnostmi, jak takové psy léčit

(Mischke, 2012). Vzniklé genetické mutace jsou pak dále přenášeny na potomstvo.

Mutací existuje několik desítek druhů. Pro hemofilii jsou tyto těmi nejzákladnějšími:

- mutace bodové: způsobené změnou v jediném nukleotidu
- missense mutace: druh bodové mutace, kdy změna nukleotidu způsobí funkční změnu kodonu (do řetězce výsledného peptidu je zařazena jiná aminokyselina)
- delece: část sekvence chybí
- inserce: je vpravena část sekvence jiného chromozomu
- duplikace: zdvojení části sekvence
- inverze: dojde k oddělení části řetězce, která je obrácena a pak opět napojena (De Brasi et al., 1995; Snustad et Simmons, 2009)

Nejčastějšími mutacemi, které způsobují u psů lehčí formy hemofilie, jsou bodové a zvláště missense mutace. Mezi ně se řadí i první objevená mutace způsobující hemB (Tsai et al., 2007). Naopak poruchy většího rozsahu, jako jsou delece, inserce, či duplikace, jsou mnohem méně časté a byly nalezeny pouze v pár nepříbuzných případech (De Brasi et al., 1995).

Mutace mohou vznikat na různých místech genu a v různých kombinacích. Kvůli velikosti genu pro FVIII není možno uvést definitivní počet mutací způsobujících hemA, ale hem B podle Tsai et al. (2007) způsobuje až 1 000 unikátních mutací na genu pro FIX.

Tyto chyby v genetické informaci se následně ve své konkrétní podobě přenášejí na další generace. Z toho pak mohou vzniknout i celé populace nemocných psů, zvláště u plemen s úzkou genetickou základnou (Mischke, 2012).

Svou konkrétní podobu má například hemofilie B u plemen rhodézský ridgeback, labrador a německý drsnosrstý pointer, kde se jedná o bodové mutace delečního a inzertního charakteru (Mischke, 2012). U jedné zvláštní proslulé populace psů s hemofilií A v Chapel Hill byla objevena inserce na 22. intronu (Nichols et al., 2009). Kombinovaná mutace pak například způsobuje deficit FIX plemene Lhasa-Apso. Zde byla popsána kompletní delece 772. – 776. nukleotidu a bodová mutace na 777. nukleotidu, kde byl cytosin zaměněn za thymin (Mauser et al., 1996).

3.6 Metody léčby hemofilie

Způsoby, jakými byla hemofilie kdy léčena, jdou ruku v ruce s historií. Než bylo objasněno cokoli o příčinách a principech nemoci, bylo možné léčit pouze sekundární projevy. Jedinou dostupnou možností tak byla místní hemostatická opatření spojená s prevencí vzniku i malého traumatu. To však mělo velký vliv na kvalitu života pacienta a i přes tuto snahu většinou docházelo k předčasným úmrtím zvláště u těžších případů.

Ve svých počátcích se léčba zabývala téměř výhradně lidskými pacienty. Pes byl sice používán, ale často pouze k ověření bezpečnosti vyvíjených preparátů a k pokusům. Dnes se již nemocným psům dostává běžné lékařské péče, přičemž zároveň napomáhají výzkumu nejnovějších metod léčby.

3.6.1 První experimenty

Přestože už v roce 1840 byly objeveny pozitivní účinky kompletní krevní transfúze (Nichols et al., 2009; Kaufman et Powell, 2013), ještě po roce 1900 se podle Ingrama (1976) v USA experimentovalo s nejrůznějšími dalšími prostředky léčby hemofilie. Uvádí, že z této doby existují záznamy o používání peroxidu vodíku, želatiny, inhalaci kyslíku, později o injekcích citrátu sodného, laktátu vápenatého, nebo o splenektomii (chirurgické odstranění sleziny). Většina z těchto metod ale nevykazovala uspokojivé výsledky.

Ingram (1976) dále pojednává i o 40. letech 20. století, kdy se podle něj hemofilie léčila rentgenovým ozařováním, autohemoterapií, perorálním podáváním tkáňového fibrinogenu, nebo hormonální terapií u žen. Jiní autoři (Saito et al., 2011; Kaufman et Powell, 2013) však do této doby zařazují mnohem pokročilejší způsob léčby, a to intravenózní podání krevní plasmy (viz. kapitola 3. 2. 2)

3.6.2 Substituční terapie

Od okamžiku, kdy se potvrdilo, že potřebná substance pro léčbu hemofilie se nachází v krevní plasmě, bylo vyvinuto mnoho typů substituční léčby založených na umělém intravenózním podání kritických elementů.

3.6.2.1 Substituce krevní plasmou a jejími koncentráty

Podání neupravené krevní plasmy bylo první možností léčby po objevení koagulačních faktorů. Vzápětí se začaly používat plasmové koncentráty, které v 50. letech znamenaly

revoluci v léčbě klasické hemofilie (Saito et al., 2011). Umožnily ranou kontrolu krvácení a rovněž bylo prokázáno, že mají profylaktické účinky (Mannucci, 2003).

3.6.2.2 Kryoprecipitát

Kryoprecipitát byl objeven v polovině 60. let (Kaufmann et Powell, 2013). Přípravuje se pomalým rozmrazováním zmražené krevní plasmy, fibrinogenu s FVIII a dalších složek. Výhodou je zde menší potřebný objem a minimální nežádoucí účinky. Mohl však být používán pouze pro léčbu hemofilie typu A, a kvůli složitosti výroby byl hůře dostupný pacientům (Mischke, 2012).

3.6.2.3 Koncentráty plasmy v 70. a 80. letech 20. století

V 70. letech byly nadále používány koncentráty krevní plasmy. Díky novějším technologiím ale dosahovaly výrazně vyšší čistoty. Bylo možné je užívat pro oba typy hemofilie a profylaxe pomocí těchto materiálů umožnila jednu z prvních chirurgických intervencí u člověka s hemofilií (Saito et al., 2011).

Výraznou změnou mimo jiné bylo, že nové koncentráty plasmy bylo možné skladovat a díky tomu se pacienti mohli léčit v domácím prostředí (Kaufmann et Powell, 2013). Péče o pacienty s hemofilií tím dosáhla velmi slušné úrovně a stala se nejúspěšnějším příkladem sekundární prevence chronického onemocnění (Mannucci, 2003).

Ať ale byly preparáty vytvářeny těmi nejčistšími technikami, stále se krevní plasma pro výrobu získávala od dárců, u kterých nebyla věnována dostatečná pozornost jejich zdravotnímu stavu. To způsobilo post-transfúzní infekci hepatitidou B a C u téměř všech léčených hemofilických pacientů (Mannucci, 2003; Roth et al., 2001). Stále ale bylo toto riziko výměnou za lepší kvalitu života přijatelné.

To se radikálně změnilo o deset let později, kdy se 60 – 80% pacientů s hemofilií v USA i v Evropě nakazilo virem HIV, kterým byly kontaminovány podávané koncentráty. Jedná se o jednu z největších tragédií v léčbě hemofilie, která si ale okamžitě vynutila reakci vědecké a lékařské komunity, což do budoucna vedlo k produkci stále bezpečnějších preparátů z lidské plasmy (Mannucci, 2003; Nichols et al., 2009).

Mimo to byla také zkoumána účinnost koncentrátů z krevní plasmy jiných živočišných druhů. Morrison et al. (1993) popisuje obstojný účinek derivátů z plasmy prasete na člověka s hemofilií. Mischke (2012) zase uvádí jako běžný terapeutický postup aplikaci lidských

plasmových koncentrátů hemofilickému psovi. V obou případech však autoři u těchto postupů přiznávají vyšší riziko imunitní reakce, a po opakovaném použití senzitivace, až anafylaxe.

3.6.2.4 Desmopresin

Desmopresin je název pro uměle syntetizovaný ekvivalent antidiuretického hormonu (ADH). Synonymum pro ADH „vasopresin“ poukazuje na jednu z funkcí tohoto hormonu, a to že způsobuje konstriktci krevních kapilár. Mechanismus působení této látky v těle je složitý a není dosud plně objasněn. Pravděpodobně ale také způsobuje uvolňování některých koagulačních faktorů z úložných míst, jelikož okamžitě zvyšuje jejich hladinu. Tento účinek má ale velmi krátké trvání (Mannucci, 1997).

Desmopresin je jednou z možností léčby pro pacienty, kteří na něj mají pozitivní reakce. To bývají případy lehké formy hemofilie typu A a von Willebrandovy choroby (Mannucci, 2003), která je způsobena deficitem von Willebrandova koagulačního faktoru (Ginsburg, 2001). U skupiny pacientů s lehkou formou hemofilie B nebyly zaznamenány žádné reakce na aplikaci desmopresinu, ti tedy museli být léčeni plasmovými produkty (Mannucci, 2003). Stejně tak se tato látka ukazuje jako neúčinná při léčbě deficitu FVIII u psů (Mischke, 2012).

Desmopresin dokáže zvýšit hladiny FVIII a vWF v plasmě bez nutnosti použití produktů z darované krve. Byl proto populární hlavně v éře, kdy se mezi pacienty s poruchami koagulace masivně šířil HIV. Časem léčba desmopresinem ale neobstála před přísnými klinickými studii a byla překonána příchodem nových, účinnějších metod (Mannucci, 1997).

3.6.2.5 Rekombinantní faktory

Rekombinantní koagulační faktory, neboli uměle syntetizované proteiny koagulační kaskády, mají několik významných výhod oproti derivátům lidské plasmy. Nesou pouze minimální riziko přenosu virových částic, mají vysokou účinnost a oproti výrobkům z plasmy jiných živočišných druhů ve většině případů nevyvolávají imunitní odpověď (Mannucci, 2003).

První dva rekombinované produkty s FVIII byly schváleny už v roce 1992 a o pět let později se tak stalo i u produktu s rekombinovaným FIX (Kaufmann et Powell, 2013). Dodnes je však problém s cenou těchto produktů a s jejich dostupností, která záleží i na zeměpisné oblasti. Oproti Kanadě a Irsku, kde bylo rozhodnuto, že pacienti budou léčeni výhradně

rekombinantními faktory, zůstává v USA 30 – 40% pacientů u plasmových produktů a v Evropě je toto číslo ještě vyšší. Navíc je třeba si uvědomovat, že stále velká část hemofiliků z celého světa má velmi omezený, nebo žádný přístup k jakékoli substituční terapii (Mannucci, 2003).

Dnes jsou rekombinantní koagulační faktory společně s moderními deriváty z krevní plasmy stále nenahraditelné a jsou masivně používány k léčbě hemofilie. Mimo jiné také umožňují výzkum a vývoj novějších metod léčby, jako je genová terapie. U té je často nutné provádět profylaktickou těmito léčbu substituenty, aby bylo možné ji bezpečně aplikovat (Saito et al., 2011).

3.6.3 Genová terapie hemofilie psa

Genová terapie je nadějným způsobem léčby hemofilie, ale stále se nachází ve fázi výzkumu. Jejím hlavním cílem je dosažení dlouhodobé terapeutické hladiny kritického faktoru bez nutnosti užívání substituentů. Základem všech typů genových strategií jsou metody genetické modifikace, kdy je do genomu fyziologicky odpovídající cílové buňky uměle vpravena správná kopie genu pro tvorbu koagulačního faktoru (High, 2005). Takto upravená buňka pak nový gen používá k transkripci a translaci, čímž dochází k syntéze potřebného proteinu.

V posledních letech jsou na tomto poli znát významné pokroky a pes jako model pro studium je zde nenahraditelný. High (2005) uvádí, že je důležité nejdříve prokázat účinnost a bezpečnost genové terapie u malých laboratorních zvířat (obvykle myš), poté u větších modelů (pes) a ideálně dokázat, že je to možné i u člověka.

Díky specifické kombinaci vlastností je hemofilie pro studování genové terapie velmi vhodné onemocnění. Mnoho autorů (Mannucci, 2003; Nichols et al., 2009; Roth et al., 2001; Manno et al., 2003) se shoduje na následujících důvodech:

1. Existují malá i větší přirozeně nemocná zvířata (hlavně myši a psi), která mohou sloužit jako modely pro studium
2. I dosažení mírného zvýšení hladiny faktoru může mít hemostatické, až terapeutické účinky. U těžkých případů může i minimální zvýšení hladiny faktoru znamenat výrazné zlepšení fenotypových projevů

3. Při zachované schopnosti odbourávat koagulační faktor je nulové riziko předávkování. Hladina i přes 100% pacientovi neublíží, není tudíž nutná regulace sekreční aktivity geneticky upravených buněk
4. Není podstatné, kde dochází k tvorbě faktoru. Ač jsou přirozeně syntetizovány v játrech, k jejich expresi může docházet v jakémkoli typu buněk, které jsou propojeny s krevním řečištěm
5. Měření vzniklé hladiny faktoru je možné běžnými krevními testy
6. Stačí upravit pouze takovou část orgánu, aby byla nahrazena sekreční funkce. Korektura celého orgánu není nutná (dle Nicholse et al. (2009) na rozdíl od jiných vrozených onemocnění, jako je například muskulární dystrofie, nebo cystická fibróza).

Zároveň je ale u genového transferu několik kritických elementů. Mingozi a High (2013) uvádějí tři. A to gen, který má být přenesen, vektor využitý pro dopravení genu do buňky a cílová buňka nebo tkáň, kde má být gen uložen a plnit svou funkci.

U přenášeného genu je důležitá jeho velikost, proto je k dispozici mnohem více studií o hemofilii B, jelikož gen pro FIX je menší a snáze přenositelný. Vektor je kritický v tom smyslu, že bývá tvořen virovou částicí, a proto určuje toxicitu podávané látky. Co se týče cílové tkáně, je pro přijetí upravených buněk nejpodstatnější místní imunitní odpověď.

3.6.3.1 Metody genového transferu

Nevirová genetická úprava buněk

Pozměnění genetické informace buňky je velmi složité a vyžaduje odborné laboratorní provedení pomocí nejmodernějších technologií. V praxi to obnáší přenesení holé molekuly DNA do buňky, která je pomocí fyzikálního působení různého druhu donucena dodávanou sekvencí přijmout. Roth et al. (2001) například popisuje neviróv přenos DNA do izolované buňky pomocí elektroporace. Takto upravená buňka je namnožena a výsledný materiál je vpraven do těla pacienta, kde by mělo docházet k expresi koagulačního faktoru.

Genový transfer za pomoci virů

Vir je vhodný jako vektor díky svým přirozeným vlastnostem. Sám o sobě se nedokáže rozmnožovat. Jeho strategií je napadat okolní buňky a vpravit do jejich genetické informace vlastní sekvenci, čímž je donutí vytvářet nové virové částice. Tento genový přenos je využit pro terapeutické účely tak, že se virem nechá přenést a vpravit do buňky upravená

DNA nesoucí informaci pro tvorbu chybějícího proteinu, přičemž část původní virové sekvence kódující nežádoucí vlastnosti viru je inaktivována, nebo odstraněna (Morrison et al., 1993).

Vektory se dále dělí podle typu použité virové partikule:

1. Retrovirové vektory

Podle Tsai et al. (2007) byly retrovirové vektory jedny z prvních, které byly vůbec používány. Existuje k tomu několik důvodů. Retroviry jsou schopny se dostat do širokého spektra buněk, mimo jiné i do hepatocytů, zde se permanentně integrují do genomu a tím umožňují dlouhodobou expresi produktu (retrovirová onemocnění jsou celoživotního rázu, patří sem i HIV). Prakticky jsou ale retrovirové vektory limitovány tím, že mohou napadat pouze dělicí se buňky a mají omezenou kapacitu (Nichols et al., 2009).

První úspěch s retrovirovou terapií u psa s hemofilií B zaznamenala studie Kay et al. (1993). Vektor byl vpraven do portálního oběhu psa a vstoupil až do 1% hepatocytů, které následně produkovaly FIX. Hladina faktoru byla sice nízká, ale i tak dokázala zkrátit celkový čas srážení krve (WBCT z anglického „whole blood clotting time“) z 50 minut na méně, než 15 a výrazně tak ovlivnit fenotypové projevy na více, než 5 měsíců. U hemofilie A bylo pomocí retrovirových vektorů také dosaženo obstojných výsledků, když se WBCT u testovaných psů zkrátily z více, než hodiny na 12 – 16 minut. Nadšení z výsledků ale opadlo kvůli vysokému riziku inzerčních mutagenéz u retrovirových vektorů (Nichols et al., 2009).

2. Adenovirové vektory

I adenovirové vektory jsou již ozkoušeny mnoha studiemi, Tsai et al., (2007) je popisuje jako schopné zařídit terapeutickou hladinu FIX, ale s krátkodobým účinkem. Dle Nicholse et al. (2009) byl po adenovirové terapii u psa s hemofilií B zaznamenán vzestup hladiny FIX téměř na normální hladinu na jeden týden, poté však hladina postupně klesala a po 70 - 100 dnech se vrátila do původního stavu. U psa s hemofilií A byl zase po adenovirové terapii zkrácen WBCT z 24,5 minuty na běžných 11,5 minuty, bohužel ale tento úspěch doprovázely vedlejší účinky, jako horečka a trombocytopenie.

Účinek je zde vždy limitován imunitní odpovědí pacienta, jelikož adenoviry běžně způsobují lehká virová onemocnění a různí jedinci na ně mají různé imunitní reakce. Imunitní systém může způsobit až zánětlivou reakci a destrukci tkání zasažených virem. Některé

výzkumy se proto zabývají vlivem imunosupresiv po adenovirové terapii (Nichols et al., 2009).

Modernější formou adenovirového vektoru jsou HD adenoviry (helper – dependentní), jejichž replikace je závislá na pomocném viru. Takový vektor má mnohem menší toxický účinek na játra pacienta a zároveň vykazuje obdobně dobré výsledky. Tento adenovirový vektor se sníženou toxicitou zaznamenal úspěch jak u terapie psa s hemofilií A (Brown et al., 2004), tak u hemofilie B (Nichols et al., 2009).

3. Adeno-asociované virové (AAV) vektory

AAV jsou v současnosti nejstudovanějšími vektory pro genovou terapii. Výzkumy se k nim uchýlily kvůli potenciálu získat terapeutickou a zároveň dlouhotrvající hladinu koagulačních faktorů (Tsai et al., 2007). Podstatné je, že adeno-asociované viry nejsou patogenní. Také mají více druhů kapsidy, tudíž je možné léčit jiným typem AAV vektoru pacienta, který měl na předchozí virový vektor negativní imunitní reakce. Navíc jsou zde k dispozici desítky studií na myších, králících i nehominidních primátech. Největší překážkou úspěšné genové terapie pomocí AAV vektoru ale je, že na tento nepatogenní, běžně se vyskytující virus, má většina dospělých jedinců protilátky (Mueller et Flotte, 2008).

U AAV je publikováno několik způsobů, jak je dodat do těla pacienta. Kromě podání do jaterní žíly existují studie o aplikování do jaterní tepny, periferního žilního systému, nebo intramuskulárně. Pes léčený kterýmkoli z uvedených způsobů snášel tuto terapii dobře, ale výsledné terapeutické účinky se liší (Nichols et al., 2009).

3.6.3.2 Dělení metod genové terapie dle cílových tkání

Transplantace jater

Transplantace jater je považována za první formu genové terapie, přestože se od modernějších způsobů hodně liší. Poprvé byl tento způsob terapie použit před více než 40 lety u psa s hemofilií A z Chapel Hillské populace, u kterého byla následně zaznamenána významná korekce klinických projevů. Poté bylo dokázáno, že stejně dobře tato transplantace zlepšuje klinické příznaky i u hemofilie B. Kvůli omezenému množství dárců, dostupné substituční terapii a modernějším způsobům genové terapie ale zůstává transplantace jater v pozadí. Dnes se k ní přistupuje v krajních případech, jako je destrukce jater těžkou hepatitidou, nebo nezhoubným nádorem (Nichols et al., 2009).

Intramuskulární injekce

Podání vektoru do svalu (intramuskulárně) je výhodné v tom, že místo aplikace je snadno přístupné. Laboratorně *in vivo* bylo navíc dokázáno, že vektorem upravené svalové buňky jsou schopny produkovat biologicky aktivní FIX, přestože primárně neplní v těle sekreční funkci (Herzog et al., 1999).

Jedny z prvních pokusů s intramuskulární (IM) injekcí obnášely vpravení AAV vektoru upraveného pro tvorbu FIX. Bylo ověřeno, že ve svalových buňkách dochází po aplikaci injekcí k expresi produktu a přechodně se u těchto pacientů zlepšily fenotypové projevy hemofilie (Mueller et Flotte, 2008). U psa bylo zjištěno, že se stoupajícím množstvím vektoru v jedné dávce roste i riziko vzniku imunitní reakce a tvorby inhibitoru. Proto se vektor aplikuje ve více dávkách o malém objemu, někdy i do různých svalových skupin (Manno et al., 2003).

Herzog et al. (1999) ve své studii uvádí případ pěti psů s hemofilií B, kterým byl do různých svalových skupin v různých dávkách vpraven AAV vektor upravený pro expresi FIX. U všech následně docházelo k tvorbě faktoru, jehož mírně terapeutická hladina se v oběhu udržela až po 17 měsíců a pouze u jednoho z takto léčených psů se tvořily protilátky.

Vpravení vektoru do portálního systému

Aplikace genové terapie do portálního oběhu, nebo přímo do jater, má tu nevýhodu, že vyžaduje chirurgickou intervenci v podobě otevření dutiny břišní. Pacient proto musí předem podstoupit dostatečnou profylaxi substituenty, aby bylo možné takovou terapii vůbec provést (Scallan et al., 2003). Na druhou stranu ale intrahepatální dodání vektoru vykazuje ve studiích výrazně vyšší účinnost, než intramuskulární podání (Mueller et Flotte, 2008).

Úspěšnou genovou terapii pomocí AAV vektoru u psa s hemofilií A, kdy byl vektor vpraven do portální žíly, popisuje například Scallan et al. (2003): nebyla zjištěna toxicita; u psa s nižší dávkou se zkrátil WBCT ze 17 na téměř normálních 6 minut a po 14 měsících se udržel na 4 až 7 minutách (u zdravých psů je běžný WBCT 3 – 5 minut), jeho hladina FVIII dosáhla až 3,8% a po 14 měsících se udržela na 2,6%. Druhý pes navzdory vyšší dávce vektoru nedosáhl takového úspěchu, což vědci přičítají imunitní odpovědi. Jaterní biopsie druhého psa po prodělané terapii ale ukazuje, že genový přenos byl úspěšný. Je jasné, že dodání vektoru do portálního systému má obrovský potenciál.

3.6.4 Genová terapie hemofilie u člověka

Výše popsané typy genové terapie i způsoby podání jsou důležité poznatky, které jsou k dispozici hlavně díky studiím na zvířecích modelech a snahou je využít je u člověka. Podle Tsai et al., (2007) je v poslední době nejvíce probírána a ověřována aplikace AAV vektoru, který u psů prokázal svou bezpečnost a účinnost. Stále zde platí, že kvůli velikosti genu se většina těchto studií zabývá hemofilií B.

Dnes je k dispozici mnoho klinických studií většinou zahrnujících skupiny o maximálně desítkách lidských pacientů s hemofilií, kteří podstoupili genovou terapii různého typu. Je třeba v takových studiích pokračovat, aby se daly získané výsledky zobecnit, což v tuto chvíli nelze. Pro účely této práce zde proto bude uvedeno pro ilustraci několik kazuistik o aplikaci a získaných výsledcích genové terapie u člověka.

3.6.4.1 Nevirová genová terapie hemofilie A

Ve své studii publikované v roce 2001 popisuje Roth et al. (2001) metodu, kterou nazval „transkaryotická implantace.“ Jde o systém genové terapie člověka, který je založen na nevirovém přenosu DNA do cílové buňky.

Do studie byla zařazena skupina pacientů s hemofilií A, kteří měli úroveň FVIII v krvi pod 2% normální hladiny a měli šest a více krvácivých příhod za rok. Dále museli dosahovat nejméně 15 let věku, podstoupit před začátkem studie alespoň 50denní profylaxi substitučními preparáty, museli mít zachovanou schopnost odbourávat FVIII a byly stanoveny hladiny hemoglobinu a trombocytů v krvi, které museli účastníci splňovat. Vyřazeni byli pacienti s tvorbou inhibitoru proti faktoru VIII, ti s potřebou léčby fixní profylaktickou dávkou substituentu během studie, ti, kteří prodělali infekci nebo rakovinu z důvodu získané imunitní nedostatečnosti, účastníci jiné vývojové studie pro léčbu hemofilie, kde byl odstup mezi studii menší, než 30 dní, a také pacienti s anatomickými abnormalitami v dutině břišní, které by mohly způsobit komplikace při laparoskopii.

Bylo vybráno šest mužů, kteří tato kritéria splňovali. Dosahovali průměrného věku 46 let a průměrné váhy 70 kg. Těmto pacientům byla pomocí substituční terapie zvýšena hladina FVIII na 100%. Následně jim byl z povrchu paže po lokální anestezii odebrán vzorek plné tloušťky kůže, přičemž hladina FVIII byla udržována v normálu ještě 3 – 4 dny po zásahu.

Do dermálních fibroblastů získaných ze vzorku byl pomocí elektroporace vpraven gen pro faktor VIII. Následně byly stabilní geneticky upravené fibroblasty naklonovány a charakterizovány. Byla mimo jiné změřena aktivita sekrece FVIII, odhadnuty růstové

vlastnosti (*in vivo* zkouška tumorigenicity) a ověřena mikrobiální bezpečnost. Buňky vybrané pro implantaci byly den před laparoskopickým zákrokem důkladně promyty a vpraveny do stříkačky.

Dalším krokem této metody byla laparoskopická implantace 100, nebo 400 milionů těchto buněk do omenta pacienta, která proběhla přibližně sedm týdnů po biopsii kůže. Před operací a týden po ní pacienti profylakticky užívali substituční FVIII. Laparoskopie byla prováděna při kompletní anestezii a trokar měli chirurgové pod přímým dohledem.

Všech šest pacientů bylo den po operaci propuštěno na domácí ošetřování. Týden jim byla k dispozici sestra a následně pravidelně docházeli na kontroly. Monitoring byl ukončen dva roky po zákroku.

Výsledky studie byly uspokojivé. Kožní biopsie proběhla u všech pacientů bez komplikací a laparoskopie byla také dobře snášena. Nenastaly ani problémy po anestezii, ani žádné dlouhotrvající komplikace. Testy na protilátky proti FVIII vyšly u všech pacientů negativní. Následující přehled shrnuje dosažené výsledky u jednotlivých pacientů.

Pacient 1: příjemce nižšího množství fibroblastů. Žádné pozorované změny ve frekvenci krvácení, ani v hladinách FVIII v krvi, stejně, jako pacient 2.

Pacient 3: po deset týdnů po zákroku nezaznamenal žádný krvácivý záchvat a po 3 měsíce jeho stav nevyžadoval užívání substituční terapie FVIII. V osmnáctém týdnu (8 týdnů po poslední infuzi FVIII) vzrostla jeho hladina FVIII z 0.4% na 2% normálu. Poté hladina opět klesala, až se ve 12. měsíci dostala na 0.5%.

Pacient 4: hladina FVIII se ve čtvrtém týdnu po zákroku zvýšila z 0.4% na 0.8%, 0.6% bylo naměřeno v šestém týdnu po operaci. Není jasné, zda má toto zvýšení klinický význam.

Pacient 5: hladina faktoru VIII byla mezi 4. týdnem a 6. měsícem vyšší, než před zákrokem. Rozdíl těchto hladin byl malý, ale byla zjištěna korelace mezi zvýšenou hladinou FVIII v krvi a sníženou spotřebou substitučního FVIII.

Pacient 6: byly mu dodány buňky, které *in vitro* prokázaly nejvyšší sekreční aktivitu. Měsíc po implantaci těchto buněk bylo zaznamenáno snížení počtu krvácení. Měření v období bez krvácení a bez užívání substitučních látek prokázala přetrvávající zvýšenou hladinu FVIII. Nejvyšší byla tato hladina ve 12. týdnu, kdy dosahovala 4%, krátkodobě dokonce 5%. Během 12. měsíce FVIII opět sklesal na 0.5% a opět se objevilo spontánní krvácení. I tak ale byla v tomto případě po dlouhou výrazně snížena potřeba užívat substituční prostředky a výsledky u tohoto pacienta jsou velmi slibné.

Obecně autoři považují tuto studii za velmi úspěšnou, neboť zvýšení hladiny FVIII v krvi u čtyř ze šesti pacientů značí významný potenciál pro klinické využití tohoto typu genové terapie.

3.6.4.2 Genová terapie hemofilie B pomocí AAV vektoru

Manno et al. (2003) popisuje genovou terapii člověka, která využívá modifikovaný vir pro přenos sekvence DNA kódující faktor IX do svalových buněk pacienta.

Bylo vybráno 8 mužů starších 18 let s těžkou hemofilií B způsobenou missense mutací, kteří byli schopni se doma léčit substitučními prostředky, a nebyla u nich zjištěna tvorba inhibitoru faktoru IX. Pacienti nesměli mít těžce poškozená játra, onemocnění ledvin, ani infekční onemocnění a jejich krev musela obsahovat určené hladiny bilirubinu, transaminázy, alkalické fosfatázy a trombocytů. Přítomnost HIV ani hepatitis C nebyla důvodem pro vyloučení ze studie. Všichni pacienti byli předem písemně informováni o průběhu terapie.

Adeno – asociovaný virový vektor přenášející lidskou sekvenci pro faktor IX byl vytvořen rekombinantními DNA technologiemi z AAV sérotypu 2. Vektor obsahoval 2 invertované virové úseky DNA důležité pro rekombinaci, mezi něž byl vložen lidský minigen pro FIX (takový minimální fragment genu pro FIX, aby byla zachována jeho exprese ve stejné podobě, jako u celého původního genu [<https://en.wikipedia.org/wiki/Minigene>]). Pro tuto studii byly použity 4 oddělené skupiny vektoru.

Před procedurou byla subjektům koncentrátem upravena hladina FIX na 100% a byl proveden typ anestezie dle výběru konkrétního pacienta, aby mohl být do svalů injekčně vpraven vektor. Protože studie této metody u psa prokázala, že se zvýšenou dávkou v jednom vstříku roste riziko imunitní odpovědi, byla dávka jednoho vpichu limitována (1.5×10 vektorových genomů) a podána na více místech, přičemž byl zachován minimální rozestup 1 cm. Za cílovou tkáň byly zvoleny tyto svaly: musculus soleus, vastus lateralis a vastus medialis triceps surae a musculus deltoideus. Skupině s nejnižší dávkou bylo aplikováno 10 – 20 injekcí, střední skupině 30 – 50 injekcí a skupině s nejvyšší dávkou 80 – 90 injekcí, všechny vpichy byly označeny tuší, aby byly později lokalizovatelné.

Dále byly naplánované svalové biopsie tkáně v místě vpichu. Po dvou měsících od injekční aplikace ji podstoupilo všech 8 pacientů, jeden z pacientů i po 6 a jeden po 12 měsících. Odebrané vzorky z deseti biopsií byly okamžitě zmrazeny a pak dále upravovány a zkoumány.

Výsledky autoři hodnotí jako velmi uspokojivé a využitelné pro studii aplikace AAV do jater, kde předpokládají lepší sekreční vlastnosti. Dávka vektoru byla u všech pacientů snášena bez komplikací a nebyla zjištěna toxicita (byla ovlivněna hladina trombocytů u pacienta F, která ale souvisela s trombocytopenií a vrátila se do normálu). Na místě vpichu byly zaznamenány pouze malé a přechodné obtíže (hematomy, indurace, necitlivost) a v jednom případě zánětlivá reakce na barvivo.

Sekvence vektoru byly 24 hodin po injekcích zaznamenány v krevním séru a slinách všech pacientů, u některých i v moči, přičemž doba jejich setrvávání v těchto tekutinách byla individuální. Ani u jednoho pacienta nebyla za celou dobu studie zaznamenána tvorba inhibitoru FIX, ale určitá imunitní reakce a tvorba protilátek byla zpozorována u všech pacientů, i u HIV pozitivních.

Výsledky biopsií potvrdily transfer genu. Osm z deseti provedených biopsií to úspěšně prokázalo při testu PCR a dalšími testy byl mimo jiné zjištěn i uspokojivý počet kopií vektorové DNA ve vzorku. Dále byla různými způsoby zkoumána exprese genu ve svalové buňce. Všechny svalové buňky si zachovaly zdravou stavbu a v 8 z deseti biopsií byly potvrzeny oblasti aktivní v expresi, které těsně přiléhaly k oblastem bez exprese. Mimoto se při testech jasně zbarvilo množství extracelulárních prostor vyplněných vyprodukovaným faktorem IX stejně, jako bylo pozorováno u zvířecích modelů.

Nejvyšší dosažená hladina FIX v krvi byla u subjektu A 1,4% a po 8 týdnů měl tento pacient vyšší hladinu FIX, než původně. Žádný další pacient neměl hladinu vyšší, než 1%, přesto 4 z nich dosáhli malého zvýšení oproti původnímu stavu. Osm z 10 pacientů muselo dále užívat substituční léčbu v původním rozsahu. U pacienta A bylo možno redukovat příjem substituční terapie po dva roky na 50% původní dávky a u pacienta B došlo k 50% snížení dávky minimálně na 3,5 roku.

Tato klinická studie jako první popisuje genovou terapii hemofilie pomocí AAV vektoru podaného parenterálně. Bylo ověřeno, že je tato metoda bezpečná a proveditelná i u člověka. Na těchto základech může pokračovat studie aplikace do jater, kde je oproti svalu šance na větší efektivitu sekrece a tím na větší terapeutický účinek.

I díky studiím, jako jsou tyto, je dnes umožněno dále pracovat s AAV vektory a pomocí moderních technologií dosahovat lepších výsledků zvláště v případě aplikace do jater, která má velký potenciál. Největším problémem stále zůstávají neutralizující protilátky proti AAV kapsidě a stále existují i další překážky zabraňující běžné klinické aplikaci. Je zde ale velká pravděpodobnost, že se genová terapie AAV vektory brzy stane běžnou praxí pro léčbu hemofilie (Mizukami et al., 2016).

4. Závěr

Cílem této práce bylo vypracovat literární rešerši o hemofilii psa a všech známých aspektech této dědičné poruchy hemokoagulace. Práce obsahuje shrnutí současných znalostí o dané problematice publikovaných ve vědecké literatuře s důrazem na možnost využití poznatků získaných u psa k aplikaci na člověka.

Dle mého názoru byl splněn cíl přehledně seznámit čtenáře s danou problematikou. Používání přirozeně nemocných psů i ostatních zvířat k vyvíjení nových způsobů léčby jich i člověka považuji za oboustranně výhodnou spolupráci zvláště v případě, když by bylo následně i nemocným zvířatům běžně možné poskytnout péči adekvátní té lidské.

Hemofilie jako ideální příklad ke studiu genové terapie je na prahu svého trvalého vyléčení a myslím, že otevřela cestu pro takovou léčbu u dalších komplikovanějších onemocnění. Jsem ráda, že jsem měla příležitost se tomuto tématu věnovat.

5. Seznam použité literatury

Brown, B. D., Shi, C. X., Powell, S., Hurlbut, D., Graham, F. L., Lillicrap, D. 2004. Helper-dependent adenoviral vectors mediate therapeutic factor VIII expression for several months with minimal accompanying toxicity in a canine model of severe hemophilia A. *Blood*. 103(3). 804-810.

Cameron, C., Notley, C., Hoyle, S., McGlynn, L., Hough, C., Kamisue, S., Glies, A., Lillicrap, D. 1998. The canine factor VIII cDNA and 5' flanking sequence. *Thrombosis and haemostasis*. 79(2). 317-322.

De Brasi, C. D., Slavutsky, I. R., & Larripa, I. B. 1995. [Molecular genetics of hemophilia A]. *Medicina*. 56(5 Pt 1). 509-517.

Evans, J. P., Brinkhous, K. M., Brayer, G. D., Reisner, H. M., High, K. A. 1989. Canine hemophilia B resulting from a point mutation with unusual consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86(24). 10095-10099.

Ginsburg, D. 2001. von Willebrand disease. *Williams hematology*. 6th edn. Philadelphia: McGraw-Hill. 1813-28.

Graves, J. A. M. 2006. Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell*. 124(5). 901-914.

Herzog, R. W., Yang, E. Y., Couto, L. B., Hagstrom, J. N., Elwell, D., Fields, P. A., Burton, M., Bellinger, D. A., Read, S. M., Brinkhous, K. M., Podsakoff, G. M., Nichols, T. C., Kurtzman, G. J., High, K. A. 1999. Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nature medicine*. 5(1). 56-63.

High, K. 2005. Gene transfer for hemophilia: can therapeutic efficacy in large animals be safely translated to patients? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 3(8). 1682-1691.

- Iltis, H. 1948. HEMOPHILIA, "THE ROYAL DISEASE" And the British Royal Family. *Journal of Heredity*. 39(4). 113-116.
- Ingram, G. I. 1976. The history of haemophilia. *Journal of clinical Pathology*. 29(6). 469-479.
- Johnstone, I. B., Norris, A. M. 1984. A moderately severe expression of classical hemophilia in a family of German shepherd dogs. *The Canadian Veterinary Journal*. 25(5). 191.
- Kaufman, R. J., Powell, J. S. 2013. Molecular approaches for improved clotting factors for hemophilia. *Blood*. 122(22). 3568-3574.
- Kay, M. A., Rothenberg, S., Landen, C. N., Bellinger, D. A., Leland, F., Toman, C., Finegold, M., Thompson, A. R., Read, M. S., Brinkhous, K. M. 1993. In vivo gene therapy of hemophilia B: sustained partial correction in factor IX-deficient dogs. *Science*. 262(5130). 117-119.
- Lawn, R. M., Vehat, G. A. 1986. *The Molecular Genetics of Hemophilia*.
- Madhok, R., York, J., Sturrock, R. D. 1991. Haemophilic arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 50(8). 588.
- Manno, C. S., Chew, A. J., Hutchison, S., Larson, P. J., Herzog, R. W., Arruda, V. R., Tai, S. J., Ragni, M. V., Thompson, A., Ozelo, M., Couto, L. B., Leonard, D. G. B., Johnson, F. A., McClelland, A., Scallan, C., Skarsgard, E., Flake, A. W., Kay, M. A., High, K. A., Glader, B. 2003. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood*, 101(8). 2963-2972.
- Mannucci, P. M. 1997. Desmopressin (DDAVP) in the treatment of bleeding disorders: the first 20 years. *Blood*. 90(7). 2515-2521.
- Mannucci, P. M. 2003. Hemophilia: treatment options in the twenty-first century. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1(7). 1349-1355.

- Mauser, A. E., Whitlark, J., Whitney, K. M., & Lothrop, C. J. 1996. A deletion mutation causes hemophilia B in Lhasa Apso dogs. *Blood*. 88(9). 3451-3455.
- Mingozzi, F., High, K. A. 2013. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood*, 122(1). 23-36.
- Mischke, R. 2012. Hämophilie A und B beim Hund. *Tierärztliche Praxis-Ausgabe K-Kleintiere Heimtiere*. 40(1). 44.
- Mizukami, H., Mimuro, J., Ohmori, T., Sakata, Y., Ozawa, K. 2016. AAV Vector-Mediated Liver Gene Therapy and Its Implementation for Hemophilia. In *Gene Therapy and Cell Therapy Through the Liver* (pp. 59-73). Springer Japan. 690
- Morrison, A. E., Ludlam, C. A., Kessler, C. 1993. Use of porcine factor VIII in the treatment of patients with acquired hemophilia. *Blood*. 81(6). 1513-1520.
- Mueller, C., Flotte, T. R. 2008. Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene therapy*. 15(11). 858-863.
- Nichols, T. C., Dillow, A. M., Franck, H. W., Merricks, E. P., Raymer, R. A., Bellinger, D. A., Arruda, V. R., High, K. A. 2009. Protein replacement therapy and gene transfer in canine models of hemophilia A, hemophilia B, von willebrand disease, and factor VII deficiency. *ILAR journal*. 50(2). 144-167.
- Patek Jr, A. J., Stetson, R. P. 1936. Hemophilia. I. The abnormal coagulation of the blood and its relation to the blood platelets. *Journal of Clinical Investigation*. 15(5). 531.
- Rogaev, E. I., Grigorenko, A. P., Faskhutdinova, G., Kittler, E. L., Moliaka, Y. K. 2009. Genotype analysis identifies the cause of the “royal disease”. *Science*. 326(5954). 817-817.
- Roth, D. A., Tawa Jr, N. E., O'Brien, J. M., Treco, D. A., Selden, R. F. 2001. Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A. *New England Journal of Medicine*. 344(23). 1735-1742.

Saito, H., Matsushita, T., Kojima, T. 2011. Historical perspective and future direction of coagulation research. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 9(s1). 352-363.

Scallan, C. D., Lillicrap, D., Jiang, H., Qian, X., Patarroyo-White, S. L., Parker, A. E., Liu, T., Vargas, J., Nagy, D., Powell, S. K., Wright, J. F., Turner, P. V., Tinlin, S. J., Webster, S. E., McClelland, A., Couto, L. B. 2003. Sustained phenotypic correction of canine hemophilia A using an adeno-associated viral vector. *Blood*. 102(6). 2031-2037.

Schramm, W. 2014. The history of haemophilia—a short review. *Thrombosis research*. 134, S4-S9.

Snustad, P. D., Simmons, M. J. 2009. *Genetika*, Masarykova univerzita. s. 894. ISBN: 9788021048522

Tsai, K. L., Clark, L. A., Murphy, K. E. 2007. Understanding hereditary diseases using the dog and human as companion model systems. *Mammalian Genome*. 18(6-7). 444-451.

5.1 Internetové zdroje

Minigene [online]. Wikipedia, The free encyclopedia. 13th February 2016 [cit. 2016-01-08]. Dostupné z <<https://en.wikipedia.org/wiki/Minigene>>