

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГЕМОГЛОБИНОПАТИИ- β -ТАЛАССЕМИЯ
В РЕСПУБЛИКЕ УЗБЕКИСТАН

Давлатова Г.Н

Жураева Н.Т

Бобоев К.Т

Раджабова С.О

РСПИМЦ Гематологии МЗ РУз.

Ключевые слова: *Гемоглобинопатия, β -талассемия, пренатальная диагностика.*

Клинически проявляющиеся признаки талассемии выявлены у 1-5% населения земного шара, при этом носителей мутаций β -талассемии в мире насчитывается порядка 80 миллионов человек. Наиболее широко данное расстройство гемоглобиновой системы распространено в бассейне Средиземного моря, на Ближнем Востоке и в Азии. В соответствии с последними данными, около 7% всего населения мира являются носителями генов нарушений гемоглобина, и что 300000 - 500000 детей ежегодно рождаются с тяжелыми гомозиготными состояниями этих заболеваний (Всемирный Банк, 2006, отчет о совместном совещании ВОЗ и организации March of Dime, 2006).

Гемоглобинопатии распространились в связи с миграцией населения из эндемических районов в страны, где они крайне редко встречались среди коренных жителей. К таким странам относятся США, Канада, Австралия, Южная Америка, Великобритания и Франция, миграция в которые произошла около века назад и где сейчас группы этнического меньшинства представлены уже в своем четвертом или пятом поколении. Более поздние миграционные потоки из высоко эндемичных стран были направлены в Северную и Западную Европу (включая Германию, Бельгию, Нидерланды), где распространенность гемоглобиновых нарушений среди коренного населения была очень низкой. Еще более поздняя волна миграции направилась в Скандинавию[1,4].

Термином «талассемия» обозначается группа заболеваний крови, характеризующихся пониженным синтезом одного или двух типов полипептидных цепей (α или β), формирующих нормальную молекулу гемоглобина взрослого человека, результатом которого является снижение уровня наполнения эритроцитов гемоглобином и анемия. В зависимости от



того, в каком гене имеется дефект и от соответствующего влияния этого дефекта на синтез глобиновых цепей, выделяют α -талассемию или β -талассемию. Одной из наиболее часто встречающихся форм гемоглобинопатий является β -талассемия, которая возникает из-за генетического дефекта, приводящего к снижению или отсутствию синтеза β -глобиновой цепи в тетрамере гемоглобина [3,5]. Распространенность носителей генов данных заболеваний будет очевидно продолжать расти в Северной и Западной Европе даже при отсутствии дальнейшей миграции - в результате воспроизводства населения и браков между представителями разных сообществ. Соответственно, существует высокая степень вероятности в отношении того, что нарушения гемоглобина станут ведущими рецессивными нарушениями в регионе, представляя собой серьезную проблему для общественного здравоохранения.

Введение. Гемоглобинопатии являются наследственной патологией, обусловленной спектром генетических изменений, приводящих к модификации скорости синтеза полипептидных цепей глобина или замене аминокислот в полипептидных цепях и дезорганизации структуры гемоглобина, вследствие чего возникают клинически или лабораторно регистрируемые нарушения его функциональных свойств, связанных с транспортом кислорода или строения и функции эритроцитов [2,4]. Для успешного лечения пациентов с β -талассемией, увеличения продолжительности и улучшения качества жизни больных необходимо раннее выявление заболевания. Первичная диагностика β -талассемии проводится на основании клинических данных и данных лабораторной диагностики. Однако у детей с β -талассемией при рождении выраженных клинических проявлений заболевания, как правило, не наблюдается: клиническая картина основной талассемии проявляется в период от 6 до 24 месяцев, промежуточная и малая формы заболевания могут быть диагностированы в еще более поздние сроки, когда неэффективный эритропоэз, гемолиз и развитие тяжелой анемии приводят к задержке развития, деформация костей, повреждение органов и восприимчивость к инфекциям и другим клиническим проявлениям.

Научная новизна

Раннее выявление и улучшение диагностики и лечения больных бета-талассемией в Республике Узбекистан, а также снижение инвалидности и смертности среди них.

Материалы и методы исследования. Стратегия *генетического исследования* для верификации, выявления гетерозиготного носительства и пренатальной диагностики β -талассемии разработана на основе изучения



данных анамнеза и генетического материала, полученного из крови 78 больных с отягощенной наследственностью и клинико-лабораторными признаками гемоглобинопатии. Кровь в объеме 3 мл собирали в пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Результаты и обсуждение. Наличие гемоглобинопатии, связанной с нарушением структуры и функции гена β -глобина, подозревается у детей в возрасте до 2-х лет с тяжелой микроцитарной анемией, легкой желтухой и гепатоспленомегалией. При гематологических исследованиях у таких больных выявляют микроцитарную анемию, гипохромию, анизоцитоз, пойкилоцитоз и эритроциты с ядрами. Носители дефектного гена β -талассемии демонстрируют отсутствие эритробластов и менее выраженное, чем у больных снижение показателей MCV, MCH и эритроцитов. Повышение уровней HbA₂ и HbF может варьировать в зависимости от наличия мутации в одном или обоих аллелях гена β -глобина и генетического варианта изменения. На основании клинико-лабораторных данных больному ставят предварительный диагноз гемоглобинопатии и проводят дальнейшее исследование генетическими методами. Клинико-генеалогический анализ при β -талассемии, включающий изучение патологических признаков у пробанда (больного), его больных и здоровых родственников, заключается в составлении и анализе родословных, что позволяет определить наследственный и ненаследственный характер заболевания (признака), его моногенный или полигенный, доминантный или рецессивный вариант наследования. На рис. 5 изображены стандартные приемы и обозначения, применяемые при составлении родословных. Больной с гемоглобинопатией – индивид, с которого начинается исследование – является пробандом, его родные братья и сестры – сибсы. Каждый член родословной имеет свой символ и шифр, состоящий из двух цифр: римская цифра обозначает номер поколения (поколения нумеруют сверху вниз), арабская цифра – номер индивида при нумерации членов одного поколения последовательно, слева направо. Сибсы располагаются в родословной в порядке рождения. Пробанд, как правило, располагается в последнем изучаемом в данной родословной поколении родственников. Родословная должна охватывать не менее двух-трех поколений.



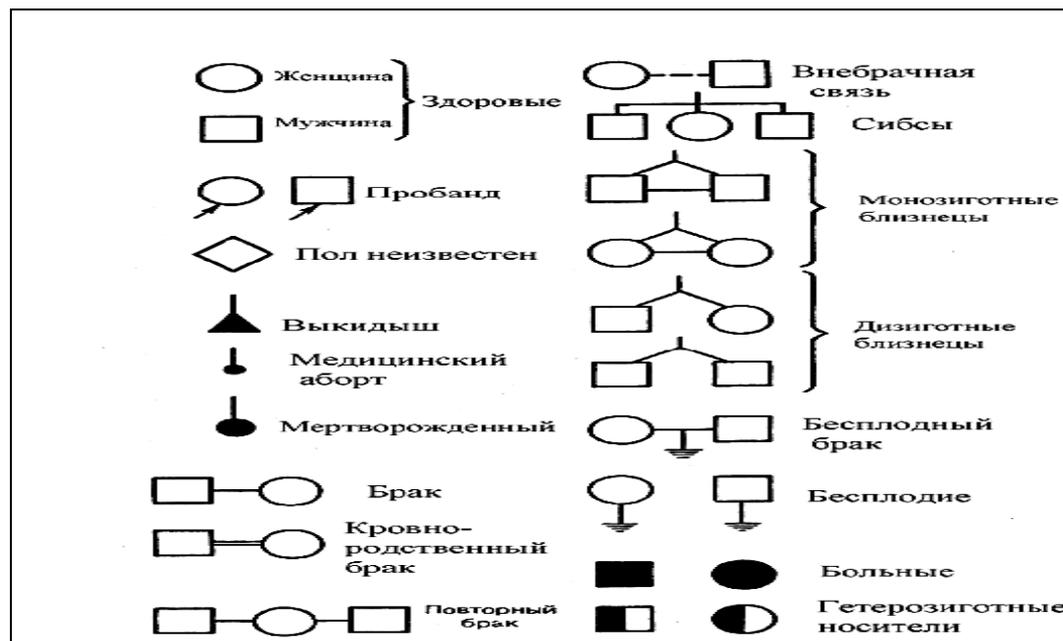


Рисунок 5.

Стандартные приемы и обозначения, применяемые при составлении родословных.

Сбор данных для составления родословной начинается с общих вопросов: ФИО, возраст, национальность пробанда и его родителей, наличие кровно-родственных браков в родословной между любыми родственниками, выявление индивидов с признаками гемоглобинопатии: бледность, желтушность кожи и слизистых, увеличение селезенки; патология развития скелета (башенный череп, уплощенная переносица, искривленный позвоночник), патологические переломы длинных трубчатых костей; боли в длинных трубчатых костях, отеки кистей; симптомы желчнокаменной болезни уже в детском возрасте, наличие длительно незаживающих язв на коже голеней, болей различной интенсивности и локализации и др.

После завершения сбора анамнестических данных проводится генеалогический анализ, заключающийся в определении варианта и типа наследования заболевания (признака) (рис.5). Для аутосомно-рецессивного типа наследования, присущего β -талассемии, характерно следующее:

1) Родители пробанда здоровы, но аналогичное заболевание может обнаруживаться у родных, двоюродных и троюродных сибсов пробанда, т. е. заболевание прослеживается в родословной по горизонтали (в одном поколении).

2) У больного родителя могут рождаются здоровые дети.

3) Риск рождения больного ребенка равен 25% (соотношение больных и здоровых лиц составляет 1:3).

4) В случае кровно-родственных браков между родителями пробанда наблюдается увеличение числа больных в родословной.

Если из родословной видно, что больные с признаками гемоглобинопатии обнаруживаются не во всех поколениях (исключается доминантный характер наследования признака), если признаки гемоглобинопатии встречаются как у мужчин, так и у женщин (исключается сцепление с Y-хромосомой), если имеет место передача заболевания от отцов к сыновьям (исключается сцепление с X-хромосомой), выдвигается гипотеза об аутосомно-рецессивном типе наследования признака, которая проверяется математически. С помощью критерия χ^2 проверяют, имеются ли в наследовании данного признака межполовые различия (Табл.1):

Таблица 1

Межполовые различия в наследовании признака болезни

Фенотип	Мужчины	Женщины	ВСЕГО
Здоровые	A	B	N-З
Больные	C	D	N-Б
ВСЕГО	N-M	N-Ж	N

Отсюда находим:

$$\chi^2 = \frac{N \cdot ([A \cdot D - B \cdot C] - N/2)^2}{(A+C) \cdot (B+D) \cdot (A+B) \cdot (C+D)}$$

Если полученное значение χ^2 меньше табличного 3,8 при $df = 1$, то гипотеза об отсутствии различий между полами подтверждается.

Далее решаем вопрос о достоверности различий между теоретически ожидаемым и фактическим количеством больных и здоровых потомков. Поскольку предполагаемые генотипы родителей в анализируемых семьях с аутосомно-рецессивно наследуемым признаком β -талассемии могут быть различны, то теоретически ожидаемое соотношение здоровых и больных индивидов, а также гетерозиготных носителей будет:

I. Родители: AA×Aa (здоровый и гетерозиготный носитель)

Потомки: AA, Aa, AA, Aa (2 здоровых, 2 гетерозиготных носителя)

II. Родители: AA×aa (здоровый и больной)

Потомки: Aa, Aa, Aa, Aa (4 гетерозиготных носителя)

III. Родители: Aa×Aa (2 гетерозиготных носителя)



Потомки: AA, Aa, Aa, aa (1 здоровый, 2 гетерозиготных носителя, 1 больной)

IV. Родители: Aa×aa (1 гетерозиготный носитель и 1 больной)

Потомки: Aa, Aa, aa, aa (2 гетерозиготных носителя, 2 больных)

Таким образом, больные индивиды рождаются при носительстве обоими родителями гетерозиготного генотипа Aa (теоретическое соотношение больных и здоровых детей составляет 1:3), а также у больного родителя (aa), если он вступил в брак с носителем гетерозиготного генотипа (теоретическое соотношение больных и здоровых детей составляет 2:2) (Табл.2):

Отсюда находим:

$$\chi^2 = \frac{N \cdot ([A \cdot D - B \cdot C] - N/2)^2}{(A+C) \cdot (B+D) \cdot (A+B) \cdot (C+D)}$$

Если полученное значение χ^2 меньше табличного 3,8 при $df = 1$, то различия между фактической и ожидаемой сегрегацией больных и здоровых недостоверны и гипотеза об аутосомно-доминантном наследовании гемоглобинопатии верна.

Таблица 2

Носительство обоими родителями гетерозиготного генотипа

Фенотип	Фактическое	Теоретическое при генотипах родителей Aa×Aa	Теоретическое при генотипах родителей Aa×aa
Здоровые	A	B *	B ***
Больные	C	D **	D ****
ВСЕГО	N	N	N
		* B = N/4 x 3 ** D = N/4 x 1	*** B = N/4 x 2 **** D = N/4 x 2

Молекулярно-генетическое исследование на основе полимеразной цепной реакции. Для выявления распространенных мутаций β-талассемии нами использовался метод полимеразной цепной реакции с набором праймеров, комплементарных наиболее распространенным мутациям в популяции, к которой принадлежит пораженный индивид.

Объектом исследования являлась ДНК, выделенная из периферической крови (ПК) больных β-талассемией. Выделение ДНК проводилось с помощью комплекта реагентов, который предназначен для выделения тотальной ДНК.



В ходе анализа исследуемые образцы ПК обрабатываются раствором для лизиса, в результате чего происходит деструкция клеточных мембран и других биополимерных комплексов и высвобождение нуклеиновых кислот и клеточных компонентов. После добавления раствора для преципитации и центрифугирования растворенная ДНК выпадает в осадок, в то время как другие компоненты лизированного клинического материала остаются в растворе и удаляются последующими отмывками. На завершающей стадии экстракции проводится растворение осадка в буфере для элюции, очищенная ДНК переходит в раствор. В результате указанной процедуры получается очищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования. Концентрация и чистота выделенной ДНК измеряется на спектрофотометре NanoDrop 2000 (США) при длине волны A260/280 нм по стандартной методике. Раствор геномной ДНК 1 мг/мл, эквивалентный 20 о.е. ДНК, хранится при -20°C . Ввиду недостаточной изученности спектра талассемических мутаций в различных регионах Республики Узбекистан мы выбрали тест-системы праймеров, которые позволяют охватить спектр мутаций β -глобинового гена, наиболее характерных для региона Средиземноморья, включая:

-30(T>A)	-101(C>T)
-87(C>G)	Codon5(-CT)
IVS1-1(G>A)	Codon6(G>A) HbC
IVS1-5(G>C)	Codon6(A>T) HbS
IVS1-6(T>C)	Codon6(-A)
IVS1-110(G>A)	Codon8(-AA)
IVS1-116(T>G)	Codon8/9(+G)
IVS1-130(G>C)	Codon15(TGG>TGA)
IVS2-1(G>A)	Codon27(G>T)
IVS2-745(C>G)	Codon39(C>T)
IVS2-848(C>A)	Codon44(-C)

В результате исследований пациентов (n=78) с клиническими признаками гемоглобинопатии, проведенных методом ПЦР с использованием тест-системы праймеров для детекции мутаций β -глобинового гена, характерных для региона Средиземноморья, нами было выявлено 11 специфических генетических аномалий (Табл.3):

IVS1-5(G>C)	Codon5(-CT)
IVS1-110(G>A)	Codon44(-C)
IVS2-1(G>A)	Codon15(TGG>TGA) Trp15Stop



IVS2-745(C>G)

Codon39(C>T)

IVS1-6(T>C)

-30(T>A)

IVS1-1(G>A)

Таблица 3.

Мутации, выявленные у больных (n=78) с клиническими признаками гемоглобинопатии и аутосомно-рецессивным типом наследования

Мутация	Кол-во больных, у которых выявлены мутации		Кол-во гетерозигот среди больных (Aa)		Кол-во гомозигот среди больных (aa)	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
IVS1-5(G>C)	2	3,8	1	2,6	1	1,3
IVS1-110(G>A)	1	1,3	1	1,3	6	7,7
IVS2-1(G>A)	1	1,3	1	1,3	1	1,3
Codon5(-CT)	7	8,9	4	5,1	3	3,8
IVS2-745(C>G)	7	8,9	4	5,1	3	3,8
Codon44(-C)	3	3,8	2	2,6	1	1,3
IVS1-6(T>C)	2	2,6	2	2,6	0	-
IVS1-1(G>A)	2	2,6	2	2,6	0	-
Codon15(TGG>TAG) Trp15Stop	2	2,6	1	1,3	1	1,3
Codon39(CAG>TAG) Gln39Stop	1	1,3	1	1,3	0	-
-30(T>A)	1	1,3	1	1,3	0	-
ВСЕГО больных, у которых были выявлены мутации	6	8,0	3	4,0	3	4,0



Таким образом, коммерческая тест-система праймеров для ПЦР, предназначенная для выявления мутаций β -талассемии, характерных для региона Средиземноморья, позволила обнаружить 11 генетических изменения β -глобинового гена из 22 исследуемых. Мутации β -талассемии были обнаружены у 63 (80,77%) больных из 78 (с учетом того, что у одного пациента могли встречаться по 2 мутации), при этом у 19,23% пациентов диагноз гемоглобинопатии остался неverifiedированным.

Секвенирование.

Метод секвенирования биополимеров нуклеиновых кислот заключается в определении их нуклеотидной последовательности, в результате чего получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров (А, Г, Ц, Т). Для секвенирования генов обычно применяют метод Сэнгера с дидезоксинуклеозидтрифосфатами (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP).

Секвенирование определенных областей генома по Сэнгеру стало золотым стандартом для диагностики мутаций талассемии. Секвенирование позволило относительно упростить анализ и охватить более широкий спектр мутаций, включая небольшие инсерции и делеции, однонуклеотидный полиморфизм (SNP) и вариации с большим числом копий (CNV). В результате исследований, проведенных методом секвенирования по Сэнгеру, наличие мутации β -глобинового гена в обследуемой группе учетных больных (n=78) с клиническими признаками гемоглобинопатии было выявлено нами у всех пациентов.

Таблица 4.

Мутации β -глобинового гена,
выявленные ПЦР и подтвержденные методом секвенирования по Сэнгеру

Мутации талассемии, выявленные ПЦР и подтвержденные методом секвенирования по Сэнгеру (всего 11 мутаций)	Мутации талассемии, выявленные методом секвенирования по Сэнгеру (всего 14 мутаций)
➤ IVS1-5(G>C)	➤ CAP-1(A>C) silent
➤ IVS1-110(G>A)	➤ Codon Start (ATG>ACG)
➤ IVS2-1(G>A)	➤ Codon16(-C)
➤ Codon5(-CT)	➤ Codon17(AAG>TAG)
➤ IVS2-745(C>G)	Lys17Stop
➤ Codon44(-C)	➤ Codon26(GAG>AAG)



➤ IVS1–6(T>C)	Glu26Lys (HbE)
➤ IVS1–1(G>A)	➤ Codon29(GGC>GGT)
➤ Codon15(TGG>TAG)	Gly29Gly
Trp15Stop	➤ Codon30(AGG>ACG)
➤ Codon39(CAG>TAG)	Arg30Thr
Gln39Stop	(Hb Monroe)
➤ –30(T>A)	➤ Codon30(AGG>AAG)
	Arg30Lys
	➤ Codon41-42(–TTCT)
	➤ Codon 8-9(insG)
	➤ Codon8(–AA)
	➤ IVS1–109>(del25)
	➤ IVS1–128(T>G)
	➤ IVS1–129(A>C)

Генетическое исследование методом секвенирования подтвердило наличие мутаций, выявленных ПЦР, а также позволило обнаружить мутации β-глобинового гена, не вошедшие в использованную тест-систему праймеров (Табл. 4).

Анализ выявленных генетических изменений с использованием базы данных Globin Gene Server (<https://globin.bx.psu.edu/>) и A database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias (https://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query_vars3) позволил установить патогенетическую принадлежность к β-талассемии всех мутаций, выявленных методом секвенирования по Сэнгеру.

Таким образом, проведенное нами исследование показало, что разработанная стратегия генетического обследования больных с клинико-лабораторными признаками гемоглобинопатии, помимо клинико-генеалогического анализа и молекулярного анализа на основе ПЦР с тест-системой базовых маркерных мутаций гена β-глобина, должна опираться на результаты секвенирования по Сэнгеру. При невозможности осуществить все этапы стратегии генетической диагностики, предпочтение должно отдаваться методу секвенирования. Высокая результативность последнего позволяет рекомендовать его для пренатальных исследований, а также для обследования родственников пробанда, предполагающих вступать в брак, для расчета риска рождения детей, больных β-талассемией, и разработки индивидуальной стратегии планирования семьи.



ЛИТЕРАТУРА:

- 1) Brancaleoni V, Di Pierro E, Motta I, Cappellini MD. Laboratory diagnosis of thalassemia. *Int J Lab Hematol*. 2016 May;38 Suppl 1:32-40. doi: 10.1111/ijlh.12527. PMID: 27183541.
- 2) Chen P, Yu X, Huang H, Zeng W, He X, Liu M, et al. Evaluation of Ion Torrent next-generation sequencing for thalassemia diagnosis. *J Int Med Res*. 2020 Dec;48(12):300060520967778. doi: 10.1177/0300060520967778. PMID: 33342339.
- 3) De Sanctis V, Kattamis C, Canatan D, Soliman AT, Elsedfy H, Karimi M, et al. β -Thalassemia Distribution in the Old World: an Ancient Disease Seen from a Historical Standpoint. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2017 Feb 20;9(1):e2017018. doi: 10.4084/MJHID.2017.018. PMID: 28293406.
- 4) Gunes AK, Gozden HE. The Spectrum of Beta-Thalassemia Mutations in Syrian Refugees and Turkish Citizens. *Cureus*. 2021 Jun 4;13(6):e15434. doi: 10.7759/cureus.15434. PMID: 34258108.
- 5) Jaing TH, Chang TY, Chen SH, Lin CW, Wen YC, Chiu CC. Molecular genetics of β -thalassemia: A narrative review. *Medicine (Baltimore)*. 2021 Nov 12;100(45):e27522. doi: 10.1097/MD.00000000000027522. PMID: 34766559; PMCID: PMC8589257.

