

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 26.05.2020
Принята к печати 22.06.2020

Контактная информация:
Манн Светлана Геннадьевна,
научный сотрудник лаборатории
молекулярной биологии ФГБУ
«НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: 9035974212@mail.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-3-50-53

Спектр генетических вариантов α - и β -глобиновых кластеров у пациентов с гемоглинопатиями, проживающих на территории Республики Дагестан

С.Г. Манн¹, Е.В. Райкина¹, И.М. Юнусова²

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ГБУ РД «Детская республиканская клиническая больница им. Н.М. Кураева» Министерства здравоохранения Республики Дагестан, Махачкала

Гемоглинопатии – это группа наследственных гемолитических анемий, распространенных в странах Средиземноморья, Юго-Восточной Азии и Африки, т. е. там, где ранее была распространена малярия. В связи с миграцией населения и увеличением числа смешанных браков данная проблема актуальна и для России. Среди субъектов Российской Федерации Республика Дагестан является наиболее эндемичным регионом по заболеваемости гемоглинопатиями. Данное исследование было направлено на выявление спектра мутаций у пациентов с гемоглинопатиями, проживающих на территории Республики Дагестан. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Материал 100 пациентов был направлен на молекулярно-генетическое исследование в лабораторию молекулярной биологии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Генетические варианты генов α - и β -глобиновых кластеров были определены с помощью метода мультиплексной лигазозависимой амплификации проб и секвенирования методом Сэнгера. Обнаружено 18 генетических вариантов, встречающихся с разной частотой. Частота мутаций β -глобинового кластера составила 62,5%, α -глобинового кластера – 23,2%, варианты, приводящие к возникновению аномального гемоглобина, – 14,3%. Также были определены 5 наиболее частых генетических вариантов среди данной когорты пациентов: CD8(-AA) и IVS1-110 (G>A), $-(\alpha)3.7$ и $-(\alpha)20.5$ и вариант CD6 GAG>GTG [Glu>Val], приводящий к возникновению аномального гемоглобина S.

Ключевые слова: гемоглинопатия в России, гемоглинопатия в Республике Дагестан, β -талассемия, α -талассемия, гемоглинобин S

Манн С.Г. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2020; 19 (3): 50–53.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-3-50-53

The spectrum of genetic variants of the α - and β -globin clusters in patients with hemoglobinopathies living in the Republic of Dagestan

S.G. Mann¹, E.V. Raikina¹, I.M. Yunusova²

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

²N.M. Kuraev Children's Republican Clinical Hospital, Ministry of Healthcare of the Republic of Dagestan, Makhachkala

Hemoglobinopathies are a group of hereditary hemolytic anemias common in the countries of the Mediterranean, Southeast Asia and Africa, where malaria was previously common. Due to population migration and an increase in the number of mixed marriages, hemoglobinopathies are also relevant to Russia. Among the Russian Federation's subjects, the Republic of Dagestan is the most endemic region for the incidence of hemoglobinopathies. This study aimed to identify the spectrum of mutations in patients with hemoglobinopathies living in the Republic of Dagestan. The research was approved by Independent ethic committee and the academic board of Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology (Moscow, Russia). Material from 100 patients was sent for molecular genetic research to the Laboratory of Molecular Biology, Federal State Budget Scientific Institution Scientific Research Center for Surgery named after Dmitry Rogachev. Genetic variants of the genes of the α - and β -globin clusters were determined using multiplex ligase-dependent amplification of samples and Sequencing by the Sanger method. Eighteen genetic variants with different frequencies were detected. The mutation frequency of the β -globin cluster was 62.5%, the α -globin cluster was 23.2%, and the variants leading to the appearance of abnormal hemoglobin were 14.3%. The five most common genetic variants among this cohort were also identified: CD8(-AA) and IVS1-110 (G>A), $-(\alpha) 3.7$ and $-(\alpha) 20.5$ and the CD6 variant GAG>GTG [Glu>Val] leading to abnormal hemoglobin S.

Key words: hemoglobinopathy in Russia, hemoglobinopathy in the Republic of Dagestan, β -thalassemia, α -thalassemia, hemoglobin S

Mann S.G., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2020; 19 (3): 50–53.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-3-50-53

Гемоглинопатии представляют собой наиболее распространенные аутосомно-рецессивные моногенные нарушения во всем мире. Среди них выделяют талассемии, вызванные нарушением синтеза полипептидных цепей, входящих в состав нормальных гемоглинобинов, и аномальные гемоглинобины, причиной

которых являются нарушения первичной структуры гемоглинобина [1].

По данным Всемирной организации здравоохранения, рождаются около 300 000–500 000 гомозиготных носителей данной патологии в год, из них большая часть приходится на серповидноклеточную

болезнь, причиной которой является аномальный гемоглобин S (HbS). Среди всех новорожденных с гемоглобинопатиями 60 000–70 000 случаев приходится на талассемию, около 50 000 из них умирают в раннем возрасте [2].

Гемоглобинопатии являются регион-специфичными нарушениями, каждая популяция имеет свой характерный спектр генетических вариантов [3].

В Российской Федерации заболевание распространено в Поволжье (среди башкир и татар) и Республике Дагестан, но в связи с миграцией населения и увеличением числа смешанных браков частота β -талассемии в гетерозиготном состоянии среди русской популяции составляет около 1% [4].

К настоящему времени описано более 2 000 мутаций, затрагивающих α - и β -глобиновые кластеры, которые приводят к возникновению различных форм гемоглобинопатии [5].

Основной причиной β -талассемии являются точковые мутации в промоторной области, кодирующей последовательности, сайтах сплайсинга и полиаденилированных сайтах гена *HBB*, расположенного на коротком плече 11-й хромосомы, приводящие к нарушению сплайсинга, сдвигу рамки считывания или образованию преждевременного терминирующего кодона. С меньшей частотой встречаются протяженные делеции, затрагивающие гены β -глобинового кластера и β LRC-регуляторные последовательности [2].

Наиболее частой причиной α -талассемии являются протяженные делеции, затрагивающие один или оба α -глобиновых гена (*HBA1*, *HBA2*), расположенных на коротком плече 16-й хромосомы [6].

Точковые мутации в генах α - и β -глобиновых кластеров, в результате которых происходит замена аминокислоты, приводят к образованию аномальных гемоглобинов. Такие гемоглобины могут иметь повышенное или пониженное сродство к кислороду или нестабильность белка [7].

Цель исследования: провести оценку распространенности и спектра мутаций при гемоглобинопатиях среди жителей Республики Дагестан.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. С 2017 по 2019 г. в лабораторию молекулярной биологии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России поступил материал 100 пациентов из Республики Дагестан в возрасте от 1 года до 14 лет, у которых по результатам консультации гематолога была заподозрена гемоглобинопатия. Законные представители всех пациентов подписали добровольное информированное согласие

Таблица 1
Последовательность праймеров

Table 1
Primer sequence

Праймер Primer	Последовательность Sequence
HBB_Promot_1ex_F	CAATATGCTTACCAAGCTGTGATTC
HBB_Promot_1ex_R	TATCAGAAACCCAAGAGTCTTCTCT
HBB_Promoter_Rseq	AGTTGTGTGTCAGAAAGCAAATG
HBB_1-2ex_F	AGGTACGGCTGTGCATCACTTAG
HBB_1-2ex_R	TCCCTTCTCTATGCATGAACCTT
HBB_2ex_Fseq	CATGTGGAGACAGAGAAGACTC
HBB_intr2_1F	GTGAGCTGCACTGTGACAAG
HBB_intr2_1R	CCT(G/T)ATTTGGTCAATATGTGTACAC
HBB_intr2_2F	AACTTTACACAGTCTGCCTAGTACA
HBB_intr2_2R	ACCCAGAAATTATCACTGTATTCTTTAG
HBB_intr2_3F	ATCTCTTTCTTTCCAGGGCAATAATGA
HBB_intr2_3R	CATTAGCCACACCAGCCAC
HBB_3ex_3UTR_F	GCTACAATCCAGCTACCATTCTG
HBB_3ex_3UTR_Rseq	GGTTTGAACCTAGCTCTTTCATTTTC
HBB_3ex_3UTR_PCR	CCTCACCTTCTTTTCATGGAGTTTAAAG
HBA1_3ex_F	CCCTCGGCCCACTGAC
HBA1_3ex_R	CCTGGCACGTTTGTGAGG
HBA2_3ex_F	GCCTGGGCCCACTGAC
HBA2_3ex_R	GTTGGCACATTCGGGATAGAGAG

на проведение молекулярно-генетического исследования α - и β -глобиновых кластеров.

Для сбора образцов цельной крови использовались пробирки с EDTA. Процедуру выделения ДНК из образцов осуществляли с помощью коммерческого набора реагентов “AmpliPrime DNA-sorb B” (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) согласно инструкциям производителя. Для элюции ДНК использовался TE-буфер. Концентрация и качество полученного препарата ДНК были оценены с помощью измерения на спектрофотометре NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Метод секвенирования по Сэнгеру использовался для детекции однонуклеотидных замен и непротяженных делеций, инсерций и дупликаций.

Секвенирование генов *HBB*, *HBA1* и *HBA2* проводили с использованием ДНК-праймеров, которые фланкируют 5'UTR, 3'UTR, 3 экзона и 2 интрона гена β -глобина и 3-й экзон генов *HBA1*, *HBA2* (таблица 1).

Для детекции крупных делеций и дупликаций, в том числе повреждений, затрагивающих регуляторные последовательности, один или несколько экзонов генов α - и β -глобиновых кластеров мы использовали метод мультиплексной лигазозависимой амплификации проб (MLPA, Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) с применением коммерческих наборов “SALSA MLPA P102 HBB probemix” (MRC, Holland, Netherlands) и “SALSA MLPA P140 HBA probemix” (MRC, Holland, Netherlands).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обнаружено 56 генетических вариантов, из них приводящих к β -талассемии – 62,5% ($n = 35$), к α -та-

лассемии – 23,2% ($n = 13$) и к возникновению аномального гемоглобина – 14,3% ($n = 8$).

Спектр мутаций β -глобинового кластера представлен 13 генетическими вариантами. Наиболее распространенными оказались CD8(-AA) и IVSI-110 (G>A), их частота составила 34,3% ($n = 12$) и 17,1% ($n = 6$) соответственно, из них 3 пациента были гомозиготны по CD8(-AA) и 1 – по IVSI-110 (G>A). Спектр мутаций α -глобинового кластера представлен 4 протяженными делециями. $-(\alpha)3.7$ и $-(\alpha)20.5$ встретились чаще остальных, их частота составила 46,2% ($n = 6$) и 38,5% ($n = 5$) соответственно; $-(\alpha)4.2$, --Med обнаружены в единичных случаях. У 3 (23%) пациентов выявлена гемоглобинопатия H в результате сонаследования $-(\alpha)3.7/-(\alpha)20.5$ и у 1 (7,7%) – $-(\alpha)3.7/--Med$. Генетический вариант CD6 GAG>GTG [Glu>Val], приводящий к возникновению аномального HbS, обнаружен у 7 пациентов,

что составляет 87,5% всех выявленных аномальных гемоглобинов в данной когорте. В 3 случаях вариант обнаружен в гомозиготном состоянии, в 1 случае HbS сочетался с β -талассемией (HbS+CD8(-AA)). Мутация CD30 (G>C) [Arg>Thr], приводящая к возникновению нестабильного варианта гемоглобина Монрое, обнаружена в единичном случае (12,5%) (таблица 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

ДНК-исследование глобиновых генов позволяет выявить как точечные мутации, так и делеции различной протяженности. Благодаря данному исследованию, мы выявили 5 наиболее часто встречающихся вариантов среди пациентов, проживающих на территории Республики Дагестан: CD8(-AA) и IVSI-110 (G>A), приводящие к β -талассемии, $-(\alpha)3.7$ и $-(\alpha)20.5$, приводящие к α -талассемии, CD6 GAG>GTG [Glu>Val], приводящий

Таблица 2

Спектр и частота 19 генетических вариантов, идентифицированных у пациентов с гемоглобинопатиями из Республики Дагестан

Table 2

Summary of the 19 identified mutations and their frequencies in patients hemoglobinopathies in Dagestan

№	Генетический вариант Mutation name	Номенклатура HGVS HGVS name	Аллельный фенотип Allele phenotype	Этническая принадлежность Ethnic origin	n	%	Гомозиготы, n Homozygotes, n
β-талассемия <i>β-thalassemia</i>							
1	CD8(-AA)	HBB:c.25_26delAA	$\beta 0$	Mediterranean	12	34,3	3
2	IVSI-110(G>A)	HBB:c.93-21G>A	$\beta +$	Mediterranean	6	17,1	1
3	IVSII-654 (C>T)	HBB:c.316-197C>T	$\beta 0/\beta +$	Chinese, SE Asian, Japanese	3	8,6	
4	CD15(G>A) (TGG-TGA)	HBB:c.48G>A	$\beta 0$	Portuguese, Japanese	3	8,6	
5	CD82/83(-G)	HBB:c.251delG	$\beta 0$	Azerbaijani, Czech, Croatian	2	5,7	
6	CD44(-C)	HBB:c.135delC	$\beta 0$	Kurdish	2	5,7	
7	CD8/9(+G)	HBB:c.27dupG	$\beta 0$	Asian Indian, Japanese, Pakistani	1	2,9	
8	IVSI-1(G>A)	HBB:c.92+1G>A	$\beta 0$	Mediterranean	1	2,9	
9	IVSII-1(G>A)	HBB:c.315+1G>A	$\beta 0$	Mediterranean, African-American, Pakistani	1	2,9	
10	CD 30 (G>A)	HBB:c.92G>A	$\beta 0$	Bulgarian	1	2,9	
11	CD41/42(-CTTT)	HBB:c.126_129delCTTT	$\beta 0$	Chinese, SE Asian, Indian, Thai	1	2,9	
12	CD37(G>A) (TGG-TGA)	HBB:c.114G>A	$\beta 0$	Saudi Arabian	1	2,9	
13	IVSII-745(C>G)	HBB:c.316-106C>G	$\beta +$	Mediterranean	1	2,9	
<i>Всего Total</i>					35	100,0	
α-талассемия <i>α-thalassemia</i>							
14	$-(\alpha)3.7$	N/A	$\alpha +$	Worldwide	6	46,2	
15	$-(\alpha)20.5$	N/A	$\alpha 0$	Mediterranean	5	38,5	
16	$-(\alpha)4.2$	N/A	$\alpha +$	Worldwide	1	7,7	
17	--Med	N/A	$\alpha 0$	Mediterranean	1	7,7	
<i>Всего Total</i>					13	100,0	
Аномальный гемоглобин <i>Abnormal hemoglobin</i>							
18	CD6 GAG>GTG [Glu>Val] (HbS)	HBB:c.20A>T	Sickle-cell	African, Indian, and many other	7	87,5	3
19	CD30 (G>C) [Arg>Thr] (Hb Monroe)	HBB:c.92G>C	Unstable	Mediterranean, African-American, N Africans, Kurds, UAE, African, Libyan, Tunisian, Pakistani	1	12,5	
<i>Всего Total</i>					8	100,0	

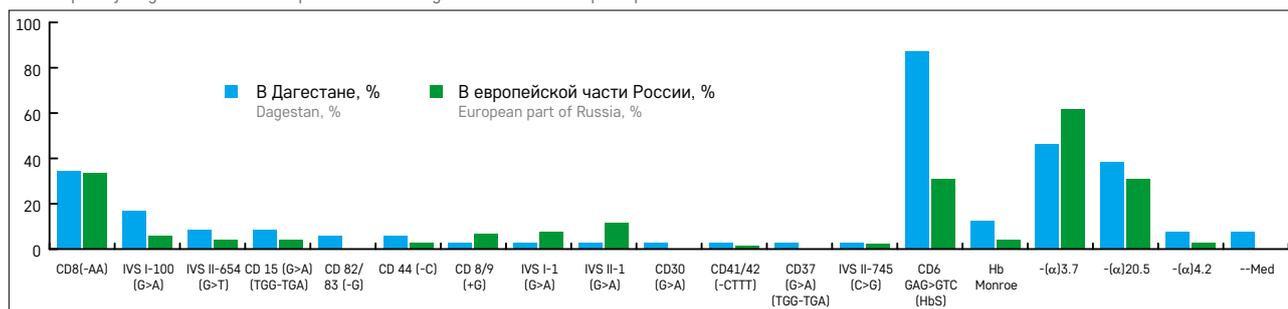
Примечание. HGVS – Общество по изучению вариаций генома человека; N/A – неприменимо.
Note. HGVS – Human Genome Variation Society; N/A – not applicable.

Рисунок

Частота встречаемости обнаруженных генетических вариантов у пациентов из Республики Дагестан и европейской части России

Figure

The frequency of genetic variants in patients from Dagestan and the European part of Russia



к возникновению аномального HbS. Все эти варианты, согласно последним данным, имеют очень высокую распространенность в Азербайджане (31%, 9%, 34%, 39% и 7% соответственно [5]). Среди всех республик бывшего СССР Азербайджан был признан наиболее эндемичным по распространению гемоглобинопатии. Научные исследования, проводившиеся в последние десятилетия в Республике Дагестан, показали, что талассемии и аномальный HbS встречаются в основном у лиц одной из многочисленных этнических групп – дагестанских азербайджанцев [8–12].

На рисунке представлены данные о частоте встречаемости обнаруженных генетических вариантов в европейской части России и Республике Дагестан. У пациентов с гемоглобинопатиями, проживающих на территории европейской части России, наиболее частыми также оказались варианты CD8(-AA) (42,4%), -(α)3.7kb (62%), -(α)20.5kb (31%), однако вариант CD6 GAG>GTG [Glu>Val], приводящий к возникновению аномального HbS, среди жителей Республики Дагестан встречается почти в 3 раза чаще (31% в европейской

части России и 87,5% в Республике Дагестан). Также 3 варианта: --Med, CD30(G>A) и CD82/83(-G) не были обнаружены у пациентов из европейской части России [13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования спектра молекулярно-генетических нарушений глобинового кластера позволят оптимизировать оказание не только специализированной помощи гематологической службой, но и медико-генетических консультаций региона.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено при спонсорской поддержке исследовательского гранта № 2196-ДОП, предоставленного ООО «Новартис Фарма».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Mann S.G. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1014-5196>

Raykina E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7634-2053>

Литература

- Goss C., Giardina P., Degtyarova D., Kleinert D., Sheth S., Cushing M. Red blood cell transfusions for thalassemia: results of a survey assessing current practice and proposal of evidence-based guidelines. *Transfusion* 2014; 54 (7): 1773–81. DOI: 10.1111/trf.12571
- Румянцев А.Г. Гемоглобинопатии и талассемические синдромы. Под ред. Румянцев А.Г., Токарева Ю.Н., Сметаниной Н.С. М.: Изд-во «Практическая медицина»; 2015. С. 196–197.
- Henderson S., Timbs A., McCarthy J., Gallienne A., Van Mourik M., Masters G., et al. Incidence of haemoglobinopathies in various populations – the impact of immigration. *Clin Biochem* 2009; 42 (18): 1745–56. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2009.05.012
- Лохматова М.Е., Сметанина Н.С., Финогенова Н.А. Эпидемиология гемоглобинопатий в Москве. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского* 2009; 87 (4): 46–9.
- [Электронный ресурс]. URL: <http://www.ithanet.eu/db/ithagenes>.
- Brimhall B., Hollan S., Jones R.T., Koler R.D., Stocklen Z., Szelenyi J.G. Multiple alpha-chain loci for human hemoglobin. *Clin Res* 1970; 18 (abst.): 184.
- Thom C.S., Dickson C.F., Gell D.A., Weiss M.J. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3 (3): a011858. DOI: 10.1101/cshperspect.a011858
- Постников Ю.В., Токарев Ю.Н. Пренатальная диагностика наследственных гемоглобинопатий. *Гематология и трансфузиология* 1988; (1): 39.
- Токарев Ю.Н., Хасаев А.Ш., Беляев В.В. Гемоглобинопатия в ДАССР. Гемолитические анемии: I Республиканская научная конференция. Душанбе; 1976. С. 18–19.
- Токарев Ю.Н. Важнейшие наследственные анемии. *Клиническая медицина* 1984; (2): 125–33.
- Токарев Ю.Н. Гемоглобинопатии: итоги и перспективы. 2-й съезд гематологов и трансфузиологов Азербайджана. Баку; 1990. С. 48–50.
- Хуцишвили Г.Э. Серповидноклеточная болезнь и β-талассемия: клиника, диагностика, лечение. Тбилиси; 1977.
- Mann S., Varlamova T., Raykina E., Kazanets E., Litvin E., Smetanina N. Mutation spectrum in HBB, HBA1 and HBA2 genes in patients from European part of Russia. 23rd Congress European Hematology Association, Sweden, Stockholm, June 14–17, 2018. PS1522.