

В.В. Саломашкина¹, О.С. Пшеничникова¹, Ф.Г. Перина², В.Л. Сури¹
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕМОФИЛИИ А В РОССИИ

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии», Москва

² ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», Екатеринбург

Введение. Гемофилия А (ГА) – распространенное X-сцепленное генетическое заболевание (около 1 на 5000 мужчин), обусловленное отсутствием или дефектами фактора свертываемости крови FVIII, кодируемого геном F8. Генетические нарушения, приводящие к ГА, в большинстве своем уникальны за исключением двух часто повторяющихся инверсий в области интронов 22 (inv22) и 1 (inv1), обуславливающих около 50% и 5% случаев тяжелой ГА, соответственно.

Цель. Определение спектра мутаций в гене F8, характерного для больных ГА в России, и оптимизация на его основе алгоритма молекулярной диагностики этого заболевания.

Материалы и методы. Материал от больных ГА и представителей их семей был собран в рамках многолетней работы по молекулярной диагностике ГА в России. Тотальную ДНК выделяли из цельной крови и сухих пятен крови с помощью фенол-хлороформного метода. При поиске мутаций в гене F8 у больных с тяжелой формой ГА сначала проверяли наличие инверсий inv22 и inv1, после чего для тех, у кого они не были выявлены, проводили секвенирование по методу Сэнгера всех экзонов и экзон-интронных сочленений гена F8. У пациентов со средней и легкой формами ГА сразу начинали поиск мутаций секвенированием. Протяженные делеции определяли по устойчивому отсутствию амплификации отдельных экзонов при успешной амплификации других.

Результаты. В исследование были включены 275 семей, затронутых ГА. Семьи были представлены пробандами (250), облигатами носителями заболевания в случаях, когда материал от пробандов был недоступен (21), а также в четырех случаях – женщинами, больными ГА. Форма ГА была известна для 249 семей, большинство из них имело тяжелую форму ГА (N=220, 88%), в то время как больных с легкой и средней формами было значительно меньше (N=6 (3%) и N=23 (9%), соответственно). В 84 случаях (30% выборки) было известно о наличии семейной истории ГА, в остальных случаях данных о других больных ГА в составе семьи не было. Для 270 пациентов из 275 нам удалось выявить нарушения в гене F8, оставшиеся пять пациентов страдали тяжелой формой ГА, однако секвенирование всех функционально значимых участков гена F8 не выявило никаких отклонений от нормы; также у них не были обнаружены inv22 и inv1. Таким образом, согласно нашим данным, сочетание проверки на inv22 и inv1 с секвенированием по методу Сэнгера

позволяет успешно идентифицировать генное нарушение в 98% случаев ГА. В тех случаях, когда нарушение не было выявлено, ГА может вызываться глубокими интронными мутациями, нестандартными инверсиями и дупликациями фрагментов гена. В исследованной выборке пациентов было выявлено 137 случаев inv22; для 123 из них установлена тяжелая форма ГА, т.е. частота inv22 составила 56% от числа случаев тяжелой ГА в выборке, что соответствует литературным данным. Было выявлено 9 случаев inv1 и 3 случая inv1, сопряженной с делецией или дупликацией прилежащих регионов. Помимо частых инверсий, выявлено 96 различных генетических нарушений, 90 из них представляли собой точечные дефекты (миссенс-мутации, микроделеции, микроинсерции, indel варианты), 61 из которых не были ранее описаны в мировой литературе. Также выявлено пять больших делеций (1,8% от общей выборки или 2,3% от числа больных с тяжелой ГА) с удалением от одного до восьми экзонов; в трех случаях из пяти в формировании делеции был вовлечен интрон 6, в двух оставшихся – интрон 22. У одного из пациентов было выявлено генетическое нарушение неясной природы, включающее разрыв в экзоне 14; возможно, имела место крупная инверсия. Только 12 мутаций, помимо частых инверсий, встречались более одного раза, остальные нарушения были уникальны. У семи из восьми пациентов из Свердловской области с легкой формой ГА была выявлена замена p.His634Arg в экзоне 12, уникальная для этого региона. Также несколько раз встретились инсерции и делеции нуклеотидов в составе полиадениновых трактов в экзоне 14, найденные суммарно в 10 семьях. Из четырех женщин, имевших клинические проявления ГА, в трех случаях нам удалось выявить мутацию в сочетании с асимметричной инактивацией X-хромосомы. В одном случае были выявлены две мутации.

Выводы. Определенные нами частоты встречаемости инверсий inv22 и inv1 соответствуют описанным для других популяций. Частота мутаций, не выявляемых сочетанием поиска inv22 и inv1 и секвенированием по Сэнгеру составляет 2%. Частота больших делеций среди больных с тяжелой формой ГА также составляет около 2%. Для пациентов с легкой формой ГА, происходящих из Уральского региона, секвенирование экзона 12 представляется целесообразным первым шагом.

С. И. Сафиуллина, Н. Г. Евтюгина, И. А. Андрианова, Р. Р. Хисматуллин, О. А. Кравцова, А. И. Хабирова, А. Г. Даминова, А. Д. Пешкова, Р. И. Литвинов

СЕМЕЙНЫЙ СЛУЧАЙ МУТАЦИИ ГЕНА MYH9, СВЯЗАННОЙ С НАРУШЕНИЕМ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

ФГАОУВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет", Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань

Введение. Мутации в гене MYH9, кодирующего субъединицу немышечного миозина IIA, нарушают динамику цитоскелета в мегакариocyтах, вызывая макротромбоцитопению, часто с кровотечением, механизм которого связан с тромбоцитами, но до конца не ясен.

Цель. Изучить структуру и функциональное состояние тромбоцитов у членов семьи с документированной мутацией гена MYH9.

Методы. Обследованы пробанд, ее сестра и их мать с признаками семейной макротромбоцитопении и геморрагического синдрома. Гематологическое обследование включало ОАК, мазок крови, проточную цитометрию тромбоцитов (экспрессия

P-селектина и активного интегринa αIIbβ3 до и после TRAP-индуцированной активации), кинетику ретракции сгустков крови, а также сканирующую и трансмиссионную электронную микроскопию тромбоцитов. Генетический анализ основан на секвенировании экзонов гена MYH9.

Результаты. Несмотря на тромбоцитопению (36x 10⁹/л у пробанда, 55x 10⁹/л у сестры, 83x 10⁹/л у матери), на момент обследования ни у кого из пациенток не было кровоточивости, хотя в анамнезе были обильные менструации, спонтанные экхимозы и послеродовые кровотечения. В мазках периферической крови обследованных присутствовали тромбоциты большого и гигантского размеров. В единичных сегментоядерных

клетках встречались пенистость и базофилия цитоплазмы, а также светло-голубые цитоплазматические включения веретеновидной или неправильной формы, часто прилегающие к мембране клетки (тельца Деле). Семейная макротромбоцитопения в сочетании с цитоплазматическими включениями в лейкоцитах типичны для дефектов гена *MYH9* и послужили основанием для молекулярно-генетического исследования. Обнаружена гетерозиготная мутация R1933X в гене *MYH9*, характерная для аномалии Мэя-Хегглина или синдрома Себастьяна. Степень контракции сгустков крови была умеренно сниженной у пробанда и ее сестры и нормальной у матери. Проточная цитометрия выявила фоновую активацию нестимулированных тромбоцитов у всех пациенток, выявленную по аномально высокой экспрессии Р-селектина и активного интегрина $\alpha\text{IIb}\beta 3$. После стимуляции, наоборот, доля тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин, у пробанда и ее сестры была ниже, чем в контроле, что указывает

на частичную рефрактерность, или сниженную реактивность, тромбоцитов. Электронная микроскопия выявила увеличение размера тромбоцитов у обследованных пациенток и выраженные ультраструктурные изменения, такие как множественные филоподии и расширение открытой канальцевой системы, со-державшей нитевидные и везикулярные включения.

Выводы. Мутация гена *MYH9*, даже гетерозиготная, связана не только с тромбоцитопенией, но и с качественными структурно-функциональными дефектами тромбоцитов. Признаки фоновой активации тромбоцитов парадоксальным образом сочетаются с их частичной рефрактерностью, а также с нарушением контракции сгустков крови, что может способствовать кровоточивости при заболеваниях, ассоциированных с мутацией гена *MYH9*. Обследование проведено с информированного согласия обследованных и разрешения Этического комитета КФУ.

Д.С. Селиванова, Е.Ю. Демидова, В.В. Саломашкина, Н.В. Цветаева, А.Л. Меликян, В.Л. Сурин

СПЕКТР АНОМАЛЬНЫХ ГЕМОГЛОБИНОВ У ПАЦИЕНТОВ, ПРОЖИВАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Введение. Наследственные гемоглобинопатии являются наиболее распространенными моногенными заболеваниями во всем мире. Они чаще встречаются в странах Средиземноморья, Передней и Юго-Восточной Азии, Африки, что, как считается, исторически сопряжено с распространением малярии в этих регионах. Однако в связи активными процессами миграции населения патологии гемоглобина распространились во всем мире, в частности в России. Аномальные гемоглобины являются одной из форм гемоглобинопатий и возникают в результате мутаций в генах разных цепей глобина (HBA1, HBA2, HBB, HBG1, HBG2, HBD). Вследствие мутации изменяется стабильность гемоглобина (Hb) и/или его сродство к кислороду, а также его электрофоретическая подвижность из-за видоизмененной структуры белка.

Цель. Описать спектр мутаций, приводящих к возникновению аномальных гемоглобинов, у пациентов разной этнической принадлежности.

Материалы и методы. В лаборатории генной инженерии ФГБУ «НМИЦ гематологии» за период с 1999 по 2022 гг. были выявлены 758 неродственных пациентов с дефектами глобиновых генов. Мутации, приводящие к образованию аномальных гемоглобинов, были найдены у 63 из них, у остальных мутации обуславливали талассемию. Пациенты – носители аномального гемоглобина этнически происходили из России, стран Закавказья и Средней Азии. Также были обследованы единичные представители Юго-Восточной Азии и Африканского континента. Работа проводилась на ДНК, выделенной из клеток периферической крови. Секвенирование ключевых участков генов HBA1, HBA2, HBB осуществлялось по методу Сэнгера.

Результаты. Были выявлены 28 разных мутаций, приводящих к образованию аномальных глобинов. Из них 26 локализованы в гене бета-глобина (HBB), одна – в гене альфа-глобина (HBA2), еще одна является крупной делецией, элиминирующей гены HBB и HBD, в результате чего образуется гибридный (химерный) вариант глобина (Hb Lepore). Одна треть пациентов (31,7%) являлись носителями гемоглобина S, обуславливающего развитие серповидноклеточной анемии. Данный вариант Hb – HbS (p.Glu6Val) – встречался в гетерозиготной форме (8), в гомозиготной форме (3), в сочетании с бета-талассемическими мутациями (7), а также в сочетании с другим аномальным Hb – Hb D-Los Angeles (p.Glu121Gln) (2). Носителями гемоглобина S предсказуемо были выходцы из африканских стран, но большинство

пациентов с этой патологией в изучаемой группе являлись представителями кавказских народов (азербайджанцы, народы Дагестана, чеченцы и др.). Второе место по частоте встречаемости принадлежало гемоглобинам Hb Monroe (p.Arg30Thr) и Hb D-Los Angeles (по 9.5% соответственно). Один из носителей Hb Monroe был также носителем Hb Knossos (p.Ala27Ser). И как было упомянуто выше, два пациента сочетали в себе Hb D-Los Angeles и Hb S. Оба эти пациента имели азербайджанские корни. Аномальный гемоглобин E (p.Glu26Lys) идентифицирован у 5 пациентов (7,9%). Только один из них был гетерозиготным носителем мутации (из России), двое были гомозиготными носителями, а ещё двое представляли собой компаунды Hb E и бета-талассемических мутаций. Последние 4 больных происходили из стран Азии (Тайланд, Афганистан, Таджикистан, Вьетнам). Мутации, приводящие к образованию Hb Köln (p.Val98Met) и Hb Hasharon (HBA2: p.Asp47His), встретились по три раза. Гемоглобин Hasharon был единственным аномальным Hb, обусловленным мутацией в гене альфа-глобина. По имеющимся данным, Hb Hasharon распространен среди евреев Ашкенази. Аномальный гемоглобин Hb Showa-Yakushiji (p.Leu110Pro) был обнаружен у двух пациентов с Кавказа. Двадцать один вариант гемоглобина отмечен единожды в представленной когорте больных. Две модификации бета-глобина – p.Thr50Ile и p.31_37delLeu-Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp ранее в мировой популяции не встречались. Интересен случай обнаружения мутации HBB: p.Leu141Arg (Hb Olmsted) у мальчика из грузинской семьи. Его родители не являлись носителями мутации, то есть она возникла у ребенка de novo. Аналогичные случаи для этого и некоторых других аномальных гемоглобинов были описаны ранее.

Выводы. Выявленный в данном исследовании спектр аномальных гемоглобинов представлен 53-мя различными вариантами. Нуклеотидные замены, вызывающие аномальные гемоглобины, встретились как в гетерозиготной форме, так и в гомозиготной, а также в сочетании с талассемическими мутациями, что более характерно для регионов «эндемичных» по талассемии. Наиболее распространенным вариантом аномального гемоглобина оказался Hb S, среди населения России он особенно часто встречается у кавказских народов. Аномальный гемоглобин E характерен для выходцев из азиатских государств. Описан случай возникновения de novo гемоглобина Olmsted, а также два новых аномальных Hb.