

В.В. Саломашкина¹, О.С. Пшеничникова¹, Ф.Г. Перина², В.Л. Сурин¹
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 инtronов 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-инtronных 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), облигатными носительницами 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 инtronными 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, микроделции, 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 формирование делеции был вовлечен инtron 6, в двух оставшихся – инtron 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 полидениновых 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. Евтухина, 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, кодирующем субъединицу немышечного миозина IIА, нарушают динамику цитоскелета в мегакариоцитах, 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

Р-селектина и активного интегрина $\alpha IIb\beta 3$ до и после ТРАР-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 ($36x 10^9/l$ у пробанда, $55x 10^9/l$ у сестры, $83x 10^9/l$ у матери), на момент обследования ни у кого из пациентов 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 probanda и ее сестры и нормальной у матери. Проточная цитометрия выявила фоновую активацию нестимулированных тромбоцитов у всех пациенток, выявленную по аномально высокой экспрессии P-селектина и активного интегрина αIIbβ3. После стимуляции, наоборот, доля тромбоцитов, экспрессирующих P-селектин, у probanda 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, содеряющей нитевидные и везикулярные включения.

Выходы. 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 и 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, удалившей 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 еще двое представляли собой комбинации 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 Ашkenази. 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.

Выходы. 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 распространенный вариант 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.