

# Генетический скрининг новорожденных г. Баку на наследственные гемоглобинопатии

Бабаев М.Ш., Алиева К.А., Мамедова Р.Ф.

Бакинский Государственный Университет  
AZ-1148, г. Баку, ул. академика Захида Халилова, 23

Наследственные гемоглобинопатии, входят в группу заболеваний крови, называемых гемолитическими анемиями. В общем случае гемоглобинопатии развиваются из-за синтеза аномального гемоглобина. Гемолитические анемии встречаются примерно у 12% населения Земного шара. Данная статья посвящена результатам генетического скрининга новорожденных г. Баку с целью исследования частоты гемоглобинопатий. Обследованы 267 новорожденных, 143 мальчика и 124 девочки. Исследования проводились в 2018-2019 гг. методом изоэлектрофокусирования. В статье также изложены результаты молекулярной диагностики  $\beta$ -талассемии у новорожденных методом высокотемпературной аллель-специфической амплификации. По данным проведенного исследования наследственных гемоглобинопатий в сыворотке крови новорожденных г. Баку установлено наличие структурно-аномальных гемоглобинов S и D и патологических аллелей генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -талассемий. Идентифицированы типы мутаций  $\beta$ -талассемий. Полученные результаты генетического скрининга позволяют своевременно проводить лечение больных детей до проявления клиники заболевания.

**Ключевые слова:** скрининг, новорожденный, гемоглобин, глобин, анемия, талассемия.

**Для цитирования:** Бабаев М.Ш., Алиева К.А., Мамедова Р.Ф. Генетический скрининг новорожденных г. Баку на наследственные гемоглобинопатии. *Медицинская генетика* 2020; 19(12): 56-60.

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2020.12.56-60

**Автор для корреспонденции:** Мамедова Рена Фирудин кызы; **e-mail:** rena.mamedova2015@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

**Поступила:** 10.10.2020.

## Genetic screening of newborns in Baku for hereditary hemoglobinopathies

Babaev M.Sh., Aliyeva K.A., Mammadova R. F.

Baku State University  
Academician Zakhid Khalilov str. 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan

Hereditary hemoglobinopathies are part of a group of blood diseases called hemolytic anemias. In general, hemoglobinopathy is the synthesis of abnormal hemoglobin. Hemolytic anemias occur in approximately 12% of the world's population. This article is devoted to the results of genetic screening among newborns in Baku in order to study the frequency of hemoglobinopathies. The study involved 267 newborns. Among them are 143 boys and 124 girls. The studies were carried out in 2018-2019. To determine hemoglobinopathies among newborns, we used the method of iso-electrofocusing. The article also details the results of molecular diagnostics of the  $\beta$ -thalassemia gene in newborns by high-temperature allele-specific amplification. In Baku, the presence of pathological genes of  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalassemias and structurally abnormal hemoglobins S and D was established. Types of  $\beta$ -thalassemia mutations have been identified.

**Keywords:** screening, newborn, hemoglobin, globin, anemia, thalassemia.

**For citation:** Babaev M.Sh., Aliyeva K.A., Mammadova R. F. Genetic screening of newborns in Baku for hereditary hemoglobinopathies. *Medical genetics*. 2020; 19(12): 56-60. (In Rus.).

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2020.12.56-60

**Corresponding author:** Mammadova Rana Firudin khyzy; **e-mail:** rena.mamedova2015@mail.ru

**Funding.** The study was carried out without sponsorship.

**Conflict of interest.** Author declare no conflicts of interest.

**Accepted:** 10.10.2020.

## Введение

Вторая половина XX века знаменательна для биологии и медицины достижениями в области молекулярной генетики, проникновением в глубо-

чайшие тайны биосинтеза белка и молекулярной патологии. Наилучшей моделью для исследования в этой области признан гемоглобин и его аномалии [1].

Выявление гетерогенности гемоглобинопатий, в том числе талассемий, изучение талассемических синдромов, разнородных по их генетической основе и фенотипическим проявлениям, в различных популяциях, выявление закономерностей их геногеографии позволит в недалеком будущем получить более глубокие представления о механизмах регуляции активности генов у человека и приведет к открытию общих закономерностей патогенеза генетических болезней человека [2].

Изучение наследственных гемоглобинопатий, начатое в 1968 г. в Азербайджане Ахундовой А.М., затем Назарли А.Г., проводится и по сегодняшний день. Если в начале изучали распространенность, клинику, биохимию, иммунологию, а затем и генетику гемоглобинопатий, то сегодня научные исследования посвящены молекулярным исследованиям гена бета-глобина [3].

Наследственные гемоглобинопатии входят в группу заболеваний крови, называемых гемолитическими анемиями. Гемолитические анемии встречаются примерно у 12% населения Земного шара. Наследственные гемоглобинопатии подразделяются на две большие группы: талассемии и аномальные гемоглобины [4].

При талассемиях нарушается биосинтез одной из четырех полипептидных цепей глобина, входящего в состав гемоглобина. В зависимости от того, синтез какой полипептидной цепи нарушен, выделяют вид талассемии. При нарушении биосинтеза  $\alpha$ -полипептидной цепи глобина возникшее нарушение называют  $\alpha$ -талассемией, при нарушении биосинтеза  $\beta$ -полипептидной цепи глобина нарушение называют  $\beta$ -талассемией и, соответственно, при нарушениях биосинтеза  $\gamma$ - и  $\delta$ -полипептидных цепей глобина возникают  $\gamma$ - и  $\delta$ -талассемии [2].

Нарушение структуры глобина приводит к *аномальным гемоглобинам*. На сегодняшний день известно свыше 400 аномальных гемоглобинов, затрагивающих структуру  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\delta$ - полипептидных цепей глобина. С клинической точки зрения наибольшее значение имеют стабильные аномальные гемоглобины: гемоглобин S, гемоглобин C, гемоглобин D, гемоглобин E и гемоглобин H. Кроме гемоглобина H, который является аномальным вариантом  $\alpha$ -полипептидной цепи глобина, остальные стабильные аномальные гемоглобины являются аномальным вариантом  $\beta$ -полипептидной цепи глобина [5].

Серповидно-клеточная анемия — тяжелая наследственная болезнь человека, известная также под названиями дрепаноцитоз, менискоцитоз, болезнь S-гемоглобина, синдром Геррика, африканская гемолитическая анемия. При этой болезни красные кровяные тельца (эритроциты), отдавая свой кислород, при-

нимают причудливую удлинненную форму, напоми- нающую полумесяц или серп. Небольшое изменение химической структуры гемоглобина (основного компонента эритроцитов) — непосредственная причина этого явления. Однако это изменение (замена всего лишь одной аминокислоты в составе белковой части молекулы) приводит к тому, что образующийся у больных гемоглобин (гемоглобин S), отдавая присоединенный кислород, становится менее растворимым, чем нормальный гемоглобин (гемоглобин A), и превращается в плотный, полутвердый гель, что и вызывает деформацию эритроцитов [6,7].

В настоящее время распространенность наследственных гемоглобинопатий (включая серповидноклеточную анемию) в мире оценивается на уровне 3–7%. В начале 2010-х годов ВОЗ отнесла серповидноклеточную анемию к глобальным проблемам здравоохранения.

### Материалы и методы

Исследования проводились в Центральной клинической больнице Нефтяников г. Баку в 2018-2019 гг., результаты обрабатывались в генетической лаборатории при больнице. В исследования были включены 267 новорожденных: 143 мальчика и 124 девочки. Для определения частоты встречаемости наследственных гемоглобинопатий среди новорожденных мы использовали аналитический метод изоэлектрофокусирования (ИЭФ) на полиакриламидно-амфолиновых пластинках с pH 3,5-9,5 и 5,5-8,5. Этот метод позволяет разделить гемолизат, приготовленный из крови новорожденных на следующие девять гемоглобиновых фракций: HbA<sub>1</sub>, HbA<sub>1c</sub>, HbA<sub>2</sub>, HbA<sub>3</sub>, HbF<sub>1</sub>, HbF<sub>2</sub>, метгемоглобин, промежуточный метгемоглобин (в виде двух фракций). Наиболее анодным является HbA<sub>3</sub>, катодным — HbA<sub>2</sub>. От анода к катоду гемоглобиновые фракции расположены следующим образом; HbA<sub>3</sub>, HbA<sub>1c</sub>, HbA<sub>1</sub>, HbF<sub>1</sub>, HbF<sub>2</sub>, промежуточный метгемоглобин, метгемоглобин и HbA<sub>2</sub>. Аномальный HbS (носительство гена серповидно-клеточной анемии), HbD располагается между фракциями гемоглобинов HbF<sub>1</sub> и промежуточного метгемоглобина. Аномальный HbE располагается между фракциями промежуточного метгемоглобина и метгемоглобина. Аномальный HbC располагается на уровне минорной фракции HbA<sub>2</sub>.

### Результаты

В табл. 1–3 представлены результаты обследования новорожденных на наследственные гемоглобинопатии.

Как видно из **табл. 1**, обследование новорожденных на наследственные гемоглинопатии позволило идентифицировать у 7 новорожденных из 267 обследованных гемоглинобины, характерные для талассемий: у 4-х для  $\alpha$ -талассемии и у 3-х новорожденных — для  $\beta$ -талассемии с фенотипической частотой 1,498% и 1,123%, соответственно.

На ИЭФ у новорожденных с изменениями, характерными для гетерозиготной  $\beta$ -талассемии, наблюдали повышение уровня HbA<sub>2</sub> по сравнению с результатами, полученными при ИЭФ крови здоровых новорожденных. У здоровых новорожденных уровень HbA<sub>2</sub> бывает низким и составляет 0,03–0,05% от общего гемоглиобина. У новорожденных с гетерозиготной  $\beta$ -талассемией уровень HbA<sub>2</sub> превышал нормальные величины и составлял 0,97–1,65%. Этот показатель является единственным тестом, используемым нами для диагностики гетерозиготной  $\beta$ -талассемии. Обычным методом электрофореза на ацетатцеллюлозных пленках выявление уровней HbA<sub>2</sub> характерных для гетерозиготной  $\beta$ -талассемии затруднено из-за низкой чувствительности метода.

Таблица 1

**Результаты скрининга новорожденных на  $\alpha$ - и  $\beta$ -талассемии**

Количество новорожденных	$\alpha$ -талассемия		$\beta$ -талассемия	
	число	%	число	%
267	4	1,498	3	1,123

Таблица 2

**Результаты скрининга новорожденных на аномальные гемоглиобины**

Количество новорожденных	Аномальные гемоглиобины							
	HbS		HbD		HbE		HbC	
	число	%	число	%	число	%	число	%
267	2	0,75	1	0,37	-		-	

Таблица 3

**Результаты скрининга уровней метгемоглиобина и промежуточного метгемоглиобина в крови новорожденных**

Количество обследованных	Метгемоглиобин		Промежуточный метгемоглиобин	
	число	%	число	%
267	13	4,87	11	4,12

У всех 3-х новорожденных наблюдали повышенные значения данной минорной фракции. Следует отметить, что значения HbA<sub>2</sub> у взрослых с гетерозиготной  $\beta$ -талассемией в отличие от новорожденных бывают выше и варьируют в пределах 3,5–8,0%. Уровни других гемоглиобиновых фракций: HbA<sub>1</sub>, HbA<sub>3</sub>, HbF<sub>1</sub>, HbF<sub>2</sub>, метгемоглиобина и промежуточной фракции метгемоглиобина были в пределах нормы.

У 4-х новорожденных выявлены изменения, характерные для носительства мутации  $\alpha$ -талассемии. На электрофореграмме у этих новорожденных дополнительно к нормальным гемоглиобиновым фракциям наблюдали две минорные, которые соответствовали гемоглиобиновым фракциям Barts. Уровни гемоглиобиновых фракций Barts колебались в пределах 2,8–5,4% и в среднем составляли 3,9%.

В отличие от  $\beta$ -глобинового гена,  $\alpha$ -глобиновый ген располагается в 16-й хромосоме и представлен четырьмя копиями. Тогда как  $\beta$ -глобиновый ген представлен двумя копиями. По структуре  $\alpha$ -глобиновые гены идентичны и различаются только по количеству синтезируемых  $\alpha$ -полипептидных цепей, т.е. различаются по экспрессии гена.

Из **табл. 2** видно, что у трех разнополых детей (2 мальчика, 1 девочка) выявлено носительство структурно-аномальных гемоглиобинов HbS и HbD: 2 случая с серповидно-клеточным носительством (HbAS) и один случай с HbD.

Метгемоглиобинемии обусловлены повышенным содержанием метгемоглиобина, не способного переносить кислород. Выделяют наследственные и приобретенные метгемоглиобинемии. К наследственным относят врожденные энзимопенические метгемоглиобинемии, обусловленные снижением или полным отсутствием в эритроцитах липоамид-дегидрогеназа—зависимой метгемоглиобинредуктазы, и метгемоглиобинемии, развивающиеся в результате наличия нестабильных или аномальных гемоглиобинов (М-гемоглиобинопатии). Наследственные энзимопенические метгемоглиобинемии наследуются аутосомно-рецессивно, М-гемоглиобинопатии — аутосомно-доминантно. При метгемоглиобинопатиях сразу после рождения ребенка на коже и слизистых оболочках, особенно в области губ, носа, на мочках ушей, в ногтевом ложе выявляется цианоз. Он сохраняется в течение всей жизни, усиливаясь при охлаждении, приеме метгемоглиобинобразующих лекарственных препаратов [8].

Как видно из **табл. 3**, в 13 (4,87%) случаях у разнополых новорожденных наблюдали увеличение метгемоглиобина, в 11 (4,12%) случаях увеличение промежуточной фракции метгемоглиобина.



### Результаты молекулярной диагностики гена $\beta$ -талассемии

Для идентификации типа мутаций  $\beta$ -талассемии из венозной крови 3-х новорожденных с диагнозом гетерозиготная бета-талассемия и их родителей выделяли геномную ДНК. Тип мутации  $\beta$ -талассемии определяли методом высокотемпературной аллель-специфической амплификации. Для этого использовали следующие синтетические олигонуклеотидные зонды (праймеры):  $\beta^0$ -IVS-2-1 (Г-А),  $\beta^0$ -kodon 8 (-AA);  $\beta^+$ -IVS-1-110 (Г-А);  $\beta^0$ -kodon 8/9 (+Г);  $\beta^+$ -IVS-1-6 (Т-Ц) и  $\beta^+$ -IVS-1-5 (Г-Ц).

Каждый образец ДНК, выделенный из крови новорожденных гибридизовали с праймерами в отдель-

ности. Из шести праймеров для двух получен положительный сигнал. Следовательно, идентифицировано два типа мутации гена  $\beta$ -талассемии:

1. Замена нуклеотида гуанин на нуклеотид аденин в 1 позиции второго — большого интрона  $\beta$ -глобинового гена с фенотипом  $\beta^0$ -талассемии —  $\beta^0$ -IVS-2-1 (Г-А) (рис. 1);

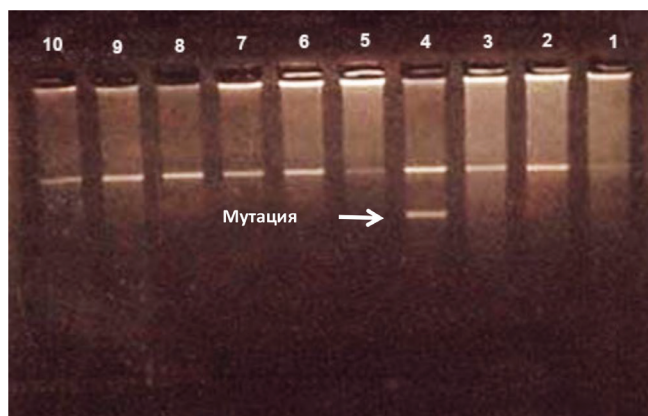
2. Замена нуклеотида гуанин на нуклеотид аденин в 110 позиции первого — малого интрона  $\beta$ -глобинового гена с фенотипом  $\beta^+$ -талассемии —  $\beta^+$ -IVS-1-110 (Г-А) (рис. 2).

Таким образом, по данным проведенного генетического исследования наследственных гемоглобинопатий в сыворотке крови новорожденных г. Баку установлено наличие патологических гемоглобинов, характерных для  $\alpha$ - и  $\beta$ -талассемий и структурно-аномальных гемоглобинов S и D, что может привести к анемии у детей. Идентифицированы типы мутаций при  $\beta$ -талассемии. Полученные результаты позволят своевременно проводить лечение больных детей до проявления клинических заболеваний.

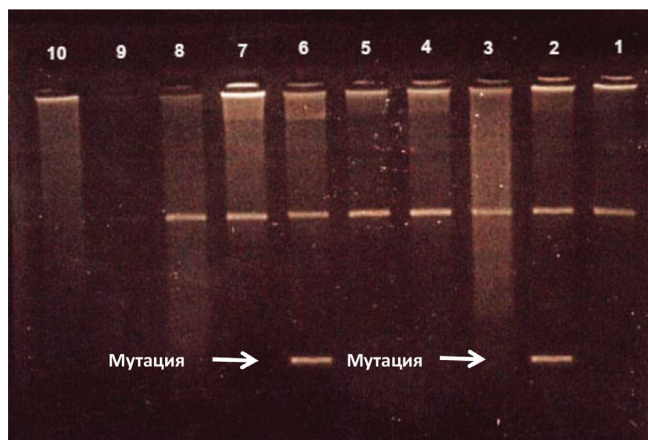
Внедрение программ массового скрининга новорожденных играет важную роль в раннем выявлении наследственных заболеваний и своевременном назначении соответствующей терапии [9]. Своевременное медико-генетическое консультирование семей с наличием патологических вариантов генов у супругов (семья с генетическим риском) с целью профилактики гомозиготного состояния у ребенка очень важно [10]. Рекомендуется проведение пренатальной диагностики.

### Литература

1. Алиева К.А., Алиев С.Д., Расулов Э.М. Популяционно-генетическая структура населения некоторых регионов Азербайджанской Республики. Материалы научной конференции, посвященной 80-летию образования Азербайджанской Республики (Баку, 28-30 мая 1998), Баку, 1998, с. 154.
2. Сеидова Г.А. Молекулярные основы промежуточной бета-талассемии у населения Азербайджана. Автореферат диссертации на соискание учёной степени д.м.н., Баку, 1994, 47 с.
3. Гаджиев Д.В., Расулов Э.М., Расулова Р.И., Алиева К.А. Популяционно-генетические исследования наследственных заболеваний в Азербайджанской Республике (Сообщение 1. Демографическая характеристика населения двух сел Кахского района), Баку, 1998, с. 79-83.
4. Мусаев М.А., Аскерова Т.А. Наследственные метгемоглобинемии среди Азербайджанцев. *Azərbaycan təbabətinin müasir nailiyyətləri*. 2008; 3: 119-123.
5. Гахраманов Э.Б., Гараев З.И., Меликова Л., Расулов Э.М. Частота врожденных и наследственных заболеваний по Баку и Сумгаитской зоне. *Здоровье*, Баку 1997; 1: 16-19.
6. Consensus Conference. Newborn screening for sickle cell disease and other hemoglobinopathies. *JAMA*. 2007; 258:1205-1209



**Рис. 1.** Результаты ПЦР диагностики мутации  $\beta^0$ -IVS-2-1 (Г-А). Из десяти образцов ДНК в одном случае (№4) идентифицирована мутация — замена нуклеотида гуанин на нуклеотид аденин в 1-ой позиции второго — большого интрона  $\beta$ -глобинового гена с фенотипом  $\beta^0$ -талассемии.



**Рис. 2.** Результаты ПЦР диагностики мутации  $\beta^+$ -IVS-1-110 (Г-А). Из десяти образцов ДНК в двух случаях (№2 и №6) идентифицирована мутация — замена нуклеотида гуанин на нуклеотид аденин в 110-ой позиции первого — малого интрона  $\beta$ -глобинового гена с фенотипом  $\beta^+$ -талассемии.

7. Garayev Z.I., Alieva R., Rasulov E.M. Children tooth-jaw system alteration with various beta-thalassemia molecular forms., WCPD, Cape Town, South Africa, 1997, p. 44.
  8. Эфендиев А.М., Аскерова Т.А., Мусаев М.А. Молекулярные основы гипоксии у новорожденных с меттемоглобинемиями, *Azərbaycan Tibb Jurnalı*, 2006; 4: 45–47.
  9. Kuliyeв A. Preimplantation diagnosis for thalassemias, *1st International Summerschool on Thalassemia*, Turkey, Antalya, 22–26 April 2000, p. 43–44.
  10. Lees C.M., Davies S., Dezateux C. Neonatal screening for sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000; 2: 1913–1919.
- References**
1. Alieva K.A., Aliev S.D., Rasulov E.M. Populyatsionno-geneticheskaya struktura naseleniya nekotorykh regionov Azerbaydzhanskoй Respubliki [Population-genetic structure of the population of some regions of the Republic of Azerbaijan]. *Materialy nauchnoy konferentsii, posvyashchennoy 80-tiletiyu obrazovaniya Azerbaydzhanskoй Respubliki* [Materials of the scientific conference dedicated to the 80th anniversary of the formation of the Republic of Azerbaijan]. Baku, May 28–30, 1998, Baku, 1998, p. 154. (In Russ.)
  2. Seidova G.A. Molekulyarnyye osnovy promezhutochnoy beta-talassemii u naseleniya Azerbaydzhana [Molecular basis of intermediate beta-thalassemia in the population of Azerbaijan]. *Avtoreferat dissertatsii. na soiskaniye uchonoй stepeni d.m.n.* [Dissertation abstract. for the degree of Doctor of Medical Sciences]. Baku, 1994, 47 p. (In Russ.)
  3. Hаjiyev D.V., Rasulov E.M., Rasulova R.I., Alieva K.A. Populyatsionno-geneticheskkiye issledovaniya nasledstvennykh zabolevaniy v Azerbaydzhanskoй Respublike (Soobshcheniye 1. Demograficheskaya kharakteristika naseleniya dvukh sel Kakhskogo rayona) [Population genetic studies of hereditary diseases in the Republic of Azerbaijan, (Communication 1. Demographic characteristics of the population of two villages of the Kakh region)]. Baku, 1998, p. 79–83. (In Russ.)
  4. Musayev M.A., Askerova T.A. Nasledstvennyye metgemoglobinemii sredi Azerbaydzhantsev Hereditary methemoglobinemia among Azerbaijanis, *Azərbaycan təbabətinin müasir nailiyyətləri*. 2008; 3: 119–123. (In Russ.)
  5. Gahramanov E.B., Garayev Z.I., Melikova L., Rasulov E.M. Chastota vrozhdennykh i nasledstvennykh zabolevaniy po Baku i Sumgaitzskoy zone [The frequency of congenital and hereditary diseases in Baku and Sumgait zone]. *Zdorov'ye [Health]*, Baku, 1997; 1: 16–19. (In Russ.)
  6. Consensus Conference. Newborn screening for sickle cell disease and other hemoglobinopathies. *JAMA.* 2007; 298: 1205–1209.
  7. Garayev Z.I., Alieva R., Rasulov E.M. Children tooth-jaw system alteration with various beta-thalassemia molecular forms. WCPD, Cape Town, South Africa, 1997, p. 44.
  8. Efendiyev A.M., Askerova T.A., Musayev M.A. Molekulyarnyye osnovy gipoksii u novorozhdennykh s metgemoglobinemiyami [Molecular basis of hypoxia in newborns with methemoglobinemia]. *Azərbaycan Tibb Jurnalı*, 2006; 4: 45–47. (In Russ.)
  9. Kuliyeв A. Preimplantation diagnosis for thalassemias, *1st International Summerschool on Thalassemia*, Turkey, Antalya, 22–26 April 2000, p. 43–44.
  10. Lees C.M., Davies S., Dezateux C. Neonatal screening for sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000; 2: 1913–1919.