

Конаследование HbD-Punjab/ β^+ -талассемии (IVSI+5 G-C) у пациента с синдромом Жильбера

А.А. ПЕТРЕНКО¹, А.В. ПИВНИК^{1,2}, П.П. КИМ², Е.Ю. ДЕМИДОВА³, В.Л. СУРИН³, А.О. АБДУЛЛАЕВ³, А.Б. СУДАРИКОВ³, Н.А. ПЕТРОВА³, С.А. МАРЬИНА³

¹Российский университет дружбы народов, Москва, Россия;

²ГБУЗ «Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова ДЗМ», Москва, Россия;

³ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва, Россия

Аннотация

Талассемия и качественная гемоглобинопатия являются наследственными нарушениями синтеза гемоглобина (Hb), которые приводят к изменению конформации Hb или уменьшению образования структурно нормального Hb. Многие варианты Hb нестабильны или обладают измененным сродством к кислороду, а также в гетерозиготной форме могут быть связаны с клинико-гематологическими проявлениями (гемолитическая анемия, гипохромная микроцитарная анемия, эритроцитоз). HbD-Punjab [β 121 (GH4) Glu \rightarrow Gln; HBB: C.364G>C] представляет собой вариант Hb, несущий аминокислотную замену в 121-м положении цепи β -глобина. Во всех описанных в литературе случаях у пациентов с сочетанием HbD-Punjab и β^+ -талассемической мутации IVSI+5 G-C наблюдались типичные для талассемии показатели с гипохромным микроцитозом, при электрофорезе Hb фракция HbD-Punjab составляла от 37 до 94%. В статье приводится описание редкого клинического случая конаследования HbD-Punjab/ β^+ -талассемии (IVSI+5 G-C) у пациента с гомозиготным вариантом синдрома Жильбера, наблюдавшегося в Московском клиническом научном центре им. А.С. Логинова.

Ключевые слова: гемоглобин D-Пенджаб, β^+ -талассемия, β^+ -талассемия IVSI+5 G-C, синдром Жильбера, гемоглобин D-Лос-Анжелес, гемоглобинопатии.

Coinheritance of HbD-Punjab/ β^+ -thalassemia (IVSI+5 G-C) in patient with Gilbert's syndrome

A.A. PETRENKO¹, A.V. PIVNIK^{1,2}, P.P. KIM², E.Yu. DEMIDOVA³, V.L. SURIN³, A.O. ABDULLAEV³, A.B. SUDARIKOV³, N.A. PETROVA³, S.A. MARYINA³

¹Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia;

²AS Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow, Russia;

³National Research Center for Hematology, Moscow, Russia

Thalassemia and qualitative hemoglobinopathy are hereditary disorders of Hb synthesis that lead to change in the Hb conformation or a decrease in the synthesis of structurally normal Hb, and consequently, to erythron pathology. Many variants of Hb are unstable or have altered affinity for oxygen, and, in heterozygous form can be associated with clinical and hematological manifestations (hemolytic anemia, hypochromic microcytic anemia, erythrocytosis). HbD-Punjab [β 121 (GH4) Glu \rightarrow Gln; HBB: C.364G>C] is variant of Hb carrying the amino acid substitution in the 121 position of β -globin chain. In all cases reported so far, patients with HbD-Punjab/ β^+ -thalassemia (IVSI+5 G-C) combination experienced typical thalassemia with hypochromic microcytosis. HbD-Punjab was detected by electrophoresis from 37 to 94% of total Hb. The article describes rare clinical case of the cohabitation of HbD-Punjab/ β^+ -thalassemia (IVSI+5 G-C) in a patient with homozygous variant of Gilbert's syndrome observed in AS Loginov Moscow Clinical Scientific Center.

Keywords: HbD-Punjab, β^+ -thalassemia, β^+ -thalassemia IVSI+5 G-C, Gilbert's syndrome, Hemoglobin D-Los Angeles, hemoglobinopathies.

АД – артериальное давление
ЧСС – частота сердечных сокращений
Glu – глутаминовая кислота
Gln – глутамин

Hb – гемоглобин
HbA – гемоглобин взрослого человека
HbE – эмбриональный гемоглобин
HbF – фетальный гемоглобин

Талассемия и качественная гемоглобинопатия являются наследственными нарушениями гемоглобина (Hb), которые приводят к образованию аномального белка или уменьшению синтеза структурно нормального белка, а следовательно, к патологии эритрона. Известно свыше 1000 различных вариантов Hb, большая часть которых обусловлена миссенс-мутациями в генах альфа- и бета-глобиновых цепей [1]. Замена одного основания на другое в гене, кодирующем один из глобинов, может привести не только к замене аминокислоты в цепи, но и к значительным конформационным изменениям в ее структуре и Hb в целом. Подобные мутации могут не иметь последствий для организма, но в большинстве случаев аномальные варианты Hb нестабильны или имеют измененное сродство к кислороду и даже в гетерозиготной форме связаны с кли-

нико-гематологическими проявлениями (гипохромная микроцитарная анемия, гемолитическая анемия, эритроцитоз) [2].

Патогенез, обусловленный мутациями в генах глобинов, представлен на **схеме**.

HbD-Punjab [β 121 (GH4) Glu \rightarrow Gln; HBB: C.364G>C] представляет собой вариант Hb, несущий аминокислотную замену в 121-м положении цепи β -глобина [3]. HbD впервые описан Н.А. Итано в 1951 г. [4]. В исследовании, проведенном в 1962 г., С. Baglioni проанализировал молекулярную структуру пяти аномальных гемоглобинов: HbD-Chicago, HbD-North Carolina, HbD-Punjab, HbD-Portugal и HbD-Oak Ridge и установил, что все они идентичны обнаруженному ранее HbD-Los Angeles [3]. Наиболее частыми наименованиями этого мутантного Hb, встречаю-



щимися в литературе, являются HbD-Los Angeles или HbD-Punjab [5]. HbD-Punjab широко распространен в Пакистане, на северо-западе Индии, в Китае, странах Ближнего Востока, а также во многих других частях мира с общей частотой 0,2—3,0% [6—8]. У этнических жителей Таджикистана HbD-Punjab не описан.

HbD-Punjab обладает нормальной растворимостью, поэтому в восстановленном состоянии не вызывает серповидности эритроцитов, хотя и схож по своим электрофоретическим свойствам с HbS.

В гетерозиготном варианте HbD-Punjab не дает клинико-гематологических проявлений. Гомозиготный вариант HbDD встречается крайне редко и обычно не связан с симптоматическими случаями, но иногда у людей с этим вариантом может развиваться слабая или умеренная гемолитическая анемия и спленомегалия [9,10]. При обоих вариантах в мазках крови могут выявляться мишеневидные

эритроциты [11]. Есть несколько сообщений, описывающих конаследование HbD-Punjab с β^+ -талассемической мутацией IVSI+5 G-C [11—14]. Во всех публикациях у пациентов с таким сочетанием наблюдались типичные талассемические показатели с гипохромным микроцитозом и при электрофорезе выявлялся HbD-Punjab от 37 до 94%. Гепатоспленомегалию выявили лишь в одном случае [12].

Публикаций, описывающих сочетание мутаций HbD-Punjab/ β^+ -талассемия (IVSI+5 G-C) или других талассемических мутаций с синдромом Жильбера, — нет. В одной работе упоминается о мексиканской семье, в которой мать оказалась носителем следующих мутаций: гетерозигота по HbD-Punjab, гомозигота по HFE H63D и гетерозигота UGT1A1*28 по синдрому Жильбера [15].

Клинический случай

Качественную и количественную характеристику образцов Hb пациента и его прямых родственников осуществляли на автоматическом анализаторе для капиллярного электрофореза Minicar с использованием набора Car-



Рис. 1, 2. Пациент с HbD-Punjab/ β^+ -талассемией (IVSI+5 G-C). Форма черепа и лицевой скелет не изменены. При пальпации отмечается выступающая из-под края реберной дуги на 6 см увеличенная селезенка.

Включение в статью **рис. 3** обусловлено тем, что у пациентов с β -талассемией характерны клинические проявления в виде: непропорционально большой деформированной головы (башенный череп), приплюснутого носа, суженных глазных щелей и выпуклых скул (признаки монголоидности). Но таких изменений у нашего пациента нет, что важно отметить.

Добавление в статью **рис. 4** необходимо для наглядного представления о том, насколько может увеличиваться селезенка у пациентов с гетерозиготной формой β -талассемии. Увеличение селезенки — частый симптом гетерозиготной β -талассемии, но значительным он бывает редко — лишь у 6%. А у нашего пациента селезенка выступает из-под края реберной дуги на 5 см.

Контактная информация:

Пивник Александр Васильевич — д.м.н., проф. каф. госпитальной терапии с курсами эндокринологии, гематологии и клинической лабораторной диагностики РУДН, руководитель отдела онкогематологии и вторичных иммунодефицитных заболеваний ГБУЗ «Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова ДЗМ», тел.: 8(495)304-30-39; e-mail: pivnikav@gmail.com

Сведения об авторах:

Петренко Андрей Анатольевич — студент VI курса каф. госпитальной терапии с курсами эндокринологии, гематологии и клинической лабораторной диагностики медицинского института Российского университета дружбы народов (РУДН)

Ким Павел Петрович — врач-хирург, н.с. отд-ния хирургии печени и поджелудочной железы МКНЦ.

Демидова Екатерина Юрьевна — научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Сурич Вадим Леонидович — исполняющий обязанности руководителя лаборатории генной инженерии, старший научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

Абдуллаев Ахтамжон Одидович — к.м.н., с.н.с. лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Судариков Андрей Борисович — д.б.н., зав. лабораторией молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Петрова Наталья Александровна — к.б.н., врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Марьина Салия Ахсановна — руководитель группы гуморального иммунитета ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

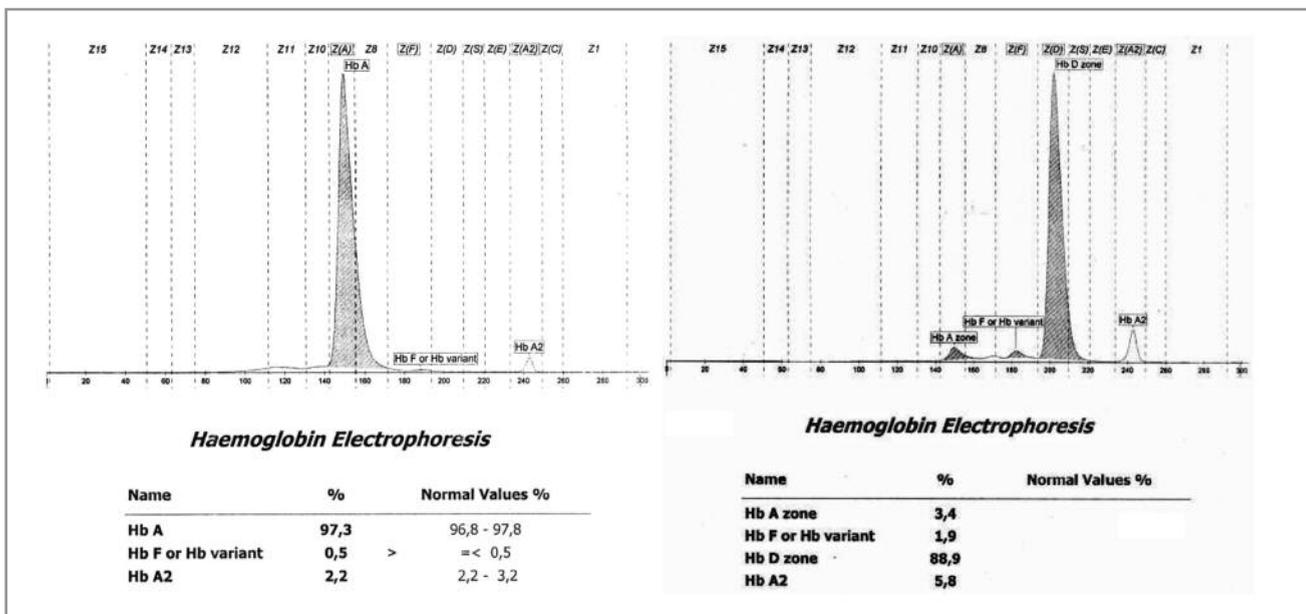


Рис. 3, 4. Результат электрофореза Hb: норма – слева, пациента – справа.

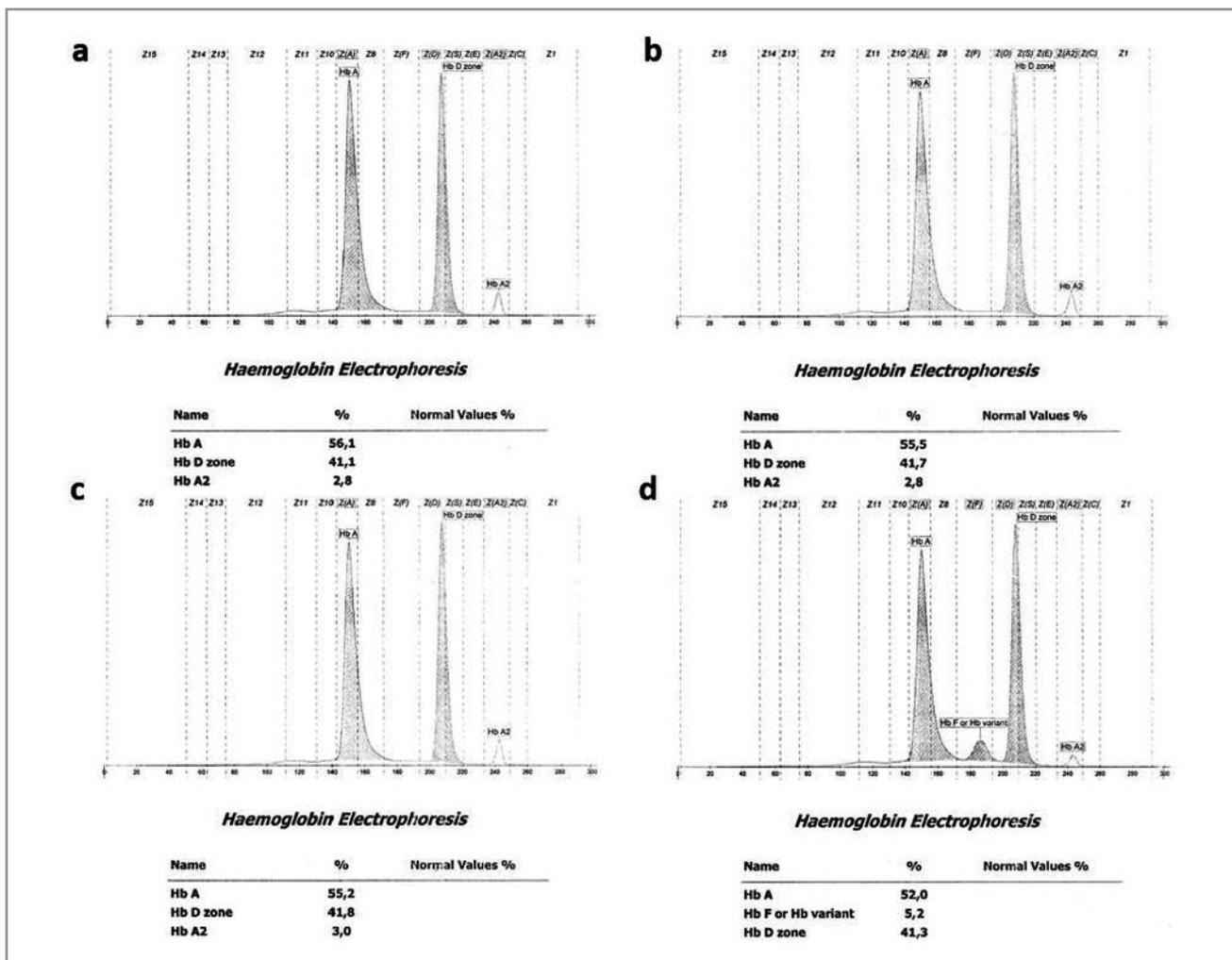


Рис. 5. Результаты электрофореза Hb родственников пациента.

illarys Hemoglobin(E) (фирма Sebia, Франция). ДНК выделяли из ядерных клеток периферической крови по стандартной методике, включающей лизис додецилсульфатом

натрия в присутствии протеиназы К с последующей депротенинизацией фенолом и хлороформом. Секвенирование по методу Сэнгера всех функционально важных уча-

Лабораторные данные пациента при поступлении в МКНЦ и после операции спленэктомии

Показатель	07.12.2017 (при поступлении)	27.01.2018 (через 2 дня после спленэктомии)	08.02.2018 (через 15 дней после спленэктомии)	26.02.2018 (через 33 дня после спленэктомии)
Гемоглобин, г/л	115	118	123	131
Эритроциты, · 10 ¹² /л	5,7	5,9	6,13	6,69
Ретикулоциты, ‰	—	—	—	26,2
Средний объем эритроцита, фл	66,0	66,0	58,7	58,3
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	20,0	19,6	20,1	19,6
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/л	305,3	298	342	336
Гематокрит, ‰	37,8	39,4	36,0	39,0
Тромбоциты, · 10 ⁹ /л	290	414	1125	251
Лейкоциты, · 10 ⁹ /л	5,8	10,8	11,3	7,93
Общий билирубин, мкмоль/л	—	178	57,3	114,3
Прямой билирубин, мкмоль/л	—	17,8	7,8	6,8
Непрямой билирубин, мкмоль/л	167	160,2	49,5	107,5
Прямая реакция Кумбса	Отрицательно	—	—	—
HBs-антиген	Отрицательно	—	—	—
Антитела к ВИЧ	Не обнаружено	—	—	—

стков гена бета-глобина и промоторной области гена уридиндифосфатглюкуронозил трансферазы (UGT1A1) проводили с помощью набора реактивов BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100Avant (Applied Biosystems, США).

Пациент 22 лет, родом из Таджикистана, поступил в клинику хирургии печени МКНЦ им. А.С. Логинова в декабре 2017 г. для проведения спленэктомии по поводу кисты селезенки. Из анамнеза пациента известно, что с детства отмечалась иктеричность склер, спленомегалия, повышение уровня непрямого билирубина до 400 мкмоль/л без выраженной анемии. Ранее установлен диагноз: синдром Жильбера. В 2015 г. выявлена киста селезенки до 9 см в диаметре, при длиннике органа до 18 см (рис. 1, 2 и см. таблицу).

При физикальном осмотре: пациент активен, спокоен, адекватен. Масса тела 60 кг при росте 174 см. Иктеричность кожных покровов и склер. Физическое и интеллектуальное развитие соответствует возрасту. Форма черепа и лицевой скелет не изменены. Легкие и сердце без патологии. Частота сердечных сокращений (ЧСС) 82 в 1 мин. Артериальное давление (АД) 120/70 мм рт. ст. Живот мягкий. Пальпируется увеличенная селезенка, выступающая из-под реберного края на 5 см с выбуханием нижнего полюса. Печень выступает из-под края реберной дуги на 2 см (см. рис. 1, 2).

Большой проконсультирован гематологом. Обращено внимание на несоответствие спленомегалии синдрому Жильбера и низкие эритроцитарные индексы. Это послужило основанием к проведению электрофореза Hb. Последующее секвенирование гена β-глобина и промоторной

области гена *UGT1A1* позволило определить характер глобиновой аномалии и генетически верифицировать диагноз гомозиготной формы синдрома Жильбера.

После обследования пациента выполнен электрофорез Hb его прямых родственников без секвенирования.

Электрофорез Hb

При электрофорезе Hb пациента выявлены количественные и качественные изменения. Гемоглобинопатия характеризовалась наличием фракции HbD-Punjab 88,9%, HbA 3,4%, HbA2 5,8% и HbF 1,9% (рис. 3, 4).

Электрофорез Hb прямых родственников: отца, 54 года, старшей сестры, 34 года, младшей сестры, 18 лет, и племянника, 4 года (сын старшей сестры), также выявил фракцию HbD-Punjab (рис. 5).

Гемоглобинопатия прямых родственников характеризовалась: отец – HbD-Punjab 41,1%, HbA 56,1%, HbA2 2,8%; старшая сестра – HbD-Punjab 41,7%, HbA 55,5%, HbA2 2,8%; младшая сестра – HbD-Punjab 41,8%, HbA 55,2%, HbA2 3,0%; племянник (сын старшей сестры) — HbD-Punjab 41,3%, HbA 52,0%, HbF или другой вариант Hb 5,2%.

Секвенирование ДНК

ДНК-диагностика, проведенная при помощи определения первичной структуры всех функционально важных фрагментов гена бета-глобина, включающих промоторную область, кодирующие участки, экзон-интронные сочленения и сигнал полиаденилирования, показала, что пациент является гетерозиготным носителем двух нарушений (компаунд) – замены CD121 GAA-CAA (Glu121Gln), приводящей к образованию аномального гемоглобина HbD-Punjab, и β⁺-талассемической мутации IVS1+5 G-C.

Секвенирование промоторной области гена *UGT1A1* показало, что пациент является гомозиготой по аллелю (TA)₇, ассоциирующемуся с синдромом Жильбера. Норме соответствует аллель, содержащийся в микросателлитном участке промотора шесть TA блоков (рис. 6, см. на цветной вклейке).

В январе 2018 г. проведена успешная лапароскопическая спленэктомия. При ревизии: печень слегка увеличена, нормального цвета и консистенции. Селезенка выступает из-под края реберной дуги на 5 см. В нижнем полюсе обнаружено округлое образование размером до 6 см – киста. Фрагменты селезенки извлечены через дополнительный 5-сантиметровый разрез в брюшной стенке. Гистологически структура селезенки сохранена, выявлен фиброз струмы.

По результатам лабораторных исследований видно, что у пациента имеется гипохромная микроцитарная анемия и высокие цифры непрямого билирубина как проявление талассемии и синдрома Жильбера (рис. 7, см. на цветной вклейке, см. таблицу).

Обсуждение

Конаследование HbD-Punjab/ β^+ -талассемии (IVSI+5 G-C) является крайне редким событием. Мы впервые описываем такое сочетание мутаций в гене β -глобина у пациента с гомозиготным генотипом синдрома Жильбера. Так как наследование HbD-Punjab у больного носило гетерозиготный характер и эритроциты содержали как HbD-Punjab (до 88,9%), так и HbA (до 3,4%), то клинического проявления эта мутация не имела. Это связано с тем, что восстановленный HbD обладает нормальной растворимостью и не приводит к изменению формы эритроцитов. В отличие от миссенс-мутации β^+ -талассемическая мутация сплайсинга IVSI+5 G-C значительно снижает уровень синтеза нормальной β -цепи и обуславливает наличие гемолитической

микроцитарной анемии у больного, что осложняет течение синдрома Жильбера. Как результат, с детства количество непрямого билирубина постоянно находилось на уровне 150–200 мкмоль/л с максимумом до 400 мкмоль/л. Через 2 нед после спленэктомии содержание Hb увеличилось до 123 г/л, непрямого билирубин снизился со 160 до 49,5 мкмоль/л. Количество тромбоцитов повысилось до 1,2 млн. Прием препарата тромборедуктина в дозе 1,5 мг в сутки привел к снижению количества тромбоцитов до 250 тыс. Однако еще через 2 нед концентрация непрямого билирубина вновь повысилась до 107 мкмоль/л. Такое повышение в большей степени обусловлено синдромом Жильбера, так как гемолитическая анемия носит компенсированный характер.

В подобных случаях крайне важным является выполнение электрофореза Hb и генетического анализа Hb родственников. Исследованы прямые родственники: отец, старшая сестра, младшая сестра и племянник (сын старшей сестры). Мать пациента умерла в возрасте 53 лет от острой коронарной недостаточности. Результаты электрофореза Hb выявили фракцию HbD-Punjab у всех исследуемых от 41,1 до 41,8%.

Заключение

Впервые описан пациент, этнический житель Таджикистана, с редким сочетанием HbD-Punjab/ β^+ -талассемии (IVSI+5 G-C) и гомозиготной формой синдрома Жильбера. Показано, что спленэктомия привела к кратковременному снижению количества непрямого билирубина в 3 раза. Сочетание таких генетических нарушений требует детального обследования не только исследуемого, но и всех его близких родственников. Электрофорез Hb прямых родственников выявил у них фракцию HbD-Punjab.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Giardine B, Borg J, Viennas E et al. Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42:D1063-D1069
- Panyasai S, Sakhachornphop S, Pornprasert S. Diagnosis of Compound Heterozygous Hb Tak/ β -Thalassemia and HbD-Punjab/ β -Thalassemia by HbA₂ Levels on Capillary Electrophoresis. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2018 Jan;34(1):110-114. Epub 2017 Apr 4. PMID: 29398808. PMID: PMC5786607 [Available on 2019-01-01]. doi: 10.1007/s12288-017-0810-3
- Baglioni C. Abnormal human haemoglobins. VII. Chemical studies on haemoglobin D. *Biochim Biophys Acta.* 1962 May 21;59:437-449. doi.org/10.1016/0006-3002(62)90194-4
- Itano HA. A Third Abnormal Hemoglobin Associated with Hereditary Hemolytic Anemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1951 Dec;37(12):775-84. PMID: 16589027 PMID: PMC1063470
- Lidiane de Souza Torres, Jéssica Viviani Okumura, Danilo Grünig Humberto da Silva, and Claudia Regina Bonini-Domingos Hemoglobin D-Punjab: origin, distribution and laboratory diagnosis. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2015 Mar-Apr; 37(2):120-126. Published online 2015 Feb 23. doi: 10.1016/j.bjhh.2015.02.007
- Das S, Mashon RS. Coinheritance of Hb D-Punjab and β -thalassemia: Diagnosis and implications in prenatal diagnosis. *Hemoglobin.* 2015;39:138-40.
- Torres Lde S, Okumura JV, Silva DG, Bonini-Domingos CR. Hemoglobin D-Punjab: Origin, distribution and laboratory diagnosis. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2015;37:120-6.
- Worthington S, Lehmann H. The first observation of Hb D Punjab beta zero thalassaemia in an English family with 22 cases of unsuspected beta zero thalassaemia minor among its members. *J Med Genet.* 1985;22:377-81.
- Adekile A, Muah-Ali A, Akar NA. Does elevated hemoglobin F modulate the phenotype in Hb SD-Los Angeles? *Acta Haematol.* 2010;123(3):135-9.26.
- Taghavi Basmanj M, Karimipoor M, Amirian A, Jafarnejad M, Kattouzian L, Valaei A, Bayat F, Kordafshari A, Zeinali S. Co-inheritance of hemoglobin D and β -thalassemia traits in three families: clinical relevance. *Arch Iran Med.* 2011;14(1):61-3.27
- Pandey S, Ranjan R, Mishra RM, Pandey S, Saxena R. Interaction of α 3.7, β Thalassemia Mutation IVS 1-5 and HbD Punjab in a Family: A Case Report. *Indian J Clin Biochem.* 2012 Jul;27(3):314-7. doi: 10.1007/s12291-012-0189-8. Epub 2012 Mar 24.
- Das S, Mashon RS. Coinheritance of Hb D-Punjab and β -thalassemia: diagnosis and implications in prenatal diagnosis. *Hemoglobin.* 2015;39(2):138-40. doi: 10.3109/03630269.2015.1004335. Epub 2015 Feb 10.
- Belhou KM, Bakir ML, Abdulrahman M. Misdiagnosis of Hb D-Punjab/ β -thalassemia is a potential pitfall in hemoglobinopathy screening programs: a case report. *Hemoglobin.* 2013;37(2):119-23. doi: 10.3109/03630269.2013.769174. Epub 2013 Feb 20.
- Taghavi Basmanj M, Karimipoor M, Amirian A, Jafarnejad M, Kattouzian L, Valaei A, Bayat F, Kordafshari A, Zeinali S. Co-inheritance of hemoglobin D and β -thalassemia traits in three Iranian families: clinical relevance. *Arch Iran Med.* 2011 Jan;14(1):61-3. doi: 011141/AIM.0014.
- Bouchán-Valencia P, Coeto-Barona G, Rosenfeld-Mann F, Trueba-Gómez R, Baptista-González H, Rivera-Echegoyén M, Rodríguez-Terán G, Martínez-Villegas O. Molecular identification of Hemoglobin D Punjab in cases detected in two families. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2016 Nov-Dec; 54(6):793-800.

Поступила 26.02.2018