

**СТРУКТУРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ Hb D PUNJAB В ГЛУ→ГЛН
У БОЛЬНОЙ С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИЕЙ**

Гаджиев Э.Г., Гаджиева Г.Г.

**Научно Исследовательский Институт гематологии и трансфузиологии
им. Б.А.Эйвазова, Баку, Азербайджан**

При обследовании женщины - азербайджанки 26 лет, был обнаружен аномальный Hb. Структурная идентификация варианта Hb позволила впервые выявить в Азербайджане наличие гетерозиготного носительства Hb D punjab в 121глу→глен. Проведенные семейно-генетические исследования позволили выявить в целом 10 гетерозиготных носителей по Hb D punjab. Характерным для гетерозигот по Hb D punjab были нормальные уровни малых гемоглобиновых фракций A₂ и F. В отличие от пробанда, у которого было обнаружена сопутствующая железодефицитная анемия, у остальных гетерозиготное носительство Hb D punjab сопровождалось без каких-либо существенных клинико-гематологических изменений.

Ключевые слова: аномальный Hb, структурная идентификация, Hb D punjab, гетерозиготное носительство.

Для практического здравоохранения Азербайджана использование методов молекулярной диагностики имеет весьма важное значение, так как на его территории встречаются мутации, определяющие возникновение как различных форм талассемий, так и аномальных гемоглобинов, различные сочетания которых могут обуславливать широкий спектр клинико-гематологических проявлений.

Исходя из изложенного, была сформирована цель – молекулярная диагностика выявленных аномальных гемоглобинов, а также изучение клинико-гематологических особенностей мутантных вариантов среди населения Азербайджана.

Структурная идентификация варианта гемоглобина (Hb) была проведена по обычной схеме изучения первичной структуры мутантных белков, а также была использована альтернативная схема изучения аномального Hb, включающая комплекс модифицированных микрометодов

по получению суммарного глобина, аномальной цепи с последующим протеолизом трипсином [4].

В группу наиболее распространенных мутантных вариантов Hb наряду с Hb S, Hb E и Hb C входит также Hb D Punjab β 121Глу→Глн. Сообщения о носительстве Hb D Punjab в Азербайджане носили предварительный и ориентировочный характер [3,12]. В связи с этим приводим первый случай структурной идентификации Hb D Punjab в Азербайджане.

При обследовании женщины – азербайджанки 26 лет, находящейся на лечении в клинике по поводу анемии, был обнаружен аномальный Hb. Мутантный вариант был выявлен при электрофорезе на ацетат-целлюлозной пленке (АЦП) в трис-ЭДТА-боратном буфере [14] в виде медленнодвигающейся фракции, расположенной на уровне Hb S. Были проведены клинико-гематологическое и генеалогическое исследования. Подсчет эритроцитов, ретикулоцитов, определение содержания общего Hb, изучение морфологии эритроцитов в мазках периферической крови, определение среднего содержания Hb в отдельном эритроците (ССГЭ), среднего объема эритроцита (СОЭ) проводили общепринятыми гематологическими методами. Показатель Ht определяли на приборе «ТЕМЕД» (Польша). Содержание сывороточного железа определяли по методу [11], а уровень фетального Hb по Wetke [8]. Процентное содержание аномального Hb определяли путем элюирования фракций после электрофореза на АЦП [14]. С целью дифференциации выявленного Hb был проведен электрофорез в цитратном агаровом геле рН 6,0 [13], а также аналитическое разделение цепей глобина на АЦП «Cellogel, Serva» в денатурирующих глобин условиях рН 6,5; 8,9 [15], использование пробы на серповидность, термостабильность и изопропанальный тест [9].

Структурная идентификация варианта Hb была проведена по обычной схеме изучения первичной структуры мутантных белков. Препаративное разделение цепей проводили колоночной ионообменной хроматографией на КМ-целлюлозе [10]. Выделенную аномальную β -цепь расщепляли

трипсином [TRTPCK, Wortington, США]. Разделение триптических гидролизатов проводили при помощи метода пептидных карт в тонком слое микрокристаллической целлюлозы «Merk, ФРГ» [4]. Аминокислотный состав пептидов определяли на автоматическом анализаторе D-500 «Durrum, США». Данные электрофореза гемолизата на АЦП, рН 9,0, в цитратном агаровом геле рН 6,0, а также результаты аналитического разделения цепей глобина на АЦП «Cellologel» рН 6,5; 8,9 позволили отнести обнаруженную фракцию к Д-подобным гемоглобинам.

При осмотре больной кожные покровы бледные, выраженные койлонихии, сечение волос. Печень и селезенка не увеличены. При гематологическом исследовании – снижение общего Нб до 77,0 г/л, эритроцитарные показатели: СОЭ – 81,2 фл, ССГЭ – 24,1 пг. Анализ мазков периферической крови свидетельствовал о выраженных морфологических изменениях эритроцитов (гипохромия, анизо- и пойкилоцитоз, мишеневидные эритроциты). Уровень сывороточного железа у обследуемой составил 8,1 мкмоль/л, что свидетельствовало о наличии сопутствующей железодефицитной анемии. Содержание аномального Нб составляло 25,0%. Уровни малых фракций Нб были в пределах нормальных величин. Проба на термостабильность и изопропанольный тест свидетельствовали о стабильности мутантного варианта.

Пептидные карты триптических гидролизатов нормальной и аномальной β-цепей Нб D Punjab представлены на рис.1, при сравнении четко видно отсутствие на пептидной карте аномальной цепи пептида T13 и появление аномального пептида T13a. Неизменность аминокислотного состава, по данным анализа, в сочетании с изменившейся электрофоретической подвижностью этого пептида по сравнению с нормой подтверждает замену в пептиде T13 в позиции 121глу→гln.

Родословная обследованного пробанда показала (рис.2), что пробанд (II-9) унаследовал аномальный Нб от матери (I-2). Помимо упомянутых носителей, Нб D Punjab был обнаружен у дочери (III-11), а также у двух

братьев (II-1,5) пробанда. А всего в описанной семье было выявлено 10 гетерозиготных носителей Hb D punjab. В отличие от пробанда, у которого было обнаружена сопутствующая железодефицитная анемия, у остальных гетерозиготное носительство Hb D punjab сопровождалось без каких-либо существенных изменений. При анализе мазков периферической крови у 2 гетерозигот были обнаружены мишеневидные эритроциты, а у 3-анизоцитоз. Характерным для гетерозигот по Hb D punjab были нормальные уровни малых гемоглобиновых фракций A₂ и F. Процентное содержание Hb D punjab, в основном, колебалось от 35,0 до 41,0%. Следует отметить, что результаты обследования выявленных в семье пробанда гетерозигот свидетельствовали о мягком и практически бессимптомном течении гемоглобинопатии D punjab.

В основном Hb D punjab распространен (до 3,0%) в северо-западной Индии у жителей штата Пенджаб [16,17]. Носительство D punjab обнаружено у жителей ряда европейских стран, Северной и Западной Африки. Случаи гемоглобиноза D punjab описаны у русских, узбеков, таджиков и представителей народностей Дагестана [1,2,5-7].

В отличие от распространенных на земном шаре вариантов Hb S, Hb E и Hb C, обеспечивающие своим носителям селективные преимущества в районах эндемичных по малярии, распространение Hb D punjab не связано с существованием селективных преимуществ для их носителей. Во всяком случае, доказательства существования каких-либо селективных преимуществ в настоящее время не имеется [14].

Таким образом, проведенная структурная идентификация мутантного варианта Hb доказавшая наличие в Азербайджане Hb D punjab β 121глу→глен, что в свою очередь позволяет расширить представления о структурных гемоглобинопатиях в Азербайджане.

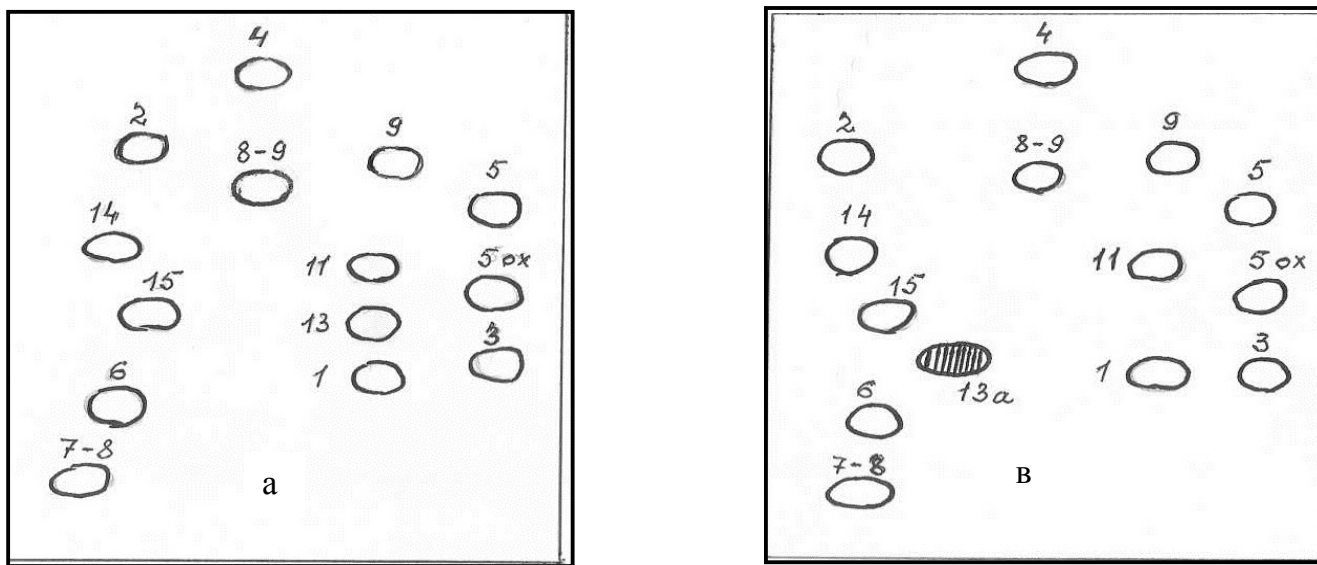


Рис. 1 Пептидные карты триптического гидролизата нормальной [а] и аномальной [б] β -цепи Hb D punjab β 121 Г ЛУ \rightarrow Г ЛН

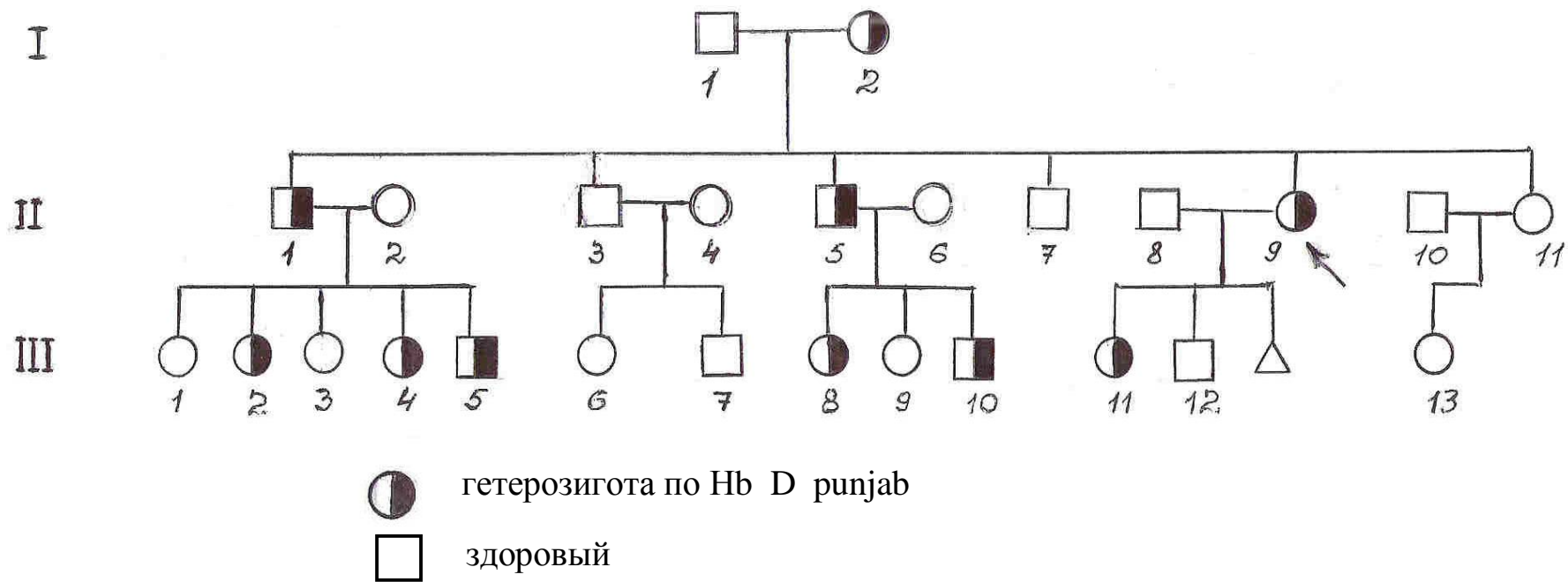


Рис. 2 Родословная семьи пробанда

Литература

1. Гарькавцева Р.Ф., Мусницкая Е.Н., Кауров Б.А. Популяционно-генеалогические исследования гемоглинопатий у населения южных районов Узбекской и Таджикской союзных республик // Пробл. гематол.-1976.-№1.-с.37-41.
2. Гемоглинопатии и талассемические синдромы // под ред. А.Г.Румянцева, Ю.Н.Токарева, Н.С.Стетаниной. – М.: Практическая медицина, 2015.-448с.
3. Джавадов Р.Б., Троицкая О.В., Гринберг Л.Н. и др. Аномальные гемоглибины, талассемия, Г-6-ФДГ в Агдашском и Геокчайском районах Азербайджана // Азерб. мед. журн.-1979.-№3.-с.72.
4. Спивак В.А., Асеева Е.А., Луценко И.Н. Микропрепаративные тонкослойные пептидные карты в молекулярной диагностике аномальных гемоглибинов человека // Молек. генет., микробиол. И вирусол.-1988.-№4.-с.29-36.
5. Спивак В.А., Молчанова Т.П., Ермаков Н.В. и др. Установление первичной структуры аномального D-подобного гемоглибина, выявленного в крови донора // Биохимия.-1978.-с.1175-1183.
6. Спивак В.А., Молчанова Т.П., Ермаков Н.В. и др. Структурная идентификация аномальных гемоглибинов S и Dpunjab, обнаруженных на территории Уз.ССР / Конференция «Новое в трансфузиологии и гематологии» - 1980.- Ташкент.- Медицина.- Тезисы.-с.35.
7. Хасаев И.А., Шамов М.Н., Кулагин М.Н. и др. Гемоглибин Dpunjab в Дагестане // Гематол. и транс.-1983.-№6.-с.47-48.
8. Betke K., Marti H.R., Schlicht I. Estimation of small percentages of foetal haemoglobin // Nature.-1959.-V.184.-P.1877.
9. Carrel R.W., Kay R. A simple method for the detection of unstable hemoglobins // Brit. J. haemat.-1972.-V.23.-P.615.
10. Clegg J.B., Naughton M.A., Weatherall D.J. Abnormal human haemoglobins. Separation and characterization of the α and β chains by chromatography and the determination of two new variants, Hb Chesapeake and HbJ [Bangkok] // J. Mol. Biol.-1966.-V.19.-P.91.
11. International committee for Standardization in haematology // Clin.Chem.-1971.-Vol.17.-p.127.
12. Javadov R.B., Gironberq L.N., Krasnova S.N. et al. Haemoglobinopathies and glucose-6 phosphate dehydrogenase deficiency in one of the regions of Azerbaijan: mass screening and laboratory investigations // Acta Biol.Med.Germ.,1977.v.36,p.709.
13. Le Crone C.N., Broszeit H.K., Jones J.A., Detter J. Adaptation of the acid citrate-agar gel method for haemoglobin electrophoresis // Clin.chem.-1976.-V.22/10.-p.1743.
14. Lehmann H., Hantsman R.G. Mans hemoglobins. - Amsterdam-Oxford; North Holland Publ. Comp., 1974.-p.177-184,310.
15. Schneider R.G. Differentiation of electrophoretically similar hemoglobins such as S,D,C and P or A₂, C,E and 0 by electrophoresis of the globin chains // Clin. Chem.-1974.-v.20.-p.1111-1115.
16. Vella F., Lehmann H. Haemoglobin D Punjab [D Los Angeles] // J.Med.Genet.-1974. V.11.-p.341-348.
17. Weatherall D.J., Clegg J.B. The Thalassemia syndromes.-3rd ed.Oxford,Blackwell Scientific publications,1981.-p.86.

XÜLASƏ

DƏMİRDEFİSİTLİ ANEMİYASI OLAN XƏSTƏDƏ HB D PUNJAB

β QLU→QLN STRUKTUR İDENTİFİKASIYASI

Hacıyev E.H., Hacıyeva G.H.

**B.Ə.Eyvazov ad. Elmi tədqiqat Hematologiya və Transfuziologiya institutu,
Bakı, Azərbaycan**

26 yaşında olan azərbaycanlı qadının müayinəsi zamanı anomal Hb aşkarlanmışdır. Hb variantının struktur identifikasiyası ilk dəfə Azərbaycanda Hb D punjab β qlu→qln heteroziqot daşıyıcılığının olmasını müəyyən etmişdir. Hb D punjab β qlu→qln üzrə aparılan ailə-genetik tədqiqatlar tam olaraq 10 heteroziqot daşıyıcıları müəyyən etməyə imkan vermişdir. Hb D punjab üzrə heteroziqot üçün xarakter A₂ və F kiçik hemoqlobin fraksiyalarının normal səviyyəsi olmuşdur. Müştərək dəmirdefisitli anemiyanın aşkarlandığı probanddan fərqli olaraq, qalan Hb D punjab heteroziqot daşıyıcılığı hər hansı bir klinik-hematoloji əhəmiyyət kəsb edən dəyişikliklərlə müşayiət olunmamışdır.

Açar sözlər: anomal Hb, struktur identifikasiya, Hb D punjab, heteroziqot daşıyıcılıq.

SUMMARY

STRUCTURAL IDENTIFICATION OF β D PUNJAB HB GLU→ GLN PATIENT WITH IRON DEFICIENCY ANEMIA

Hajiyev E.G., Hajiyeva, G.G.

**¹Scientific research institute of Hematology and Transfusiology named after
B.A.Eyvazov, Baku, Azerbaijan**

In a survey of women – an 26 years old, was discovered abnormal Hb. Structural identification of variant Hb for the first time reveal the presence in Azerbaijan heterozygous Hb carrier D punjab β 121glu→gln. Family genetic studies revealed a total of heterozygous media 10 Hb D of punjab. Characteristic heterozigot on Hb D punjab were normal levels of small factions gemoglobin A₂ and F. Unlike probanda who had discovered the accompanying anemia, other carriers of heterozygous Hb D punjab was accompanied by without any significant clinical and hematological changes.

Keywords: abnormal Hb, structural identification, Hb D punjab, heterozygous carrier.

Redaksiyaya daxil olub: 12.01.2017

Çapa tövsiyə olunub: 26.01.2017

Rəyçi: dos. Qədimova E.Ə.