

К.Т. БОБОЕВ

НИИ гематологии и переливания крови
МЗ Республики Узбекистан, Ташкент
E.mail: abdukadir-babaev@mail.ru

ПОПУЛЯЦИОННЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ГЕМОФИЛИИ «А» И «В» В УЗБЕКИСТАНЕ



Работа суммирует результаты проведенных ретроспективных эпидемиологических и молекулярно-генетических исследований гемофилии А и В в Узбекистане. За период с 1991 по 2004 гг. в республике зарегистрировано 1304 случая гемофилии А и В (суммарно). Показатель заболеваемости колебался от 0,75 до 1,46 на 10 000 новорожденных мальчиков. Средняя частота рождения больных гемофилией А и В составила $1 : 8735$ ($1,14 \cdot 10^{-4}$) родившихся мальчиков. Проанализированы особенности некоторых ДНК-полиморфизмов в генах факторов VIII и IX свертывания крови в узбекской популяции. Изучены частоты аллелей и определена информативность этих генетических маркеров для выявления гетерозиготного носительства и пренатальной диагностики гемофилии А и В. Подведены итоги ДНК-диагностики гемофилии А и В.

© К.Т. БОБОЕВ, 2008

Введение. Основным эффективным путем профилактики гемофилии А и В является медико-генетическое консультирование (МГК) семей больных с последующим выявлением гетерозиготных носителей и проведением пренатальной диагностики на ранних этапах беременности. В современных условиях МГК семей больных невозможно без создания генетического регистра, важной составной частью которого является популяционно-генетическое изучение заболевания [1, 2]. Установление статуса носительства и последующая пренатальная диагностика гемофилии А и В осуществляется в основном при помощи молекулярно-генетических методов, основу которых на сегодняшний день составляет тестирование мутантного гена посредством анализа полиморфных маркеров, расположенных внутри генов факторов VIII и IX или сцепленных с ними [3, 4]. В настоящей работе представлены обобщенные результаты проведенного нами ретроспективного эпидемиологического и молекулярно-генетического исследования гемофилии А и В в Узбекистане.

Материалы и методы. В качестве материала для эпидемиологического исследования гемофилии использованы ретроспективные данные архивных материалов НИИГ и ПК МЗ Республики Узбекистан и гематологических отделений всех областей республики за период 1990–2004 гг. (15 лет). Частота заболеваний рассчитана за период 1991 по 2000 гг. (10 лет). Показатель заболеваемости вычисляли по формуле

$$Y = \frac{n \cdot 10^4}{N \cdot t},$$

где n — абсолютное число впервые зарегистрированных случаев заболевания; N — численность детского населения на момент наблюдения; t — количество лет наблюдения.

Показатель заболеваемости рассчитывали на 10 000 живых новорожденных мальчиков.

Материалом для проведения молекулярно-генетического исследования служили образцы ДНК (270 образцов), полученные от семей больных гемофилией и здоровых доноров узбекской национальности. Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), рестрикцию фрагментов ДНК специфическими эндонуклеазами и электрофорез осуществляли согласно общепринятым методам [3, 5, 6].

Молекулярно-генетическая часть работы выполнена совместно с НИИ акушерства и гинекологии им. Отто РАМН (г. Санкт-Петербург) в лаборатории пренатальной диагностики (зав. чл.-кор. РАМН В.С. Баранов).

Результаты исследований и их обсуждение. По данным Государственного комитета по статистике, за анализируемый период в Узбекистане родилось 3 258 241 мальчиков (табл. 1), из них 373 случая зарегистрированы как больные гемофилией А и В (суммарно). Абсолютное количество впервые зарегистрированных за один год случаев гемофилии А и В по республике подвержено значительным колебаниям (от 21 до 52 случаев). В среднем ежегодно выявлялось $37,00 \pm 3,47$ больных в год. Показатель заболеваемости гемофилией в республике также колебался от 0,75 до 1,46 на 10 000 новорожденных мальчиков, рожденных живыми. Среднегодовой показатель заболеваемости детей гемофилией за 10-летний период составил $1,13 \pm 0,08$.

Таблица 1
Динамика показателя заболеваемости и абсолютное число первично выявленных с гемофилией А и В в Узбекистане в период с 1991 по 2003 гг.

Год наблюдения	Количество, рожденных живыми новорожденных мальчиков	Гемофилия А+В	
		Абсолютное число первично выявленных случаев гемофилии у детей	Показатель заболеваемости гемофилией у детей (на 10 000 рожденных мальчиков)
1991	372 193	49	1,32
1992	365 018	52 **	1,42
1993	355 634	48	1,35
1994	342 647	50	1,46 **
1995	349 720	29	0,83
1996	326 783	33	1,01
1997	309 961	27	0,87
1998	284 923	33	1,16
1999	280 095	21 *	0,75 *
2000	271 267	31	1,14
Итого	3 258 241	373	
Среднее значение (M ± m)	$325\,824,1 \pm 11\,748,27$	$37,3 \pm 3,56$	$1,13 \pm 0,08$

* Минимальные значения показателя заболеваемости.

** Максимальные значения показателя заболеваемости.

Одной из следующих задач настоящего исследования было установление частоты гемофилии А и В в республике. Средняя частота рождения больных гемофилией А и В за 10-летний период составила $1 : 8735 (1,14 \cdot 10^{-4})$ родившихся мальчиков (табл. 2). Распространенность гемофилии в отдельных областях республики колеблется от 0,5 до 2,04 на 10 000 живорожденных мальчиков. Самые высокие показатели установлены в Джизакской (2,04), Хорезмской (1,97), Андижанской (1,58) областях и городе Ташкенте (2,02), что существенно превышает общереспубликанский показатель (1,15). В Ташкентской, Бухарской и Ферганской областях частоты заболевания соответствовали общереспубликанскому показателю (1,15; 1,14 и 1,12 соответственно). Наименьшая частота заболеваемости наблюдалась в Кашкадарьинской, Сурхандарьинской, Наманганской и Сырдарьинской областях (0,5; 0,76; 0,85 и 0,92 соответственно).

Полученные средние показатели заболеваемости гемофилией в республике можно характеризовать как невысокие при сравнении с литературными данными из других стран [1, 7–10], что, возможно, связано со снижением общего уровня рождаемости в республике и, главное, со сравнительно низким уровнем выявляемости заболеваний (особенно в регионах). Полученные данные о заболеваемости являются важной составной частью для создания генетического регистра гемофилии, что позволит планировать организацию лечебно-профилактических мероприятий и дать правильную оценку их эффективности. Дальнейшим прогрессом в решении проблем гемофилии является внедрение в республике медико-генетического консультирования, выявление гетерозиготных носителей и пренатальная диагностика на ранних сроках беременности.

К настоящему времени в гене фактора VIII были полностью исследованы полиморфные локусы HindIII и XbaI (интронов 19 и 22 соответственно), микросателлитные (CA)_n повторы (интронов 13 и 22), а также, частично, внегенный минисателлитный полиморфизм TaqI в локусе DхS52 (табл. 3).

Показано сходство характера распределения частот аллелей полиморфных локусов HindIII и XbaI на нормальных и мутантных хромосо-

мах. Обнаружена существенная гетерогенность аллельного разнообразия микросателлитных (СА)-повторов интрона 13 и 22. В локусе (СА)-повтора интрона 22 в обследованной нами узбекской популяции идентифицировано два новых, ранее не описанных аллеля, размеры (СА)-динуклеотидных повторов которых были равны 27 и 28. Частоты встречаемости новых аллелей в узбекской популяции составили 0,11 и 0,04 соответственно. Дальнейший анализ показал, что область распространения дополнительных аллелей ограничена узбекской и, возможно, территориально близко расположенными популяциями. Тестирование указанного полиморфизма перспективно для изучения процессов миграции населения и, возможно, для выяснения этнической принадлежности. Частоты гетерозиготности полиморфизмов HindIII, XbaI и (СА)-повторов интронов 13 и 22 в узбекской популяции составили 0,40; 0,50; 0,34; 0,60 соответственно. Эти данные позволили рассчитать диагностическую эффективность, т.е. суммарную информативность использования этих локусов для ДНК-диагностики гемофилии А, которая для популяции Узбекистана составляет 0,92. Теоретически это означает, что 92 % семей с гемофилией А информативны хотя бы по одному из четырех маркеров и при необходимости в этих семьях может быть проведена пренатальная диагностика.

Полностью исследованы полиморфные локусы HinfI-DdeI, TaqI (интроны а и d соответственно), а также полиморфизм TaqI-Alu4 (табл. 4). Разработаны основные подходы выявления гетерозиготного носительства и пренатальной диагностики гемофилии В. Частоты гетерозиготности полиморфизмов HinfI/DdeI, TaqI и TaqI-Alu4 в узбекской популяции составили 0,45; 0,27 и 0,21 соответственно. Обнаружена существенная гетерогенность аллельного разнообразия инсерционного полиморфизма HinfI/DdeI в узбекской популяции. Идентифицирован ранее не описанный дополнительный аллель размером 395 п.о., являющийся, по всей вероятности, результатом инсерционного полиморфизма. Частота гетерозиготности упомянутого маркера благодаря наличию нового аллеля оказалась выше (0,45), чем в других изученных европейских популяциях (0,41). Выявлены сравнительно низкие частоты гетерозиготности

Таблица 2
Частота гемофилии А + В по регионам Узбекистана

Регионы (области)	Количество		Частота гемофилии	Частота ($\times 10^{-4}$)
	рожденных живых мальчиков	больных		
г. Ташкент	188 342	38	1 : 4956	2,02
Ташкентская	278 064	32	1 : 8689	1,15
Джизакская	142 386	29	1 : 4909 **	2,04 **
Кашкадарьинская	337 086	17	1 : 19828 *	0,5 *
Самаркандская	384 327	39	1 : 9854	1,01
Наманганская	269 494	23	1 : 11717	0,85
Бухарская	175 701	20	1 : 8785	1,14
Ферганская	357 013	34	1 : 9154	1,12
Андижанская	290 038	46**	1 : 6305	1,58
Сырдарьинская	86 830	8*	1 : 10853	0,92
Сурхандарьинская	275 229	21	1 : 13106	0,76
Каракалпакстан	197 269	21	1 : 9393	1,06
Хорезмская	181 216	36	1 : 5033	1,97
Навоинская	98 246	10	1 : 9825	1,02
По республике	3 258 241	373	1 : 8735	1,14

* Минимальные значения частоты заболеваемости.

** Максимальные значения частоты заболеваемости.

Таблица 3
Частоты встречаемости гетерозигот полиморфных маркеров гена ФVIII в узбекской популяции

Полиморфизм	Размер аллеля, п.о.	Частота аллелей	Гетерозиготность	
			экспериментальная	теоретическая
HindIII, интрон 19	250	0,72	0,42	0,40
	160 + 90	0,28		
XbaI, интрон 22	96	0,52	0,50	0,50
	68 + 28	0,48		
(СА) _n , интрон 13	(СА) ²⁴	0,00	0,34	—
	(СА) ²³	0,03		
	(СА) ²²	0,03		
	(СА) ²¹	0,14		
	(СА) ²⁰	0,8		
	(СА) ¹⁹	0,00		
	(СА) ¹⁸	0,00		
	(СА) ¹⁷	0,00		
(СА) _n , интрон 22	(СА) ²⁵	0,28	0,52	0,60
	(СА) ²⁶	0,57		
	(СА) ²⁷	0,11 *		
	(СА) ²⁸	0,04 *		

* Новые аллели.

Таблица 4
Частоты встречаемости гетерозигот полиморфных маркеров гена ФІХ в узбекской популяции

Поли-морфизм	Размер аллеля, п.о.	Частота встречаемости	Гетерозиготность	
			экспериментальная	теоретическая
TaqI, интрон <i>d</i>	594 463	0,84 0,16	0,30	0,27
HinfI-DdeI, инсерция интрон <i>a</i>	395 *	0,1		
TaqI-Alu4, интрон <i>f</i>	350	0,21	0,43	0,45
	300	0,69		
TaqI-Alu4, интрон <i>f</i>	184	0,88	0,20	0,21
	176 + 8	0,12		

* Новый аллель.

локусов TaqI интрона *d* и TaqI-Alu4 (0,27 и 0,21 соответственно). Показано сходство характера распределения частот аллелей этих полиморфных локусов в нормальных и мутантных генах. Полученные данные свидетельствуют о популяционной особенности этих аллельных полиморфизмов в узбекской популяции. Рассчитанная диагностическая эффективность, т.е. суммарная информативность использования этих локусов для ДНК-диагностики гемофилии В, составляет 0,68.

Исследованные нами генетические маркеры генов VIII и IX оказались информативными для выявления гетерозиготных носителей гемофилии А и В в 27 обследованных нами семьях. В результате проведенной ДНК-диагностики статус носительства мутаций гена был отвергнут у 15, а определен у 17 родственниц больных гемофилией А и В. В 5 случаях успешно проведена пренатальная диагностика гемофилии А.

Таким образом, проведенный анализ показывает как сходство, так и популяционные особенности полиморфных аллелей генов VIII и IX в узбекской популяции. В результате проведенных исследований определена информативность этих молекулярных маркеров и на основе этого разработана эффективная стратегия ДНК-диагностики гемофилии А и В в Узбекистане.

SUMMARY. This work summarizes the results of conducted retrospective epidemiologic and molecular genetic investigations of Hemophilia A and B in Uzbekistan. Totally 1304 Hemophilia A and B cases were registered in the republic during the period from 1991 to 2004. Morbidity rate varied from 0.75 up to 1.46 per 10 000 new born boys. An average birth rate of patients with Hemophilia A and B for 10 years period (1991–2000) was 1 : 8735 ($1.14 \cdot 10^{-4}$) of born boys. Some peculiarities of DNA polymorphism in genes of blood coagulation factors VIII and IX in Uzbek population have been analyzed. Frequency of alleles was studied and self-descriptiveness of these gene markers for revelation of heterozygous carrier and prenatal diagnostics of hemophilia A and B have been determined. Finally DNA-diagnostics of Hemophilia A and B were summed up.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лобанова Е.В., Чернов В.М., Румянцев А.Г. Заболеваемость детей в 17 регионах Российской Федерации в период с 1991 по 1994 гг. // Гематология и трансфузиология. – 1999. – 44, № 6. – С. 53–54.
2. Эфендиев З.И. Клинико-популяционные особенности и принципы реабилитации больных гемофилией : Дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1983.
3. Bowen D.J. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights // J. Mol. Pathol. – 2002. – 55. – P. 127–144.
4. Pruthi R.K. Hemophilia: a practical approach to genetic testing // Mayo Clin. Proc. – 2005. – 80 (11). – P. 1485–1499.
5. Lalloz M.R.A. et al. Haemophilia A diagnosis by analysis of a novel dinucleotide tandem repeat sequence within the factor VIII gene // Brit. J. Haematol. – 1992. – 80. – P. 3а.
6. Saiki R.K., Scharp S., Faloona F. Polimerasa chain reaction // Science. – 1985. – 230. – P. 1350.
7. Никонов А.М., Бувич Е.И. Популяционно-генетическое исследование гемофилии в Алтайском крае // Пробл. гематологии. – 1999. – № 1. – С. 21–25.
8. Чернов В.М., Лобанова Е.В., Якунина Л.Н., Вдовин В.В. и др. Динамика заболеваемости гемофилией детей различных регионов Российской Федерации с 1991 по 1994 гг. // Гематология и трансфузиология. – 1999. – 44, № 2. – С. 7–10.
9. Istvan L., Czeizel A. Genetic-epidemiologic study of haemophilia A and B in Hungary // Hum. Hered. – 1990. – 40. – P. 29–33.
10. Spassov B., Spassov V. Population genetics in children with haemophilia in Bulgaria // XX Inter. Cong. of the WFH. – Hague, Netherlands, 1998. – P. 156.

Поступила 05.09.07