

UOT 575.1/2:599.89

S.Ə. Ağayeva

AMEA Genetik Ehtiyatlar İnstitutu

saltanat.genetic@gmail.com

AZƏRBAYCAN RESPUBLİKASI POPULYASIYASINDA Q-6-FD GENİNİN GENETİK TƏDQIQI

Açar sözlər: Q6FD, biokimyəvi polimorfizm, gen, molekulyar-genetik analiz, mutasiya, nukleotid, aminturşu

Azərbaycan Respublikasının Masallı rayonunun məktəblərində aparılan genetik skrining nəticəsində 23 şagirdə Q6FD fermentinin müxtəlif dərəcəli ferment çatışmazlığı (0-60%-li aktivlik) təyin edilmişdir. Fermentin defisiti aşkar edilmiş şagirdlərin eritrositlərindən hazırlanmış ferment preparatlarının biokimyəvi analizi aparılmış və ÜST-nin göstərişinə əsasən üç sinfə aid edilmişlər: 2-ci sinfə – 13 şagird, 3-cü sinfə – 6 şagird, 4-cü sinfə – 4 şagird.

2-ci sinfə aid edilmiş probandın qanından əldə edilmiş DNT-nin molekulyar analizi nəticəsində G6FD geninin 1178-ci nukleotidi quaninin adenin nukleotidilə əvəzi identifikasiya edilmişdir. Mutasiya nəticəsində zülalın 393-cü vəziyyətində arginin aminturşusu histidin aminturşusu ilə əvəzi baş vermişdir [Q6FD,1173 (G-A) Arq393His].

S.А.Агаева

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНА Г6ФД В ПОПУЛЯЦИИ АЗЕРБАЙДЖАНСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

Ключевые слова: Г6ФД, биохимический полиморфизм, ген, молекулярно-генетический анализ, мутация, нуклеотид

Генетический скрининг школьников Масаллинского района Азербайджанской Республики у 23 школьников выявил дефицит фермента Г6ФД в различной степени (от 0 до 60% активности). Биохимические анализы для школьников с дефицитом активности фермента проведены на ферментных препаратах, приготовленных из эритроцитов. По показаниям ВОЗ исследованные ферментные препараты были отнесены к следующим классам: 2 класс – 13 школьников, 3 класс – 6 школьников, 4 класс – 4 школьника. Молекулярный анализ ДНК, выделенной из крови пробанда с 2-м классом недостаточности фермента Г6ФД, выявил замену нуклеотида гуанин на аденин в позиции 1178. В следствии мутации в 393 позиции в белке происходит замена аминокислоты аргинин на гистидин [G6PD,1173 (G-A) Arg393His].

S.A.Aghayeva

GENETIC STUDIES OF G6PD GENE IN POPULATION OF THE AZERBAIJAN REPUBLIC

Keywords: *G6FD, biochemical polymorphism, gene, molecular genetic analysis, mutation, nucleotide*

Genetic screening of school children in Masally region in Azerbaijan Republic identified 23 school children with G6PD enzyme activity different deficiency (from 0 up to 60% activity). Biochemical studies were done for school children with activity deficiency on enzyme preparations from erythrocytes. As to WHO Guidelines enzymatic preparations were related to the following calsses: 2nd class – 13 schoolboys, 3rd class – 6 schoolboys, 4th class – 4 schoolboys.

DNA molecular analysis, isolated from blood of the index patient classified as the 2nd class of G6PD enzyme deficiency, has shown the substitution of Guanine nucleotide with Adenine in position 1178. As a result of the mutation in protein in the position 393, there was substitution of amino acids Arginine with Hystidine [G6PD,1173 (G-A) Arg393His].

GİRİŞ

Qlükoza-6-fosfat dehidrogenaza (Q6FD: EC 1.1.1.49) fermentinin geni yüksək polimorfizmi ilə fərqlənir. Fermentin 400-dən artıq biokimyəvi variantı müəyyən edilmişdir ki, bunların da təxminən 1/4 hissəsi endemikliyilə fərqlənir. Q6FD fermentinin anormal variantlarından bir qismi konkret bir etnik qrup üçün, digər qismi müxtəlif etnik qrup üçün xarakterik olmuşdur. Fermentin defisiti olan şəxslərin bir qrupu dərman preparatları, digər qrupu paxlalı qida məhsulları qəbul edərkən (favizm) onlarda hemolitik kriz baş verir [11; 14; 15].

Biokimyəvi variantların əksəriyyəti kliniki asiptomatik olur. Biokimyəvi variantların böyük qismi kimyəvi maddələrin təsirindən hemolitik anemiya ilə nəticələnir. Variantların kiçik bir qismi ağır xroniki qeyri-sferositar anemiyaya səbəb olur [1; 2; 3].

Q6FD fermentinin geni X-cinsi xromosomda yerləşir və heteroziqotdaşıyıcı anadan oğula ötürülür. Qadınlarda iki X-cinsi xromosomdan biri inaktivləşdiyindən, heteroziqotların klinikasında fərq müşahidə olunur. Fermentin zədələnməmiş geni inaktivasiya olduğu halda eritrositlərin əksəriyyətində zədələnməmiş gen üstünlük təşkil edir və klinikası hemoziqot kişilərdə olduğu kimi olur [1; 12; 13].

Ümumdünya Səhiyyə Təşkilatının məlumatına əsasən (1997) dünya əhalisində təxminən 100 milyon insanda Q6FD fermentinin çatışmazlığı müşahidə edilir [1; 2; 12].

Azərbaycan Respublikasının əhalisində Q6FD fermentinin aktivliyinin çatışmazlığı populyasiya səviyyəsində keçən əsrin 70-ci illərindən başlamışdır. Tədqiqatlar yalnız fermentin aktivliyinin öyrənilməsilə kifayətlənmişdir [5; 6].

Keçən əsrin 70-ci illərində Masallı rayonunun əhalisində aparılmış populyasiya tədqiqatları Q6FD fermentinin çatışmazlığının yüksək tezliyini (30-23%) aşkar etmişdir. Beləliklə, tədqiqatlarımız üçün Masallı rayonu təsadüfən seçilməmişdir [1; 17].

Tədqiqatımızın məqsədi Masallı rayonunda populyasiya tədqiqatları nəticəsində aşkar edilmiş pasientdə anormal aktivliyə malik Q6FD fermentinin fiziki-kimyəvi xüsusiyyətlərinin öyrənilməsi, genin molekulyar-genetik tədqiqi olmuşdur.

MATERIAL VƏ METODLAR

Material Masallı rayonunun Ərəbkəndi, Güllütəpə, Təklə, Çaxırlı, Bədəlan kənd məktəblərində və rayon mərkəzində təhsil alan 7-11-ci sinif şagirdləri arasında aparılan skrining nəticəsində toplanmışdır. 276 şagird arasında aparılmış skrining nəticəsində 23 oğlanda Q6FD fermentinin homoziqot irsiyyət tipi aşkar edilmişdir.

Biokimyəvi tədqiqat üçün material tərkibində antikoagulyant EDTA olan venoz qandan istifadə edilmişdir [1; 5].

Q6FD fermentin aktivliyi modifikasiya edilmiş fluoressensiya metodu ilə təyin edilmişdir. Analizin dəqiqliyini, irsiyyət tipini müəyyən etmək üçün ferment defisiti aşkar edilmiş şagirdlərin valideynləri və ailə üzvləri müayinə edilmişlər. Ümumiyyətlə, 302 qan nümunəsi tədqiq edilmişdir [6].

Ferment preparatlarının təmizlənməsi və xarakteristikasının tədqiqi ÜST-nin standartlaşdırılmış metodlarına əsasən aparılmışdır [2].

Q6FD fermentinin geninin molekulyar analizi Almanyanın CENTOGEN laboratoriyasında aparılmışdır [11].

NƏTİCƏLƏR VƏ MÜZAKİRƏ

Skrining nəticəsində 23 şagirdə Q6FD fermentinin müxtəlif dərəcəli ferment çatışmazlığı (0-60%-li aktivlik) təyin edilmişdir. Ümumdünya Səhiyyə Təşkilatının (ÜST) 1967-ci ildə verdiyi məlumatına əsasən Q6FD fermentinin aktivliyinin defisitinə (çatışmazlığına) əsasən beş sinfə bölünür: 1-ci sinif – xroniki qeyri-sferositar anemiya, 2-ci sinif – fermentin kəskin defisiti (10%-dən aşağı); 3-cü sinif - fermentin orta defisiti (10-60%-li aktivlik); 4-cü sinif – fermentin çox yumşaq defisiti (60%) və 5-ci sinif – fermentin normaya uyğun aşağı aktivliyi.

Bizim tədqiqatlarımızda aşkar edilmiş ferment çatışmazlığı ÜST-nin 2, 3 və 4-cü siniflərinə uyğun gəlir: 2-ci sinifdə 13, 3-cü sinifdə - 6, 4-cü sinifdə - 4 şagird.

Cədvəl 1-də Masallı rayonunun məktəb şagirdləri arasında aparılmış Q6FD fermentinin genetik skrininginin nəticələri verilmişdir. Cədvəldə müayinə olunanların sayı, ferment defisiti aşkar olunan şagirdlərin fenotipik tezliyi, ferment çatışmazlığının gen tezliyi, ferment defisitinə əsasən siniflər və yaşayış məntəqələri verilmişdir.

Beş yaşayış məntəqəsi üzrə oğlan cinsli 276 məktəb şagirdi və 24 ailə üzvü müayinə olunmuşlar. Q6FD fermentinin fenotipik tezliyi və gen tezliyi verilmişdir. Yüksək nəticələr Masallı mərkəzi rayon məktəbi (11,11% və 0,1111v.d.), aşağı nəticələr Ərəbkəndi və Təklə kənd məktəbləri üçün alınmışdır (5,56% və 0,0555). Ferment çatışmazlığının rayon üzrə fenotipik tezliyi 8,33%, gen tezliyi 0,0833-ə bərabər olmuşdur.

Masallı rayon mərkəzində Q6FD fermentinin defisitinin 2, 3 və 4-cü sinifləri, Güllütəpə və Bədəlan kəndlərində yalnız 2-ci sinif, Ərəbkəndində və Çaxırlıda 3-cü sinif, Təklə kəndində 2-ci və 3-cü siniflər müəyyən edilmişdir. Bədəlan kəndində fermentin homoziqota irsiyyət tipi olan F.N. probandin 24 ailə üzvü müayinə edilmiş və 6 kişidə fermentin homoziqota irsiyyət tipi təyin edilmişdir. Ailənin nəsil ağacı 1 sayılı şəkildə verilmişdir.

Cədvəl 1. Masallı rayonunda məktəb şagirdləri arasında aparılmış Q6FD fermentinin genetik skrininginin nəticələri

Yaşayış məntəqəsi	Müayinə olunanlar	Aşkar olunanlar	Fenotipik tezlik (%)	Gen tezliyi (vahid daxilində)	Ferment defisitinə əsasən siniflər
Rayon mərkəzi	72	8	11,11	0,1111	2 şagird - 2-ci sinif 2 şagird - 3-cü sinif 4 şagird - 4-cü sinif
Güllütəpə kəndi	38	4	10,53	0,1053	3 şagird - 2-ci sinif 1 şagird - 2-ci sinif
Ərəbkəndi	42	3	5,56	0,0555	3 şagird - 3-cü sinif
Təklə kəndi	54	3	5,56	0,0555	2 şagird - 2-ci sinif 1 şagird - 3-cü sinif
Çaxırlı kəndi	30	2	7,14	0,0714	2 şagird - 3-cü sinif
Bədəlan kəndi	40	3	7,50	0,0750	3 şagird - 2-ci sinif
F.N. probandin ailə üzvləri	24	6	25,0	0,2500	6 şəxs - 2-ci sinif

2-ci sinifə uyğun gələn Bədəlan kənd məktəbinin şagirdi F.N.-nin 24 ailə üzvünün müayinəsi əlavə altı nəfərdə fermentin 2-ci sinfinə uyğun fermentin kəskin defisiti aşkar edilmişdir (10%-dən aşağı).

Cədvəl 2-də Masallı rayonunda Bədəlan kəndində F.N. şagirdinin və ferment defisiti aşkar edilmiş altı ailə üzvünün qanından hazırlanmış ferment preparatlarının fiziki-kimyəvi xarakteristikası verilmişdir.

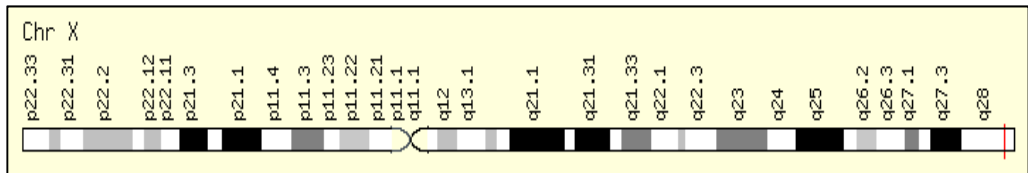
Cədvəl 2. Bədəlan kəndində Q6FD fermentinin identifikasiya edilmiş mutant variantı

Variantın adı	Q6FD Aktivliyi (%)	EF-hərəkəti	K_m Q6F mkmol	2dQ6F utilizasiya	pH optimum	Termostabilitik	Klinikası
Bədəlan	6,0-8,0	85-90	21,3-24,5	78,6-80,0	8,0-9,0	zəif aşağı	Yüngül anemiya

Ferment preparatlarında pH-optimum göstəricisi norma (pH 7,5-8,5) hüdudunda olaraq pH-optimumun bifaz variantı qeyd edilmişdir. Elektroforetik hərəkətilik norma göstərmişdir. Bütün nümunələrdə Q6F substratına əsasən Mixaelis-Menten konstantının (K_m) normadan aşağı göstəricisi aşkar edilmişdir (21,3-24,5 mkm). 2dQ61 substrat analoqu üçün yüksək utilizasiya dərəcəsi müəyyən edilmişdir (78,6-80,0).

Beləliklə, fermentin Bədəlan variantı – fermentin aşağı aktivliyi (normanın 6,0-9,0%-i), Q6F substratı üçün aşağı dərəcəli K_m birləşməsi (24,4 mkm), 2dQ6F substrat analoqu üçün yüksək utilizasiya dərəcəsi (Q6F substratın 80%-i), yüngül anemiya.

Şəkil 1-də X-cinsi xromosomun strukturunun sxematik şəkili və Q6FD geninin lokusu (q28) verilmişdir.



Şəkil 1. X-cinsi xromosomun strukturunun sxematik şəkili və Q6FD geninin lokusu (q28).

Q6FD fermentinin geni X-cinsi xromosomun uzun çiyinin subtelomer Xq28 hissəsində yerləşir. Q6FD fermentinin ilk kDNT-si mRNT-nə əsasən 1981-ci ildə M. Persico tərəfindən sintez edilmişdir. 1986-cı ildə T.Takizawa insanın qaraciyər hüceyrələrindən istifadə edərək klonlaşdırma yolu ilə kDNT-nin kitabxanasını yaratmışdır. İnsanın Q6FD fermentinin geni 13 ekzon və 12 introndan ibarət olaraq 18 kbas ölçüyə malikdir. Ekzonların ölçüsü 12 nukleotid əsasında 236 nukleotid əsasına kimi, intronların ölçüsü 97 nukleotid əsasında başlayaraq 11 kbas ölçüyə kimi təşkil edir. Genin promotor hissəsi – 202 vəziyyətində ATTAAAT 5¹-hissədən, 20 nukleotid əsası əvvəl yerləşərək

TATA qutu rolunu oynayır. Genin promotor hissəsində heksonukleotid ardıcılığı GGGCGGG üç dəfə, bu ardıcılığa komplementar CCCGCCC ardıcılığı 6 dəfə təkrar edilmişdir. Bu nukleotid ardıcılıqları adətən ATTAAAT ardıcılıqlarından 12-400 nukleotid əsası kənarında yerləşir. GGGCGGG ardıcılığı əsasən 1-ci intronun 5¹-sonluqdan 70 kbas məsafədə yerləşir. Transkripsiyanın səviyyəsini tənzimləyən CAAT nukleotid ardıcılığı GC nukleotid ardıcılığı ilə zəngin olan 5¹-hissədən 220 nukleotid əsası məsafəsində yerləşmişdir. ATTG nukleotid ardıcılığı -411-ci vəziyyətdə yerləşmişdir.

1991-ci ildə Chen T.Y. Q6FD fermentnin geni daxil olmaqla 20114 nukleotid ardıcılığını sekvenləşdirmə yolu ilə tədqiq edərək Q6FD fermentinin aminturşu ardıcılığını öyrənmişdir.

Fusco və həmk. (2012) Alu təkrar genin 5¹-translyasiyada iştirak etməyən hissəsində üç dəfə müşahidə edilmişdir. 12 Alu genin ən böyük ikinci intronunda yerləşmişdir. Capellini və Fiorelli (2008) Q6FD fermentinin 515 aminturşu qalığından ibarət olduğunu müəyyən etmişdir [7; 8; 16; 18; 19].

F.N.-nin qanından əldə edilmiş DNT-nin molekulyar analizi Almaniyanın CENTOGENE laboratoriyasında aparılmış Q6FD fermentinin geninin mutasiyası identifikasiya edilmişdir. Genin 1178-ci nukleotidi olan Guanin nukleotidinin Adenin nukleotidilə əvəzi identifikasiya edilmişdir. Mutasiya nəticəsində zülalın 393-cü vəziyyətində Arginin aminturşusu Histidin aminturşusu ilə əvəzi baş verir.

Q6FD fermentinin geninin 1178-ci vəziyyətində qvaninin adenin nukleotidilə əvəzi ilk dəfə Filosa və həmkarları (1992) tərəfindən aşkar edilmiş və müəlliflər tərəfindən fermentin yeni mutasiyasını G6FD Portici adlandırmışlar. Müəlliflər Q6FD fermentinin bu yeni mutasiyasını ÜST-nin klassifikasiyasına əsasən 2-ci qrupa aid etmişlər [4; 9; 10].

Beləliklə, Masallı rayonunun kənd məktəblərində aparılan genetik skrining nəticəsində 23 şagirdə Q6FD fermentinin müxtəlif dərəcəli ferment çatışmazlığı (0-60%-li aktivlik) təyin edilmişdir. ÜST-nin tələblərinə əsasən aşkar edilmiş ferment çatışmazlıqları biokimyəvi xarakteristikalarına əsasən üç sinfə aid edilmişlər: 2-ci sinif (13 şagird), 3-cü sinif (6 şagird), 4-cü sinif (4 şagird). 2-ci sinfə uyğun gələn Bədəlan kənd məktəbinin şagirdi F.N.-nin 24 ailə üzvünün müayinəsi əlavə altı nəfərdə fermentin 2-ci sinfinə uyğun gələn fermentin kəskin defisiti aşkar edilmişdir.

F.N.-nin qanından əldə edilmiş DNT-nin molekulyar analizi G6FD geninin 1178-ci nukleotidi qvaninin adenin nukleotidilə əvəzi identifikasiya edilmişdir. Mutasiya nəticəsində zülalın 393-cü vəziyyətində arginin aminturşusu histidin aminturşusu ilə əvəzi baş vermişdir [Q6FD,1173 (G-A) Arg393His].

NƏTİCƏ

1. G6FD fermentinin çatışmazlığının Masallı royonu üzrə fenotipik tezliyi 8,33%, gen tezliyi 0,0833 (v.d.) bərabər olmuşdur.

2. ÜST-nin tələblərinə əsasən aşkar edilmiş ferment çatışmazlığı biokimyəvi xarakteristikasına əsasən üç sinfə aid edilmişlər: 2-ci sinif (13 şagird), 3-cü sinif (6 şagird), 4-cü sinif (4 şagird).

3. G6FD geninin molekulyar analizi genin 1178-ci nukleotidi olan quaninin adenin nukleotidilə əvəzi identifikasiya edilmişdir. Mutasiya nəticəsində zülalın 393-cü vəziyyətində arginin aminturşusu histidin aminturşusu ilə əvəzi baş vermişdir [Q6FD,1173 (G-A) Arg393His].

ƏDƏBİYYAT

1. Ağayeva S. Ə., Kiçibəyov B.R. Azərbaycan Respublikasının Masallı rayonunda Q-6FD fermentinin biokimyəvi polimorfizminin tədqiqi // Pedaqoji Universitetin Xəbərləri, 2018, C.66, №2, s.21-26
2. Ağayeva S.Ə., Məmmədov A.M., Kiçibəyov B.R. Azərbaycan Respublikasının Oğuz rayonunda eritrositar qlükoza-6 fosfatdehidrogenaza fermentinin biokimyəvi polimorfizmi // AMEA Zoologiya İnstitutunun Elmi əsərləri, 2018, C.36, №1, s.16-21
3. Бойтлер Э. Нарушение метаболизма эритроцитов и гемолитическая анемия: пер.с англ.-М.: Медицина, 1981, 256 с.
4. ВОЗ. Научная группа. Стандартизация методов исследования Г6ФД эритроцитов.: пер. с англ. / Серия технических докладов. №366. Женева, 1988, с.48
5. Краснопольская К.Д., Шатская Т.А., Филиппов И.К. и др. Генетическая гетерогенность Г6ФД-недостаточности: исследование мутантных аллелей Gd⁺ в Шекинском районе Азербайджанской ССР // Генетика. 1977, Т.ХІІ. №8, с.1454-1461
6. Краснопольская К.Д., Яковлев С.А., Смирнова О.А. Прытков А.Н. Закономерность распространения аллелей Gd⁺ в Азербайджане. Сообщение IV. Частота и полиморфизм недостаточности эритроцитарной Г6ФД в поселке Коби Абшеронского районе // Генетика, 1985, Т.21, №3, с. 487-492
7. Aghayeva S.A., Huseynova L.S., Kichibekov B.R., Aliyeva K.A., Khalilov R.I. Inherited metabolic disease phenylketonuria and deficiency of g6pdenzyme in a family study. Deutscher Wissenschaftsherold • German Science Herald, 2018,N 2/2018(34-36). DDC-UDC 616.633.284/.466.26-008.9:575.224 DOI:10.19221/2018210
8. Aghayeva S.A., Mammadov A.M., Mamedbeyli A.K., Rasulov E.M. Combination of two genetic disturbances: G6PD enzyme deficiency and Duchenne muscular dystrophy in one patient. Human Genome and Health, 2nd International Conference Tbilisi, Georgia, 2019, p.21

9. *Beutler E.* The genetics of glucose-6-phosphatedehydrogenase deficiency. *Seminars in Hematol.* 1998, v.27. 3, 137-164
10. *Beutler E.* G6PD deficiency. *Blood.*1994. 84, pp. 3615-3636
11. *Daniel Trujillano, Aida M Bertoli-Avella, Arndt Rolfs.* Clinical exome sequencing: results from 2819 samples reflecting 1000 families. *Eur J Hum Genet.* 2017 Feb; 25(2): 176–182. Published online 2016 Nov 16
12. *Du C.S., Xu Y.K., Wu Q.L.,* glukoze-6-phosphatedehydrogenase variants and polymorphic frequency in Guangdog. China. *Hum.Genet.* 1988, v.60, pp.385-388
13. *Filosa S., Calabro V. Vallone V., Poggi D., et al.* Molecular basis of chronic non-spherocytic hemolytic anemia: A new G6PD variant (393 Arg to His) with abnormal $K_{(m)}$ G6P and marked in vivo instability. *Brit.J. Hematol.* 80: 111-116, 1992: (Pub. Med: 1536798, related citations Ful text)
14. *Filosa S.,Giacometti N., Wangwei C., De Mattia., D., Pagnini D. et al.* Somatic-cell selection is a major determinant of the blood-cell phenotype in heterozygotes for glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations causing severe enzyme deficiency. *Am.J.Hum.Genet.* 59.887-895, 1996, (Pub. 8808605, related citations)
15. *Fujii H., Miwa S., Takegawa S., Takahashi K., et al.,* Two new variants of glukoze-6-phosphatedehydrogenase found Japan. *Hum. Genet.* 1984. V.66. 2. P.276-278
16. *Hirono A., Ishii A., Kere N. et al.* Molecular analysis of glukoze-6-phosphatedehydrogenase variants in the Solomon Islands. *Amer. J. Hum. Genet.*1995. V.56. 5
17. *Krasnopolskaya X.D., Shatskaya T.L.* Distribution of Gd alleles in some ethnic group in the USSR. *Hum.Genet.*1987. V.75.3.P.258-263.
18. *Xu W., Westwood B., Bartsocas C.S., Malcorra-Azpiazu J.J. et al.,* G6PD mutations and haplotypes in various ethnic groups. *Blood.*1999. V.85.1, pp.257-263
19. *Zuo L., Chen E., Du C.S. et al.,* Genetic study of Chinese G6PD variants by direct PCR sequencing. *Blood,* 1999, V.76

Redaksiyaya daxil olub 27.02.2020