

УДК: 616.155.16

**КОМПЛЕКСНЫЙ МУТАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ НВВ-ГЕНА ДЛЯ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ АССОЦИИРОВАННОЙ β -
ГЕМАГЛОБИНОПАТИИ В АХСУИНСКОМ РАЙОНЕ АЗЕРБАЙ-
ДЖАНСКОЙ РЕСПУБЛИКИ****Г.А.АКПЕРОВА****Бакинский Государственный Университет
gunay.akbarova@bsu.az**

Проведены гематологические и молекулярные исследования методом RDBH (Reverse Dot-Blot Hybridization StripAssay) и full DNA sequence в одной из семей Ахсуинского района Азербайджанской Республики с подозрениями на наследственную анемию и с целью установления точного диагноза и типов мутаций. На первоначальном этапе проведены полный анализ крови с оценкой НВ, МСН, МСV, МСНС, RBC, Hct, HbA₂, HbF, билирубина, активности фермента глюкоза-6-фосфат-дегидрогеназы и мониторинг содержания сывороточного железа и ферритина (Serum iron, Serum ferritin). Молекулярный анализ – определение мутаций методами RDBH (Reverse Dot-Blot Hybridization StripAssay) и технологией Big Dye Terminator DNA sequence. Гематологические показатели носителей соответствовали показателям носительства β^+ thalassemia minor (MCV: 69.05↓, MCH: 20.4↓, HbA₂: 5.3↑, HbF: 1.95↑, RBC: 4.45). Методом RDBH и Big Dye Terminator DNA sequence установлены генотипы IVS1.6[T>C]/wt и IVS1.110[G>A]/wt. Полное секвенирование ДНК выявило средиземноморский вариант мутации гена Г6ФД в 6-м экзоне - 563(C>T). Когда анализ гематологических параметров не однозначен и трудно интерпретируется, молекулярная диагностика является единственным инструментом в постановке точного диагноза ассоциированных наследственных гемоглобинопатий.

Ключевые слова: β -талассемия, IVS1.6[T>C], IVS1.110[G>A], Г6ФД - 563(C>T), Reverse Hybridization StripAssay, Big Dye Terminator DNA sequence, Азербайджанская Республика

β -глобиновый ген (длиной 1.6 Кб, 11p15, НВВ) совместно с генами ϵ , фетального А- γ и G- γ , псевдогеном $\psi\beta$ и δ составляют генный комплекс длиной ~60 kb (рис.1). НВВ состоит из трех экзонов, 5' и 3'- некодирующих областей (UTRs), регулируется 5'-промотором, в котором расположены ТАТА, СААТ и удвоенный САССС, усиленный энхансер, расположенный на расстоянии 50 Кб от β -глобинового гена (рис.1). Этот контролируемый регион (LCR), содержит четыре (HS-1 – HS-4) эритроидноспецифических ДНКазы, являющихся сверхчувствительными сайтами (HS), каждый из которых состоит из разных комбинаций ДНК, взаимо-

действующих с факторами транскрипции. β -кластер совместно с α -кластером, расположенным на дистальном конце короткого плеча хромосомы 16, в области ДНК с длиной 30 kb, формируют глобиновую цепь [7, 14].

Две копии α -глобинового гена: α_1 и α_2 , каждая из которых обеспечивает синтез α -глобиновой цепи, формируют в онтогенезе разные формы гемоглобина: гемоглобины взрослого человека - HbA ($\alpha_2\beta_2$), составляющий 96%, и HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$), составляющий 2,5%, а также фетальный гемоглобин - HbF ($\alpha_2\gamma_2$), составляющий менее 1% [12, 15].

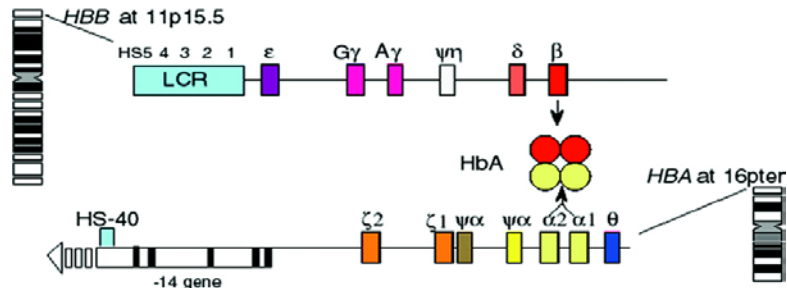


Рис. 1. Локализация и структура α - и β -генных глобиновых кластеров в хромосомах [5].

β -талассемии - аутосомно-рецессивные заболевания, причиной которых является синтетический дефект β -глобиновой цепи при мутации β -гена. При β -талассемии, связанной со снижением (β^+) или полным отсутствием синтеза β -цепей (β^0), происходит дисбаланс в соотношении между глобиновыми цепями с преобладанием α -цепей, в результате чего изменяется эритропоэз и продолжительность жизни эритроцитов [7, 8, 9].

Региональное распространение β -талассемии нередко сопровождается дефицитом глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФД) – наиболее частой энзимопатией гексозо-монофосфатного цикла, наследующейся Х-сцепленно и ведущей к гемолитической анемии. Ген Г6ФД длиной 18 kb состоит из 13 экзонов, разделенных 12 сегментами длиной 12-236 kb, и интрона в 5'-нетранслируемой области и находится в теломерном локусе Xq28 (рис.2) [11].

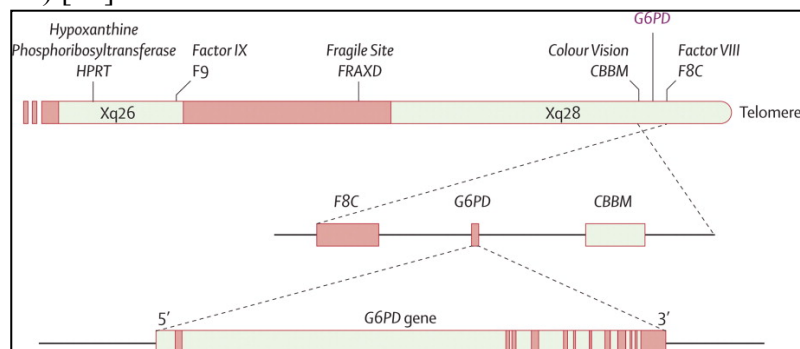


Рис. 2. Локализация гена Г6ФД на X-хромосоме.

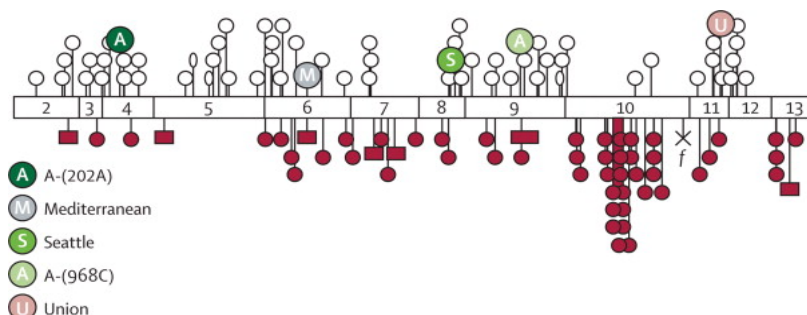


Рис.3. Типы мутаций в кодирующем сегменте гена Г6ФД.

Примечание: Экзоны – пронумерованы. Светлые кружки – мутации классов II и III. Закрашенные кружки – спорадические мутации класса I. Эллипсы – мутации класса IV. Квадраты - малые делеции. Крест - нонсенс-мутации. F - splice site мутация.

Сегодня во всем мире известно более 200 мутаций β -глобинового гена и более 180 мутаций дефицита Г6ФД (рис.3) [7, 6, 10].

β -талассемия и анемии, вызванные недостатком Г6ФД, представляют особый интерес для населения Азербайджана, где частота их самая высокая по сравнению с другими наследственными болезнями и в некоторых регионах достигает 15-20% гетерозиготного носительства и 13-15% (в некоторых селах – 36,2%), в случае талассемии и дефицита Г6ФД, соответственно [1, 2, 10].

Высокая частота данных заболеваний объясняется историческим распространением малярии в субтропических зонах республики. Так при измененном эритропоэзе, который возникает при β -талассемии продолжительность жизни эритроцитов уменьшается, вследствие чего малярийный плазмодий не находит достаточного субстрата для развития и погибает, тем самым сохраняя жизнь больного. Окислительный стресс, наблюдающийся в эритроцитах пациентов с дефицитом Г6ФД, вызывает образование метгемоглобина и выброс гемина, преждевременный лизис эритроцитов, внутриклеточное накопление токсичных промежуточных продуктов, которое приводит к нарушению размножения паразитов и, таким образом, защищает от малярии. Оба заболевания являются примером адаптации к малярийному плазмодиуму, и хотя, в настоящее время в Азербайджане уничтожены 98% очагов локализации малярии, в 2010 г. Выявлено всего лишь 50 случаев заболеваемости *P.vivax*, раннее распространение плазмодия оставило свой след в генофонде азербайджанского населения [14]. Кроме того, число лиц с мутациями в генах β и Г6ФД растет и за счет кровнородственных браков, исторически широко распространенных в республике [13].

Нами проведены гематологические и молекулярные исследования методом RDBH (Reverse Dot-Blot Hybridization StripAssay) и full DNA sequence (Big Dye Terminator DNA sequencer) в одной из семей Ахсуинского района Азербайджанской Республики с подозрениями на наследственную анемию и с целью установления точного диагноза и типов мутаций. Ахсуинский район является одним из бывших очагов распространения P.vivax и, соответственно, регионом с высокой частотой гемоглобинопатий [10, 12].

Материалы и методы

Для получения четкой генотипической структуры генов глобина, на первоначальном этапе проведены гематологические анализы:

- Полный анализ крови с оценкой Hb, MCH, MCV, MCHC, RBC, Hct, HbA₂, HbF, билирубина.
- Мониторинг содержания сывороточного железа и ферритина (Serum iron, Serum ferritin).

Экспресс-диагностику активности ГбФД проводили методом флуоресцирующих пятен Beutler E., основанным на флуоресценции NADPH под воздействием УФ-лучей (Hoefel MacroVue UV-25, Amersham Bioscience) [3].

Экстракция ДНК

Использована периферическая кровь - 5 мл, собранная в пробирки с ЭДТА. ДНК экстрагировали из крови с помощью комплекта Life Technologies: PureLink Genomic DNA Mini Kit (USA). Процедура экстракции включает следующие этапы: 1. Внести 200 мкл пробы крови в микропробирку, добавить 20 мкл Proteinase K, 20 мкл RNase A, инкубировать 2 мин. при комнатной температуре; 2. Добавить 200 мкл PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer, инкубировать 10 мин при 55°C; 3. Добавить 200 мкл 96% этанол, центрифугировать при 10.000 об/мин 1 мин при комнатной температуре; 4. Добавить 500 мкл Wash Buffer 1 в супернатант, центрифугировать при 10.000 об/мин в течение 1 мин; 5. Добавить 500 мкл Wash Buffer 2 в супернатант, центрифугировать при максимальном обороте 3 мин при комнатной температуре; 6. Добавить 200 мкл PureLink Genomic Elution Buffer в супернатант, инкубировать 1 мин при комнатной температуре, центрифугировать 1 мин при максимальном обороте. Т.о. экстрагированный супернатант, который содержит только ДНК используется на следующем этапе исследований.

Концентрацию ДНК проверяли при помощи NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, $\lambda=260/230$ nm, $\lambda=260/280$ nm (Thermo Fisher Scientific, USA).

Аmplification ДНК и Reverse Dot-Blot Hybridization StripAssay.

Multiplex ПЦР-амплификация проведена с Nuclear Laser Medicine Kits, Italy и состояла из двух этапов: 1. подготовка – 15 мкл Amplification

Mix, 5 мкл Taq DNA polymerase, 5 мкл ДНК; 2. ПЦР - pre-PCR: 94°C/2 мин, thermocycling: 94°C/15 сек. - 58°C/30 сек. - 72°C/45 сек. (35 циклов), final extension: 72°C/3 мин (Thermal Cycler verity 2720, Life Technologies, USA).

Reverse Hybridization состояла из гибридизации, промывки и хроматографии, и также осуществлена с использованием Nuclear Laser Medicine Kits, Italy (cod. AC006: 23 mutations of β -thalassemia). Гибридизация: смешав 10 мкл DNAT (1.6% NaOH) и 10 мкл ПЦР-продукта, добавить 1мл Hybridization Buffer при 45°C и смешать 5 мин. Промывка: после 30 мин инкубации при 45°C добавить по 1 мл Wash Solution A три раза по 15 мин при 45°C. Хроматография: использовались Wash solution B, Conjugation Solution и Color Developer по 1 мл. В начале добавляли Conjugate Solution, инкубировали 15 мин, трижды добавляли Wash solution B, инкубировали по 5 мин, в конце добавляли 1 мл Color Developer solution, инкубировали 15 мин в темноте. Reverse Hybridization проведен с использованием Autolipa 48 Instrument (Innogenetics, Ghent, Belgium).

Амплификация и полное секвенирование ДНК.

Геномная ДНК амплифицировалась в 2-х ПЦР master mixes (PCR I and II), каждая из которых содержит общий объем 50 мкл реакционной смеси (Applied Biosystems). ПЦР I: ddH₂O, 5U TaqGold, PCR amplification buffer (Applied Biosystems), MgCl₂, 150 μ mol/L 4dNTP mix, 20 pmol primer A, 20 pmol primer B, 20 pmol primer D, 100-200 ng ДНК. ПЦР II имеет тот же состав, исключая 20 pmol primer C и 20 pmol primer D. Амплификация: 1 цикл денатурации - 95°C, 10 минут с последующими 35 циклами денатурации при 95°C в течение 30 секунд, отжиг при 58.5°C, 1 мин, элонгация при 72°C, 2 мин, конечный этап при 72°C, 10 мин.

Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 1%-ном агарозном геле. До ДНК-секвенирования ампликоны очищались при помощи QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), 5 мкл ампликонов секвенировали с использованием ABI PRISM BigDye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Праймеры, используемые для секвенирования (PCR I, A и E; PCR II, C и F) использованы в конечной концентрации 1 мкмоль/л. Термоциклирование состояло из 25 циклов денатурации при 96°C, 10 сек, отжига - 50°C, 5 сек, элонгации - 60°C, 4 мин. Ампликоны секвенирования очищены раствором 2,2% додецилсульфат натрия в Centri-Sep spin columns (Princeton Separations, Adelphia, NJ) и электрофорезированы в ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Использованы праймеры для ДНК секвенирования: exons 1 и 2 (fragment A: SEQ1F 5'-GGGCCAAGAGATATATCTTAG-3', SEQ1R 5'-CAATGACATGAACTTAACCATAG-3'), exon 3 (fragment B: SEQ2F 5'-ATGTATCATGCCTCTTTGCACC-3', SEQ2R 5'-GCACTGACCTCCCA-CATTCC-3'), T12F: AGACCTCACCTGTGGAGCC, T12R: TCAAGA-

GTCCTAGGTGCACGT. Для секвенирования гена Г6ФД использованы олигонуклеотидные праймеры [4]. Данные секвенирования проанализированы с помощью Sequencing Analysis Software, version 5.2 (Applied Biosystems).

Результаты

Клиническая картина наблюдалась в виде желтушности кожи и отсутствием трансфузий у пациентов, которые являлись двоюродными сибсами, 12 и 14 лет, в течении жизни. Лабораторные показатели выявили анемию с нормальным количеством эритроцитов в крови, более низкими значениями MCV, MCH и MCHC, более высокими значениями HbA₂, практически нормальным значением HbF (табл.1). Подобные проявления отвечали талассемии *minor*.

Выявлен гемизиготный генотип дефицита Г-6-ФД и увеличение содержания билирубина, что подтверждено полным секвенированием. Установлен средиземноморский вариант в 6-м экзоне гена 563(C>T) (рис.4).

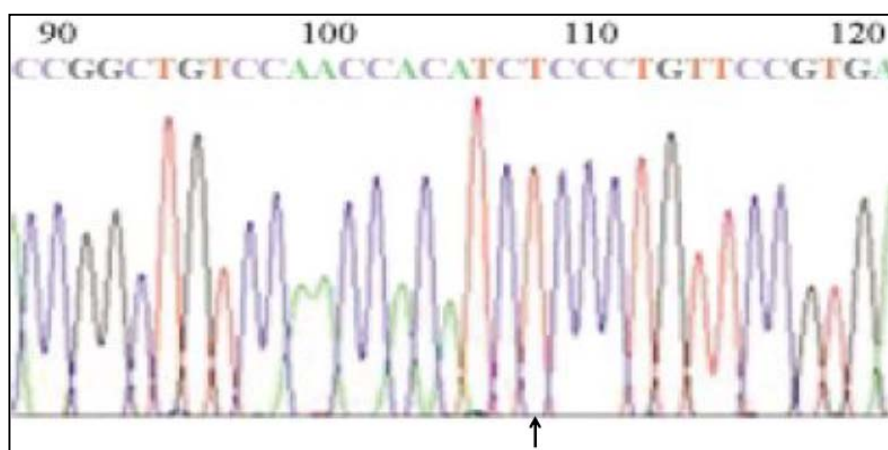


Рис.4. Определение мутации 563(C>T) технологией Big Dye Terminator DNA sequence.

Гематологические показатели соответствовали классическим показателям в случае носительства β^+ -талассемии (MCV: 69.05↓, MCH: 20.4↓, HbA₂: 5.3↑, HbF:1.95↑, RBC: 4.45). Небольшая анемия одного из сибсов объясняется незначительным снижением уровня гемоглобина (Hb: 8.81↓) (табл.1).

Молекулярный анализ генов β -глобина методом StripAssay (RDBH) подтвердил, что пациенты имеют гетерозиготное носительство транзиции β^+ IVS1.6[T>C] и β^+ IVS1.110[G>A] (рис.5).

Таблица 1

Лабораторные показатели (средние значения)

Лабораторные показатели	IVS1.6[T>C]/wt	IVS1.110[G>A]/wt	Норма, wt/wt
RBC, 10 ⁶ /μl	5.12	3.77	4.5-6.0
Hb, g/dl	11.9	8.81	12-18
Hct, %	33.3	24.7	women: 37-47 men: 42-52
MCV, fl	72.0	66.1	82-98
MCH, pg	20.8	19.9	27-32
MCHC, g/dl	36.1	34.5	33-37
HbA ₂ , %	5.12	5.4	<3%
HbF, %	1.8	2.1	<1%
Serum iron, ng/μl	1.4	6.15	women: 0.4-1.6 men: 0.5-1.7
Serum ferritin, ng/μl	102.0	186.5	women: 6-81 men: 30-250
Bilirubin, μM/l	45.8	46.2	7.8
Активность Г6ФД, U/g	0.19	0.22	4.8

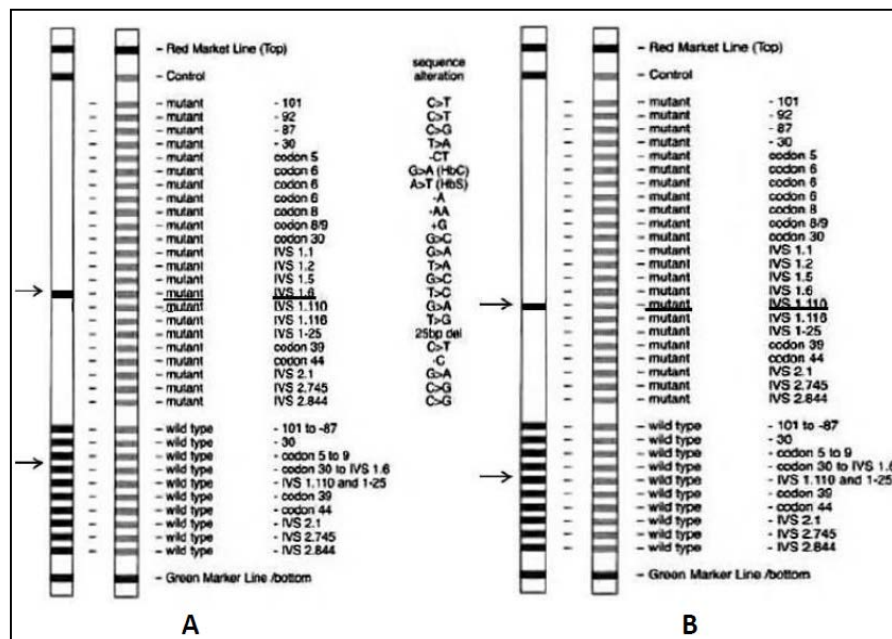


Рис. 5. Результат Reverse Dot Blot Hybridization StripAssay образцов с генотипами β^+ IVS1.6[T>C]/wt (A) и β^+ IVS1.110[G>A]/wt (B).

Полное секвенирование ДНК субстратов технологией Big Dye Terminator DNA sequence не выявил полиморфизма и подтвердил ранее проведенные молекулярные анализа методом RDBH (рис. 6, 7).

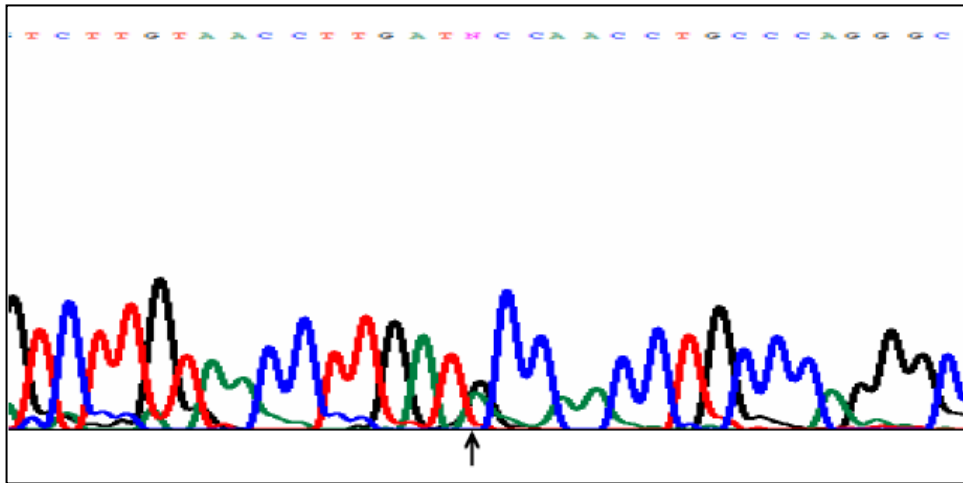


Рис.6. Определение мутации β^+ IVS1.6[T>C] технологией Big Dye Terminator DNA sequence.

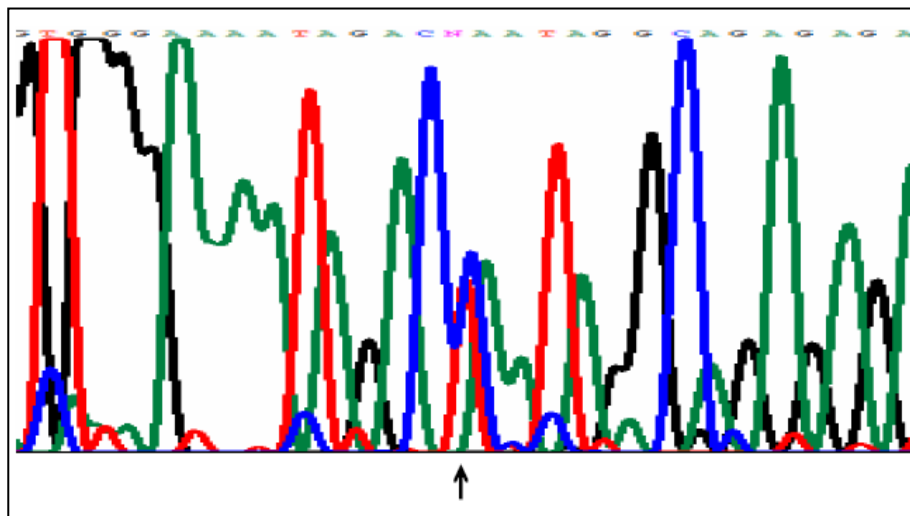


Рис. 7. Определение мутации β^+ IVS1.110[G>A] технологией Big Dye Terminator DNA sequence.

Обсуждение

Накопление α -цепей глобина в эритрокариоцитах костного мозга и эритроцитах периферической крови возникает при нарушении синтеза β -цепи. В свою очередь, происходит повреждение клеточной мембраны и преждевременная гибель клеток. Эритрокариоциты костного мозга гибнут, нарушается соотношение между раздраженным красным ростком и небольшим повышением ретикулоцитов. Т.о. дисбаланс синтеза глоби-

новых цепей вызывает развитие неэффективного эритропоэза, что ухудшает выработку эритроцитов, гемолиз эритроцитов периферической крови и развитие гипохромно-микроцитарной анемии, когда средний объем эритроцитов (MCV) значительно ниже 80 fl, что снижает пропускную способность кислорода в тех немногих эритроцитах, которые выживают (табл.1) [9]. В данном случае причиной снижения гемоглобина у одного из sibсов является снижение общего количества эритроцитов, вследствие их гемолиза, что сопровождается гемоглобинурией, повышением в крови уровня ретикулоцитов и телец Гейнца, а также содержания непрямого билирубина с наличием или отсутствием гипербилирубинемией.

При дефиците активности фермента Г-6-ФД, наиболее выраженным в самых зрелых или дефектных по мутации клетках эритроцитарной популяции, концентрация восстановленного глутатиона, играющего важную роль в защите эритроцита от перекисного повреждения, снижается и уровень окисленного глутатиона повышается. Между окисленным глутатионом и SH-группой гемоглобиновых аминокислот образуются бисульфидные мосты, образованные частицы гемоглобина оседают на внутренней поверхности мембраны эритроцита в виде телец Гейнца, нарушается избирательная проницаемость клеточной мембраны, что приводит к осмотическому лизису эритроцитов – гемолизу. В зависимости от интенсивности гемолиза и функционального состояния печени, в крови повышается уровень непрямого билирубина, который часто способствует неонатальной желтухе, а при выраженной недостаточности эритроцитарного энзима является причиной гипербилирубинемии, осложненной поражением головного мозга.

Определение содержания гемоглобина и эритроцитов, уровня непрямого билирубина и активности энзима являются критерияльно значимыми методами гематологического и биохимического анализа при выявлении случаев наследственного дефицита эритроцитарного фермента Г6ФД.

Молекулярная диагностика является единственным инструментом в тех случаях, когда анализ гематологических параметров не однозначен и трудно интерпретируется. Так, детям со слабосимптомальной талассемией был поставлен ошибочный диагноз анемии, назначены железосодержащие препараты, которые, естественно, не привели к положительному результату. Молекулярное изучение генетического дефекта приводит к предотвращению рисков заболеваемости β -талассемией и Г6ФД будущего поколения и к лучшему и более полному информированию родителей о потенциальном рождении больного ребенка.

Благодарности:

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Фонда Развития Науки при Президенте Азербайджанской Республики – **Грант № EIF-Mob-2-2013-4(10)-13/06/3.**

LİTERATURA

1. Акперова Г.А. Анализ наследственных нарушений системы крови в трех зонах Азербайджана. Фундаментальные исследования. 2008, 7, 14-8.
2. Akbarova G. History of the study and solution to the problem of β -thalassemia in Azerbaijan. J Clin Med Kaz 2013, 4(30), 21-8.
3. Beutler E. G6PD deficiency. Blood. 1994, 84, 3613-36.
4. Beutler E., Vulliamy T., Luzzatto L. Hematologically Important Mutations: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. Internet resource: http://www.g6pd.org/it/G6PDDeficiency-it/ResearchPapers-it/Beutler_03-it.aspx
5. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. Genetics IN Medicine. 2010,12 (2), 61-76.
6. Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Lancet 2008, 371, 64-74.
7. Clair C.St., Visick J.E. Exploring Bioinformatics. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers. 2009, 360.
8. Gaeke V. A Database-Driven Website of β -Thalassemia Mutations: Master's Projects. San José State University. 2012, 287.
9. Gardenghi S., Marongiu M.F., Ramos P., et al. Ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin. Blood 2007, 109(11), 5027-35.
10. Kondrashin A, Baranova AM, Ashley EA, et al. Mass primaquine treatment to eliminate vivax malaria: lessons from the past. Malaria Journal 2014, 13, 51.
11. Martini G, Toniolo D, Vulliamy T, et.al. Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase. EMBO J. 1986, 5 (8), 1849.
12. Petrou M. Screening for beta thalassaemia. Indian J Hum Genet. 2010,16, 1-5.
13. The State Statistical Committee of the Republic of Azerbaijan. Healthcare, social security and housing conditions in Azerbaijan. The statistical yearbook. Morbidity of population with thalassemia. Baku, 2012, 56.
14. Trent R.J.A. Diagnosis of the Hemoglobinopathies. Clin Biochem Rev 2006, 27(1), 27-38.
15. Wajcman H., Prehu H., Bardakdjian-Michau J., et al. Abnormal Hermoglobins. Hemoglobin. 2001, 25, 169-81.

AZƏRBAYCAN RESPUBLİKASININ AĞSU RAYONUNDA ASSOSİASIYA OLUNMUŞ B –HEMAQLOBİNOPATİYANIN AŞKARLANMASI MƏQSƏDİLƏ HBB-GENİN KOMPLEKSLİ MUTASİON TƏHLİLİ

G.H.ƏKBƏROVA

XÜLASƏ

Azərbaycan Respublikasının Ağsu rayonunda ailələrin birində irsi anemiyanı və mutasiya tiplərini müəyyən etmək məqsədilə hematoloji və molekulyar tədqiqatlar aparılmışdır. İlk mərhələdə MCH, MCV, MCHC, RBC, Hct, HbA₂, HbF, glükoza-6-fosfat dehidrogenaza fermentinin aktivliyi, bilirubin, zərdabda olan dəmir və ferritin miqdarını (Serum iron, Serum ferritin) müəyyən etməklə qanın tam analizi aparılıb. Molekulyar analiz RDBH (Reverse Dot-Blot Hybridization StripAssay) və full DNA sequence (Big Dye Terminator DNA sequencer) üsulu vasitəsilə həyata keçirilib. Hematoloji analiz β^+ thalassemia minor mutasiya tipinə görə daşıyıcılığı müəyyən etmək imkan yaratmışdır (MCV: 69.05↓, MCH: 20.4↓, HbA₂: 5.3↑, HbF: 1.95↑, RBC: 4.45). RDBH və Big Dye Terminator DNA sequence üsulu vasitəsilə IVS1.6[T>C]/wt və IVS1.110[G>A]/wt genotipləri müəyyən olunmuşdur. DNT-nin nukleotid ardıcılığının tam oxunması vasitəsilə G6FD genin 6-cı ekzonunda Aralıq dənizi mutasiya tipi (563(C>T)) müəyyən olunmuşdur. Hematoloji analizlərin nəticələri birmənalı

olunmayan və çətin izah olunduğu zaman molekulyar diaqnostika assosiasiya olunmuş irsi hemaqlobinopatiyaların dəqiq diaqnozunu verilməsində yeganə üsul hesab olunur.

Açar sözlər: β -talassemiya, IVS1.6[T>C], IVS1.110[G>A], G6PD - 563(C>T), Reverse Hybridization StripAssay, Big Dye Terminator DNA sequence, Azərbaycan Respublikası

Minnətdarlıq: Bu iş Azərbaycan Respublikasının Prezidenti yanında Elmin İnkişaf Fondunun № EIF-Mob-2-2013-4(10)-13/06/3 qrantı hesabına aparılmışdır.

COMPREHENSIVE HBB MUTATION ANALYSIS FOR DETECTION OF THE ASSOCIATED B-HEMOGLOBINOPATHY IN AGSU REGION OF AZERBAIJAN REPUBLIC

G.H.AKBAROVA

SUMMARY

The hematological and molecular studies in one of the families of Agsu region of Azerbaijan have been conducted by RDBH (Reverse Dot-Blot Hybridization StripAssay) and full DNA sequence to determinate the exact diagnosis and the types of mutations of the possible hereditary anemia. Hematological (HB, MCH, MCV, MCHC, RBC, Hct, HbA₂, HbF, Serum iron, Serum ferritin, bilirubin, activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme) and molecular analysis were carried out by RDBH (Reverse Dot-Blot Hybridization StripAssay) and Big Dye Terminator DNA sequence technology. The biochemical and hematological tests highlighted that two persons were carriers of the beta-thalassemic trait, (MCV: 69.05↓, MCH: 20.4↓, HbA₂: 5.3↑, HbF: 1.95↑, RBC: 4.45), that has been confirmed through our molecular analysis by RDBH and Big Dye Terminator DNA sequence (genotype: β^+ thalassemia minor IVS1.6[T>C]/wt and IVS1.110[G>A]/wt). The Mediterranean type of G6PD gene's mutation in the 6th exon of gene (-563(C>T)) was established by full DNA sequencing. Molecular diagnostics is the only tool in the accurate diagnosis of the associated hereditary hemoglobinopathies, when the analysis of haematological parameters is ambiguous and difficult to be interpreted.

Key words: β -thalassemia, IVS1.6[T>C], IVS1.110[G>A], G6PD (563(C>T)), Reverse Hybridization Strip Assay, Big Dye Terminator DNA sequence, Azerbaijan Republic

Acknowledgment: This work was supported by the Science Development Foundation under the President of the Republic of Azerbaijan - **Grant № EIF-Mob-2-2013-4(10)-13/06/3**.

Поступила в редакцию: 06.02.2014 г.

Подписано к печати: 12.05.2014 г.