

AYPARAŞƏKİLLİ ANEMİYANIN MOLEKULAR
DİAQNOSTİKASI HAQQINDA

S.X.MƏMMƏDOVA

İşdə ayparaşəkili anemiyanın prenatal və postnatal diaqnostikası üçün polimeraza zəncirvari reaksiyasına əsaslanan iki molekular üsul (haplotipləşdirmə və yüksək temperaturlu allel-spesifik amplifikasiya) şərh edilmişdir.

Ümumdünya Səhiyyə Təşkilatının Hemolitik anemiyalar işçi qrupunun verdiyi məlumata əsasən dünya əhalisinin 12%-də hemolitik anemiyanın daşıyıcılığını təmin edən patoloji gen aşkar edilir ki, bunların da 5,1%-i (266 milyon insan) hemoqlobinopatiyaların; talassemiya və anormal hemoqlobinlərin payına düşür. Hər il doğulan 144 milyon uşağın təxminən 6,5%-ni (9.285.000) hemoqlobinopatiyanın patoloji geninin daşıyıcısı – heteroziqot genotipli ana doğur. Hər il təxminən 300.000 irsi hemoqlobinopatiyalı xəstə uşaq doğulur [6-10].

Keçmiş SSRİ Respublikaları arasında anormal hemoqlobin S yalnız Azərbaycanda və Dağıstanın cənubunda azərbaycanlılar yaşayan kəndlərdə qeydə alınmışdır [1-4].

HbS-in kompleks laborator tədqiqat üsullarından istifadə edərək öyrənilməsinin böyük praktiki əhəmiyyəti vardır.

Ayparaşəkili anemiyanın perinatal və postnatal diaqnostikası üçün polimeraza zəncirvari reaksiyasına (PZR) əsaslananiki fərqli molekular-genetik üsuldən istifadə edilmişdir [5]: 1. Endonukleaza (restriktaza) fermentlərinin köməkliliklə beta qlobin geninin xəritələşdirilməsi (haplotipləşdirilmə) və 2. Yüksək temperaturlu allel-spesifik amplifikasiya.

Beta qlobin geninin xəritələşdirilməsi üçün Hind 2, Dde 1, Hinf 1 və Ava 2 endonukleaza fermentlərindən istifadə edilmişdir. Hər bir restriktaza fermenti üçün xüsusi quruluşlu sintetik oliqonukleotid praymerlərdən istifadə edilmişdir. Cədvəl 1-də restriktaza fermentləri və onlara uyğun sintetik oliqonukleotid praymerlərin quruluşları verilmişdir.

Cədvəl 1

Restriktaza fermentləri və onlara uyğun sintetik oliqonukleotid praymerlər

Ferment	Sintetik oliqonukleotid praymerlərin quruluşu
Hind 2	QTA STS ATA STT TAA QTQ STA AST TAA QSA AQA TTA TTT STQ QTS TST
Dde 1 (1)	ATA AQT SAQ QQS AQA QSS ATS TAT AQQ QQA AAQ AAA ASA TSA AQQ QTS
Dde 1 (2)	QQS SAA TST AST SSS AQQ AQ ASA TQA AQQ QTS SSA TAQ AS
Hinf 1	TQQ ATT STQ SST AAT AAA A QQQ SST AQT ATA QQQ TAA T
Ava 2	AST SSS AQQ AQS AQQ QAQ QQS AQQ TTS QTS TQT TTS SSA TTS TAA AST

Diaqnostika üç mərhələdə aparılıb; 1 - PZR; 2 - DNT-nin restriktaza fermenti vasitəsilə kəsilməsi; 3 - amplifikatın elektroforezi.

1-ci mərhələ. Həcmi 0,5 ml olan eppendorf sınaq şüşəsinə 1 mkl genom DNT-sinin nümunəsi, 8 mkl sintetik oliqonukleotid praymer qarışığı və 40 mkl PZR-nin qarışığı əlavə edilir. Məhlullar qarışdırıldıqdan sonra üzərinə iki damla steril parafin yağı əlavə edilərək PERKİN ELMER termosikler cihazında sayı 30 dövrədən ibarət polimeraza zəncirvari reaksiyası aparılır. Hər dövrə ibarətdir: 1 dəqiqə 30 saniyə - 72°S; 1 dəqiqə - 94°S; 1 dəqiqə - 56°S. 29 dövrədən sonra 30-cu sikl üç dəqiqə müddətində 72°S davam etdirilir.

2-ci mərhələdə eppendorf sınaq şüşəsinə birinci mərhələdə alınmış reaksiya məhlulundan 25 mkl, 3 mkl reaksiya buferi, 1 mkl restriksiya fermenti (10 vahid/mkl) əlavə edilir, qarışdırılır və sentrifüqaləşdirilir. İnkubasiya 37 °S-də axşamdan səhərə kimi aparılır. 3-cü mərhələdə tərkibi 1,6 qr NuSieve Aqaroza, 1,6 qr Aqaroza (Ultra təmiz) və 80 ml 1X-ACB buferində həll edilir, həcmi destillə su ilə 500 ml çatdırılır. 25 mkl nümunə 5 mkl markerlə ağırlaşdırılaraq gelin lunkasına yerləşdirilir. Elektroforez 100 volt gərginlikdə, 30 dəqiqə müddətində aparılır. Gel 5-10 dəqiqə müddətinə etidium bromidin sulu məhluluna yerləşdirilir. Rənglənmiş DNT fraqmentlərinə ultrabənövşəyi lampa üzərində baxılır.

Ayırmaşəkili anemiyalı xəstədən alınmış DNT molekulu Hind 2 restriktaza fermentilə kəsildikdə uzunluğu 1,8 kbaz, Dde 1 – 1,3 və 1,4 kbaz, Hinf 1 – 2,2 kbaz, Ava 2 – 0,9 kbaz nukleotid ardıcılığı olan DNT fraqmentləri aşkar edilir (cədvəl 2).

Cədvəl 2

Restriktaza fermentlərinin HbS-in müxtəlif genotiplərində və normada yaratdıqları DNT fraqmentlərinin ölçüləri

Ferment	Genotip			
	HbSS DNT fraqmentinin uzunluğu (kba)	HbAS		HbAA
Hind 2	1,8	1,8	3,1	3,1
Dde 1	1,3 və 1,4	1,3;1,4	2,4	2,4
Hinf 1	2,2	2,2	3,0	3,0
Ava 2	0,9	0,9	4,2	4,2

Ayparaşəkili anemiyanın daşıyıcılığı (HbAS) olan şəxslərdə istifadə edilən restriktaza fermentlərinin təbiətindən asılı olaraq müvafiq uzunluqlu DNT fraqmentlərindən əlavə normal genotipə uyğun olan DNT fraqmenti aşkar edilir.

Normal genotipli şəxsin qanından ayrılmış DNT Hind 2 restriktaza fermentilə kəsildikdə uzunluğu 3,1 kba, Dde 1 – 2,4 və 1,4 kba, Hinf 1 – 3,0 kba, Ava 2 – 4,2 kba nukleotid ardıcılığı olan DNT fraqmentləri aşkar edilir.

Ayparaşəkili anemiya diaqnozlu uşaqların ailə üzvlərində və ya hamilə ananın prenatal diaqnostikası zamanı normal genotipə uyğun olan DNT fraqmenti aşkar edilməsi onların normal genotipli olmalarına sübutdur.

Restriktaza fermentlərinin köməyi ilə beta qlobin geninin xəritələşdirilməsi üsulundan fərqli olaraq yüksək temperaturu allel-spesifik amplifikasiya üsulu mutasiyanı birbaşa yüksək dəqiqliklə təyin edir. Diaqnostika məqsədilə xüsusi sintetik oliqonukleotid praymerlərdən istifadə edilmişdir (cədvəl 3).

Yüksək temperaturu allel-spesifik amplifikasiyada istifadə edilmiş sintetik oliqonukleotid praymerlər

Бядвял 3

Praymerin нювц Q u r u l u ш u

Sickle M (A-T)	5'-SSS ASA QQQ SAQ TAA SQQ AST TST QSA-3'
Sickle N	5'-SSS ASA QQQ SAQ TAA SQQ AST TST QST-3'
Ümumi praymer	5'-ASS TSA SSS TQT QQA QSS AS-3'
Nəzarət 1	5'-SAA TQT ATS ATQ SST STT TQS ASS-3'
Nəzarət 2	5'-QAA TSA AQQ STQ AQA QAT QSA QQA-3'.

Diaqnostika məqsədilə X.O. ailəsinin beş üzvünün qanından ayrılmış DNT molekulunun yüksək temperaturu allel-spesifik amplifikasiya üsulu ilə beta^s-mutant genin diaqnostikası dörd mərhələdə aparılmışdır: 1. Venoz qanın içərisində EDTA antikoagulyantlı sınaq şüşəsinə götürülməsi (2,0 ml həcmində), 2. qanın limfositlərindən DNT molekulunun ayrılması, intaktlığının və miqdarının elektroforez üsulu ilə yoxlanması, 3. yüksək temperaturu allel-spesifik amplifikasiya üsulunun aparılması və 4. gelin rənglənməsi, analizin nəticələrinin elektroforez üsulu ilə aşkarlanması.

Analizin nəticəsinə əsasən ata, ana və uşaqlardan biri ayparaşəkili anemiyanın patoloji geninin heteroziqot daşıyıcısı (HbAS), iki uşaq ayparaşəkili anemiyanın patoloji geninin homoziqot forması (HbSS) olmuşlar.

Mutasiyanın tez bir zamanda, birbaşa, yüksək dəqiqliklə identifikasiya edilməsini nəzərə alaraq yüksək temperaturlu allel-spesifik amplifikasiya üsulunun dölün ana bətnində HbS-in aşkar edilməsində istifadəsi məsləhət görülür. Dölün ana bətnində ayparaşəkili anemiyanın aşkar edilməsi iki mərhələdə, aşağıdakı sxem üzrə aparılması təklif edilir: 1-ci mərhələ: Valideynlərdə HbS-in patoloji geninin aşkar edilməsi. Dölün ana bətnində prenatal diaqnostikasını aparmaq üçün valideynlərin hər ikisi HbS-in patoloji geninin heteroziqot və ya biri heteroziqot, digəri homoziqot olmalıdır. Birinci halda homoziqot genotipli xəstə uşağın doğulma riski - genetik risk 25%, ikinci halda 50%-ə bərabər olacaqdır. Hər iki halda genetik riskli valideynlərdən qan alınmış hazırlanmış hemolizatin asetat-sellyuloza kağızında elektroforez, poliakrilamid-amfolin gelində analitik izoelektrofokuslaşdırma və DNT molekulu səviyyəsində analizi vasitəsilə anormal HbS-in diaqnozu dəqiqləşdirilməlidir.

Genetik risk qiymətləndirildikdən sonra prenatal diaqnostikanın 2-ci mərhələsi məsləhət görülür. 2-ci mərhələ dörd pillədən ibarətdir: 1. Hamiləliyin 10-12 həftəliyində transabdominal və ya transservikal invaziv üsullar vasitəsilə ultrasəs aparatının iştirakı ilə xorionun biopsiyası aparılıb xorion hüceyrələri götürülməlidir. Hamilə diaqnostika məqsədilə hamiləliyin ikinci üçaylığında müraciət edərsə, 16-20 həftəliyində transabdominal invaziv üsul vasitəsilə dölyanı maye ilə birlikdə fibroblast hüceyrələri götürülməlidir. 2. Biopsiya materialından (xorion və ya fibroblast hüceyrələrindən) DNT molekulu ayrılması. 3. DNT molekulu yüksək temperaturlu allel-spesifik amplifikasiya üsulu ilə əvvəl mutant beta-qlobin geni - "Sickle M", sonra normal beta-qlobin geni - "Sickle N" sintetik oliqonukleotid praymerləri vasitəsilə genetik analizi aparılması. 4. Analizin nəticələrinin DNT fraqmentlərinin aqapoza gelində elektroforez yolu ilə aşkarlanması.

Analizin nəticələrinə əsasən üç genotip aşkar edilə bilər; 1. fenotip və genotipcə norma - HbAA, 2. fenotipcə norma, genotipcə hetepoziqot - HbAS və 3. Fenotipcə xəstə, genotipcə homoziqot - HbSS. Yalnız fenotipcə xəstə, genotipcə homoziqot olan hamiləlik arzu edilməzdir. Valideynlərin razılığı ilə fenotipcə xəstə, genotipcə HbSS olan dölün inkişafı tibbi abort yolu ilə dayandırılmalıdır.

Beləliklə, ayparaşəkili anemiyanın prenatal diaqnostikası məqsədilə PZR üsuluna əsasən işlənib hazırlanmış haplotipləşmə və yüksək temperaturlu allel spesifik amplifikasiya üsulları məsləhət görülür. Tibbi-genetik məsləhətxanaların işində haplotipləşmə və yüksək temperaturlu allel spesifik amplifikasiya metodlarının genetik riskli ailələrdə hamiləlik dövründə dölün ana bətnində prenatal diaqnostikasında tətbiqi mütəxəssislərə ayparaşəkili anemiya diaqnozlu xəstə uşaqların doğulmasının qarşısını almağa imkan verəcəkdir.

ƏDƏBİYYAT

1. Гаджиев Э.Г., Рустамов Р.Ш., Асадов Ч.Д. и др., Гетерозиготное носительство гемоглобина в Азербайджане. Гематод. И трансфузиол. 1991. с. 16-18.
2. Расулов Е.М., Аскерова Т.А. Сочетание генетических эритроцитарных дефектов β -талассемии с гемоглинозами S и D. Тезисы докладов I Республиканской конференции молодых ученых по физико-химической биологии. Баку. 1981. с. 82.
3. Расулов Е.М., Мехтиев Н.Х., Мовсум-заде К.М., Аскерова Т.А. Способ определения структурно-аномальных гемоглинозов. 1983, Авторское свидетельство № 1027616.
4. Расулов Е.М., Мовсум-заде К.М., Мехтиев Н.Х. Гемоглинопатии в Таузском районе Азербайджанской ССР. Известия АН Азерб. ССР. серия биологических наук. 1981. № 6. с. 98-100.
5. Saiki, R. K.; Chang, C.-A.; Levenson, C. H.; Warren, T. C.; Boehm, C. D.; Kazazian, H. H., Jr.; Erlich, H. A. : Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. New Eng. J. Med. 319: 537-541, 1988.
6. Cao A. A world-wide evaluation of one ongoing reseach and futuredirections toward preventing thalassemia and sickle cell disease. 2nd International Thalassemia Summerschool. 01-05 April 2002 Kyrenia/North Cyprus. p.7-8.
7. Huisman T.H.J., Carver M.F.H., Baysel E. Syllabus of Thalassemia Mutations. The Sickle Cell Anemia Faundation, Augusta, USA, 1997.
8. Tuzmen S., Tadmouri G.O., Ozer A. et al., Prenatal Diagnosis of beta-Thalassemia and Sickle Cell Anemia in Turkei. Prenatal Diagnosis. 1996. v.16. p.252-258.
9. Weatherall D.J. and Clegg J.B. The Thalassemia Syndroms, Third edition, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1981.
10. Weatherall D.J. and Clegg J.B., Higgs D.R. "The Hemoglobinopathies", in CR, Scriver, AL., Beauder, WS, Sly, and D.Volle (eds) The Metabolic Basis of Inherited Disease, p.1281-1339, Mc-Graw-Hill, USA, 1989.

О МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ СЕРПОВИДНОКЛЕТОЧНОЙ АНЕМИИ

С.Х.МАМЕДОВА

АННОТАЦИЯ

В работе описаны две молекулярных метода (гаплотипирования и высокотемпературная аллел-специфическая амплификация), которые основаны на полимеразно-цепной реакции для пренатальной и постнатальной диагностики серповидноклеточной анемии.

SICKLE CELL ANAEMIA MOLECULAR DIAGNOSTICS

S.Kh.MAMEDOVA

ABSTRACT

There are described two molecular methods (haplotyping and high-temperature allele-specific amplification) which are based on polymerase chain reaction for prenatal and postnatal diagnostics on sickle cell anaemia.