

**AZƏRBAYCAN RESPUBLİKASININ DƏVƏÇİ RAYONUNUN  
ƏHALİSİNDƏ  $\beta$ -TALASSEMIYANIN PATOLOJİ GENİNİN AŞKAR  
EDİLMƏSİ VƏ GENETİK HETEROGENLİYİ**

**K.S.ZEYNALLI\*, K.Ə.ƏLİYEVƏ\*\*, E.M.RƏSULOV\***

**\* Neftçilər xəstəxanası**

**\*\* Bakı Dövlət Universiteti**

*Ümumdünya Səhiyyə Təşkilatının məlumatına əsasən (1996) dünya əhalisinin təxminən 266 milyonunda (5,1%) irsi hemoqlobinopatiyaların patoloji genləri aşkar edilmişdir. İrsi hemoqlobinopatiyaları talassemiyalar ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - və  $\delta$ -talassemiyalar), anormal hemoqlobinlər və hər il doğulan 144 milyon uşağın təxminən 9.285.000-ini (6,5%) heteroziqot genotipli ananın dünyaya gətirdiyi körpələr təşkil edir.*

Müasir tibb elminə  $\alpha$ - və  $\beta$ -talassemiyanın 400-dən artıq molekulyar tipi məlumdur.

Azərbaycan Respublikasının əhalisi üçün  $\beta$ -talassemiyanın 24 mutasiyası identifikasiya edilmişdir. Mutasiyalar ayrı-ayrılıqda  $\beta$ -qlobin zəncirinin biosintezini transkripsiya və translyasiya səviyyələrində pozaraq  $\beta^0$ - və  $\beta^+$ -talassemiya fenotiplərinə gətirib çıxarır ki, hər bir fenotipin arxasında çoxsaylı mutasiyalar durur (2,5,9).

$\beta^0$ -talassemiya fenotipində  $\beta$ -qlobin zəncirinin biosintezi tamam pozulur və xəstədə talassemiyanın ağır klinikası müşahidə olunur.  $\beta^+$ -talassemiya zamanı  $\beta$ -qlobin zəncirinin biosintezi müxtəlif dərəcələrdə pozulur və xəstəliyin klinikası  $\beta$ -qlobin zəncirinin biosintezinin pozulma dərəcəsindən asılı olur. Müəyyən edilmişdir ki, xəstəliyin klinikası talassemiya geninin molekulyar tipindən əlavə, yerləşdiyi haplotipdən də asılıdır. Haplotipin tərkibində mövcud polimorf restriksiya saytları birbaşa və ya dolay yolla  $\beta$ -qlobin klasterində yerləşən genlərin, o cümlədən  $\gamma$ -qlobin geninin ekspressiyasına təsir edir.

Respublikanın ayrı-ayrı rayonlarının əhalisində  $\beta$ -talassemiyanın patoloji geninin yayılması kifayət qədər öyrənilmişdir. Lakin molekulyar səviyyədə genetik heterogenliyi az tədqiq edilmişdir. Elə bu səbəbdən işimizin məqsədi Dəvəçi rayonunun əhalisində  $\beta$ -talassemiyanın patoloji geninin aşkar edilməsi və genetik heterogenliyinin öyrənilməsi olmuşdur.

Material 2005-2006-cı illər ərzində Dəvəçi rayonuna ekspedisiyalar zamanı toplanmışdır. Uşaqlar və reproduktiv yaş həddində olanlar arasında talassemiyanın patoloji geninin skriningi aparılmışdır. Tədqiqat üçün venoz qandan istifadə edilmişdir. Qan tərkibində antikoagulyant

olan eppendorf sınaq şüşələrinə toplanmışdır. Skrininq metodu olaraq analitik izoelektrofokuslaşdırma üsulundan istifadə edilmişdir. Reproductive yaş həddində olan 148 şəxsin (kişi -102 və qadın-46) və 202 uşağın (oğlan – 123 və qız - 79) qanı müayinə edilmişdir. Ümumilikdə 350 şəxsin qanında talassemianın patoloji geninin skrininqi aparılmışdır.

Diaqnoz hemolizatin poliakrilamid-amfolin gelində (pH 3.5-9.5 və 5,5-8,5) izoelektrofokuslaşdırma metodu ilə müəyyənləşdirilmişdir.

Talassemiyaların diaqnostikası üçün istifadə olunan izoelektrofokuslaşdırma üsulu Amerşam firmasının (ABS) istehsalı olan Multifor II cihazında aparılır. Hemoqlobinlərin izoelektrofokuslaşdırılmasında 1.500 volt cərəyan şiddətindən istifadə edilmişdir.

İzoelektrofokuslaşdırma üçün istifadə edilən hemolizat aşağıdakı kimi hazırlanır. 100 mkl kapilyar qan 10-15 dəqiqə müddətində dəqiqədə 3.000 fırlanma rejimində sentrifugalasdırılır. Zərdab eritrositar kütlədən ayrılır. Eritrositar kütlə üç dəfə eyni həcmli fizioloji məhlul ilə yuyularaq hər dəfə eyni rejimdə sentrifugalasdırılır. Eritrositar kütlə fizioloji məhlulla yuyulduqdan sonra üzərinə eyni həcmdə distillə suyu və 10 mkl karbontetraxlorid üzvi məhlulu əlavə edilir. Qarışıq homogen məhlul alınana kimi çalxalanır (təxminən 10-15 dəqiqə) və sentrifugalasdırılır (30 dəqiqə 8.000 fırlanma/dəqiqədə). Lipidlər və eritrositin membranı sınaq şüşəsinin dibinə çökür. Çöküntünün üzərində təmiz hemoqlobindən ibarət hemolizat alınır. Bu hemoqlobin kütləsi 1:5 nisbətində distillə suyu ilə duruldularaq izoelektrofokuslaşdırma üçün yararlı vəziyyətə çatdırılır.

Poliakrilamid-amfolin geli aşağıdakı tərkibdə hazırlanmışdır: 2,7 ml akrilamid/bisakrilamid, 0,5 ml HCl/Tris buferi (3,03 qr tris 80 ml distillə suyunda həll edilərək, HCl turşusunun köməyi ilə pH 8,4-ə və ümumi həcmi 1 litrə çatdırılır). 1 ml qliserol, 100 mkl amfolin rN 3,5-9,5 və 100 mkl amfolin rN 6-8, 10 mkl TEMED, 20 ml distillə suyu və 20 mkl ammonium persulfat (400 mq ammonium persulfat + 1 ml distillə suyu). Yuxarıda qeyd edilən ardıcılıqda reaktivlər kimyəvi stəkana əlavə edilir. Polimerizasiya məqsədilə kimyəvi stəkanın içərisindəki məhlul ölçüsü 110x260 mm olan şüşələrin arasına əlavə edilir. Polimerizasiya iki saat ərzində baş verir. Gel tamamilə polimerizasiya olunduqdan sonra şüşələrdən biri çıxarılır və gel ikinci şüşəyə birləşmiş şəkildə alınır. Şüşələrdən birinin gəldən rahat ayrılması üçün şüşə etil spirti və ya efir vasitəsilə yağsızlaşdırılır. Gel şüşə ilə birlikdə aparatın soyudulan hissəsinin üzərinə qoyulur. Gel və soyuducu hissənin arasında hava qabarcıqlarının qalmaması üçün gelin qoyulacaq yerinə kerosin və ya istənilən detergentin (Triton X-100) sulu məhlulu çəkilir.

İzoelektrofokuslaşdırma vaxtı 1,5 saatdır. İzoelektrofokuslaşdırmadan sonra hemoqlobin fraksiyalarının fiksə edilməsi üçün gel şüşə ilə birgə 40%-li etil spirti olan qabın içərisində 10-15 dəqiqə müddətində saxlanılır. Rəngləmə məqsədilə 2%-li Kumassi G rəngləyicisindən istifadə edilmişdir.

Reproduktiv yaş həddində olan 148 şəxsin altısında  $\beta$ -talassemiyanın heteroziqot, birində homoziqot forması aşkar edilmişdir. Skrininqi aparılmış 202 uşağın səkkizində heteroziqot, ikisində homoziqot forma müəyyən edilmişdir.

$\beta$ -talassemiyanın heteroziqot formasının fenotipik tezliyi 4%, homoziqotların fenotipik tezliyi 0,85%, ümumiyyətlə  $\beta$ -talassemiyanın patoloji geninin tezliyi 0,0286 bərabər olmuşdur.

Üç homoziqot və on dörd heteroziqotun venoz qanı 2 ml həcmində antikoagulyanta götürülərək DNT analizi üçün hazırlanmışdır.

Birinci növbədə xəstənin qanından DNT molekulu ayrılmış və intaktlığı aqaroza gelində elektroforez yolu ilə yoxlanılmışdır.  $\beta$ -talassemiyanın mutasiyalarının identifikasiyası yüksək temperaturlu allel-spesifik amplifikasiya (YTASA) üsulu ilə ABŞ-nın istehsalı olan Termosikler-Amplifikator cihazında aparılmışdır. YTASA üsulunu aparmaq məqsədilə eppendorf sınaq şüşəsinə 250 mkl PSR buferi, 25 mkl 96 saylı praymer, 25 mkl 97 saylı praymer, 1.2 mkl ferment – amplitaq əlavə edərək qarışdırılır. Sonra üzərinə 1.5 mkl genom DNT-si (1 pq/ml) əlavə edilərək təkrar qarışdırılır. Üzərinə 2 damla parafin yağı əlavə edilərək termosiklərdə 30 sikl amplifikasiyası aparılır (1 sikl - 94°S-1 dəqiqə, 60°S-1 dəqiqə və 72°S 1 dəqiqə 30 saniyə). Analizin nəticəsi termostatdan sonra amplifikatın aqaroza gelində elektroforez vasitəsilə müəyyən edilmişdir.

Respublika əhalisində aşkar edilib identifikasiyası aparılmış  $\beta$ -talassemiya mutasiyalarına uyğun altı müxtəlif sintetik oliqonukleotid praymerdən istifadə edilmişdir: 1.  $\beta^{\circ}$ - IVS-1 (Q-A); 2.  $\beta^{\circ}$ -kodon 8 (-AA); 3.  $\beta^{\circ}$ - IVS-1-110 (Q-A); 4.  $\beta^{+}$ - IVS-1-6 (T-S); 5.  $\beta^{\circ}$ -kodon 8/9 (-Q) və 6.  $\beta^{+}$ - IVS-1-5 (Q-S).

Üç homoziqot uşaqlarda aşağıdakı mutasiyalar identifikasiya edilmişdir:

1.  $\beta$ -qlobin geninin ( $\beta$ -QQ) böyük intronunun (IVS-2) birinci adenin nukleotidinin quanin nukleotidi ilə əvəzi; homoziqot -  $\beta^{\circ}$ - IVS-2-1 (Q-A) /  $\beta^{\circ}$ - IVS-2-1 (Q-A), 2.  $\beta$ -QQ-nin birinci ekzonunun 8-ci kodonunda iki adenin nukleotidinin mikrodelesiyası; homoziqot -  $\beta^{\circ}$ -kodon 8 (-AA) /  $\beta^{\circ}$ -kodon 8 (-AA) və 3.  $\beta$ -QQ-nin kiçik intronunun (IVS-1) 110-cu vəziyyətində adenin nukleotidinin quanin nukleotidi ilə əvəzi -  $\beta^{+}$ -IVS-1-110 (Q-A) və digər alleldə  $\beta^{\circ}$ -kodon 8(-A) mutasiyası; ikiqat heteroziqot (kompaund,  $\beta^{+}$ -IVS-1-110(Q-A) /  $\beta^{\circ}$ -kodon 8 (-AA)).

Fenotipcə homoziqot olan üç uşağın ikisində genotipcə eyni mutasiyanın homoziqot forması, bir uşaqlarda isə ikiqat heteroziqot – kompaund forma aşkar edilmişdir.

Identifikasiya edilmiş mutasiyalardan  $\beta^{\circ}$ - və  $\beta^{+}$ -fenotipinə malik olmuşdur.  $\beta^{\circ}$ -fenotipində -  $\beta^{\circ}$ - IVS-2-1 (Q-A) və  $\beta^{\circ}$ -kodon 8 (-AA),  $\beta^{+}$ -fenotipində -  $\beta^{+}$ -IVS-1-110 olmuşdur. DNT analizində identifikasiya edilmiş mutasiyalar izoelektrofokuslaşdırma yolu ilə alınmış nəticələri təsdiq etmişdir.

Beləliklə, Dəvəçi rayonunun əhalisində  $\beta$ -talassemiyanın heteroziqot formasının fenotipik tezliyi 4%, homoziqotların fenotipik tezliyi 0,85%, ümumiyyətlə  $\beta$ -talassemiya patoloji geninin tezliyi 0,0286 bərabər olmuşdur. DNT səviyyəsində  $\beta$ -talassemiyanın üç mutasiyası aşkar edilərək identifikasiyası aparılmışdır.

#### ƏDƏBİYYAT

1. Arcasoy A. Turkiyede Talassemia ve Hemoglobinopati sorumu. 2. Uluslararası Talassemi Yaz Okulu. Girne/KKTC. 01-05 Nisan 2002. p.1-6.
2. Asadov Ch. Beta-talassemia control programme in Azerbaijan. International Islamic Medical Journal, 1996, p.10-14.
3. Cao A. A world-wide evaluation of one ongoing research and future directions toward preventing thalassemia and sickle cell disease. 2<sup>nd</sup> International Thalassemia Summerschool. 01-05 April 2002 Kyrenia/North Cyprus. p.7-8.
4. Maniatis T., Phrig E., Sembruk D. Methods of genetic engineering. Molecular cloning., in Russia, translation from English. M. 1984
5. Namazova A.A., Rasulov E.M. Prevention of Thalassemia in Azerbaijan. 2<sup>nd</sup> International Thalassemia Summerschool. 01-05 April 2002 Kyrenia/North Cyprus. p.45.
6. Oliveri O., Vitoux D., Galactéros F., Bachir D. et al. Dehydration of sickle cells: Role of the position of the S mutation on the activation of the KCl transport system. 4<sup>th</sup> International conference on thalassemia and the hemoglobinopathies, Nice-Acropolis – France, 6-8 November 1991. p.113
7. Panepinto JA., Magid D., Rewers MJ., Lane PA. Universal versus targeted screening of infants for sickle cell disease: a cost-effectiveness analysis. J Pediatr, Feb 2000, 136(2), p. 201-8.
8. Perrine, S. P.; Ginder, G. D.; Faller, D. V.; Dover, G. H.; Ikuta, T.; Witkowska, H. E.; Cai, S.; Vichinsky, E. P.; Olivieri, N. F. : A short-term trial of butyrate to stimulate fetal-globin-gene expression in the beta-globin disorders. New Eng. J. Med. 328: 81-86, 1993.
9. Rasulov E. Gene geography and conception of prophylactic of genetic variants of beta-thalassemia in Azerbaijan. Doctor dissertation, Kiev, 1992.
10. Setianingsih I., Williamson R., Daud D., Harahap A., Marzuki S., Forrest S. Phenotypic variability of Filipino beta(0)-thalassemia/HbE patients in Indonesia. Am. J Hematol, 1999 Sep; 62(1): 7-12.
11. Sozuoz A., Yazman M., Camber I et al., Prevention of beta-thalassemia among Turkish Cypriots. Prenatal diagnosis by DNA analysis. 2<sup>nd</sup> International Thalassemia Summerschool. 01-05 April 2002 Kyrenia/North Cyprus. p.37.
12. Ustuntag M. Turkiyede Hemoglobinopati Kontrol Programi 2<sup>nd</sup> International Thalassemia Summerschool. 01-05 April 2002 Kyrenia/North Cyprus. p.47.
13. Vassiliadou D., Papadopulos V., Konstantinidou C., Arnaoutoglu M. HbOThrace trait, HbOThrace hemoglobinopathy and HbOThrace/Hb beta zero hemoglobinopathy: a retrospective study of 118 cases. Folia Med (Plovdiv), 1998, 40(3B Suppl 3), p. 46-50.
14. Westmeier R. Electrophoresis in Practice. A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation. Third Edition. New York. 2000. p.356.

**ВЫЯВЛЕНИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ  
ГЕНА  $\beta$  - ТАЛАССЕМИИ У НАСЕЛЕНИЯ  
ДЕВИЧИНСКОГО РАЙОНА АЗЕРБАЙДЖАНСКОЙ РЕСПУБЛИКИ**

**К.С.ЗЕЙНАЛЛЫ, К.А.АЛИЕВА, Э.М.РАСУЛОВ**

**РЕЗЮМЕ**

Установлены фенотипические частоты гетерозигот, гомозигот и частота патологического гена  $\beta$ -талассемии среди населения Девичинского района.

Идентифицировано три мутации  $\beta$ -талассемии с использованием метода высокотемпературной аллель-специфической амплификации: 1.  $\beta^0$ - IVS-2-1 (Г-А), 2.  $\beta^0$ -кодон 8 (-АА) и 3.  $\beta^+$ -IVS-1-110 (Г-А).

**$\beta$  - THALASSAEMIA GENE IDENTIFICATION AND GENETIC HETEROGENEITY  
IN POPULATION OF DIVICHI AREA  
OF AZERBAIJAN REPUBLIC**

**K.S.ZEYNALLY, K.A.ALIYEVA, E.M.RASULOV**

**SUMMARY**

Phenotypic frequencies of heterozygotes, homozygotes and  $\beta$ -thalassaemia pathologic gene frequency were found in the population of Divichi area. Three mutations of  $\beta$ -thalassaemia were identified by means of method of Amplification Refractory Mutation System: 1.  $\beta^0$ - IVS-2-1 (G-A), 2.  $\beta^0$ -codon 8 (-AA) и 3.  $\beta^+$ -IVS-1-110 (G-A).