

**QLYÜKOZA-6-FOSFATDEHİDROGENAZA FERMENTİNİN
MOLEKULYAR XARAKTERİSTİKASI****R.M.QULİYEVA, M.Ş.BABAYEV***Bakı Dövlət Universiteti*

Molekulyar metodlardan istifadə edərək Bərdə rayonunda qlükoza-6-fosfatdehidrogenaza fermentinin hemiziqot formasında iki müxtəlif fenotiplərin molekulyar xarakteristikası verilmişdir. Aralıq dənizinin hövzəsində yaşayan əhaliyə xarakter olan iki müxtəlif mutasiya identifikasiya edilmişdir: 1. Genin 202-ci vəziyyətində quanin nukleotidinin adeninlə və 376-cı vəziyyətdə adenin nukleotidinin quaninlə əvəz olunmuş iki müxtəlif nukleotid dəyişikliyi qlükoza-6-fosfatdehidrogenaza A(-) variantına uyğundur və 2. Genin 563-cü vəziyyətdə sitozin nukleotidinin timin ilə əvəz olunması – qlükoza-6-fosfatdehidrogenaza B (-) variantına uyğundur.

Qlükoza-6-fosfatdehidrogenaza (Q6FD) zülalı əsasən qanın formalı elementlərində - eritrositlərin tərkibində olub, qlükoza mübadiləsində iştirak edən 19 fermentdən ən əsasıdır (1-4).

Q6FD fermentinin geni X-cinsiyyət xromosomunun qısa çiyində yerləşir. Ölçüsü böyük olmasa da, 19 intron və 18 ekzondan ibarətdir. Kişilərdə qadınlardan fərqli olaraq bir X-cinsiyyət xromosomu olduğu üçün fermentin bir, qadınlarda isə iki geni olur. Qadınlarda iki gəndən birinin çatışmazlığı heteroziqot tipinə, iki genin eyni zamanda fəaliyyətinin pozulması isə homoziqot irsiyyət tipinə gətirib çıxarır. Kişilərdə genin fəaliyyətinin pozulması hemiziqot irsiyyət tipinə gətirib çıxarır və xəstəliyin klinikası qadınlarda olan homoziqot formaya oxşardır. Kişilərdə ağır hemolitik anemiyaya səbəb olan ferment çatışmazlığının hemiziqot, qadınlarda isə homoziqot formasıdır (5,6).

Ədəbiyyatın analizi göstərir ki, Q6FD fermentinin çatışmazlığı bir sıra dünya ölkələrinin əhalisində yüksək fenotipik və gen tezliyinə malikdir. Q6FD fermentinin çatışmazlığına əsasən Avropanın Aralıq dənizi sahili ölkələrində, Şimali Afrikanın əhalisində, Asiya qitəsinin demək olar ki, əksər ölkələrinin əhalisində təsadüf edilir (12).

Fermentin ən yüksək fenotipik və gen tezliyi İsrailin yerli əhalisində, təxminən 70%, Yemənin bir sıra qəbilələrində – 40%, Avropanın cənub ölkələrində; İtaliya (Sardiniya adası), Yunanıstan, Kipr adasının yunan və türk əhalisində 10% təşkil edir (4).

Q6FD fermentinin çatışmazlığı Qafqaz (Azərbaycan, Gürcüstan) və Orta Asiya Respublikalarının (Tacikistan, Özbəkistan, Türkmənistan), Moldova Respublikasının və Rusiya Federasiyasının orta zolağında yaşayan əhali arasında təsadüf edilmişdir (12).

Keçmiş SSRİ respublikaları arasında fermentin ən yüksək gen tez-

liyi (20-23%) Azərbaycanın Şəki rayonunun əhalisində aşkar edilmişdir. Q6FD fermentinin yayılma tezliyi müəyyən edildikdən sonra hemiziqot oğlanlarda fermentin biokimyəsi və molekulyar tipləri öyrənilmişdir. Fermentin bir neçə yeni molekulyar tipi aşkar edilmişdir - Şəki, Oxut-1 və Oxut-2 (1-4,6,7); (1-3,5,6).

Mövsüm-zadə K.M. və Əskərova T.Ə. (1990), 428 yenidoğulmuşun (230 oğlan və 198 qız) qanında qlükoza-6fosfat dehidrogenaza fermentinin aktivliyini öyrənmişlər. Belə ki, 37 yenidoğulmuşun 16-da (3,74%) hemizqot, ikisində (0,47%) -homiziqot və 19-da (4,44%) heteroziqot forması müəyyən edilmişdir. Nəsil ağaclarının tərtib edilib öyrənilməsi ferment çatışmazlığının irsiyyətli olduğunu təsdiqləmişdir.

Mövsüm-zadə K.M. və həmkarları, (1984) Azərbaycanın üç rayonunun (Masallı, Tovuz, Kürdəmir) on kəndinin şagirdlərinin və Bakı şəhərinin tələbələrinin qanında dörd müxtəlif eritrositar fermentin: qlükozafosfat izomeraza, qlutation peroksidaza, qlutation reduktaza və piruvatkinazanın aktivliyinin çatışmazlığını öyrənmişlər.

Respublikanın bir sıra rayonlarının əhalisində Q6FD fermentinin çatışmazlığının yayılma tezlikləri öyrənilmişdir. Q6FD fermentinin çatışmazlığının ən yüksək tezliyi Respublikanın cənub-şərqində yerləşən Lənkəran-Astara zonasının əhalisi arasında müəyyən edilmişdir – 9,3-36,4%. Ən kiçik tezlik – 9,3% Lənkərandə aşkar edilmişdir. Masallıda Q6FD fermentinin çatışmazlığı – 23,0%, Astarada - 29,0% olmuşdur (8).

Q6FD fermentinin aktivliyinin çatışmazlığının Respublika əhalisində yayılması kifayət qədər öyrənilmişdir. Lakin fermentin genetik heterogenliyi haqda məlumat olmadığı üçün biz Bərdə rayonunun əhalisində Q6FD fermentinin aktivliyinin çatışmazlığında molekulyar səviyədə fermentin genetik heterogenliyinin öyrənilməsini qarşımıza məqsəd qoymuşuq.

Material və metodika. Material Bərdə rayonuna ekspedisiyalar zamanı toplanmışdır. Genetik skrining üçün kapilyar qan məktəblilərdən (5-11-ci sinif şagirdləri) və Mərkəzi rayon xəstəxanasında müalicə alan xəstələrdən içərisində Trilon B və ya heparin saxlayan həcmi 1,5 ml olan mikrosınaq qablarına – eppendorflara götürülmüşdür. Q6FD fermentinin aktivliyi Beutler və Baluda üsulu ilə təyin edilmişdir (9,10). Rayon üzrə 204 şagirdin, müxtəlif profilli 116 xəstənin və onların qohumlarının qanı müayinə edilmişdir. Cəmi 320 şəxsin qanı tədqiq edilmişdir.

Q6FD fermentinin aktivliyinin çatışmazlığı aşkar edilmiş şəxslərdən növbəti ekspedisiyalar zamanı venadan 5 ml qan götürülmüşdür. Venoz qanın limfositlərindən genom DNT-si Maniatis və həmkarlarının (1982) təklif etdiyi metodika üzrə ayrılmışdır (11).

Zəncirvari Polimeraza Reaksiyası (ZPR) məhlulunun tərkibi aşağıdakı kimi olmuşdur: 5 mkl 10x reaksiya buferi, 1 mkl 10mM dNTP qarışığı, 6-cı ekzon üçün birbaşa praymer (2,5 mkl) – 5¹-ASTSSSQAAAQAQTTTTSAAG-3¹, 7-ci ekzon üçün R-praymerindən – 5¹SSAQSSSTSSSAQQAQAQAQTAAQ-3¹ 2,5 mkl, 5 mkl DMSO, 34 mkl distillə suyu, 1 mkl genom DNT-si və 2,5 vahid Taq-polimeraza fermentindən istifadə edilir. PZR üçün üç temperaturdan istifadə edilir: 95°S (denaturasiya) - 1 dəqiqə, 61 °S (yapışma) – 45 saniyə və 72 °S (sintez) – 1,5 dəqiqə. 30 sikkədən sonra amplifikasiyanın nəticələri 6%-li poliakrilamid gelində elektroforez üsulu ilə yoxlanılır. Rəngləyici məqsədlə

etidium bromiddən istifadə edilmişdir.

Restriksiya analizi məqsədilə amplifikasiyaya uğramış DNT-nin üzərinə 25 mkl DNT, 1,5 mkl bufer, 1 mkl Mbo1 restriktazası əlavə edilərək 37 °S gecə müddətində inkubasiya edilir. Marker məqsədilə λ 174 Hae3-dən istifadə edilmişdir. Reaksiyanın nəticəsi 3% -li aqaroza gəlində elektroforezlə müəyyən edilmişdir (U=200V, İ=80 mA).

M.S. probandın ailəsində atadan və qardaşından, N.K. ailəsində probandın özündən təkrar qan tərkibində EDTA antikoagulyantı olan sınaq şüşəsinə götürülmüşdür. Genom DNT-nin periferik qanın limfositlərindən alınması və təmizlənməsi və DNT molekulunun elektroforezi Maniatis və həmkarlarının (1982) təklif etdikləri metodlar üzrə aparılmışdır. Zəncirvari – polimeraza reaksiyasına əsaslanan metod üzrə DNT molekulunun amplifikasiyası, allel-spesifik hibridləşdirmə Saiki və həmkarlarının (1990) təklif etdikləri metodika üzrə aparılmışdır. Amplifikasiyaya uğramış fraqmentlərin endonukleazaların iştirakı ilə restriksiya analizi Villiam və həmkarlarının (1992) təklif etdikləri metodika üzrə həyata keçirilmişdir. Q6FD fermentinin Aralıq dənizi variantını – genin 6-cı ekzonunun 563 vəziyyətində sitosin nukleotidinin timin nukleotidi (S-T) ilə əvəz olunması mutasiyası Mbo2 endonukleazası, 5-ci ekzonun 376-cı nukleotidində adeninin quaninlə (A-Q) əvəz olunması Fok1 endonukleazası ilə aşkarlanmışdır. Fermentin digər 202-ci vəziyyətdə quanin nukleotidinin adenin nukleotidi ilə əvəz olunmuş mutasiyanı Nla3 endonukleazasının iştirakı ilə identifikasiya edilmişdir (12-13).

Nəticələr və onların müzakirəsi

Q6FD fermentinin məktəb şagirdləri arasında genetik skriningi zamanı 204 şagirdin 12-də fermentin hemiziqot forması identifikasiya edilmişdir. Probandların ailəsinin genealoji analizi fermentin müxtəlif ekspressiyaya malik olan iki genetik tipi müəyyən edilmişdir (8).

M.S. ailəsində - anada fermentin 20% aktivliyi – 1 U/qHb (homoziqot forma), digərində - atada fermentin aktivliyi “0” (hemiziqot forma) olduğu aşkar edilmişdir.

Homoziqot qadının iki hemiziqot oğlunun birində fermentin “0”, digərində - 20% -lik aktivliyi, üç qızında – 40-70% -lik aktivlik müəyyən edilmişdir (1,3-3,1 U/qHb). Həm oğlan və həm də qız uşaqları üçün fermentin aktivliyinin polimorfizmi, anada iki müxtəlif ekspressiyaya malik molekulyar tipli genlərin homoziqot formasının olmasını göstərir.

Fermentin “0” aktivliyi aşkar edilmiş ikinci – N.K. ailəsində atanın iki heteroziqot qızında fermentin eyni – 40% -lik aktivliyi (1,8 U/qHb) müəyyən edilmişdir. Hər iki qızda fermentin aktivliyinin çatışmazlığının eyni olması onunla izah edilmişdir ki, ata mutasiyaya uğramış yeganə Q6FD genini hər iki qızına vermişdir. Belə olan halda qızların hər ikisində fermentin eyni aktivliyi müşahidə edilmişdir. Ana və iki oğulda fermentin aktivliyi normal olmuşdur (4,5-5,0 u/qHb).

ZPR-na əsasən Aralıq dənizinin hövzəsində yaşayan əhaliyə xarakter olan mövcud iki müxtəlif mutasiya identifikasiya edilmişdir: 1. Genin 202-ci nukleotid vəziyyətində quanin nukleotidinin adenin nukleotidi (Q-A) ilə və 376-cı vəziyyətdə adenin nukleotidinin quanin nukleotidi (A-Q) ilə əvəz olan iki müxtəlif nukleotid dəyişikliyi identifikasiya edilmişdir. Bu da öz növbəsində Q6FD A (-) variantına uyğun

olmuşdur. 2. İkinci mutasiya genin 563-cü nukleotid vəziyyətində sitozin nukleotidinin timin nukleotidi ilə əvəz olunması identifikasiya edilmişdir ki, bu da öz növbəsində Q6FD B (-) variantına uyğundur.

Beləliklə, respublikanın əhalisində Q6FD fermentinin yüksək tezlikdə çatışmazlığı səhiyyə orqanları üçün problem yaradır. Yaranmış bu problemi həll etməkdə şübhəsiz ki, həkim-genetiklərin rolu böyük olacaqdır. Rayon mərkəzlərində yaradılacaq tibbi-genetik məsləhətxanalar genetik riski olan ailələr arasında prospektiv və retrospektiv məsləhətlər apararaq ferment çatışmazlığı ilə doğulacaq uşaqların sayının azalmasına və hemolitik sarılıqla doğulan uşaqların düzgün müalicəsinə gətirib çıxaracaqdır.

Nəticə

Respublikada ilk dəfə olaraq Bərdə rayonunun əhalisində DNT molekulu səviyyəsində Q6FD fermentinin iki müxtəlif mutasiyası identifikasiya edilmişdir. Hər iki mutasiya Aralıq dənizi sahillərində yaşayan əhali üçün xarakterikdir.

1. Genin 202-ci nukleotid vəziyyətində quanin nukleotidinin adenin nukleotidi (Q-A) ilə və həmin gendə digər mutasiyanın; 376-ci vəziyyətdə adenin nukleotidinin quanin nukleotidi (A-Q) ilə əvəz olunan iki müxtəlif nukleotid dəyişikliyi identifikasiya edilmişdir. Aşkar edilmiş gen Q6FD A (-) molekulyar variantına uyğundur.

2. Genin 563-cü nukleotid vəziyyətində sitozin nukleotidinin timin nukleotidi ilə əvəz olunması – Q6FD B (-) molekulyar variantına uyğundur.

ƏDƏBİYYAT

1. Краснопольская К.Д., Маринчева Г.С., Стомина Н.С. клинико-генеалогический анализ умственно остсталых больных с патологией аминокислотного обмена. Ж. неврол. и психиат. Т10, 1975 с.1539-1543.
2. Краснопольская К.Д., Драудин В.А. Скринирование наследственных болезней обмена среди контингента детей с тяжелой степенью интеллектуального дефекта. Ж. неврологии и психиатрии. 1975, с.571-573.
3. Краснопольская К.Д., Филиппов М.К., Сотникова Е.Н., Мовсум-заде К.М. и др. Закономерности распространения аллелей Эд- в Азербайджане. Генетика, 1980, №9, с.1625-1692.
4. Мачадо К., Опольский А.Ф. Распространение и частота недостаточности Г6ФД в центральном районе Кубы. Генетика. №5, с.864-867.
5. Мовсум-заде К.М., Аскерова Т.А. Частота и клиническое проявление дефицита Г6ФД у новорожденных. Материалы II съезда гематологов и трансфузиологов Азербайджана, Баку, 1990, с.85-86.
6. Мовсум-заде К.М., Расулов Э.М., Цаликова Т.П., Тургиева Д.А. и др. Жизнеспособность гетерозигот по бета-талассемии и компаундов недостаточностью глюкозо-6 фосфатдегидрогеназы в Юго-Восточном регионе Азербайджана. Мат. конф., 1998, Баку, с.151-154.
7. Мухтаров З.Я., Алиева К.А., Расулов Э.М. Популяционно - генетические исследования в Лерикском районе Азербайджанской Республики. Ж. Цитология и генетика, Киев, 2000, №5, с.22-29.
8. Quliyeva R.M., Babayev M.Ş., Rəsulov E.M. Azərbaycan Respublikasının Bərdə rayonunun əhalisində Q6FD fermentinin fenotipik, gen tezliyi və genetik heterogenliyi. Bilgi dərgisi, 2003. 1. p. 33-36.

9. Beutler E. The genetics of G6PD Deficiency. Seminars in Hematol. 1990. v. 27. p. 137-164
10. Beutler E. G6PD deficiency and red cell glutathione peroxidase. Blood. 1977. v.49. p. 467-469.
11. Maniatis T., Fritsch E.K., Sambrook J. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor. 1982 NY. p. 234.
12. Saiki R.K., A Guide to Methods and Applications. Edited by Michael A Innis., David H.Gelfand. 1990. p. 230.
13. Villiamy T., Mason P., Luzzatto L. The molecular basis of G6PD deficiency. Trends in Genetics. 1992. v. 8. p. 138-143.

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТА ГЛЮКОЗО-6-
ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ**

Р.М.КУЛИЕВА, М.Ш.БАБАЕВ

РЕЗЮМЕ

Среди населения Бардинского района идентифицировано два молекулярного варианта Г6ФД, 1 вариант - замена нуклеотида гуанин на аденин в 202 позиции и замена аденин на гуанин в позиции 376 и 2-й вариант - замена нуклеотида цитозин на тимин в позиции 563. Идентифицированные варианты гена Г6ФД характерны для населения стран Средиземноморского бассейна.

**GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE ENZYME'S
MOLECULAR CHARACTERISTICS**

R.M.GULIYEVA, M.Sh.BABAYEV

SUMMARY

Applying molecular methods, molecular characteristics for two different phenotypes of G6PD hemizygous form in Barda area inhabitants have been presented. Two different mutations specific for population of Mediterranean area have been identified: 1. Substitution of guanine by adenine in position 202 of the gene and substitution of adenine by guanine in position 376 of the gene which results in A (-) variant of G6PD, and 2. substitution of cytosine by thymine in position 563 of the gene results in G6PD B(-).