

УДК 575.1

**Кулиева Р.М.**

*Бакинский государственный университет (Азербайджан)*

## **МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ ФОРМ СОЧЕТАНИЯ β-ТАЛАССЕМИИ И ДЕФИЦИТА ФЕРМЕНТА Г6ФД У НАСЕЛЕНИЯ АЗЕРБАЙДЖАНА**

**R. Kuliyeva**

*Baku State University, Azerbaijan*

### **MOLECULAR TESTING OF COMBINED FORMS OF β-THALASSEMIA AND G6FD FERMENT DEFICIT AMONG THE PEOPLE OF AZERBAIJAN**

*Аннотация.* Молекулярное тестирование геномной ДНК от больных с сочетанием β-талассемии и дефицита Г6ФД позволило нам идентифицировать два известных Средиземноморских молекулярных типа фермента: Г6ФД В (-) 563 С-Т и Г6ФДА (-) 376 А-Г/202 Г-А в сочетании с мутацией β-глобинового гена - β<sup>0</sup>- IVS-2-1 Г-А. Своевременное выявление носителей β-талассемии и гемизиготного носительства дефицита Г6ФД, а также их сочетания, с установлением генотипа мутаций позволит специалистам в дальнейшем провести квалифицированное лечение клинических проявлений и профилактику заболевания в виде медико-генетического консультирования, включая претанальную диагностику гемолитических анемий.

*Ключевые слова:* глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа (Г6ФД), фетальный гемоглобин (НБФ), этилен диамин тетраацетат (ЭДТА), полимеразно-цепная реакция (ПЦР), Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ).

*Abstract.* The molecular testing of genomic DNA from sick people with the combination of β-thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6FD) deficit made it possible to identify two well-known Mediterranean molecular types of ferment: G6FD – В (-) 563 С – Т and G6FDA (-) 376 А – Г 202 Г – А in combination with mutation of β-globin gene, i.e., β<sup>0</sup> – IVS – 2 – 1 Г – А. The modern exposure of β-thalassemia carriers and the hemizygote carriage of G6FD deficit and also their combined forms with establishing of mutations' genotypes will enable the specialists later to conduct the qualified treatment of clinical manifestation and the prophylaxis of illness in the form of medical and genetic consulting, including prenatal diagnostics of anaemia.

*Key words:* glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6FD), fetal hemoglobin (HBF), ethylene diamine tetraacetate (EDTA), polymerase chain reaction (PCR), World Health Organization (WHO).

Многочисленные исследования гемоглино- и энзимопатий в Азербайджане позволили выявить значительную долю их сочетаний ввиду насыщенности эндемических зон различными мутантными аллелями гемоглобина и эритроцитарных ферментов [1-2]. Частота распространения β-талассемии составляет 9-13%, структурно-аномального гемоглобина S – 3%, дефицита фермента глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Г6ФД) – 13-15%, доходя в отдельных регионах до 36,2% [3-4]. Определенный вклад в генетическую гетерогенность наследственных дефектов вносят компаунды – носители дефекта, получившие два разных мутантных аллеля по одному локусу от своих родителей. Их удельный вес среди таких больных возрастает по мере распада изолятов, что приводит к дальнейшему нарастанию фенотипического многообразия моногенно наследуемых дефектов [7; 9; 10]. В связи с изложенным представляется актуальным своевременное выявление носителей подобных дефектов с целью предупреждения и адекватного лечения клинических осложнений.

## Материалы и методы

Материал для исследований собран во время экспедиций в г. Гянджа и Бардинский район Республики Азербайджан, а также в двух учебных заведениях г. Баку. Обследованию подвергались главным образом школьники и студенты, среди которых значительную часть составили уроженцы различных районов Азербайджана. Также для анализов использовали кровь больных из ЦРБ Бардинского района. Для выявления гемоглинопатий было обследовано 541 человек, из них в клиниках и школах г. Гянджа – 248, в Бардинском районе - 195 и в г. Баку – 98 человек.

Для осаждения эритроцитов 2-3 мл гепаринизированной крови из вены центрифугировали 15 мин при 2000g с последующим трехкратным промыванием в физиологическом растворе (20 мин. при 5000g) при 4°C. Гемолизаты [1, с. 20] готовили на холодной бидистиллированной воде с последующим замораживанием (-20°C) и оттаиванием при комнатной температуре. Гемоглиновые фракции выявляли методом аналитического изоэлектрофокусирования на полиакриламидно-амфолиновых пластинках при pH 3,5-9,5 и 5,5-8,5 на Multifor 2117 с последующим денситометрированием гелей на лазерном денситометре 2202 фирмы LKB (5). Критериями диагностики гетерозиготной  $\beta$ -талассемии являлись повышение уровней HbA<sub>2</sub> до 4-8% (норма 2,5-3,5%) и фетального гемоглобина (HbF) до 3-8% (норма 1-2%) [11].

Активность фермента Г6ФД в гемолизатах эритроцитов измеряли по программе ВОЗ спектрофотометрически в реакционной смеси следующего состава: 0,1 М Трис-HCl буфер, 0,5 мМ ЭДТА, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> pH 8,0, 0,2 мМ НАДФ Na и гемолизат. Инкубацию проводили в течение 10 мин при 25°C. Реакцию начинали 50 мкл 0,6 мМ Г6Ф Na [6].

Рестрикционный анализ геномной ДНК проводили с использованием буфера следующего состава: 25 мкл ДНТ, 1,5 мкл буфер и 1 мкл рестриктаза Mbo II. Термостатирование проводили при температуре 37°C в течение ночи. В качестве маркера использовали x174

Нае III рестрикцию. Результаты рестрикции образца геномной ДНК, обработанной рестриктазой Mbo II, проверяли путем электрофореза на 3% агарозном геле. Режим электрофореза - U=200V,  $\dot{Y}$ =80 mA. Для окрашивания фрагментов ДНК использовали водный раствор этидиум бромид [8; 9]. Структура используемых олигонуклеотидных праймеров представлена в табл. 1.

Тестирование мутаций  $\beta$ -талассемии проводили с использованием следующего температурного режима – 30 сек. 55°C, 1 мин. 72°C и 30 сек. 92°C. ПЦР состояла из 30 циклов. Результат ПЦР проверяли путем электрофореза амплификата на 2,0% агарозных пластинках.

## Результаты и обсуждение

Генетический скрининг недостаточности фермента Г6ФД среди обследованных школьников, студентов и больных выявил гемизиготное состояние у 20 лиц мужского пола и гетерозиготное, а также гомозиготное состояние дефицита фермента у 18 лиц женского пола. Фенотипическая и генная частота дефицита фермента среди жителей Бардинского района и г. Гянджа соответственно составила 4,62%, 0,0462 и 2,43%, 0,9243 (в долях единицы). Генетический скрининг гемоглинопатий и недостаточности фермента Г6ФД среди обследованного контингента выявил сочетание гетерозиготного носительства  $\beta$ -талассемии и гемизиготного носительства недостаточности Г6ФД у двух лиц мужского пола. У первого пациента А.А. с сочетанием гетерозиготного носительства  $\beta$ -талассемии и гемизиготного носительства дефицита Г6ФД, уровни HbA<sub>2</sub> и HbF были повышены и составили соответственно 4,6%, 3,2%. Активность фермента Г6ФД была «0». Для выявления типа мутации гена Г6ФД с гемизиготным состоянием и «0» активностью фермента геномную ДНК выделяли из венозной крови пациента А.А. Геномную ДНК обработали рестриктазой Mbo II. В качестве маркера использовали расщепленный x174 Нае III. Результаты рестрикции образца геномной ДНК, обработанной рестриктазой

Таблица 1

№	Praymer	Нуклеотидная последовательность
15	ARMS constant	CAA TGT ATC ATG CCT CTT TGC ACC
16	And $\beta$	GAG TCA AGG CTG AGA GAT GCA GGA
30	Common	ACC TCA CCC TGT GGA GCC AC
31	Common	CCC CTT CCT ATG ACA TGA ACT TAA
38	Fr 8/9 M (+G)	CCT TGC CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAC ACC
39	Fr 8/9 N	CCT TGC CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAC ACT
40	IVS-110 M (G-A)	CTG ATA GGC ACT GAC TCT CTC TGC CTA TTA
41	IVS-110 N	ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAC ACC
46	IVS-1-6 M (T-C)	TCT CCT TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTC ATG
49	IVS-2-1 M (G-A)	AAG AAA ACA TCA AGG GTC CCA TAG ACT GAT
77	IVS-2-1 N	AAG AAA ACA TCA AGG GTC CCA TAG ACT GAC
54	Codon 8 M (-AA)	ACA CCA TGG TGC ACC TGA CTC CTG AGC AGG
55	Codon 8 N	ACA CCA TGG TGC ACC TGA CTC CTG AGC AGA

Мбо II, проверяли путем электрофореза на 3% агарозном геле.

Известно, что при обработке геномной ДНК рестриктазой Мбо II фрагмент ДНТ длиной 514 п.о. в норме расщепляется на два фрагмента длиной 394 и 120 п.о. В нашем эксперименте фрагмент ДНТ длиной 514 п.о. под влиянием рестриктазы Мбо II был расщеплен на три фрагмента длиной 276, 120 и 118 п.о. Полученный результат позволяет нам идентифицировать Средиземноморский тип дефицита фермента – Г6ФД В (-). Средиземноморский тип дефицита фермента Г6ФД происходит при замене аминокислоты цитозин на аминокислоту гуанин в позиции 563 внутри гена Г6ФД (Г6ФД В (-) 563 С-Т).

У второго пациента К.Ф. с сочетанием гетерозиготного носительства  $\beta$ -талассемии и гемизиготного носительства дефицита с «0» активностью Г6ФД, уровни HbA<sub>2</sub> и HbF были также повышены и соответственно составили 5,4%, 3,3%. Активность фермента Г6ФД была «0». В результате обработке фрагмента

геномной ДНК, выделенной из крови больного К.Ф. длиной 109 п.о. рестриктазой NlaIII, при электрофорезе выявляется два фрагмента ДНК длиной 46 и 63 п.о., что свидетельствует о наличии замены нуклеотида гуанин на нуклеотид аденин в позиции 202 внутри гена Г6ФД. Данная замена приводит к замене кодона GTG на кодон ATG. В следствие этой замены кодонов после транскрипции внутри фермента происходит замена аминокислоты валин на аминокислоту метионин. Выявленная мутация соответствует Средиземноморскому типу мутации – Г6ФД А (-). Данному типу мутации Г6ФД А (-) характерна также дополнительная замена нуклеотида аденин на нуклеотид гуанин в позиции 376 внутри гена (AAT-GAT). Под влиянием рестриктазы FokI фрагмент ДНК длиной 90 п.о. расщепляется на два фрагмента длиной 58 и 32 п.о. Таким образом, внутри гена Г6ФД идентифицировано две мутации: замена нуклеотида аденин на нуклеотид гуанин в позиции 376 и замена нуклеотида гуанин на нуклеотид аде-

нин в позиции 202 внутри гена Г6ФД (Г6ФД А (-) 376 А-Г/202 G-А) [5; 9].

Тестирование мутаций  $\beta$ -талассемии проводили с использованием пяти различных синтетических олигонуклеотидных зондов (праймеров) на следующие мутации  $\beta$ -талассемии – IVS-110 (G-A), IVS-2-1(G-A), IVS-1-6 (T-C), Codon 8 (-AA), Fr 8/9 (+G), идентифицированные ранее у населения Азербайджана [4; 7; 10]. В результате тестирования мутаций  $\beta$ -талассемии у пациентов с сочетанием дефицита фермента Г6ФД и  $\beta$ -талассемии в обоих случаях удалось идентифицировать следующую мутацию – замена гуанина на аденин первого нуклеотида большого интрона  $\beta$ -глобинового гена ( $\beta^0$ - IVS-2-1; G-A). Замена гуанина на аденин первого нуклеотида большого второго интрона  $\beta$ -глобинового гена на месте контакта со вторым экзоном приводит к нарушению транскрипции, в частности к нарушению сплайсинга (процессинга)  $\beta$ -полипептидной цепи. В следствии данной мутации отсутствует наличие нормальной  $\beta$ -полипептидной цепи и, следовательно, наблюдается заболевание с  $\beta^0$ -фенотипом.

Таким образом, больные с сочетанием гетерозиготного носительства  $\beta$ -талассемии и гемизиготного носительства дефицита Г6ФД с «0» активностью имели следующий генотип: Больной А.А. – Г6ФД В (-) 563 С-Т/  $\beta^0$ - IVS-2-1; G-А и Больной К.Ф. – Г6ФД А (-) 376 А-Г/202 G-А/  $\beta^0$ - IVS-2-1; G-А. Следовательно, своевременное выявление носителей  $\beta$ -талассемии и гемизиготного носительства дефицита Г6ФД, а также их сочетанных дефектов с установлением генотипа мутаций позволит специалистам в дальнейшем провести квалифицированное лечение клинических проявлений и профилактику заболевания в виде медико-генетического консультирования, включая пренатальную диагностику.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Аскерова Т.А., Мовсум-заде К.М., Кичибекон Б.Р. Выявление сочетанных форм гемоглобино- и энзимопатий среди новорожденных // Вопросы медицинской химии.– 1993.– № 6.– С. 51-54.
2. Мовсум-заде К.М., Расулов Э.М., Аскерова Т.А. Исследование генетической гетерогенности Г6ФД-недостаточности и  $\beta$ -талассемии в Азербайджане // Изв.АН Азерб.ССР. Серия биол. наук.– 1980.– № 5.– С. 99-106.
3. Мовсум-заде К.М., Расулов Э.М., Цаликова Т.П. Распространение эритроцитарных энзимопатий пируваткиназы, глюкозофосфатизомеразы, глутатионредуктаазы и глутатионпероксидазы у населения Азербайджана // Вести АМН СССР.– 1984.– № 7.– С. 48-51.
4. Расулов Э.М., Ифраимова З.Н., Ширинова И.Л. Молекулярные формы талассемии у населения двух регионов Азербайджанской ССР // Азмеджурнал.– 1990.– № 9.– С. 28-31.
5. Aksoy M., Kutlar A., Kutlar F., et al. Survey on hemoglobin variants,  $\beta$ -thalassemia, G6FD deficiency and haptoglobin types in Turks from western Thrace // J.Med.Genet. – 1995. V. 22.– P. 288-290.
6. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and red cell glutathione peroxidase // Blood.– 1977, V. 79.– P467-469.
7. Fyodorov A.P., Rasulov E.M., Nasyrova F., et al. Molecular analysis of  $\beta$ -thalassemia in two Soviet populations / 8th World Congress on Human Genetics, USA, Washington, 1991.
8. Maniatis T., Phrig E., Sembruk D. Methods of genetic engineering. Molecular cloning, in Russia, translation from English.– М.: 1984.– 231p.
9. Movsum-zade K.M., Tsalikova T.P., Turgieva D.A. Detection of mutations in G6PD gene in Azerbaijan / 25th Silver Jubilee FEBS Meeting.– Copenhagen, Denmark, 1998.– p.156.
10. Rasulov E.M., Mamedov K. Yu., Haji-zade B. et al. Thalassemia mutant gene geographical distribution in Azerbaijan population / European Association of Gynaecologists and Obstetricians, 6th Meeting.– Moscow, 1991.– P. 101-102.
11. Westmeier R. Electrophoresis in Practice. A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation (Third Edition).– New York, 2000. – 356 p.