

## AZƏRBAYCAN RESPUBLİKASI POPULYASIYASINDA QLÜKOZA-6-FOSFATDEHİDROGENAZA FERMENT ÇATIŞMAZLIĞININ YAYILMA TEZLİYİ VƏ MOLEKULYAR GENETİK TƏDQIQI

Quliyeva E.K<sup>1,3</sup>., Rəhimova N.C<sup>2</sup>., Əşrəfova K.N<sup>2</sup>., Ağayeva S.Ə<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Azərbaycan Qida Təhlükəsizliyi İnstitutu, Azərbaycan Respublikası, Bakı şəh., AZ1124, S.S.Axundov 73c / elvira.guliyeva@afsa.gov.az / +994776419770

<sup>2</sup>K.Fərəcova adına Elmi Tədqiqat Pediatriya institutu, Azərbaycan Respublikası, Bakı şəh. AZ1065 Yasamal ray., Bəsti Bağirova küç., 17

<sup>3</sup>AMEA Genetik Ehtiyatlar İnstitutu, Azərbaycan Respublikası, Bakı ş., AZ1106, Azadlıq pr.,155, saltanat.genetic@gmail.com

**Qlükoza-6-fosfatdehidrogenaza (Q6FD) fermenti qanın eritrosit hüceyrələrinin tərkibində 19 fermentdən ən vacibi olaraq qlükozanın mübadiləsində açar rolunu oynayır. Fermentin aktivliyinin çatışmazlığı eritrositlərdə ATF-in sintezini pozur və eritrositlərin hemolizinə səbəb olur.**

**Açar sözlər:** qlükoza-6-fosfatdehidrogenaza fermenti, biokimyəvi polimorfizm, ferment preparatı, anormal variant, molekulyar-genetik analiz.

Ümumdünya Səhiyyə Təşkilatının məlumatına əsasən dünya əhalisində təxminən 100 milyon insanda Q6FD fermentinin çatışmazlığı müşahidə edilir. Eritrositar Q6FD fermentinin 400-dən artıq anormal variantının identifikasiyası aparılmışdır ki, bunların da təxminən 1/4 hissəsi endemikliyinə görə fərqlənir. Q6FD fermentinin anormal variantları fermentin defisiti olan şəxslərin bir qrupu dərman preparatları, digər qrupu paxlalı qida məhsulları qəbul edərkən (favizm) onlarda hemolitik kriz baş verir [1,3].

Azərbaycan Respublikasının əhalisində Q6FD fermentinin aktivliyinin çatışmazlığı populyasiya səviyyəsində keçən əsrin 70-ci illərindən başlamışdır. Tədqiqatlar yalnız fermentin aktivliyinin öyrənilməsilə kifayətlənmişdir. Belə ki, keçən əsrin 70-ci illərində Masallı rayonunun əhalisində aparılmış populyasiya tədqiqatları Q6FD fermentinin çatışmazlığının yüksək tezliyini (30-23%) aşkar etmişdir. Beləliklə, tədqiqatlarımız üçün Masallı rayonu təsadüfən seçilməmişdir [1,3].

Tədqiqatın məqsədi Oğuz və Masallı rayonlarında əhali arasında Q6FD fermentinin çatışmazlığının anormal variantlarının aşkarlanması və ferment aktivliyində defisit olan fermentlərin fiziki-kimyəvi xüsusiyyətlərini, yayılma tezliyini tədqiq etmək olmuşdur. Aparılmış tədqiqatın nəticələri və onların müzakirəsi nəticəsində Oğuz və Masallı rayonlarının

əhalisində fermentin çatışmazlığının yüksək tezliyini aşkar edilmişdir [1,2,3].

**Nəticələr və onların müzakirəsi.** 1 sayılı cədvəldə Oğuz rayonunda ferment çatışmazlığı aşkar edilmiş oğlan uşaqlarının qanından hazırlanmış ferment preparatlarının fiziki-kimyəvi xarakteristikası verilmişdir. Aktivlik dərəcəsinə görə Kərimli 1 və 2, Padar 1,2 və 3 variantlar fermentin II sinfinə, Muxas və Xalxal fermentin III sinfinə aiddir. Qeyd edilməlidir ki, Muxas və Xalxal ferment variantları fermentin klassik Gd<sup>-</sup> III variantına uyğundur. Yalnız bir halda – Kərimli 1 variantında kliniki olaraq zəif anemiya müşahidə edilir, digər pasientlərdə dərman qəbulundan sonra zəif hemoliz müşahidə edilmişdir. Q-6-FD fermentinin defisiti olan preparatlarda aktivlik normal aktivliyin 2, 4-2,6 % (Kərimli 1) – 28,0-35,0% (Xalxal) təşkil etmişdir (2).

Ferment preparatlarının elektroforezi zamanı elektroforetik hərəkəti normal göstəricidən fərqlənmişdir. Aşağı elektroforetik hərəkətlilik Kərimli 1 variantda (98,0%), yüksək elektroforetik hərəkətlilik Padar 2 ferment preparatında (107,0%) əldə edilmişdir. Mixaelis konstantına (Km) görə aşağı göstərici Padar 2 (20,4 mkmol), yuxarı göstərici Padar 1 ferment preparatında qeyd edilmişdir (66,6%). Gd<sup>-</sup> ferment preparatının Q-6-FD substratına birləşmə dərəcəsinə görə Padar 1 variantı (6,5 mkm) və Padar 2 (20,4 mkm) normadan aşağı olmuşdur (30,2-45,5 mkmol). 7 ferment preparatının hamısında bu göstərici aşağı olmuşdur [6].

**Cədvəl 1.**

**Oğuz rayonunda Q-6-FD fermentinin identifikasiya edilmiş mutant formaları**

Variantın adı	Q-6-FD Aktivlik %	EF-hərəkət	Km Q-6-F mkmol	2dQ-6-F utilizasiya	pH optimum	Termoctabillik	Klinikası
Kərimli 1	2,4-2,6	98,0	30,2	20,0	Bifaza	Aşağı	Zəif anemiya
Kərimli 2	4,5-4,8	99,0	43,5	26,0	9,5 pik	Zəif aşağı	Yumşaq anemiya
Padar 1	12,5-16,7	105,0	66,5	15,0	9,0 pik	Norma	Simptomsuz
Padar 2	10,0-14,5	107,0	20,4	40,5	Bifaza	Zəif aşağı	Dərman hemolizi
Padar 3	11,6-12,5	105,0	37,5	45,5	Bifaza	Zəif aşağı	Dərman hemolizi
Muxac	25,4-29,5	100,0	45,5	16,5	Norma	-	-
Xalxal	28,0-35,0	100,0	39,5	19,0	9,0	-	-

2dQ-6-F substrat analoqunun utilizasiya dərəcəsinə görə aşağı göstərici Padar 1 (15,0%) yuxarı göstərici Padar 3 (45,5%) ferment preparatında müşahidə edilmişdir. pH optimum göstəricisinə əsasən Kərimli 1, Padar 2 və Padar 3 ferment preparatları üçün bifaz, Muxac ferment preparatı üçün normal nəticələr əldə edilmişdir. Padar 1, Xalxal ferment preparatları üçün pH optimum 9,0, Kərimli 2 ferment preparatı üçün 9,5 olmuşdur. Termotabilitet göstəricisinə əsasən aşağı Kərimli 1, zəif aşağı Kərimli 2 və Padar 3 ferment preparatları üçün göstərilmişdir. Normal göstərici Padar 1 ferment preparatında olmuşdur. Klinik göstəricilərə əsasən Kərimli 2, Padar 2 və Padar 3 ferment variantlarında pasientlərdə dərman preparatlarının qəbulundan sonra hemoliz müşahidə edilmişdir. Zəif anemiya Kərimli 1 ferment variantının sahibində olmuşdur. Padar 1 ferment variantı simptomsuz olmuşdur [4].

Qeyd edək ki, istifadə edilən metodların ÜST tərəfindən təklif edilməsinə baxmayaraq zəif tərəfləri mövcuddur: belə ki, Q-6-FD fermentinin xüsusiyyətləri fermentin təmizlik dərəcəsi və xarakteristikasının tədqiqat şəraitindən, eləcə də, istifadə olunan laborator reaktivlərin keyfiyyətindən, NADF<sup>+</sup> üçün Km göstəricisi çox həssas olaraq spektrofotometriya zamanı çətinliklər, 4. qan nümunəsinin götürülməsi, preparatın hazırlanması və fiziki-kimyəvi xarakteristikasının tədqiqi zamanı laboratoriyada olan temperaturun təsirindən asılıdır [2,5].

2 sayılı cədvəldə Masallı rayonunda ferment çatışmazlığı aşkar edilmiş oğlan uşaqlarının qanından hazırlanmış ferment preparatlarının fiziki-kimyəvi xarakteristikası verilmişdir.

**Cədvəl 2.****Masallı rayonunda Q6FD fermentinin identifikasiya edilmiş mutant formaları.**

Variantın adı	Q-6-FD Aktivlik %	EF-hərəkət	Km Q-6-F mkmol	2dQ-6-F utilizasiya	pH optimum	Termoctabillik	Klinikası
Təklə	5,2-7,0	92-95	146,7	70,0	8,0-9,0	zəif aşağı	Yox
Ərəbkəndi	4,5-6,0	90-95	75,0	67,0	8,0-8,5	zəif aşağı	yumşaq anemiya
Çaxırlı	7,4-12,5	90	80,0	78,0	8,5	Aşağı	Yox
Bədəlan	6,0-8,0	85-90	24,5	80,0	8,0-9,0	zəif aşağı	Yüngül anemiya
Güllütəpə	5,5-9,0	95	135,5	65,0	8,5	Norma	Yox

Q-6-FD fermentinin defisiti bütün hallarda normal aktivliyin 5,2-12,5%-ni təşkil etmişdir. Aktivlik dərəcəsinə görə əldə edilmiş ferment aktivliyi fermentin II sinfinə aiddir. Beş ferment preparatının üçündə (Güllütəpə, Təklə və Çaxırlı) fermentin aşağı aktivliyi (0-10%) müşahidə edilmişdir. Hər üç variantda paxlalı qida məhsulunun qəbulundan sonra eritrositlərin hemolizi və anemiya müşahidə edilmişdir (favizm) (1).

Ferment preparatlarının Ərəbkəndi və Bədəlan variantlarında zəif anemiya hallarına təsadüf edilmişdir ki, bu da fermentin klinikasına əsasən fermentin II sinfinə aiddir. Beş ferment preparatının hamısında pH-optimum göstəricisi norma hüdudunda olmuşdur (pH 7,5-8,5). Beş ferment preparatının ikisində (Təklə və Bədəlan) pH-optimumun bifaz variantı qeyd edilmişdir.

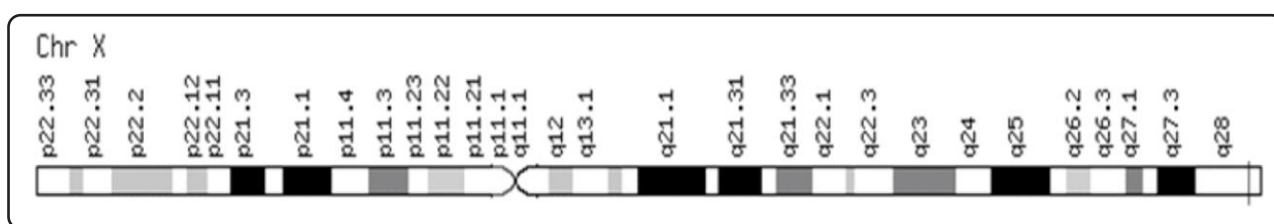
Tədqiq edilən ferment preparatlarının hamısı aşağı elektroforetik hərəkətlik göstərmişdir. Q-6-F substratına əsasən Mixaelis-Menten konstantının ( $K_m$ ) göstəricisi beş ferment preparatının hamısında yüksək olmuşdur.  $K_m$  ən yüksək göstəriciləri Təklə (146,7mkm) və Güllütəpə (135,5 mkm) ferment preparatlarında qeyd edilmişdir.  $K_m$  ən aşağı göstəricisi Bədəlan ferment preparatında aşkar edilmişdir (24,5 mkm).

Dörd ferment variantında 2dQ-6-F substrat analoqu üçün yüksək utilizasiya dərəcəsi müəyyən edilmişdir (2).

Masallı rayonu üzrə tədqiq edilmiş Q-6-FD fermentinin çatışmazlığı olan şəxslərin ferment preparatlarının fiziki-kimyəvi xarakteristikalarının dünya ədəbiyyatında əks etdirilmiş ferment variantları ilə müqayisəsi beş variantdan üçünün yeni olduğunu göstərmişdir. Təklə variantı – fermentin aşağı aktivliyi (normanın 5,2-7,0%-i), Q-6-F substratı üçün yüksək dərəcəli  $K_m$  birləşməsi (146,7 mkm), 2dQ-6-F substrat analoqu üçün yüksək utilizasiya dərəcəsi (Q-6-F substratın 70%-i), bifaz pH optimum və klinikanın olmaması. Bədəlan variantı – fermentin aşağı aktivliyi (normanın 6,0-9,0%-i), Q-6-F substratı üçün aşağı dərəcəli  $K_m$  birləşməsi (24,4 mkm), 2dQ-6-F substrat analoqu üçün yüksək utilizasiya dərəcəsi (Q-6-F substratın 80%-i), yüngül anemiya. Güllütəpə variantı - fermentin aşağı aktivliyi (normanın 5,5-9,0%-i), Q-6-F substrat üçün yüksək dərəcəli  $K_m$  birləşməsi (135,0 mkm), 2dQ-6-F substrat analoqu üçün yüksək utilizasiya dərəcəsi (Q-6-F substratın 65%-i), pH optimum üçün kəskin pik və klinikanın olmaması (1).

Beləliklə, fermentin Bədəlan variantı - fermentin aşağı aktivliyi (normanın 6,0-9,0%-i), Q6F substratı üçün aşağı dərəcəli  $K_m$  birləşməsi (24,4 mkm), 2dQ6F substrat analoqu üçün yüksək utilizasiya dərəcəsi (Q6F substratın 80%-i), yüngül anemiya.

Şəkil 1-də X-cinsi xromosomun strukturunun sxematik şəkili və Q6FD geninin lokusu (q28) verilmişdir.



Şəkil 1. X-cinsi xromosomun strukturunun sxematik şəkili və Q6FD geninin lokusu (q28).

Q6FD fermentinin geni X-cinsi xromosomun uzun çiyinin subtelomer Xq28 hissəsində yerləşir. Q6FD fermentinin ilk kDNT-si mRNT-nə əsasən 1981-ci ildə M. Persico tərəfindən sintez edilmişdir. 1986-cı ildə T.Takizawa insanın qaraciyər hüceyrələrindən istifadə edərək klonlaşdırma yolu ilə kDNT-nin kitabxanasını yaratmışdır. İnsanın Q6FD fermentinin geni 13 ekzon və 12 introndan ibarət olaraq 18 kbas ölçüyə malikdir. Ekzonların ölçüsü 12 nukleotid əsasında 236 nukleotid əsasına

kimi, intronların ölçüsü 97 nukleotid əsasında başlayaraq 11 kbas ölçüyə kimi təşkil edir. Genin promotor hissəsi –202 vəziyyətində ATTAAAT 5<sup>1</sup>-hissədən, 20 nukleotid əsası əvvəl yerləşərək TATA qutu rolunu oynayır. Genin promotor hissəsində heksonukleotid ardıcılığı GGGCGGG üç dəfə, bu ardıcılığa komplementar CCCGCCC ardıcılığı 6 dəfə təkrar edilmişdir. Bu nukleotid ardıcılıqları adədən ATTAAAT ardıcılıqlarından 12-400 nukleotid əsası kənarında yerləşir. GGGCGGG

ardıcılığı əsasən 1-ci intronun 5<sup>1</sup>-sonluqdan 70 kbas məsafədə yerləşir. Transkripsiyanın səviyyəsini tənzimləyən CAAT nukleotid ardıcılığı GC nukleotid ardıcılığı ilə zəngin olan 5<sup>1</sup>-hissədən 220 nukleotid əsası məsafəsində yerləşmişdir. ATTG nukleotid ardıcılığı -411-ci vəziyyətdə yerləşmişdir.

1991-ci ildə Chen T.Y. Q6FD fermentnin geni daxil olmaqla 20114 nukleotid ardıcılığını sekvenləşdirmə yolu ilə tədqiq edərək Q6FD fermentinin aminturşu ardıcılığını öyrənmişdir. Fusco və həmk. (2012) Alu təkrar genin 5<sup>1</sup>-translyasiyada iştirak etməyən hissəsində üç dəfə müşahidə edilmişdir. 12 Alu genin ən böyük ikinci intronunda yerləşmişdir. Capellini və Fiorelli (2008) Q6FD fermentinin 515 aminturşu qalığından ibarət olduğunu müəyyən etmişdir [5, 6,10, 11,12].

Beləliklə, tədqiqatların nəticəsi olaraq qeyd etməliyə ki, Oğuz və Masallı rayonlarında Q-6-FD fermentinin çatışmazlığı olan şəxslərdən hazırlanmış ferment preparatlarının fərqli fiziki-kimyəvi göstəriciləri əldə edilmişdir. Ferment preparatlarının fərqli fiziki-kimyəvi göstəriciləri Q-6-FD fermentin geni səviyyəsində müxtəlif mutasiyaların olduğunu göstərir. F.N.-in qanından əldə edilmiş DNT-nin molekulyar analizi Almaniyanın CENTOGENE laboratoriyasında aparılmış Q6FD fermentinin geninin mutasiyası identifikasiya edilmişdir.

Genin 1178-ci nukleotidi olan Guanin nukleotidinin Adenin nukleotidilə əvəzi identifikasiya edilmişdir. Mutasiya nəticəsində zülalın 393-cü vəziyyətində Arginin aminturşusu Histidin aminturşusu ilə əvəzi baş verir.

Q6FD fermentinin geninin 1178-ci vəziyyətində quaninin adenin nukleotidilə əvəzi ilk dəfə Filosa və həmkarları (1992) tərəfindən aşkar edilmiş və müəlliflər tərəfindən fermentin yeni mutasiyasını G6FD Portici adlandırmışlar. Müəlliflər Q6FD fermentinin bu yeni mutasiyasını ÜST-nin klassifikasiyasına əsasən 2-ci qrupa aid etmişlər [4,8 9].

#### Nəticə.

1. G6FD fermentinin çatışmazlığının Masallı royonu üzrə fenotipik tezliyi 8,33%, gen tezliyi 0,0833 (v.d.) bərabər olmuşdur.

2. ÜST-nin tələblərinə əsasən aşkar edilmiş ferment çatışmazlığı biokimyəvi xarakteristikasına əsasən üç sinifə aid edilmişlər: 2-ci sinif (13 şagird), 3-cü sinif (6 şagird), 4-cü sinif (4 şagird).

3. G6FD geninin molekulyar analizi genin 1178-ci nukleotidi olan quaninin adenin nukleotidilə əvəzi identifikasiya edilmişdir. Mutasiya nəticəsində zülalın 393-cü vəziyyətində arginin aminturşusu histidin aminturşusu ilə əvəzi baş vermişdir [Q6FD,1173 (G-A) Arg 393His].

#### ƏDƏBİYYAT:

1. Ağayeva S. Ə., Kiçibəyov B.R. (2018) Azərbaycan Respublikasının Masallı rayonunda Q-6FD fermentinin biokimyəvi polimorfizminin tədqiqi. Azərbaycan Dövlət Pedaqoji Universitetin Xəbərləri, 2018, C. 66, N2 (səh.21-26)
2. Ağayeva S.Ə., Məmmədov A.M., Kiçibəyov B.R.(2018) Azərbaycan Respublikasının Oğuz rayonunda eritrositar qlükoza-6 fosfatdehidrogenaza fermentinin biokimyəvi polimorfizmi AMEA Zoologiya İnstitutunun Elmi əsərləri, C.36, N1(səh.16-21)
3. Краснопольская К.Д., Шатская Т.А., Филиппов И.К. и др.(1977) Генетическая гетерогенность Г6ФД-недостаточности: исследование мутантных аллелей Gd<sup>+</sup> в Шекинском районе Азербайджанской ССР. Генетика.Т.ХII. №8. с. 1454-1461.
4. ВОЗ. Научная группа. Стандартизация методов исследования Г6ФД эритроцитов.: пер. С англ. Серия технических докладов. №366. Женева, 1988. С.48.
5. Aghayeva S.A., Huseynova L.S., Kichibekov B.R., Aliyeva K.A., Khalilov R.I., (2018). Inherited metabolic disease phenylketonuria and deficiency of g6pdenzyme in a family study. Deutscher Wissenschaftsherold•German Science Herald, N 2/2018(34-36). DDC-UDC 616.633.284/.466.26-008.9:575.224 DOI:10.19221/ 201821
6. Aghayeva S.A., Mamedbeyli A.K., Rasulov E.M.(2019) Combination of two genetic disturbances: G6PD enzyme deficiency and Duchenne muscular dystrophy in one patient. Human Genome and Health, 2nd International Conference Tbilisi, Georgia. p.21
7. Mammadov A.M., Aghayeva S.A., Huseynova L.S., Guliyeva E.K., Mehdiyeva Z.İ.(2019) Molecular-genetic investigation of some hereditary diseases in Azerbaijan. "Azərbaycan\_Türkiyə

Universitetləri təhsil, elm, texnologiya”, Bakı, 18-20 dekabr, I Beynəlxalq elmi-praktiki konfransın materialları. s.155-160

8. Beutler E. The genetics of glucose-6-phosphatedehydrogenase deficiency. Seminars in Hematol. 1998. v.27. 3.137-164.

9. Beutler E. G6PD deficiency. Blood.1994. 84. P. 3615-3636.

10. Hirono A., Ishii A., Kere N. et al. Molecular analysis of glucose-6-phosphatedehydrogenase variants in the Solomon Islands. Amer. J. Hum. Genet.1995. V.56.

11. Xu W., Westwood B., Bartsocas C.S., Malcorra-Azpiazu J.J. et al., G6PD mutations and haplotypes in various ethnic groups. Blood.1999. V.85.1.P.257-263

12. Zuo L., Chen E., Du C.S. et al., Genetic study of Chinese G6PD variants by direct PCR sequencing. Blood. 1999. V.76.

## РЕЗЮМЕ

### Исследование молекулярной генетики и частота распространения ферментативного дефицита Г-6-ФД в популяции Азербайджанской Республики

Гулиева Э.К.<sup>1,3</sup>, Рагимова Н.Дж.<sup>2</sup>, Ашрафова К.Н.<sup>2</sup>, Агаева С.А.<sup>3</sup>

*Азербайджанский Институт Пищевой Безопасности<sup>1</sup>*

*Научно-исследовательский Институт Педиатрии имени К.Я.Фараджевой<sup>2</sup>*

*НАНА Институт Генетических Ресурсов<sup>3</sup>*

**Ключевые слова:** фермент глюкозо-6-фосфатдегидрогеназный, биохимический полиморфизм, ферментный препарат, аномальный вариант, частота, молекулярно-генетический анализ.

Глюкоза-6-фосфатдегидрогеназный фермент играет ключевую роль в метаболизме глюкозы как важнейшего из 19 ферментов в составе эритроцитарных клеток крови. Недостаток активности фермента нарушает синтез АТФ в эритроцитах и вызывает гемолиз эритроцитов.

## SUMMARY

### Studies of molecular genetics and frequency of distribution of q-6-fd enzyme deficiency in population of the republic of Azerbaijan

Guliyeva E.K.<sup>1,3</sup>, Rahimova N.C.<sup>2</sup>, Ashrafova K.N.<sup>2</sup>, Agayeva S.A.<sup>3</sup>

*Azerbaijan Food Safety Institute<sup>1</sup>*

*Scientific Research of Pediatric Institute named after K.Y. Farajova<sup>2</sup>*

*Institute of Genetic Resources<sup>3</sup>*

**Key words:** glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme, biochemical polymorphism, enzyme preparation, abnormal variant, frequency, molecular genetic analysis

Glucose-6-phosphatdehydrogenase ferment plays a key role in the metabolism of glucose, the most important of 19 enzymes in the composition of erythrocyte cells of the blood. Deficiency of enzyme activity disrupts the synthesis of ATF in erythrocytes and causes hemolysis of erythrocytes.

### Quliyeva Elvira

*Qida Təhlükəsizliyi İnstitutu*

*E-mail: elvira.guliyeva@afsa.gov.az*

*Redaksiyaya daxil olub:07.05.2021*

*Çapa tövsiyə olunub:10.05.2021*

*Rəyçi: t.ü.f.d. Qasımova Y.A.*