

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АЗЕРБАЙДЖАНА
ИНСТИТУТ БОТАНИКИ**

На правах рукописи

РЕНА ФИРУДИН КЫЗЫ МАМЕДОВА

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ УРОВНЯ ТИРЕОТРОПНОГО
ГОРМОНА, НЕДОСТАТОЧНОСТИ ФЕРМЕНТА Г6ФД И
НОСИТЕЛЬСТВА β -ТАЛАССЕМИЙ СРЕДИ НОВОРОЖДЕННЫХ
ГОРОДА БАКУ**

2409.01– Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора философии по биологии

Баку - 2015

Работа выполнена на кафедре «Генетики и эволюционного учения» Бакинского Государственного Университета и в Генетической лаборатории Центральной Больницы Нефтяников.

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор **М.Ш.Бабаев.**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
У.Ф.Гашимова
кандидат биологических наук
А.Ч.Мамедов

Ведущая организация: Азербайджанский Медицинский
Университет, кафедра «Медицинской
биологии и генетики»

Защита состоится «12» 01 2016 г. в _____
часов на очередном заседании Диссертационного Совета Д
01.061 при Институте Ботаники НАНА Азербайджана.

Адрес: AZ-1004, Бадамдарское шоссе, 40

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
Ботаники НАНА Азербайджана.

Автореферат разослан « » _____ 2015 г.

Ученый Секретарь
Диссертационного
Совета Д 01.061,

доктор биологических наук,
профессор С. Дж. Ибадуллаева

ОСНОВНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Программа профилактики врожденных и наследственных заболеваний должна базироваться на данных о "грузе" наследственной патологии, который в обобщенном виде составляет 30-60 на 1000 живорожденных. При этом в структуре наследственных болезней доля тяжелых форм патологии составляет около 2% (Володин Н.Н., 2008). В связи с невозможностью полного излечения и часто прогрессирующим характером врожденных и наследственных заболеваний основным направлением в борьбе с ними является их профилактика. Существует несколько организационных форм профилактики врожденных и наследственных заболеваний. Среди них особая роль принадлежит генетическому скринингу наследственных заболеваний (Levy H.L., Albers S., 2000; Новиков П.В., 2006; Вахарловский В.Г., Горбунова В.Н., 2007;).

Применяемые технологии для скрининга наследственных заболеваний (НЗ) и врожденных пороков развития (ВПР) разнообразны - от ингибиторного теста Гатри для диагностики фенилкетонурии (ФКУ), начало применения которого восходит к 1950 гг. до tandemной масс-спектрометрии (ТМС) и молекулярно-генетических методов для многих моногенных и хромосомных заболеваний (Guthrie R., 2002). Основная цель программ массового просеивания новорожденных на наследственные болезни - раннее выявление заболевания на доклинической (досимптоматической) стадии и организация лечения (Барашнев Ю.И., 2004).

Для стран с развитым здравоохранением принято считать, что массовое просеивание новорожденных нужно проводить лишь для нескольких болезней: это ФКУ, врожденный гипотиреоз, врожденная гиперплазия надпочечников, галактаземия, муковисцидоз и талассемия (Дюбкова Т.П., 2008).

ФКУ и врожденный гипотиреоз - самые частые из тех нарушений, при которых слабоумие развивается в постнатальном периоде и может быть предотвращено при своевременной диагностике и лечении. Следует отметить тот факт, что генетический скрининг таких наследственных заболеваний как гипотиреоз, фенилкетонурия, гемоглобинопатий и дефицита фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФД) в комплексе среди новорожденных республики не проведен. Следовательно, и не известны реальные их частоты встречаемости в Азербайджанской Республике.

Цель и задачи исследования. Учитывая выше изложенное целью наших исследований явилось выявление и изучение генетической гетерогенности, распространенности наследственных заболеваний: гипоти-

реоз, гемоглобинопатий, дефицита фермента Г6ФД и фенилкетонурии среди новорожденных г. Баку и разработка единой программы их скрининга.

Для достижения выше поставленной цели было планировано решение следующих задач:

1. Установить частоту встречаемости гипотиреозидизма на основании изменения уровня тиреотропного гормона (ТТГ);

2. Выявить частоту встречаемости гена фенилкетонурии среди новорожденных;

3. Определить частоту встречаемости наследственных гемоглобинопатий, в частности бета-талассемии среди новорожденных и в случае выявления установить тип мутации;

4. Установить частоту встречаемости и тип мутации при дефиците активности фермента Г6ФД у новорожденных;

5. Разработать единую программу генетического скрининга наиболее часто встречающихся наследственных заболеваний среди новорожденных Азербайджанской Республики.

Научная новизна работы. Впервые нами разработан «Генетический паспорт новорожденного», включающий наиболее часто встречающиеся наследственные заболевания крови и метаболизма, ранее зарегистрированные среди населения Азербайджана. Установлено статистически достоверное изменение значения тиреотропного гормона у 2,25% обследованных новорожденных.

Установлена генетическая природа гемолитической болезни у новорожденных, связанная с дефицитом фермента Г6ФД. Идентифицировано два фенотипа для гемизиготной формы дефицита фермента у мальчиков: Г6ФД «+» фенотип (77,8%) и Г6ФД «-» фенотип (22,2%).

Идентифицировано два типа мутации гена β -талассемии у новорожденных: замена нуклеотида аденин на нуклеотид гуанин в 110 позиции первого интрона (IVS-I-110, A-G), а также замена нуклеотида аденин на гуанин в позиции один второго интрона β -глобинового гена (IVS-II-1, A-G).

Результаты исследований позволяют определить объем генетического груза наследственных заболеваний в популяции. Все полученные результаты помогут специалистам разработать пути их профилактики в виде пренатальной диагностики, а также вычислить объем медицинской помощи больным детям.

Практическая значимость. С учетом региональных особенностей для своевременного выявления наиболее часто встречающихся наследственных заболеваний среди новорожденных республики разработана и использована программа, включающая генетическую паспортизацию но-

ворожденного. Благодаря данной скрининговой программе выявлены такие наследственные заболевания метаболизма как фенилкетонурия и гипотиреоз. Выявлены гетерозиготные носители: альфа-талассемии, бета-талассемии, гена серповидноклеточности, гемоглобина D, а также недостаточность фермента Г6ФД.

Результаты скрининга наносятся на специально подготовленные формы - «Генетический паспорт новорожденного» и выдаются родителям при выписке новорожденного. На основании выявленного нарушения у новорожденного в специализированных детских медицинских учреждениях можно провести своевременное лечение или же профилактику заболевания.

Для предотвращения в дальнейшем повторного рождения больного ребенка с данной патологией следует провести ретроспективное медико-генетическое консультирование с последующей пренатальной диагностикой в данной семье, что позволит значительно снизить рождаемость детей с наследственными заболеваниями.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Наличие гипотиреозидизма у новорожденных г. Баку.
2. Наличие мутации талассемии и аномальных гемоглобинов у новорожденных г. Баку.
3. Влияние дефицита активности фермента Г6ФД на гемолитическую болезнь у новорожденных.
4. Наличие мутации фенилкетонурии у новорожденных г. Баку.

Апробация результатов. По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 5 статей и 3 тезиса. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на Международной научной конференции, посвященной 100-летию академика Г.Алиева (Баку-2007 г.); на Республиканской научной конференции, посвященной 85-ти летию Г.А.Алиева (Баку-2008 г.); на Международной научной конференции, посвященной «Моногенным, хромосомным и врожденным порокам развития», Баку-2011 г.; на расширенном заседании кафедры «Генетики и эволюционного учения», Баку-2015 г.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, главы, посвященной изложению результатов собственных экспериментальных исследований и их обсуждению, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 135 страницах компьютерного текста, содержит 10 таблиц и 9 рисунков. Список литературы состоит из 210 наименований.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал собран в родильном отделении Центральной Больницы Нефтяников с 2003 по 2006 гг. Общее число новорожденных - 128 мальчиков и 139 девочек. Всего обследовано 267 новорожденных. Кровь для анализов в количестве 1-1,5 мл брали в микропробирки эппендорф, содержащие антикоагулянт ЭДТА в течение 72 часов после рождения.

Количественный анализ тиреотропного гормона (тироид-стимулирующий гормон) проводили на приборе «Personal Lab» (Германия) с использованием реактивов Adaltis фирмы «Human» (Италия) иммуноферментного анализа. Аппарат и реактивы рассчитаны для автоматического анализа тироид-стимулирующего гормона.

Для диагностики наследственных гемоглобинопатий использовали аналитический метод изоэлектрофокусирования на полиакриламидноамфолиновых пластинках. Аналитический метод изоэлектрофокусирования - наиболее точный электрофоретический метод, позволяющий быстро диагностировать наследственные гемоглобинопатии. С помощью данного метода гемоглобины человека можно разделить на следующие восемь фракций: HbA₁, HbA_{1c}, HbA₂, HbF₁, HbF₂, метгемоглобин и две фракции промежуточного метгемоглобина. Следовательно, аналитический метод изоэлектрофокусирования имеет большие диагностические преимущества (Dacie S.J. et al., 1999).

Для идентификации типа мутаций β -талассемии методом высокотемпературной аллель-специфической амплификации использовали следующие синтетические олигонуклеотидные зонды: 1. β^0 - IVS-2-1 (Г-А), 2. β^0 -kodon 8 (-АА); 3. β^+ - IVS-1-110 (Г-А); 4. β^0 -kodon 8/9 (+Г); 5. β^+ - IVS-1-6 (Т-Ц) и 6. β^+ - IVS-1-5 (Г-Ц). Высокотемпературную аллель-специфическую амплификацию проводили на амплификаторе - Thermal Cycler BioCycler TC-S фирмы Amersham (США).

Для диагностики глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной недостаточности использовали метод флюоресцирующих пятен (E.Beutler, 2002). Этот тест основан на флюоресценции NADP·H под воздействием лучей источника, дающего сплошной ультрафиолетовый спектр.

Диагностику ФКУ на уровне мочи проводили пробой Фелинга, на уровне сыворотки крови методом тонкослойной хроматографии (Dacie S.J. et al., 1999).

Статистический анализ фенотипических и генных частот наследственной патологии проведен с использованием общепринятых методов (Ли Ч., 1979).

Также, для статистической обработки экспериментального материала использовали программу VoxBenkin2F. Программа обеспечивает построение расчетной матрицы, расчет коэффициентов двухфакторной модели и проведение регрессионного анализа с проверкой адекватности модели (по критерию Фишера), а также вычисление невязки между данными эксперимента и полученными при использовании модели результатами. Отличительной особенностью программы VoxBenkin2F является гибкий алгоритм удаления незначачих коэффициентов из модели, реализованный в виде развернутого диалога с необходимыми комментариями, помогающими пользователю принять решение о значимости коэффициента. Программа обеспечивает наглядное представление результатов расчетов на каждом из этапов вычислений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

«Генетический паспорт для новорожденных». Мы в своих исследованиях задались целью создать «Генетический паспорт новорожденных» для новорожденных Азербайджана с учетом результатов предыдущих популяционно-генетических исследований. В «Генетический паспорт новорожденных» включены две группы наследственных заболеваний:

1. Генетические нарушения, которые имеют наиболее высокую встречаемость среди населения республики. Это наследственные гемоглобинопатии, включающие α - и β -талассемии, структурно-аномальные гемоглобины; гемоглобин S (ген серповидноклеточности), гемоглобин D, гемоглобин C, гемоглобин E; метгемоглобинемии, включающие метгемоглобин и промежуточные фракции метгемоглобина; недостаточность эритроцитарного фермента Г6ФД. Все выше перечисленные генетические нарушения довольно часто встречаются среди населения республики.

2. Вторая группа наследственных заболеваний, включенных в «Генетический паспорт новорожденных» - наследственные заболевания, которые встречаются с одинаковой частотой среди населения Земного шара. К таким наследственным заболеваниям относятся: гипотиреоз и фенилкетонурия, диагностирующая нарушение аминокислотного обмена, в частности аминокислоты фенилаланин. Гликолизированный гемоглобин A_{1c}, используется при диагностике сахарного диабета 1 типа. Всего при составлении генетического паспорта для новорожденных были использованы одиннадцать наследственных нарушений. «Генетический паспорт новорожденных» представлен на рис.1.

GENETİK ARAYIŞ № _____ Verilir _____ yenidoğulmuşun anasının adı, soyadı və atasının adı Doğulduğu tarix _____ ondan ötəri ki, ona _____ tarixdən aşağıda göstərilən analizlər keçirilmişdir: 1. İrsi hemoglobinopatiya: • α-talassemiya (HbH) _____ • β-talassemiya _____ • aypara şəkilli anemiya (HbS) _____ • anormal HbC _____ • anormal HbD _____ • anormal HbE _____ • methemoglobinemiya (MetHb) _____ 2. Hemoglobin $A_{1c}HbA_{1c}$ _____ 3. G6FD _____ 4. Tireotrop hormon (TSH) _____ 5. Fenilketonuriya (FKU) _____ Qeyd: _____ Mərkəzi klinik – diaqnostiki laboratoriyanın müdiri _____	GENETİK DATA № _____ Given to _____ name, sur name & father's name of newborn's mother) Born on _____ about carried out analysis on the date _____ 1. Inherited hemoglobinopathies: • α-talassemiya (HbH) _____ • β-talassemiya _____ • sickle-cell anemiya (HbS) _____ • abnormal HbC _____ • abnormal HbD _____ • abnormal HbE _____ • methemoglobinemia (MetHb) _____ 2. Hemoglobin $A_{1c}HbA_{1c}$ _____ 3. G6FD _____ 4. Thyroid Stimulating hormone (TSH) _____ 5. Phenylketonuria (FKU) _____ Notice: _____ Head of Central Clinical- Diagnostic Laboratory _____
---	---

Рис. 1. Генетический паспорт новорожденных.

Как видно из рисунка, внутренняя часть генетического паспорта составлена на двух языках; на первой странице представлен номер генетического паспорта, фамилия имя и отчество матери (роженицы) новорожденного (ой), дата рождения, перечень анализов, примечание и фамилия и имя руководителя центральной клинко-диагностической лаборатории.

Первая страница написана на азербайджанском языке. На второй странице представлено тоже самое только на английском языке. На титульном листе представлено фото новорожденного с надписью «Йенидоулулушун генетик паспорту». Мальчикам предоставляется «Генетический паспорт новорожденных» в синей, девочкам в красной обложке.

Результаты скрининга уровня тиреотропного гормона у новорожденных. Нами проведен скрининг уровня тиреотропного гормона в сыворотке крови новорожденных г. Баку. Для этого использована венозная кровь 267-и новорожденных. Показатели нормы содержания тиреотропного гормона в плазме крови составляют у новорожденных от 1,1 до 17 мЕд\л, у взрослых 0,30-3,00 мЕд\л.

Забор крови для исследований производили на 3 сутки после рождения новорожденного. Сразу же выделяли сыворотку и при проведении отсроченных исследований сыворотку замораживали в морозильнике холодильника. Сыворотку оттаивали один раз перед проведением исследований. Уровень тиреотропного гормона измеряли для определения гипер - и гипофункции щитовидной железы у новорожденных. Многие авторы полагают, что тиреотропный гормон - наиболее чувствительный тест из используемых в диагностике заболеваний щитовидной железы.

Определяли уровень ТТГ в крови, взятой в первые 3-5 дней жизни. При очень низких и высоких значениях уровня ТТГ тест повторяли. При уровне >10 мЕд\л проверяли дополнительно лабораторные показатели функции щитовидной железы и советовали матери обращаться к врачу педиатру после выписки из родильного дома. Результаты скрининга представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты генетического скрининга гипотиреоза среди новорожденных

<i>уровни тиреотропного гормона (мЕд\л)</i>							
	0-1,0	1,0-1,5	1,5-2,0	2,0-3,0	3,0-4,0	4,0-4,5	и выше
Количество новорожденных	32	88	85	37	14	5	6
Число %	11,98%	32,95	31,83%	14,85%	5,24%	1,87%	2,25%

Как видно из таблицы, наблюдали модальное распределение ТТГ. Наибольшее количество новорожденных имело уровень тиреотропного гормона в пределах - 1,0-1,5 мЕд\л и 1,5-2,0 мЕд\л, 88 новорожденных (32,95%) и 85 новорожденных (31,83%) составляли 64,79% от всех подверженных к скринингу новорожденных. 32 новорожденных (11,98%) имели уровень тиреотропного гормона в пределах 0-1,0 мЕд\л. Начиная с 2,0-3,0 мЕд\л наблюдали уменьшение числа новорожденных, обладавших высокими концентрациями гормона: 2,0-3,0 мЕд\л - 37 новорожденных (14,85%), 3,0-4,0 мЕд\л - 14 новорожденных (5,24%), 4,0-4,5 мЕд\л - 5 новорожденных (1,87%) и выше 4,5 мЕд\л - 6 новорожденных (2,25%). Установлены гипо- и гиперфункция щитовидной железы, что напрямую связано с дальнейшими нарушениями ЦНС у детей.

Программой массового скрининга гипотиреоз выявляется не у всех пораженных новорожденных. Кроме того, многие дети не были вовлече-

ны в программу скрининга. Следовательно, рекомендуют врачам при выявлении у детей хотя бы одного симптома гипотиреоза немедленно проводить определение параметров функциональной активности щитовидной железы.

Полученные результаты генетического скрининга ТТГ позволят врачам педиатрам своевременно проводить лечение больных детей до проявления клиники заболевания.

Статистическая обработка полученных результатов значений тиреотропного гормона. Любая отрасль современной науки стремится, как правило, выразить вскрытые ею объективные законы в форме математической модели, т. е. в виде тех или иных соотношений между показателями, характеризующими различные стороны познанных явлений. Такую модель определенных соотношений между показателями называют функциональной зависимостью. Сущность ее проявляется в том, что каждое изменение значения одного показателя закономерно вызывает соответствующее изменение и другого показателя. Знание функциональной зависимости позволяет предсказывать значения зависимой величины (функции) при любом значении «управляющей» ею величины (аргумента). Отсюда вытекает практическая и научная ценность функциональных моделей: они позволяют предсказывать ход описываемого ими процесса, управлять этим процессом.

Принимая за X_1 количество новорожденных, за X_2 численный процент, деленный на 100 - составим таблицу зависимости показателей функционирования процесса. $Y_{\text{экс}}$ вычисляем как среднее арифметическое из экспериментальных показателей, приведенных в рабочей тетради. При этом получаем следующую таблицу:

Таблица 2. Зависимость показателей функционирования процесса.

X_1	X_2	$X_1 X_2$	X_1^2	X_2^2	$Y_{\text{экс}}$
32	0.11985	3.8352	1024	0.014364	0.872
88	0.32959	29.0040	7744	0.108690	1.254
85	0.31835	27.0597	7225	0.101346	1.786
37	0.13857	5.1271	1369	0.01920	2.397
14	0.05243	0.7340	196	0.00275	3.478
5	0.01873	0.09365	25	0.00035	4.260
6	0.02247	0.13482	36	0.000505	6.31

На основании экспериментальных данных была решена задача статистического исследования зависимостей показателей, характеризующая функционирование процесса. Выбранные для эксперимента уровни фактора, выражаются в кодированных величинах и соответствуют +1 и -1. От числа уровней зависит объем эксперимента и эффективность оптимизации.

Результаты генетического скрининга наследственных гемоглобинопатий среди новорожденных. Для определения частоты встречаемости наследственных гемоглобинопатий среди новорожденных мы использовали аналитический метод изоэлектрофокусирования на полиакриламидно-амфолиновых пластинках с pH 3,5-9,5 и 5,5-8,5.

Аналитический метод изоэлектрофокусирования на полиакриламидно-амфолиновых пластинках с pH 3,5-9,5 и 5,5-8,5 позволяет разделить гемолизат, приготовленный из крови новорожденных на следующие девять гемоглобиновых фракций: HbA1, HbA1c, HbA2, HbA3, HbF1, HbF2, метгемоглобин, промежуточный метгемоглобин (в виде двух фракций). Наиболее анодным является HbA3, катодным HbA2. От анода к катоду гемоглобиновые фракции расположены следующим образом; HbA3, HbA1c, HbA1, HbF1, HbF2, промежуточный метгемоглобин, метгемоглобин и HbA2. Аномальный HbS (серповидноклеточное носительство), HbD располагается между фракциями гемоглобинов HbF1 и промежуточного метгемоглобина. Аномальный HbE располагается между фракциями промежуточного метгемоглобина и метгемоглобина. Аномальный HbC располагается на уровне минорной фракции HbA2.

В таблице 3 представлены результаты генетического скрининга крови новорожденных на наследственные гемоглобинопатии.

Таблица 3. Результаты генетического скрининга крови новорожденных на α - и β -талассемии

Количество новорожденных	α -талассемия		β -талассемия	
	число	%	число	%
267	4	1,498	3	1,123

Генетический скрининг крови новорожденных на наследственные гемоглобинопатии позволил идентифицировать у 7-ми новорожденных из 267 обследованных гетерозиготное носительство талассемий: у 4-х выявили α -талассемию и у 3-х новорожденных β -талассемию с фенотипической частотой 1,498% и 1,123%, соответственно.

У 3-х разнополых детей выявлено гетерозиготное носительство структурно-аномальных гемоглобинов типа HbS и HbD: 2 случая с серповидноклеточным носительством (HbS) и один случай с HbD.

Родители новорожденных с серповидноклеточным носительством были выходцами из Шеки-Закатальской Зоны (Шеки, Кабала и Огуз).

Результаты молекулярной диагностики гена β -талассемии. Для идентификации типа мутаций β -талассемии из венозной крови 3-х новорожденных с диагнозом гетерозиготная бета-талассемия и их родителей выделяли геномную ДНК, затем интактность геномной ДНК анализировали электрофорезом на агарозных пластинках. Тип мутации β -талассемии определяли методом высокотемпературной аллель-специфической амплификации. Для этого использовали следующие синтетические олигонуклеотидные зонды (праймеры): β^0 - IVS-2-1 (Г-А), β^0 -kodon 8 (-AA); β^+ - IVS-1-110 (Г-А); β^0 -kodon 8/9 (+Г); β^+ -IVS-1-6 (Т-Ц) и β^+ -IVS-1-5 (Г-Ц).

Каждый образец ДНК, выделенный из крови новорожденных гибридизировали с праймерами в отдельности. Из шести образцов праймеров для двух получен положительный сигнал. Следовательно, идентифицировано два типа мутации для гена β -талассемии: 1. замена нуклеотида гуанин на нуклеотид аденин в 1 позиции второго - большого интрона β -глобинового гена с фенотипом β^0 -талассемии - β^0 - IVS-2-1 (Г-А) и 2. замена нуклеотида гуанин на нуклеотид аденин в 110 позиции первого - малого интрона β -глобинового гена с фенотипом β^+ -талассемии - β^+ -IVS-1-110 (Г-А).

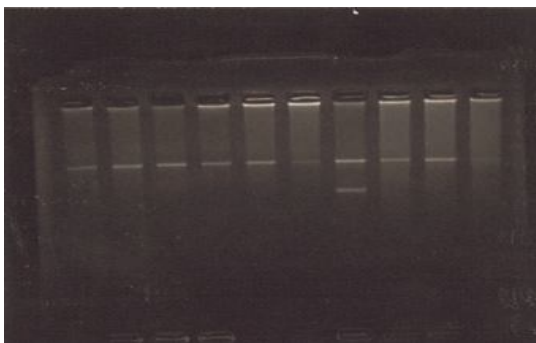


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР диагностики с мутацией - β^0 -IVS-2-1(Г-А). Положительный сигнал получен для одного образца под №4.

На рисунке 3 представлена электрофореграмма ПЦР диагностики с мутацией замена нуклеотида гуанин на нуклеотид аденин в 1-ой позиции второго - большого интрона β -глобинового гена с фенотипом β^0 -талассемии - β^0 -IVS-2-1(Г-А) .

Как видно из рисунка 2 из десяти образцов ДНК в одном случае (№4) идентифицирована мутация - замена нуклеотида гуанин на нуклеотид аденин в 1-ой позиции второго - большого интрона β -глобинового гена с фенотипом β^0 -талассемии.

Второй тип мутации, идентифицированный нами - замена нуклеотида гуанин на нуклеотид аденин в 110 позиции первого - малого интрона β -глобинового гена с фенотипом β^+ -талассемии - β^+ -IVS-1-110 (Г-А). Из десяти образцов ДНК в двух случаях (№2 и №6) идентифицирована мутация - замена нуклеотида гуанин на нуклеотид аденин в 110-ой позиции первого - малого интрона β -глобинового гена с фенотипом β^+ -талассемии. У трех обследованных (родители) не удалось выявить гетерозиготное носительство β -талассемии.

Таким образом, по данным проведенного генетического скрининга наследственных гемоглобинопатий в сыворотке крови новорожденных г. Баку установлено наличие патологических генов α - и β -талассемий и структурно-аномальных гемоглобинов S и D, что на прямую связано с дальнейшими нарушениями кроветворной системы, приводящими к анемии у детей. Идентифицированы типы мутаций β -талассемий. Полученные результаты позволяют врачам педиатрам своевременно проводить лечение больных детей до проявления клиники заболевания.

Результаты генетического скрининга наследственных нарушений обмена аминокислоты фенилаланин среди новорожденных. Мы в своих исследованиях для диагностики ФКУ среди новорожденных использовали пробу Фелинга и метод тонкослойной хроматографии. Для этого использовали мочу и капиллярную кровь новорожденного. Диагностику ФКУ на уровне мочи проводили пробой Фелинга, на уровне сыворотки крови методом тонкослойной хроматографии.

Скрининг ФКУ, проводимый нами среди 267 новорожденных позволил у двух обнаружить на пленке пятна зеленого цвета, что характерно для генного дефекта при ФКУ. Зеленый цвет появляется на месте контакта пробы Фелинга и мочи новорожденного. Для подтверждения диагноза был произведен забор венозной крови у этих новорожденных и проведена тонкослойная хроматография сывороточных аминокислот. В 2-х случаях по сравнению с контрольной группой наблюдали значительное увеличение уровня ФКУ.

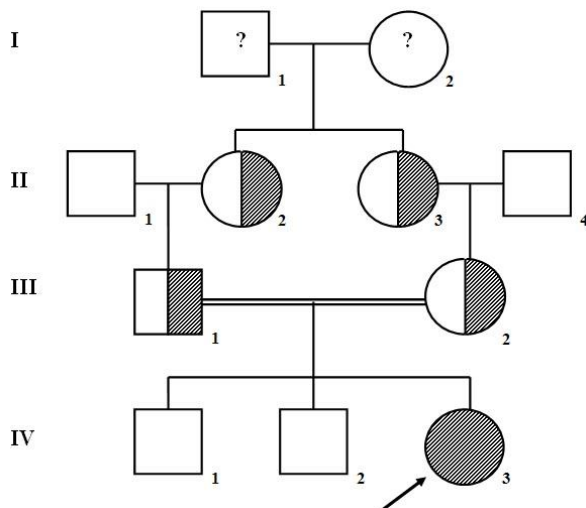


Рис.3. Родословная семьи новорожденного пробанда от матери М.А. с ФКУ.

Спектрофотометрическое определение уровней фенилаланина среди новорожденных с положительной реакцией на пробу Фелинга показало следующие распределения: новорожденный от матери М.А. - 0,18 г\л и новорожденный от матери Р.А. - 0,19 г\л. В обоих случаях родители новорожденных состояли в кровном родстве.

На рисунке 3 представлена родословная семьи пробанда М.А. в четырех поколениях. Пробанд М.А. (IV-3) новорожденная девочка родилась от кровнородственного брака между брачной парой - III-1 (отец) и III-2 (мать), которые являются двоюродными сибсами. Родители пробанда М.А. являются детьми родных сестер. Следовательно, пробанд М.А. родился от кровнородственного брака второй степени, параллельного типа. По всей вероятности патологический ген ФКУ родители пробанда М.А. унаследовали от матерей - гетерозигот патологического гена ФКУ.

Пробанд Р.А., новорожденный мальчик родился от кровнородственного - троюродного брака. Брак между двоюродным дядей и племянницей. У родителей пробанда Р.А. дедушки являются родными братьями. Отец отца пробанда является родным братом дедушки матери пробанда. Брак троюродный, тип параллельный. Следовательно, пробанд Р.А. ро-

дился от кровнородственного брака третьей степени, параллельного типа. По всей вероятности патологический ген ФКУ пробанд унаследовал от бабушки по отцовской (II-2) и прабабушки (II-3) по материнской линии.

Таким образом, анализ двух родословных с гомозиготной формой патологического гена ФКУ у новорожденных показал кровное родство между их родителями. Кровное родство второй и третьей степени параллельного типа. В одном случае троюродного родства брак был заключен между двоюродным дядей и племянницей. Следовательно, во всех случаях наблюдали эффект родоначальника.

Своевременная диагностика ФКУ и перевод новорожденного на специальную безфенилаланиновую диету позволит предотвратить развитие тяжелой психической инвалидности.

Диагностика Г6ФД дефицита у новорожденных. У 14 новорожденных был поставлен диагноз гемолитическая болезнь новорожденного. Из 14 новорожденных с данным диагнозом 9 были мальчиками, только 5 девочками. У всех 14 новорожденных наблюдали сильно выраженную желтуху с высокими значениями сывороточного билирубина, варьирующими в пределах - 3,9-10,5 мг\л и более, при норме 1,0 мг\л.

При определении активности фермента Г6ФД у 14-ти новорожденных у всех мальчиков (9 мальчиков) и у 5-ти девочек удалось диагностировать дефицит фермента Г6ФД. У всех 9 мальчиков идентифицировано гемизиготное состояние недостаточности фермента Г6ФД. Гемизиготное состояние недостаточности фермента Г6ФД приравнивается к гомозиготному состоянию недостаточности фермента Г6ФД у женщин. Только у одной новорожденной девочки было обнаружено гетерозиготное состояние фермента. Дополнительные исследования, проведенные у родителей новорожденных, учитывали генетику фермента Г6ФД. Гемизиготы-мальчики дефицитный ген недостаточности фермента Г6ФД наследовали только от гетерозигот матерей. Повторные исследования крови матерей у всех без исключения выявили гетерозиготное состояние. Уровень активности фермента варьировал в пределах 60-80% от нормальной активности фермента Г6ФД. Опрос матерей позволил установить тот факт, что родители были выходцами из эндемических регионов республики, где наблюдаются высокие генные частоты недостаточности фермента Г6ФД. Это Шеки, Саатлы, Агдаш, Огуз, Масаллы, Лерик, Астара, Ленкорань, Сабабад, Ширван и т.д.

Более детальное исследование активности фермента Г6ФД у 9-ти мальчиков с гемизиготным носительством, позволило нам идентифицировать два фенотипа: это Г6ФД (-) и Г6ФД (+). В первом случае - Г6ФД (-) у 2-ух мальчиков (22,22%) наблюдали полный дефицит фермента Г6ФД. Данный фенотип с полным отсутствием фермента называют Г6ФД «0»-фенотип.

Во втором случае у семи мальчиков (77,77%) наблюдали остаточную активность фермента с варьированием активности от 10 до 30% от общей нормальной активности фермента. Этот фенотип обозначают как Г6ФД «+»-фенотип.

У пяти новорожденных девочек с гетерозиготным дефицитом фермента наблюдали 60-80% активность от нормальной активности фермента.

Таким образом, при скрининге крови 267 новорожденных у 14-ти удалось выявить дефицит фермента Г6ФД (5,24%). Фенотипическая частота дефицита фермента среди новорожденных мальчиков - гемизигот составила -7,03%. Фенотипическая частота дефицита фермента выявлена на основании обследования 128 новорожденных мальчиков.

На основании обследования 139 новорожденных девочек фенотипическая частота дефицита фермента составила - 3,60%.

Полученные результаты помогут специалистам разработать пути их профилактики в виде пренатальной диагностики, а также вычислить объем медицинской помощи больным детям.

ВЫВОДЫ

1. Впервые нами разработан «Генетический паспорт новорожденного», включающий наиболее часто встречающиеся наследственные заболевания крови и метаболизма, ранее зарегистрированные среди населения Азербайджана.

2. Установлено статистически достоверное изменение значения тиреотропного гормона у 2,25% обследованных новорожденных.

3. Установлены фенотипические частоты патологических генов α - и β -талассемий и идентифицированы структурно-аномальные гемоглобины типа S и D, а также случаи метгемоглобинемий.

4. Идентифицировано два типа мутации гена β -талассемии у новорожденных: замена нуклеотида гуанин на нуклеотид аденин в 110 позиции

первого интрона (IVS-I-110, G- A), а также замена гуанина на аденин в позиции один второго интрона β -глобинового гена (IVS-II-1, G-A).

5. Выявлены и установлены генотипы фенилкетонурии у новорожденных и их родителей.

6. Установлена генетическая природа гемолитической болезни у новорожденных, связанная с дефицитом фермента Г6ФД.

7. Идентифицировано два фенотипа для гемизиготной формы дефицита фермента Г6ФД у мальчиков: Г6ФД «+» фенотип (77,8%) и Г6ФД «-» фенотип (22,2%).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Р.Ф.Мамедова, М.Ш.Бабаев. Неонатальный генетический скрининг наследственных заболеваний у новорожденных г. Баку / “Ekologiya: təbiət və cəmiyyət problemləri”, Akademik Həsən Əliyevin 100 illik yubileyinə həsr olunmuş Beynəlxalq elmi konfrans. Bakı-2007, с. 288.
2. Р.Ф.Мамедова. Генетический паспорт для новорожденных / “Biologiyanın müasir problemləri”. H.Ə.Əliyevin anadan olmasının 85-ci ildönümünə həsr olunmuş Respublika elmi konfransı. Bakı-2008, с.80-81.
3. Р.Ф.Мамедова, М.Ш.Бабаев. Неонатальный скрининг наследственных заболеваний // “Bakı Universitetinin xəbərləri”, Təbiət elmləri seriyası, №3, 2008, с.36-41.
4. Р.Ф.Мамедова. Диагностика наследственных заболеваний и врожденных пороков развития у новорожденных // Вестник Московского государственного областного университета, Серия “Естественные науки”, №4, 2010, с. 9-13.
5. Р.Ф.Мамедова. Исследование генетической гетерогенности гемоглобинопатий и молекулярных вариантов β -талассемии у новорожденных // Молекулярная Генетика микробиология и вирусология, Москва Издательство “Медицина”, 1, 2011, с. 11-14.
6. Р.Ф.Мамедова, М.Ш.Бабаев. Генетический скрининг фенилкетонурии среди новорожденных // “Bakı Universitetinin xəbərləri”, Təbiət elmləri seriyası, №1, 2011, с. 118-124.

7. Р.Ф. Мамедова. Моногенные хромосомные заболевания и врожденные пороки развития у новорожденных / Beynəlxalq Elmi Konfransının materialları (29-30 aprel), Bakı-2011, s. 112-113.
8. Р.Ф.Мамедова. Диагностика гипотиреоза у новорожденных // Azərbaycan Milli Elmlər Akademiyası Mikrobiologiya İnstitutunun Elmi əsərləri, Bakı- “Elm” -2014, cild 12, №1, s. 134-138.

**BAKİ ŞƏHƏRİNDƏ YENİDOĞULMUŞLARDA TİREOTROP HORMON
SƏVİYYƏSİNİN, Q6FD FERMENT ÇATIŞMAZLIĞININ VƏ
β-TALASSEMİYALARIN DAŞIYICILIĞININ GENETİK SKRİNİNGİ**

Xülasə

Yenidoğulan körpələrin genetik skirininginin əsas məqsədi ondan ibarətdir ki, anomaliyalar simptomatik olana qədər aşkar edilsin, belə ki, preventiv müalicəni aparmaq mümkün olsun, heç olmasa elə bir müalicə ki, doğrudan da bu müalicə xəstəliyin simptomlarının ağırlıq səviyyəsini aşağı salsın. Belə skrininq elə pozulmalar üçün aparılır ki, onlar müalicəyə tabe olur.

267 yenidoğulmuş arasında apardığımız genetik skrininqin nəticələri «Yenidoğulmuşun genetik pasportuna» salınmışdır. Bu pasport Azərbaycan əhalisi arasında əvvəllər ən çox qeydə alınmış qan və metabolizm irsi xəstəliklərini nəzərə alaraq tərtib edilmişdir.

Tədqiq olunmuş yenidoğulmuşların 2,25% TTH göstəricisinin dəyişikliyi müəyyən olunmuşdur. α- və β-talassemiyaların patoloji genlərin fenotipik tezlikləri müəyyən olunmuş, S- və D-tipli struktur-anomal hemoqlobinlər, həmçinin methemoqlobinemiya halları aşkar olunmuşdur. Beta-talassemiyanın iki müxtəlif mutasiyası identifikasiya edilmişdir: beta-hlobin geninin 1-ci intronunun 110-cu vəziyyətdə qanin nukleotidinin adenin nukleotidi ilə əvəz olunması - (IVS-I-110, G-A) və beta-hlobin geninin 2-ci intronunun 1-ci vəziyyətdə qanin nukleotidinin adenin nukleotidi ilə əvəz olunması - (IVS-II-1, G-A).

Yenidoğulmuşlarda və onların valideynlərində fenilketonuriya genin genotipləri aşkar olunmuşdur. Yenidoğulmuşlarda Q6FD fermentinin çatışmazlığı ilə bağlı hemolitik xəstəliyinin genetik təbiəti müəyyən olunmuşdur. Oğlan yenidoğulmuşlarda Q6FD fermentinin hemiziqot forması üçün 2 fenotip: Q6FD “+” və Q6FD “-” fenotipləri identifikasiya edilmişdir.

**THE GENETICAL SCREENING OF THIREOTROP HORMONE
LEVEL, G6FD ENZYME DEFICIENCY AND β -THALASSEMIA
AMONG NEWBORNS IN BAKU**

Summary

The main purpose of making screening tests among newborns is to define genetical disorders before they get symptomatic. In some cases a preventive treatment can be provided. In other cases newborns will get therapy reducing the severity of symptoms, which could possibly progress without the appropriate cure. This type of screening tests can be applied to the cases when the appropriate treatment will lead to the positive results.

The outcomes of the genetical screening tests used among 267 newborns have been registered in our first developed "Genetic passport of a newborn". It includes most often meeting hereditary diseases of blood and metabolism earlier registered among the population of Azerbaijan. It is established changed values of TTH at 2,25 % of the surveyed newborns. We established phenotypic frequencies of pathological genes of α - and β -thalassemias and identified structurally-abnormal haemoglobin types S and D, and cases with methahemoglobinaemia.

Two different beta-thalassemia mutations were identified: substitution of guanine by adenine in position 110 of intron 1 of beta-globin gene – (IVS-I-110, G-A) and substitution of guanine by adenine in position 1 if intron 2 of beta-globin gene (IVS-II-1, G-A).

Genotypes of a gene of phenylketonuria at newborns and their parents are revealed and identified. It is established the genetic nature of haemolytic disease at newborns connected with deficiency of enzyme G6FD. It is identified two phenotypes for hemizygous forms of enzyme G6FD deficiency at boys: G6FD "+" and G6FD "-".

Формат бумаги: 60x84, 1x16
Физически печатные страницы: 1,25
Тираж: 100 экз.

Афтореферат отпечатано в типографии
Азербайджанского Университета Кооперации.
Адрес: город Баку, улица Наджафа Нариманова 93.

**AZƏRBAYCAN MİLLİ ELMLƏR AKADEMİYASI
BOTANİKA İNSTİTUTU**

Əlyazması hüququnda

RƏNA FİRUDİN QIZI MƏMMƏDOVA

**BAKİ ŞƏHƏRİNDƏ YENİDOĞULMUŞLARDA TİREOTROP
HORMON SƏVİYYƏSİNİN, Q6FD FERMENT ÇATIŞMAZLIĞININ VƏ
VƏ β -TALASSEMİYALARIN DAŞIYICILIĞININ GENETİK SKRİNİNGİ**

2409.01 – Genetika

**Biologiya üzrə fəlsəfə doktoru elmi dərəcəsi
almaq üçün təqdim olunmuş dissertasiyanın**

AVTOREFERATI

Bakı - 2015