

AZƏRBAYCAN RESPUBLİKASI

Əlyazması hüququnda

YOĞUN BAĞIRSAĞIN BƏDXASSƏLİ ŞİŞLƏRİNDƏ XƏRÇƏNG HÜCEYRƏLƏRİNİN GENETİK VƏ EPİGENETİK TƏDQIQI

İxtisas : 2409.01- Genetika

Elm sahəsi: Tibb Elmləri

İddiaçı: **Bayram İlham oğlu Bayramov**

Fəsləfə doktoru elmi dərəcəsi almaq üçün
təqdim edilmiş dissertasiyasının

AVTOREFERATI

BAKI – 2024

Dissertasiya işi Azərbaycan Respublikası Elm və Təhsil Nazirliyi Genetik Ehtiyatlar İnstitutunun "Molekulyar genetikə və genomika" şöbəsinin "İnsan genetikası" laboratoriyasında, Azərbaycan Tibb Universiteti və M.A.Topçubaşov adına Elmi Cərrahiyyə Mərkəzində yerinə yetirilmişdir.

Elmi rəhbər:

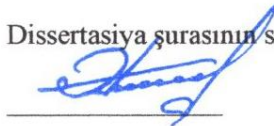
AMEA-nın müxbir üzvü,
tibb elmləri doktoru, professor
Nuru Yusif oğlu Bayramov

Rəsmi opponentlər:

REA-nın müxbir üzvü,
tibb elmləri doktoru, professor
Rəna Əbülfəz qızı Zinçenko
Prof. **Dr.Volkan Necati oğlu Baltacı**
Biologiya elmləri doktoru, professor
Tahirə Ələmşah qızı Əsgərova

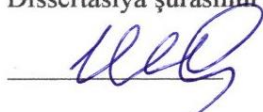
Azərbaycan Respublikasının Prezidenti yanında Ali Attestasiya Komissiyasının Azərbaycan Tibb Universiteti nəzdində fəaliyyət göstərən BFD 4.27 Birdəfəlik Dissertasiya şurası

Dissertasiya şurasının sədri:



AMEA-nın müxbir üzvü,
tibb elmləri doktoru, professor
Elmar Mustafa oğlu Qasimov

Dissertasiya şurasının elmi katibi:



Tibb üzrə fəlsəfə doktoru, dosent
Elnur Elman oğlu İbrahimov

Elmi seminarın sədri:



Biologiya elmləri doktoru, dosent
**Günay Hafiz qızı Əkbərova-
Ben-Tzvi**



GİRİŞ

Mövzunun aktuallığı və işlənmə dərəcəsi. Xərçəng xəstəlikləri çoxfaktorlu xəstəliklər qrupuna mənsub olub, onkogenlərin aktivləşməsi və tumor supressor genlərin inaktivləşməsi, hüceyrələrin nəzarətsiz çoxalması və hüceyrə daxilində mutasiyaların kumulyasiyası nəticəsində meydana gələn xəstəliklərdir. Eyni zamanda, genomda baş verən delesiyalar, amplifikasiyalar, xromosom aberrasiyaları, müxtəlif kimyəvi qrupların DNT-yə əlavə olunması və digər proseslər xərçəngyarana prosesini-karsinogenezi induksiya edə bilər. Tumor supressor genlər (*P53*, *Rb*, *CDH1*, *BRCA1/BRCA2*, *APC*, *CD95* və s.) hüceyrə çoxalmasını nəzarət altında saxlayan genlərdir və əsas funksiyaları xətalı hüceyrə tsiklinin blokadası, DNT-də baş verən xətalının reparasiyası, hüceyrələrin apoptoza yönləndirilməsi və genomun stabilliyinin təmini kimi hüceyrəvi prosesləri icra etməkdir. Onkogenlər (*NRAS*, *KRAS*, *abl*, *bcr-2*, *c-myc*, *erbB-2* və s.) protoonkogenlərdə baş verən nöqtəvi mutasiyalar, xromosom translokasiyaları və amplifikasiyaları nəticəsində meydana gələn genlərdir. Protoonkogenlərin onkogenlərə çevrilməsi nəticəsində hüceyrədə böyümə faktorlarının məhsullarının artması, hüceyrə bölünməsi üzərindəki nəzarətin itirilməsi, hüceyrənin fasiləsiz olaraq böyümə siqnalları alması, transkripsiya faktorlarının sintezinin artması və nəhayət, hüceyrələrin nəzarətsiz şəkildə fasiləsiz olaraq bölünməsi prosessləri baş verir. Molekulyar səviyyədə xərçəng hüceyrələrinin genom xüsusiyyətlərinin anlaşılması genom verilənləri əsasında fərdi müalicə üsullarının işlənilib hazırlanması və dərman dozalandırılması kimi məsələlərdə öz vacibliyini qoruyur.

Yoğun bağırsağ xərçəngi xərçənglə əlaqəli ölümlərin ikinci əsas səbəbi olub, heterogen xəstəliklər qrupuna daxildir. Aparılan tədqiqatlarla 2030-cu ilə qədər dünya üzrə yeni diaqnoz qoyulan xəstə sayının 2,2 milyon və ölüm hallarının isə 1,1 milyon olacağı təxmin edilir. Ümumi ölüm sayının 2035-ci ilə qədər rektal nahiyədə və yoğun bağırsağın digər şöbələrində müvafiq olaraq 60% və 71,5% artacağı proqnozlaşdırılır¹.

¹ Naidoo, M., Gibbs, P., Tie J. ctDNA and Adjuvant Therapy for Colorectal Cancer: Time to Re-Invent Our Treatment Paradigm // *Cancers* (Basel), - 2021 Jan 19. 13(2):346, - p. 1-22.

Fərdiləşdirilmiş tibbin inkişaf etdiyi dövrdə bəd xassəli şişlərin molekulyar profillərinin xarakterizə edilməsi çox vacibdir. Bu müalicənin optimal ardıcılığı və dərman rezistentliyi ilə bağlı məlumatların təmin edilməsinə, eləcə də müalicənin vaxtında tənzimlənməsinə imkanlar yaradır. Bununla birlikdə, şiş toxumasının biopsiya metodu ilə profilləndirilməsi törəmənin müəyyən bir nahiyəsindən məlumatlar təqdim edir ki, bu isə özlüyündə molekulyar dəyişikliklərin heterogenliyini tamamilə əks etdirə bilmir. Digər tərəfdən, toxuma biopsiyası xəstələr üçün potensial riskləri özündə cəmləşdirən invaziv prosedurdur. Odur ki, minimal invaziv, daha təhlükəsiz və real zamanda diaqnostik qiymətləndirmə imkanları təqdim edən metodların inkişafına ehtiyac duyulur. Metastaz aşkar edilən xəstələrin əksəriyyətinin periferik qanında şişə xas genetik və epigenetik dəyişikliklər aşkar edilə bilər ki, bu da məqsədli müalicələrin seçimi daxil olmaqla, şişlərin qeyri-invaziv molekulyar xarakteristikasına imkan yaradır.

Genom məlumatlarına əsaslanaraq fərdi müalicə protokollarının təkmilləşdirilməsi, eləcə də dərman preparatlarının dozalandırılması və həmçinin, yeni diaqnostik və prediktiv molekulyar biomarkerlərin müəyyənləşdirilməsi mühüm əhəmiyyət kəsb edir.

Tədqiqatın obyektı və predmeti. Tədqiqat işinin obyektı, Azərbaycan Tibb Universiteti və M.A.Topçubaşov adına Elmi Cərrahiyyə Mərkəzinə müraciət edən, laborator-instrumental və klinik müayinələrlə yoğun bağırsağ xərçəngi diaqnozu təsdiqlənmiş xəstələrdir. Tədqiqatın predmeti yoğun bağırsağın xərçəng hüceyrələrində tumor suppressor və onkogenlərdəki mutasiya və polimorfizmlərin, DNT metilləşməsinin müəyyənləşdirilməsidir.

Tədqiqatın məqsəd və vəzifələri. Tədqiqat işində məqsəd yoğun bağırsağ xərçəngi diaqnozu qoyulan xəstələrdə tumor suppressor və onkogenlərdəki genetik və epigenetik dəyişiklikləri müqayisəli tədqiq edərək, aşkar edilən dəyişikliklərlə kliniki və demoqrafik parametrlər arasındakı assosiasiyaları tədqiq etməkdir.

Tədqiqat işinin məqsədinə nail olmaq üçün qarşıya aşağıdakı vəzifələr qoyulmuşdur:

- Anamnezin toplanılması, biomaterialların götürülməsi, DNT ekstraksiyası, kliniki və demoqrafik göstəricilərin sistemləşdirilməsi;

- Sanger sekvensləmə üsulu ilə bədxassəli törəmədən əldə edilən DNT-də və qan plazmasından alınan cfDNT-də *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* və *PIK3CA* genlərindəki nöqtəvi mutasiyaların aşkar edilməsi;
- Xəstələrdə və nəzarət qrupunda *hMLH1*, *hMSH2*, *miRNT-149*, *miRNT-196a2*, *DNMT3B*, *8q24*, *NQO1* və *P53* genlərindəki Tək Nukleotid Polimorfizmlərinin (TNP-lər) PZR-RFLP üsulu ilə təyini, genotiplərin və riskli gen allellərinin tezliyinin müqayisəli təhlili;
- Yaş, cins, alkoqol və siqaretdən istifadə faktorları və eləcə də xərçəngin mərhələ və dərəcəsi kimi klinik parametrlərdə genotiplərin paylanması, müqayisəli təhlili və xəstəlik riskinin təyin edilməsi;
- MS-PZR üsulu ilə *DAPK* və *RAR-β2* genlərinin promotor metilləşməsinin müqayisəli tədqiqi, metilləşmə həssaslığının və spesifikliyinin təyini

Tədqiqat metodları. Tədqiqat obyektlərindən EDTA-lı tyublarda qan nümunələri götürülmüş, qan plazmasından cfDNT ekstraksiyası kit protokolu (QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, Qiagen Hilden, Almaniya) əsasında, venoz qandan DNT ekstraksiyası isə manual üsulla (salting-out) həyata keçirilmişdir. Əldə edilən DNT nümunələrinin kəmiyyət və keyfiyyət göstəriciləri Nanodrop cihazında (NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers, Thermo Scientific) təyin edilmişdir. Hər bir genin hədəflənən nahiyyələrinə spesifik praymerlər vasitəsilə PZR reaksiyaları qoyulmuş və mutasiyalar Sanger sekvensləmə (*3730xl* DNA Analyzer, Thermo Fisher) üsulu ilə müəyyən edilmişdir. Hər bir gen polimorfizmi üçün spesifik olan restriksiya fermentlərindən (New England Biolabs (NEB), MA, ABŞ) istifadə edilmiş, PZR-RFLP metodlarından istifadə olunmaqla polimorfizmlər təyin edilmiş, allel və genotip tezlikləri müəyyənləşdirilmişdir. MSP üsulu ilə isə genlərin promotor nahiyyəsində yerləşən CpG adacıqlarındakı metilləşmə vəziyyəti analiz edilmişdir. Nəticələrin biostatik təhlili *SPSS v.22* proqramı (*SPSS/22*, Çikago, İllinoys, ABŞ) vasitəsilə həyata keçirilmişdir.

Müdafiyyə çıxarılan əsas müddəalar:

- Yoğun bağırsağ xərçəngində cfDNT-nin *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* və *PIK3CA* genləri üzrə analizi, xərçəng genomunun qeyri-invaziv üsulla təyini və dərman rezistentliyinin müəyyənləşdirilməsinə imkan verir;

- 8q24.21 xromosom nahiyəsində yerləşən uzun kodlaşdırmayan RNT növünün T>C (rs10505477) polimorfizmi yoğun bağırsaq xərçəngi üçün risk təşkil etmir;
- Qadınlar arasında *mir-149* T>C (rs2292832) və *mir-196a2* C>T (rs11614913) gen polimorfizmləri yoğun bağırsaq xərçəngi riskinin artması ilə əlaqələndirilir;
- *P53* geni c.215G>C (rs1042522) polimorfizminin genotip və allel tezlikləri ilə xəstəlik riski arasında əlaqə müəyyən olunmur;
- Yoğun bağırsaq xərçəngində *NQO1* genindəki C609T polimorfizminin heteroziqot CT genotipi və mutant T alleli xəstəlik riskinin artmasına səbəb olur;
- DNT reparasiyası genlərindən *hMSH2* 1032G>A (rs4987188) ilə xəstəlik riski arasında statistik əlaqə qeyd edilmir, lakin *hMLH1* -93G>A (rs1800734) polimorfizminin xərçəngin mərhələləri ilə assosiasiyası qeyd olunur;
- *DNMT3B* -579G>T (rs1569686) polimorfizmi ilə yoğun bağırsaq xərçənginin inkişaf riski arasında assosiasiyalar aşkar olunur;
- *DAPK* və *RAR-β2* genlərinin promotor metilləşməsi xərçəng xəstələrində nəzarət qrupu ilə müqayisədə yüksək həssaslıq və spesifiklik göstərir.

Tədqiqatın elmi yeniliyi. İlk dəfə olaraq, yoğun bağırsaq xərçəngi diaqnozu qoyulan xəstələrin cfDNT və xərçəng toxumalarında *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* və *PIK3CA* gen paneli üzrə onkogen və tumor supressor genlərində müxtəlif missens tipli mutasiyalar müqayisəli analiz edilmiş və maye biopsiyası üsulu optimallaşdırılmışdır.

İlk dəfə olaraq, kiçik kodlaşdırmayan RNT çeşidlərindən *mir-149* T>C (rs2292832) və *mir-196a2* C>T (rs11614913) genlərinin müvafiq polimorfizmləri tədqiq edilmiş, genotip və allel tezlikləri hesablanaraq klinik və demoqrafik göstəricilər arasındakı assosiasiya müqayisə olunaraq risklər təyin edilmişdir. Xəstə qadınlarda *mir-149* (rs2292832) TC genotipi ilə xəstəlik riski arasında protektiv tipli statistik əlaqə aşkar edilmişdir. Eyni zamanda, qadınlarda *mir-196a2* C>T (rs11614913) polimorfizminin, xüsusilə, CT genotipinin yoğun bağırsaq xərçəngi riskini artırdığı müəyyən edilmişdir.

İlk dəfə olaraq, hüceyrə tsiklinin əsas tənzimləyicilərindən biri olan və tumor supressor gen kimi fəaliyyət göstərən *P53* geninin c.215G>C

dəyişikliyi xəstələrdə və nəzarət qrupunda müqayisəli tədqiq edilmiş, riskli allel və genotip tezlikləri müəyyənləşdirilmişdir. Sağlam insanlarla müqayisədə, xəstələrdə homoziqot mutant CC genotipinə daha çox rast gəlinmişdir. Azərbaycan populyasiyasında *P53* geninin c.215G>C polimorfizmi yoğun bağırsaq xərçəngi aşkarlanan xəstələrdə daha çox rast gəlinməyə də, bu, xəstəlik üçün risk təşkil etməmişdir.

İlk dəfə olaraq, DNT metilləşməsi prosesini həyata keçirən *DNMT3B* geninin promotorundakı -579G>T polimorfizminə görə tədqiqat qrupları genotipləşdirilmiş, heteroziqot GT genotipi və mutant T alleli ilə yoğun bağırsaq xərçəngi riski arasında əhəmiyyətli statistik assosiasiya aşkar edilmişdir. Həmçinin, tədqiqata daxil edilən kişilər arasında və yaşı 61-dən az olan insanlarda heteroziqot GT genotipi ilə yoğun bağırsaq xərçənginin aşağı riski arasında əhəmiyyətli statistik əlaqə aşkar edilmişdir.

İlk dəfə olaraq, DNT reparasiya genlərindən *hMLH1* -93G>A (rs1800734) və *hMSH2* 1032G>A (rs4987188) genləri üzrə 134 xəstə və 137 nəfərdən ibarət nəzarət qrupunda genotipləşmə aparılmış, *hMSH2* 1032G>A gen polimorfizmi ilə yoğun bağırsaq xərçəngi riski arasında əhəmiyyətli statistik əlaqə müşahidə olunmadığı halda, *hMLH1* -93G>A genetik dəyişikliyinə resessiv modeli ilə (GG+GA/AA) aşağı xərçəng riski arasında assosiasiya aşkar edilmişdir. Eyni zamanda, *hMLH1* -93G>A polimorfizmi ilə bədxassəli şişin mərhələləri arasında əhəmiyyətli statistik korrelyasiya tapılmışdır.

İlk dəfə olaraq, 8q24.21 xromosom bölgəsindəki uzun kodlaşdırmayan RNT növünün T>C (rs10505477) polimorfizmi tədqiq edilmiş allel və genotip tezlikləri müqayisəli şəkildə hesablanmışdır. Tədqiq edilən gen polimorfizmi ilə tədqiqat obyektlərinin yaşı, cinsi, xərçəngin mərhələ və dərəcəsi, siqaret və alkoqol istifadəsi arasında assosiasiya aşkar edilməmişdir. Beləliklə, populyasiyamızda 8q24.21 xromosom nahiyəsindəki rs10505477 polimorfizminin yoğun bağırsaq xərçəngi üçün risk daşımadığı müəyyənləşdirilmişdir.

İlk dəfə olaraq, *NQOI* genində prolinin serinə çevrilməsi ilə nəticələnən C609T (rs1800566) polimorfizmi xəstə və nəzarət qrupunda müqayisəli analiz edilmiş, heteroziqot CT, dominant model (CC/CT+TT) və mutasiya T allelinin yoğun bağırsaq xərçəngi üçün statistik əhəmiyyətli yüksək risk daşdığı aşkar edilmişdir. Həmçinin, xəstə kişiləri sağlam

kişilərlə qarşılaşdırdıqda, heteroziqot CT genotipi ilə xəstəlik riski arasında statistik əhəmiyyətli əlaqə aşkar edilmişdir.

İlk dəfə olaraq, qan plazmasından izolə edilən xərçəng hüceyrələrinə aid cfDNT-də, xərçəng toxumasında və nəzarət qrupunda *DAPK* və *RAR-β2* genlərinin promotor metilləşməsi müqayisəli analiz edilmişdir. Sağlam insanlarla müqayisədə, xəstələrin həm cfDNT, həm də toxuma DNT-sində *DAPK* geninin promotor metilləşməsi daha çox rast gəlinməklə yüksək spesiflik və həssaslıq nümayiş etdirmişdir.

İşin elmi-praktik əhəmiyyəti: Dissertasiya işində yoğun bağırsağ xərçəngi diaqnozu qoyulan xəstələrdə maye biopsiyası metodunun tətbiqi, xüsusilə, metastatik bədxassəli şişlərin klinik monitorinqi, proqnozlaşdırılması, diaqnozu, tətbiq edilən terapevtiklərə verilən cavabın izlənilməsi və yeni qeyri-invaziv potensial genetik biomarkerlərin aşkar edilməsi zamanı istifadə oluna bilər.

CfDNT-də müxtəlif tumor suppressor və onkogen mutasiyalarının tədqiqi kimyaterapiya zamanı istifadə edilən dərman preparatlarına verilən cavabı öncədən təxmin etməyə imkan verir. Bu baxımdan metastatik yoğun bağırsağ xərçəngi zamanı cfDNT və xərçəng toxumasında *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* və *PIK3CA* gen mutasiyalarının tədqiqi, anti-EGFR terapiyasına (*Cetuximab* və *Panitumumab*) verilən optimal cavabın öncədən qiymətləndirilməsi, əldə edilən genom məlumatları əsasında fərdi müalicə üsullarının təkmilləşdirilməsi və hər bir fərdin şəxsi genom məlumatları əsasında dərman dozasının təyin edilməsi, dərman rezistentliyinin genetik mexanizmlərinin müəyyənləşdirilməsi kimi məsələlərdə müalicənin səmərəliliyini artıracaqdır.

Dissertasiya işində tədqiq edilən, xüsusilə, klinik və demoqrafik parametrlərlə statistik əlaqəsi aşkar edilən və xəstəlik riski ilə əlaqələndirilən gen polimorfizmlərindən yoğun bağırsağ xərçənginin inkişaf riskinin əvvəlcədən proqnozlaşdırılmasında qeyri-invaziv genetik biomarkerlər kimi istifadə edilə bilər. Bundan əlavə, xəstələrdə erkən mərhələdə genetik polimorfizmlərin analiz edilib aşkar olunması düzgün kimyaterapevtik preparatların və xəstələr üçün uyğun dozanın seçilməsində faydalı ola bilər ki, bu da müalicə üsullarının tətbiqində yeni imkanlar açacaqdır.

Gen polimorfizmlərinə görə aparılan genetik skrining gələcəkdə yarana biləcək yoğun bağıraq xərçəngində fərdə uyğun müalicə

planlaşdırılmasını da mümkün etməklə yanaşı, sağlam şəxslərin xərcəng xəstəliyinə tutulma riskini öncədən müəyyənləşdirməyə imkan verəcəkdir ki, bu da xəstəliyə meyilli şəxslərin mütəmadi müayinələrə cəlb olunmasına və xəstəliyin qarşısının alınmasına xidmət edəcəkdir.

Maye biopsiyası ilə əldə edilən cfDNT-də metilləşmə profillərinin sistemli təhlili şişə xas epigenetik modifikasiyaların daha erkən aşkarlanması, müalicəyə cavabların monitorinqi və residivvermənin skriningi üçün məqsədəuyğun hesab oluna bilər.

İşin aprobasiyası: Dissertasiya işinin əsas nəticələri Xəzər Universitetinin təşkilatçılığı ilə “Tək Sağlamlıq: problemlər və onların həlli” mövzusunda keçirilən I beynəlxalq konfransında (2018), Akademik Cəlal Əlirza oğlu Əliyevin 90 illik yubileyinə həsr olunmuş “Müasir Biologiya və Aqrar Elmlərdə İnnovasiyalar və Qlobal Çağırışlar” mövzusunda Gənc Alim və Tələbələrin Konfransında (2018), Avrasiya Cərrah və Qastroenteroloqlarının XVIII Beynəlxalq Konqresində (2019), “İnsan Genetikası və Genetik Xəstəliklər: Problemlər və İnkişaf Perspektivləri” Birinci Beynəlxalq Elmi-Praktik Virtual Konfransında (2020), “Sağlamlıq Elmləri və İnnovasiyalar” mövzusunda IV Beynəlxalq Konfransında (2021), XVIII Türk Kolon və Rektal Cərrahiyyə Konqresində (Türkiyə, 2021), “Cərrahiyyə: dünən, bugünü və sabahı” mövzusunda Qazaxıstan Cərrahlarının Beynəlxalq VII Konqresində (Qazaxıstan, 2021) və həmçinin, Genetik Ehtiyatlar İnstitutunun elmi seminarlarında müzakirə edilmişdir.

Dərc edilmiş nəşrlər. Dissertasiya işinin nəticələrinə dair 9 məqalə və 8 tezis olmaqla ümumilikdə 17 elmi əsər nəşr olunmuşdur.

Dissertasiya işinin yerinə yetirildiyi təşkilatın adı. Dissertasiya işi Azərbaycan Respublikası Elm və Təhsil Nazirliyi Genetik Ehtiyatlar İnstitutunun “Molekulyar genetikə və genomika” şöbəsinin “İnsan genetikası” laboratoriyasında, Azərbaycan Tibb Universiteti və M.A.Topçubaşov adına Elmi Cərrahiyyə Mərkəzində yerinə yetirilmişdir.

Dissertasiyanın struktur bölmələrinin ayrılıqda həcmi qeyd olunmaqla dissertasiyanın işarə ilə ümumi həcmi. Dissertasiya işi giriş, beş fəsil, yekun, nəticələr, tövsiyələr, 341 ədəbiyyat (338-i xarici) və ixtisarlar siyahısından ibarət olmaqla ümumilikdə 168 səhifədə təqdim edilmişdir. Dissertasiya işində 16 şəkil və 51 cədvəl vardır.

Dissertasiyada ümumi işarələrin sayı 172055-dir, bunlardan: titul vərəqi və mündəricat – 6962 işarə, giriş – 19719 işarə, I fəsil – 51337 işarə, II fəsil – 11644 işarə, III fəsil – 11270 işarə, IV fəsil – 50576 işarə, V fəsil 8124 işarə, yekun – 7040 işarə, nəticələr – 3741 işarə, praktik tövsiyələr – 909 işarə, ixtisarlara siyahısı – 733.

İŞİN ƏSAS MƏZMUNU

I FƏSİL. ƏDƏBİYYAT İCMALI

Ədəbiyyat icmalında dissertasiya işi ilə əlaqəli elmi əsərlər təhlil edilmiş, yoğun bağırsağ xərçənginin epidemiologiyası, risk faktorları, xəstəliyin molekular-genetik patogenezi, xəstəliyin yaranması və inkişafında epigenetik modifikasiyaların rolu və xəstəliyin diaqnostikasında istifadə edilən ənənəvi və müasir diaqnostika üsulları təhlil edilərək ən son yerli və xarici elmi əsərlərə istinadlar verilmişdir.

II FƏSİL. TƏDQIQAT İŞİNİN MATERIAL VƏ METODLARI

2.1. Tədqiqatın materialları

Azərbaycan Tibb Universitetinin Tədris Cərrahiyyə Klinikası və M. Topçubaşov adına Elmi Cərrahiyyə Mərkəzinə müraciət edən və yoğun bağırsağ xərçəngi diaqnozu təstiqlənmiş xəstələrdən xərçəng toxumasına məxsus 36 biopsiya materialı, EDTA-lı tyublarda ümumilikdə 153 venoz qan nümunələri alınmış və onlardan tədqiqat materialı kimi istifadə edilmişdir. Müqayisəli genetik analizlərin aparılması üçün xəstəlik tarixçəsində xərçəng xəstəliyi aşkar edilməyən 164 nəfər isə nəzarət qrupu kimi tədqiqata cəlb edilmiş, onlardan da periferik qan nümunələri toplanılmışdır.

2.2. Tədqiqatın metodları

Tədqiqat işində qan və xərçəng toxumasından DNT-nin ekstraksiyası, DNT-nin kəmiyyət və keyfiyyətinin spektrofotometrik üsulla ölçülməsi, Polimeraza Zəncirvari Reaksiyası (PZR), Sanger sekvensləmə, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), Metilləşməyə Spesifik PZR (MSP) aqaroz gel elektroforezi və alınmış nəticələrin statistik analizi metodlarından istifadə olunmuşdur.

Yoğun bağırsağ xərçəngi diaqnozu qoyulan xəstələrdən biopsiya vasitəsilə əldə olunan toxuma nümunələrindən DNT-nin izlə edilməsi Polşanın EURx firmasının təqdim etdiyi kit protokolu² (EURx Ltd, Gdansk, Poland) əsasında həyata keçirilmişdir.

Həmçinin, qan plazmasından cfDNT ekstraksiyası kit protokolu³ (QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, Qiagen Hilden, Almaniya) əsasında, venoz qandan DNT ekstraksiyası isə manual üsulla (*salting-out*)⁴ həyata keçirilmişdir. DNT-nin kəmiyyət və keyfiyyəti spektrofotometrik üsulla Nanodrop 2000/2000c (NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers, Thermo Scientific) cihazı vasitəsilə təyin edilmişdir.

Hər bir genə spesifik praymerlərdən istifadə olunmaqla PZR reaksiyaları optimallaşdırılmışdır. Aqaroz gel elektroforezi ilə nəticələr qiymətləndirildikdən sonra amplifikasiya olunmuş DNT fraqmentlərindəki genetik dəyişikliklər ABI 3730xL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) cihazında analiz olunmaqla mutasiyalar identifikasiya edilmişdir.

Tədqiqat işində TNP-lər RFLP metodu ilə təyin edilmişdir. Bu məqsədlə NEB (New England Biolabs, Massachusetts, USA) firmasının təqdim etdiyi hər bir genə spesifik restriktaza fermentlərindən istifadə edilmişdir. Sonra isə polimorfizmlər 2%-li aqaroz gəldə elektroforez edilməklə təyin edilmişdir.

MSP metodu vasitəsilə DNT-də CpG adacıqlarının metilləşmə vəziyyəti analiz edilmişdir. Nəticələr aqaroz gel elektroforezi vasitəsilə təhlil edilmişdir.

Alınmış nəticələrin statistik analizi statistik paket SPSS 22.0 versiyası ilə analiz edilmişdir. Parametrlər arasındakı assosiasiya

² Universal kit for DNA isolation with GeDI reagent: [Electronic resource] / EURx Molecular biology products. 2019. URL: <https://eurx.com.pl/docs/manuals/en/e3765.pdf>

³ QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit: [Electronic resource] / Qiagen, DNA & RNA Purification. 2019. URL: [HB-0202-006_HB_QA_CirculatingNucAcid_0819_WW%20\(1\).pdf](https://www.qiagen.com/~/media/Files/Application/CLIA/CLIA_CirculatingNucAcid_0819_WW%20(1).pdf)

⁴ Suguna, S. Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non enzymatic salting out method / D. H. Nandal, S.Kamble, A. Bharatha [et al.] // Int J pharm pharm sci, - 2014. Vol 6(6), -p.198-9

Fisher's exact və *Pearsonun chi-square* testləri vasitəsilə qiymətləndirilmişdir. $P < 0,05$ statistik olaraq etibarlı qəbul edilmişdir.

III FƏSİL. XƏRÇƏNG XƏSTƏLƏRDƏ ONKOGEN VƏ TUMOR SUPRESSOR GEN MUTASIYALARININ TƏDQIQI

3.1. Xərçəng toxuması və cfdNT-də KRAS və NRAS genlərinin sekvensi və mutasiyaların identifikasiyası

Maye biopsiyası metodu vasitəsilə qanda dövr edən şiş hüceyrələrinin (CTC) və şişə aid sərbəst DNT fraqmentlərinin genetik profilinin analizini və xərçəng xəstəliklərinin qeyri-invaziv üsulla monitorinqini həyata keçirmək mümkün olmuşdur⁵.

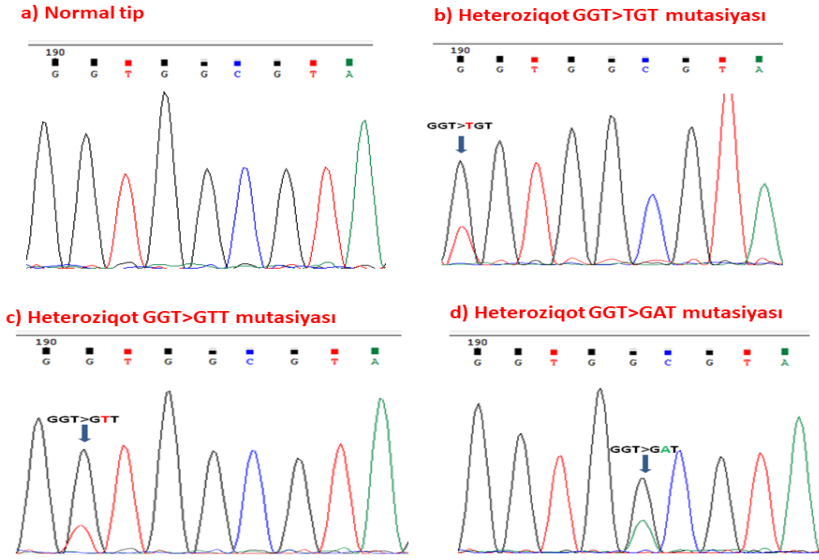
Bədxassəli şişin aşkar olunduğu 30 xəstədə xərçəng toxumasından əldə edilən DNT və plazmadakı cfdNT fraqmentlərində *KRAS* və *NRAS* genləri müqayisəli analiz edilmişdir.

KRAS geni üzrə, ümumilikdə, 14 missens tipli nöqtəvi mutasiya aşkar edilmişdir. Xərçəng toxumasından əldə olunan DNT nümunələrində 10 (33,3%), plazma cfdNT nümunələrində isə 4 (7,7%) mutasiya aşkar edilmişdir. Toxuma nümunələrindəki mutasiyaların 6-sı *KRAS* geninin 2-ci ekzonunun 12-ci kodonunda, 4-ü isə 13-cü kodonda baş vermişdir. Bununla yanaşı, cfdNT-dəki mutasiyaların 2-si *KRAS* geninin 2-ci ekzonunun 12-ci kodonunda, 2-si isə 13-cü kodonda aşkar edilmişdir. *KRAS* geninin 12-ci (GGT) və 13-cü kodonları (GGC) qlisin amin turşusunu kodlayır. Tapılan mutasiyaların 6-sı qlisinin (Gly) aspartik amin turşusuna (Asp), 4-ü valinə (Val), 3-ü serinə (Ser) və 1-i isə sistinə (Cys) çevrilməsi ilə nəticələnir. Şəkil 3.1.1-də sekvens analizi nəticəsində müəyyən edilmiş nəticələrin elektroferoqramları göstərilmişdir.

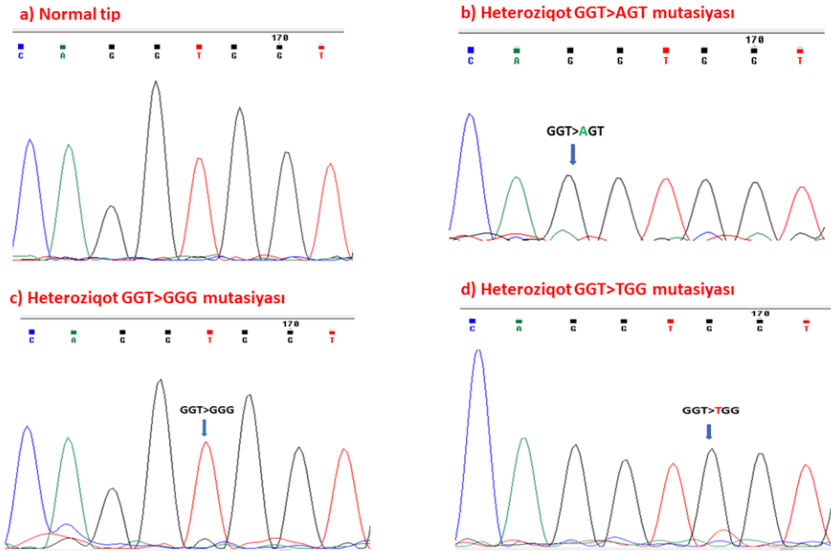
NRAS geninin 2-ci ekzonunda ümumilikdə 7 (23,3%) missens tipli mutasiya aşkar edilmişdir. Mutasiyaların altısı (20%) toxuma DNT-də, 1 (3,3%) mutasiya isə cfdNT-də aşkar olunduğu halda, 23 xəstədə *NRAS* gen mutasiyasına rast gəlinməmişdir. Toxuma DNT-də rast gəlinən 6

⁵ Normanno N, Cervantes A, Ciardiello F, De Luca A, Pinto C. The liquid biopsy in the management of colorectal cancer patients: Current applications and future scenarios. *Cancer Treat Rev.* 2018 Nov;70:1-8

mutasiyadan 1-i *NRAS* geninin 2-ci ekzonunun 12-ci kodonunda, digər 5 mutasiya və həmçinin, cfDNT-də aşkarlanan 1 mutasiya 13-cü kodonda baş vermişdir.



Şəkil 3.1.1. *KRAS* geninin 2-ci ekzonunun Sanger sekvens elektroferoqramı



Şəkil 3.1.2. *NRAS* geninin 2-ci ekzonunun Sanger sekvens elektroferoqramı

3.2. Xərçəng toxuması və cfDNT-də *BRAF* geninin 15-ci ekzonunun sekvensi və mutasiyaların identifikasiyası

BRAF geninin 15-ci ekzonunun analizi nəticəsində 16 (53,3%) mutasiya müəyyən edilmişdir. Belə ki, xərçəng toxuma DNT-sində 12 (40%), cfDNT nümunələrində isə 4 (13,3%) mutasiya təyin edilmişdir (Cədvəl 3.1.1). Toxuma nümunələrində aşkarlanan mutasiyaların 3-ü V600E (c.1799T>A), 9-u isə L597Q (c.1790T>A) missens tipli, cfDNT nümunələrində tapılan mutasiyaların 3-ü V600E (c.1799T>A), 1-i isə L597Q (c.1790T>A) missens tipli olmuşdur.

Cədvəl 3.2.1

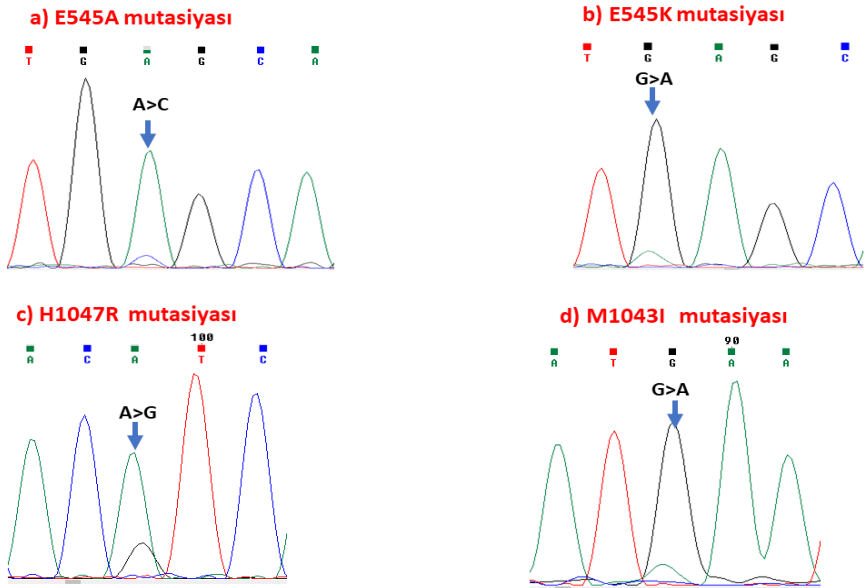
BRAF genində aşkar edilən mutasiyalar

Toxuma	Ekzon	Mutasiya	Amin turşu dəyişməsi
1.	15	V600E (c.1799T>A)	Val→Glu
2.	15	V600E (c.1799T>A)	Val→Glu
3.	15	V600E (c.1799T>A)	Val→Glu
4.	15	L597Q (c.1790T>A)	Leu→Gln
5.	15	L597Q (c.1790T>A)	Leu→Gln
6.	15	L597Q (c.1790T>A)	Leu→Gln
7.	15	L597Q (c.1790T>A)	Leu→Gln
8.	15	L597Q (c.1790T>A)	Leu→Gln
9.	15	L597Q (c.1790T>A)	Leu→Gln
10.	15	L597Q (c.1790T>A)	Leu→Gln
11.	15	L597Q (c.1790T>A)	Leu→Gln
12.	15	L597Q (c.1790T>A)	Leu→Gln
Plazma	Ekzon	Mutasiya	Amin turşu dəyişməsi
13.	15	V600E (c.1799T>A)	Val→Glu
14.	15	V600E (c.1799T>A)	Val→Glu
15.	15	V600E (c.1799T>A)	Val→Glu
16.	15	L597Q (c.1790T>A)	Leu→Gln

3.3. Xərçəng toxumasında *PIK3CA* geninin 9-cu və 20-ci ekzonlarının sekvensi və mutasiyaların identifikasiyası

Tədqiqat işində *PIK3CA* geninin 9-cu ekzonunun sekvenslənməsi

nəticəsində 14 (46,7%) xəstədə mutasiya aşkar edildiyi halda, 16 (53,3%) xəstədə mutasiyaya rast gəlinməmişdir. Təyin edilən E545A (c.1634A>C), E545K (c.1633G>A), R555K (c.1664G>A) və E542K (c.1624G>A) mutasiyaları missens tipli mutasiyalardır və hər biri aminturşu əvəzlənməsinə səbəb olmuşdur. *PIK3CA* geninin 20-ci ekzonunun analizi nəticəsində 30 xəstədə 3 (10%) mutasiya aşkarlanmışdır. M1043I (c.3129G>A) və H1047R (c.3140A>G) mutasiyaları da missens tipli olub, aminturşu əvəzlənməsinə səbəb olmuşdur.



Şəkil 3.3.1. *PIK3CA* geni üzrə aşkar edilən mutasiyaların elektroferoqramları

Sekvensləmə texnologiyalarının imkanlarından istifadə etməklə yoğun bağırsaq xərçəngi diaqnozu qoyulan xəstələrdə maye biopsiyası metodikasını tətbiq edərək *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* genlərinin və xəstəliklə əlaqəli digər onkogen və tumor supressor genlərin tədqiqi, xüsusilə, metastaz aşkar edilmiş xəstələrdə düzgün müalicə seçimi və optimal nəticələrin alınmasına yardımcı ola bilər. Maye biopsiyasının praktik təbabətdə tətbiq edilməsi və daha da dərinlən araşdırılması xəstəliyin erkən diaqnozu, monitorinqi, müalicə seçimi, vaxta qənaət və yeni diaqnostik biomarkerlərin aşkar edilməsi baxımından əhəmiyyət

kəsb edir.

IV FƏSİL. YOĞUN BAĞIRSAQ XƏRÇƏNGİNİN TƏK NUKLEOTİD POLİMORFİZMİ ƏSASINDA TƏDQIQI

4.1. Yoğun Bağırsağ Xərçəngində *mir-149* T>C rs2292832 və *mir-196a2* C>T rs11614913 Polimorfizminin Tədqiqi

Tədqiqat işində, ilk dəfə olaraq, 120 xəstədə və 125 nəfərdən ibarət sağlam nəzarət qrupunda *mir-149* T>C (rs2292832) və *mir-196a2* C>T (rs11614913) polimorfizmləri müqayisəli tədqiq edilmiş, genotip və allel tezlikləri hesablanmış, xəstələrin kliniki və patoloji parametrləri, eləcə də demoqrafik göstəriciləri ilə statistik əlaqə tədqiq edilmişdir. Xəstə və nəzarət qruplarında müvafiq olaraq *mir-149* geninin normal TT genotipinin 44,2% və 39,2%, heteroziqot TC-nin 32,5% və 44%, homoziqot mutant CC genotipinin isə 23,3% və 16,8% təşkil etdiyi aşkar edilmişdir. Heteroziqot TC (OR=0,66; 95%CI=0,37-1,15; P=0,142) və mutant CC (OR=1,23; 95%CI=0,62-2,45; P=0,550) genotipləri ilə xəstəlik riski arasında korrelyasiya müəyyən edilməmişdir.

Mir-149 T>C polimorfizmi üzrə kişilərdə heteroziqot TC nəzarət qrupunda yüksək (38,2%), homoziqot CC isə xəstə qrupunda yüksək tezliklə rast gəlinmişdir. Xəstə və sağlam kişilərdə genotiplər müqayisə edildikdə statistik korrelyasiya müşahidə edilməmişdir (P>0,05). Xəstə qadınları sağlam qadınlarla müqayisəsi zamanı isə heteroziqot TC genotipinin xəstəlik riski ilə assosiasiyası aşkar olunmuşdur (OR=0,43; 95%CI=0,19-1,01; P=0,048). Yaşı 60-dan az və çox olan xəstələrdə sağlam insanlara nəzərən mutant CC genotipi üstünlük təşkil etmiş (45,8% və 43,1%), lakin orta yaş nəzərə alındıqda, qrupların müqayisəsi zamanı genotiplərlə xəstəlik riski arasında statistik fərq müəyyən olunmamışdır.

Mir-196a2 C>T polimorfizmi üzrə təhlil aparıldıqda kişi xəstələrdə mutant TT genotipi (23,5%) sağlam kişilərə nəzərən üstünlük təşkil etsə də, bu statistik əhəmiyyətli olmamışdır (OR=0,99; 95%CI=0,38-2,56; P=0,979). Xəstə qadınlarda isə həm heteroziqot CT (48,1%) və həm də homoziqot mutant TT (30,8%) genotiplər sağlam qadınlara nisbətən daha çox müşahidə olunmuşdur. Qadınlarda, xüsusilə, heteroziqot CT

genotipinin yoğun bağırsağ xərçəngi riski ilə assosiasiyası aşkar edilmişdir (OR=2,77; 95%CI=1,13-6,79; P=0,025). Yaş amilini əsas götürdükdə *mir-196a2* C>T polimorfizminə görə xəstə və nəzarət qruplarında statistik fərq müşahidə olunmamışdır.

Beləliklə, qadınlarda *mir-149* TC genotipi ilə xəstəliyin aşağı inkişaf riski arasında pozitiv statistik əlaqə aşkar edildiyi halda, *mir-192a2* heteroziqot CT isə qadınlarda yoğun bağırsağ xərçənginin yüksək inkişaf riski ilə assosiasiyası tapılmışdır. Alınan nəticələr qadınlarda yoğun bağırsağın bəd xassəli törəmələrinin inkişaf etmə riskini müəyyənləşdirmədə genetik marker kimi istifadəsinə tövsiyə edilə bilər.

4.2. 8q24.21 xromosom nahiyəsində yerləşən uzun kodlaşdırmayan RNT növünün T>C (rs10505477) polimorfizminin tədqiqi

Tədqiqat işində, 153 xərçəng diaqnozu qoyulmuş xəstə və 140 praktik sağlam insanlarda 8q24.21 xromosom nahiyəsindəki T>C (rs10505477) polimorfizmi öyrənilmişdir. Xəstə və kontrol qruplarında müvafiq olaraq homoziqot TT genotipi 52 (34%) və 50 (35,7%), heteroziqot TC genotipi 71 (46,4%) və 57 (40,7%), homoziqot CC genotipi isə 30 (19,6%) və 33 (23,6%) nəfərdə aşkar edilmişdir. Heteroziqot TC (OR=1,198; 95%CI=0,71-2,02; P=0,498), mutant CC (OR=0,874; 95%CI=0,47-1,164; P=0,675), dominant (TT/TC+CC) və resessiv model (TT+TC/CC) və mutant C alleli (OR=0,955; 95%CI=0,69-1,33; P=0,785) ilə kolorektal xərçəng riski arasında statistik korrelyasiya aşkar olunmamışdır. Beləliklə, 8q24.21 xromosom lokusunda yerləşən uzun kodlaşdırmayan RNT növünün T>C (rs10505477) polimorfizmi ilə kolorektal xərçəng riski arasında əhəmiyyətli assosiasiya müəyyən edilməmişdir.

4.3. Xəstələrdə və nəzarət qrupunda P53 geni c.215G>C (rs1042522) polimorfizminin müqayisəli tədqiqi

Tədqiqat işində PZR-RFLP metodları ilə P53 geninin c.215G>C (rs1042522) polimorfizmi 141 xəstə və 150 nəfərdən ibarət nəzarət qrupunda tədqiq edilmişdir. GG, GC və CC genotip tezlikləri xəstələrdə 26,2%, 52,5% və 21,3%, nəzarət qrupunda isə müvafiq olaraq 29,3%, 52% və 18,7% müəyyən edilmişdir. Hər iki qrupu qarşılaşdırdıqda heteroziqot GC (OR=1,128; 95%CI=0,657-1,937; P=0,662) və mutant CC (OR=1,274; 95%CI=0,648-2,504; P=0,482) genotipləri ilə yoğun

bağırsağ xərçəngi riski arasında statistik assosiasiya aşkar edilməmişdir. Xəstələrdə normal G allelinə 52,5%, mutant C allelinə 47,5% rast gəlinəyi halda, nəzarət qrupunda həmin allellərin tezliyi, müvafiq olaraq 55,3% və 44,7% təşkil etmişdir. Mutant C alleli xəstələrdə üstünlük təşkil etmişdir, lakin mutant C alleli ilə (OR=1,122; 95%CI=0,809-1,554; P=0,490) xəstəlik riski arasında assosiasiya müşahidə edilməmişdir.

Bununla yanaşı, yaş, cinsiyyət, siqaret və alkoqoldan istifadə, eləcə də xərçəngin mərhələ və dərəcəsi ilə tədqiq edilən gen polimorfizmi arasında əlaqə aşkar edilməmişdir (P>0,05).

4.4. *NQO1* geni C609T polimorfizmi ilə yoğun bağırsağ xərçəngi riski arasındakı əlaqənin müqayisəli təhlili

Tədqiqata yoğun bağırsağ xərçəngi aşkar olunan 142 xəstə və nəzarət qrupu kimi 146 praktik sağlam insan daxil edilmişdir. Xəstələr arasında həm heteroziqot CT (39,5%) və həm də mutant TT (5,6%) genotiplərinə daha çox rast gəlinmişdir. Heteroziqot CT (OR=1,813; 95%CI=1,097-2,995; P=0,020), dominant model (OR=1,842; 95%CI=1,137-2,983; P=0,013), mutant T alleli (OR=1,644; 95%CI=1,096-2,465; P=0,016) və tədqiqata daxil edilən kişilər arasında heteroziqot CT (OR=2,219; 95%CI=1,079-4,565; P=0,029) genotipi ilə artmış xəstəlik riski arasında statistik əhəmiyyətli əlaqə aşkar edilmişdir. Bundan əlavə siqaret və alkoqoldan istifadə edən və etməyənlərdə *NQO1* geni C609T polimorfizmi təhlil edildikdə statistik əhəmiyyətli nəticə əldə edilməmişdir. Həmçinin, xərçəngin mərhələ və dərəcəsinə genotiplərin paylanması ilə xəstəlik riski arasında asılılıq aşkar olunmamışdır (P>0,05).

Alınan nəticələrə əsaslanaraq, bizim populyasiyada yoğun bağırsağ xərçənginin proqnozlaşdırılmasında və meylliliyin təyində *NQO1* geni C609T gen polimorfizmi qeyri-invaziv genetik biomarker kimi istifadə edilə bilər.

4.5. Yoğun bağırsağ xərçəngində DNT reparasiya genlərindən *hMLH1* -93G>A (rs1800734) və *hMSH2* 1032G>A (rs4987188) gen polimorfizmlərinin tədqiqi

DNT reparasiya genlərindən *hMLH1* -93G>A (rs1800734) və *hMSH2* 1032G>A (rs4987188) genlərinin tranzisiya tipli polimorfizmləri 134 xəstədə və 137 nəfərdən ibarət nəzarət qrupunda

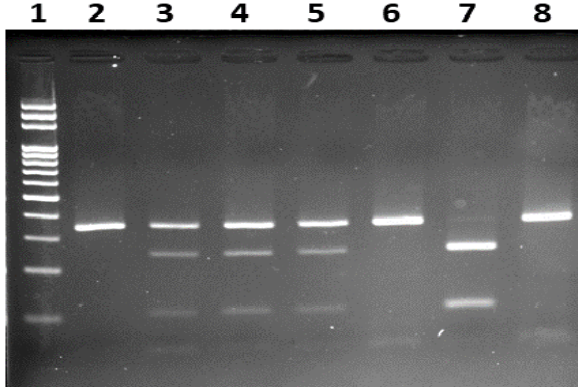
tədqiq olunmuş, bu polimorfizmlərlə kolorektal xərçəngin inkişaf riski arasındakı əlaqə müqayisəli təhlil edilmişdir. *HMLH1* geninin -93G>A polimorfizminin genotip və allel tezlikləri hər iki qrup üçün hesablanmış və statistik olaraq qiymətləndirilmişdir. Alınan nəticələrə əsasən xəstələrdə GG genotipi 15,7%, heteroziqot GA 32,1%, mutant AA genotipi isə 52,2% təşkil etmişdir. Nəzarət qrupunda isə GG, GA və mutant AA genotiplərinin müvafiq olaraq 16,8, 45,2 və 38% olduğu qeydə alınmışdır. Resessiv model ilə (GG+GA/AA) xəstəlik riski (OR=0,56; 95%CI=0,35-0,91; P=0,018) arasında statistik əhəmiyyətli assosiasiya aşkarlanmışdır. Şişin dərəcəsi ilə *hMLH1* geni -93G>A genotipləri arasında statistik əhəmiyyətli fərq qeydə alınmadığı halda şişin mərhələsi və genotiplərin paylanması arasındakı fərq statistik əhəmiyyətli olmuşdur (P<0,05). Kolorektal xərçəng xəstələri arasında *hMSH2* geninin 1032G>A polimorfizminə çox az rast gəlinmiş, heteroziqot GA xəstələrdə 17,2%, nəzarət qrupunda isə nisbətən az 9,5% təşkil etmişdir. Eyni zamanda yaş, cinsiyyət, siqaret və alkoqol istifadəsi və şişin dərəcələri baxımından tədqiqat qrupları müqayisə edildikdə əhəmiyyətli fərq ortaya çıxmamışdır (P>0,05).

Beləliklə, alınan nəticələrə əsaslanaraq *hMLH1* -93G>A polimorfizmindən xərçəngin mərhələlərinin təyininə genetik biomarker kimi istifadəsi tövsiyə oluna bilər.

4.6. DNT-metil transferaza genlərindən *DNMT3B* -579G>T polimorfizminin tədqiqi ilə kolorektal xərçəng arasındakı əlaqənin tədqiqi

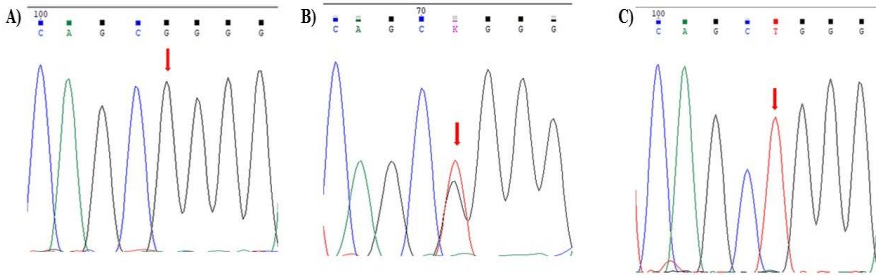
Tədqiqata 140 xəstə və 164 sağlam şəxsdən ibarət nəzarət qrupu daxil edilmişdir. Periferik qandan DNT ekstraksiyası həyata keçirilərək PZR-RFLP metodları ilə genotiplər 2%-li aqaroz gel üzərində gel görüntüləmə sistemi vasitəsilə qiymətləndirilmişdir. GT genotipi (OR=0,53; 95%CI=0,32-0,88; P=0,014) və dominant model (OR=0,53; 95%CI=0,33-0,87; P=0,010) ilə azalmış xəstəlik riski arasında statistik əhəmiyyətli assosiasiya aşkar olunmuşdur. G allelinin tezliyi xəstələrdə 62,1%, nəzarət qrupunda isə 53,7% olmuşdur. Mutant T allelinə isə xəstələrdə 37,9%, sağlam insanlarda isə 46,3% təsadüf edilmişdir. Mutant T allelinə (OR=0,71; 95%CI=0,51-0,98; P=0,035) ilə yoğun bağırsağ xərçəngi riski arasında statistik korrelyasiya müəyyən

olunmuşdur. Xəstə kişiləri sağlam kişilərlə müqayisə etdikdə, eləcə də yaşı 61-ə qədər olan tədqiqat qruplarını qarşılaşdırdıqda, heteroziqot GT genotipinin azalmış xəstəlik riski ilə assosiasiyası müəyyən edilmişdir ($P < 0,05$). Alınan nəticələrin aqaroz gel və Sanger sekvensləmə görüntüləri Şəkil 4.6.1 və 4.6.2-də təqdim edilmişdir.



Şəkil 4.6.1. Genotiplərin aqaroz gel görüntüsü

- A) Ladder (100 n.c.): 1
- B) Normal genotip GG: 2, 6, 8
- C) Heteroziqot GT: 3, 4, 5
- D) Homoziqot TT: 7



Şəkil 4.6.2. Sanger sekvenslənməsi nəticəsində alınan genotip nəticələri

- A) Normal homoziqot GG
- B) Heteroziqot GT
- C) Homoziqot mutant TT

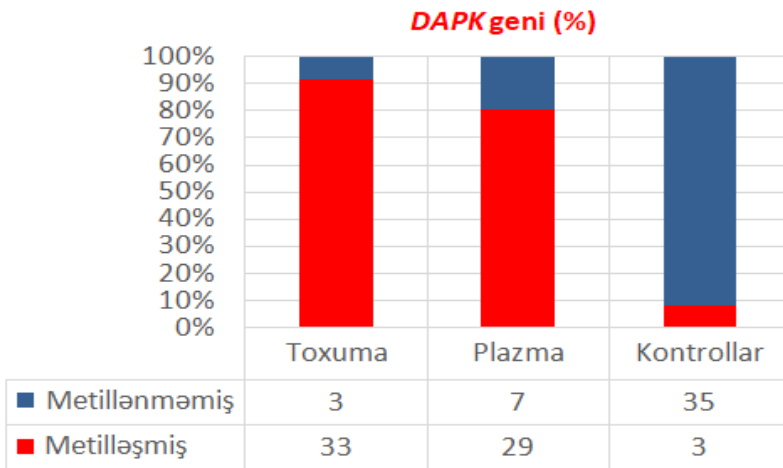
Nəticə etibarilə, tədqiqat nəticəsində *DNMT3B* -579G>T polimorfizminin Azərbaycan populyasiyasında yoğun bağırsağ xərçəngi

riski ilə assosiasiyasının olduğu məlum olmuşdur. Nəticələrimiz *DNMT3B* -579G>T polimorfizminin yoğun bağırsaq xərçəngi riskini təyin etmədə genetik biomarker kimi istifadə oluna bilər.

V FƏSİL. YOĞUN BAĞIRSAQ XƏRÇƏNGİ DİAQNOSTİK QOYULAN XƏSTƏLƏRDƏ DNT PROMOTOR METİLLƏŞMƏSİNİN TƏDQIQI

5.1. *DAPK* və *RAR-β2* Genlərinin Promotor Metilləşməsinin Müqayisəli Tədqiqi

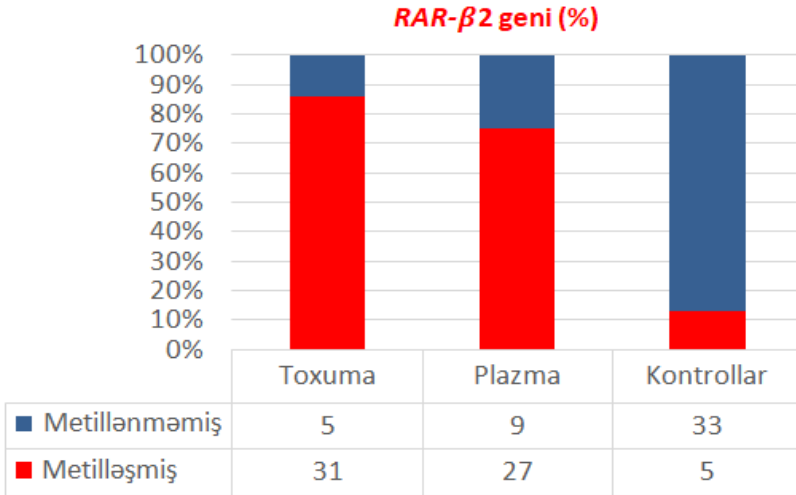
Tədqiqat işində xəstələrin toxuma biopsiyasından əldə edilən DNT-də, qan plazmasından ekstraksiya edilmiş cfDNT-də və nəzarət qrupunda *DAPK* və *RAR-β2* genlərinin promotor metilləşməsi tədqiq edilmişdir. *DAPK* geninin promotor metilləşməsi xərçəng toxumasının DNT nümunələrində 91,7%, nəzarət qrupunda 7,9%, eyni xəstələrin cfDNT-lərində isə 80,6% təşkil etmişdir (Şəkil 5.1.1). Toxuma və plazmada əldə edilmiş metilləşmə vəziyyətini nəzarət qrupunun metilləşmə statusu ilə müqayisə etdikdə, *DAPK* geni üzrə statistik əhəmiyyətli fərq üzə çıxmışdır ($P < 0,05$).



Şəkil 5.1.1. Xəstələrdə və kontrol qrupunda *DAPK* geninin promotor nahiyyəsinin metilləşmə göstəriciləri

Bununla yanaşı, *RAR-β2* geni üzrə nəzarət qrupunda 13,1%

metilləşmə, xərçəng toxumasında 86,1%, cfDNT-lərdə isə 75% metilləşmə təyin edilmişdir (şəkil 5.1.2). *RAR-β2* geni üzrə kontrol qrupu, xərçəng toxuması və plazma cfDNT-də metilləşmə vəziyyətini müqayisə etdikdə, statistik əhəmiyyətli əlaqə aşkar olunmuşdur ($P<0,05$).



Şəkil 5.1.2. Xəstələrdə və kontrol qrupunda *RAR-β2* geninin promotor nahiyyəsinin metilləşmə göstəriciləri

Əlavə olaraq, xərçəng toxuması və cfDNT-də hər iki genin metilləşmə uyğunluğu (κ -kappa) müqayisə edilərkən *DAPK* geni üçün yüksək ($\kappa=0,825$), *RAR-β2* geni üçün isə orta dərəcədə uyğunluq ($\kappa=0,571$) aşkar edilmişdir (Cədvəl 5.1.1).

**Cədvəl 5.1.1
DAPK və *RAR-β2* genləri üzrə xərçəng toxuması və qan plazmasında metilləşmənin uyğunluq analizi**

	<i>DAPK</i> geni metilləşmə, N (%)	<i>RAR-β2</i> geni metilləşmə, N (%)
Toxuma DNT (n=32)	30 (93,8)	28 (87,5)
Plazma cfDNT (n=32)	27 (84,3)	24 (75)
κ Testi	0,825	0,571

P dəyəri	0,233	0,201
-----------------	-------	-------

DAPK geni üzrə metilləşmə şişin G1 dərəcəsində 60%, G2-də 85,8% və G3-də isə 60% təyin edilmişdir. *RAR-β2* geni üzrə metilləşmə isə G1-də 40%, G2-də 71,4% və G3-də isə 40% şəkildə təyin edilmişdir. Hər iki gen üzrə metilləşmə şişin G2 dərəcəsində daha yüksək rast gəlinmişdir. Şişin dərəcəsi ilə genlərin promotor metilləşmə göstəriciləri arasında statistik əhəmiyyətli fərq aşkar edilmədi ($P>0,05$). *DAPK* geninin promotor metilləşməsi şişin T2 mərhələsində 85,8%, T3-də 80,9% və T4 mərhələsində isə 62,5% rast gəlinəndə *RAR-β2* geni üçün isə T2 mərhələsində 57,1%, T3-də 66,7% və T4 mərhələsində isə 75% müşahidə edilmişdir. Yüksək metilləşmə faizi *DAPK* geni üzrə digər şiş mərhələləri ilə müqayisədə T2 mərhələsində, *RAR-β2* geni üzrə isə T4 mərhələsində müşahidə edildi. Buna baxmayaraq şişin mərhələləri ilə hər iki genin promotor metilləşmə statusu arasında statistik əhəmiyyətli fərq müşahidə edilməmişdir ($P>0,05$).

NƏTİCƏLƏR

1. Yoğun bağırsaq xərçəngində *KRAS* geni üzrə 14, *NRAS* geni üzrə 7, *BRAF* geni üzrə isə 16 (53,3%) missens tipli mutasiya identifikasiya edilmişdir. Mutasiyaların 40%-i xərçəng toxumasında, 13,3%-i isə cfDNT fraqmentlərində rast gəlinmişdir. Bunlardan əlavə, xərçəng toxumasında *PIK3CA* geninin 9-cu ekzonunda 14 (46,7%), 20-ci ekzonunda isə 3 (10%) mutasiya aşkar edilmişdir.
2. Xəstə qadınları sağlam qadınlarla qarşılaşdırdıqda *mir-149* TC genotipinin kolorektal xərçəng riskini qadınlarda azaltmasına, *mir-196a2* CT genotipinin isə qadınlarda xərçəng riskini artırmasına dair statistik əhəmiyyətli fərq aşkar edilmişdir ($P<0,05$).
3. Uzun kodlaşdırmayan RNT növünün 8q24.21 nahiyəsində yerləşən T>C (rs10505477) və *P53* genindəki c.215G>C (rs1042522) polimorfizmləri müqayisəli tədqiq edilmiş, bəzi riskli allellər xəstələrdə üstünlük təşkil etsə də allel və genotiplərlə xəstəlik riski arasında statistik assosiasiya aşkar edilməmişdir.
4. *NQO1* geninin C609T polimorfizmi üzrə aparılan genotipləşmə zamanı heteroziot CT (OR=1,813; 95%CI=1,097-2,995; $P=0,020$),

dominant model (OR=1,842; 95%CI=1,137-2,983; $P=0,013$), mutant T alleli (OR=1,644; 95%CI=1,096-2,465; $P=0,016$) ilə yoğun bağırsaq xərçəngi riski arasında yüksək statistik assosiasiya aşkar edilmişdir. Bununla yanaşı, xəstə kişiləri sağlam kişilərlə müqayisə etdikdə heteroziot CT genotipi ilə xərçəng riski arasında da korrelyasiya aşkar edilmişdir (OR=2,219; 95%CI=1,079-4,565; $P=0,029$).

5. DNT reparasiyası prosesini həyata keçirən *hMLH1* -93G>A (rs1800734) və *hMSH2* 1032G>A (rs4987188) gen polimorfizmlərinin tədqiqi zamanı *hMLH1*(rs1800734) geninin resessiv (GG+GA/GA) modeli üzrə statistik əhəmiyyətli aşkar olunmuşdur (OR=0,56; 95%CI=0,35-0,91; $P=0,018$). Əlavə olaraq, şişin mərhələsi ilə *hMLH1* geni -93G>A genotipləri arasında da statistik əhəmiyyətli müəyyən edilmişdir ($P<0,05$).
6. *DNMT3B* geni -579G>T polimorfizminin tədqiqi zamanı heteroziot GT genotipi (OR=0,53; 95%CI=0,32-0,88; $P=0,014$), dominant model (GG/GT+TT) üzrə (OR=0,53; 95%CI=0,33-0,87; $P=0,010$) və eləcə də mutant T alleli (OR=0,71; 95%CI=0,51-0,98; $P=0,035$) ilə yoğun bağırsaq xərçəngi riski arasında statistik korrelyasiya müəyyən edilmişdir. Habelə, kişilər arasında GT genotipi ilə aşağı xəstəlik riski arasında korrelyasiya aşkar edilmişdir (OR=0,40; 95%CI=0,19-0,84; $P=0,015$). Həmçinin, yaşı 61-dən az olan tədqiqat qruplarını qarşılaşdırdıqda GT genotipinin aşağı xəstəlik riski ilə assosiasiyası müəyyən edilmişdir (OR=0,47; 95%CI=0,22-0,99; $P=0,048$).
7. *DAPK* və *RAR-β2* genlərinin promotorlarının xərçəng toxuması və cfDNT-dəki metilləşmə statusunu nəzarət qrupu ilə müqayisə etdikdə, statistik əhəmiyyətli fərq üzə çıxmış ($P<0,05$), *DAPK* geninin promotor metilləşməsi yüksək spesifiklik və həssaslıq göstərmişdir.

TÖVSIYƏLƏR

1. *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* və *PIK3CA* genlərinin panel şəklində xüsusilə, cfDNT-də analiz olunması yoğun bağırsaq xərçənginin diaqnozu, proqnozlaşdırılması və fərdi genom məlumatları əsasında müalicə istiqamətinin seçimində istifadə oluna bilər.
2. Qadınlarda yoğun bağırsaq xərçənginin inkişaf riskini

qiymətləndirmədə və proqnozlaşdırmada *mir-149* T>C (rs2292832) və *mir-196a2* C>T (rs11614913) gen polimorfizmlərindən skrining məqsədilə istifadəsi tövsiyə olunur.

3. Yoğun bağırsağ xərçənginə meylliliyin təyini, xəstəliyin proqnozlaşdırılması və gedişatının izlənilməsində *NQOI* geninin C609T polimorfizminin nəzərə alınması tövsiyə edilir.
4. *HMLH1* geninin -93G>A (rs1800734) polimorfizmi, kolorektal xərçəngin mərhələlərinin təyini və interpretasiyasında genetik biomarker kimi istifadə oluna bilər.
5. *DNMT3B* geninin promotorunda -579G>T polimorfizmi, eləcə də *DAPK* və *RAR-β2* genlərinin promotor metilləşməsindən xərçəng hüceyrələrinin daha erkən təyində qeyri-invaziv epigenetik biomarker kimi istifadə oluna bilər.

Dissertasiyanın mövzusu üzrə dərc olunmuş elmi əsərlərin siyahısı:

1. Aslanov, H.M. Study Of The MTHFR Gene Polymorphism C677T In Precancerous Colorectal Lesions In Azerbaijan Population / V.B.Yaqublu, **B.I.Bayramov**, S.C.Farhadova [et al.] // 1st International Conference One Health: Problems & Solution, – Baku: Khazar University – 1-2 June, – 2018, – p. 55
2. **Bayramov, B.I.** Use Of Liquid Biopsy in Monitoring and Management of Colorectal Cancer // Innovations in Biology and Agriculture to Solve Global Challenges. Dedicated to the 90th Anniversary of Academician Jalal A. Aliyev, – Baku: ANAS Institute of Molecular Biology and Biotechnologies – October 31–2018, – p. 133.
3. **Bayramov, B.I.** Study Of *CASC8* Gene T>C Polymorphism In Patients With Precancerous Colon Diseases And Cancer / H.Aslanov, L.Ibrahimova, V.Yagublu // XVIII International Euroasian Congress of Surgery and Hepatogastroenterology, –Baku: – September 11-14, – 2019, –p. 86-87.
4. **Bayramov, B.I.** Yoğun Bağırsağın Bədxassəli Törəmələrində Uzun Kodlaşdırmayan RNT Növü Genotipinin Tədqiqi // – Bakı: AMEA Genetik Ehtiyatlar İnstitutunun Elmi Əsərləri, – 2019, I cild, – s. 98-103.

5. Aslanov, H.M. Yoğun Bağırsağ Xərçəngində P53 Geni Arg72Pro Polimorfizminin Tədqiqi / **B.İ.Bayramov**, G.Ə.İsmayılova, Z.M.Məmmədova, [və b.] // Cərrahiyyə Elmi Praktiki Jurnalı – Bakı: – 2020, №3-4, – s. 11-15.
6. **Bayramov, B.I.** DNMT3B -579G>T Polymorphism And The Risk Of Colorectal Cancer In Azerbaijan Population / Kh.E Eynullazada, N.I.Karimova, H.M. Aslanov [et al.] // Proceedings of The First International Scientific Practical Virtual Conference Human Genetics And Genetic Diseases: Problems And Development Perspectives –Baku: Azerbaijan Medical University, – May 30-31, - 2020, –p. 58.
7. **Bayramov, B.İ.** Yoğun Bağırsağ Xərçəngində *miRNT-149* Geninin Tranzisiya Tipli C>T Polimorfizminin Tədqiqi // – Bakı: Tibb və Elm Jurnalı, – 2021, №3 (25), – s. 33-37.
8. **Bayramov, B.İ.** Comparative analysis of *KRAS* and *NRAS* gene mutations in colorectal cancer / Sh.A.Mammadova, F.A.Gahramanova, N.Y.Bayramov // Journal of Life Sciences&Biomedicine – Baku: – 2021, №1, vol.3(76), – p. 108-115.
9. Асланов А.М. Сравнительное Исследование Полиморфизма Единичного Нуклеотида Тр53 Гена При Воспалительных Заболеваниях Кишечника / Р.М.Агаев, **Б.И.Байрамов**, Г.А.Исмаилова [и др.] // – Материалы VII Конгресса Хирургов Казахстана С Международным Участием «Хирургия: Вчера, Сегодня, Завтра», Посвященного 75-Летию Со Дня Основания Национального Научного Центра Хирургии Им. А.Н.Сызганова – Алматы: – 2021, – с. 122-123.
10. **Bayramov, B.I.** Investigation Of Association Between Mir-149 T>C And Mir-196a2 C>T Polymorphisms And Colorectal Cancer Risk / N.Y.Bayramov, Ş.Abdulrahimli, H.M.Aslanov, // 4th International Health Sciences and Innovation Congress – Baku: Liberty Publications – July 5-6, – 2021, – p. 565.
11. **Bayramov, B.I.** Association between mismatch repair gene hMLH1 -93 G>A promoter polymorphism andcolorectal cancer risk / F.A.Gahramanova, Sh.A.Mammadova, N.Y.Bayramov // – Turkey: Springer – 30 November – 4 December, 2021, –p. 17-18.

12. Yagublu, V.A. *TP53* Codon 72 Polymorphism and the Risk of Colorectal Cancer in an Azerbaijani Population / **B.I.Bayramov**, M.Yuce, H.M.Aslanov // Turkish Journal of Gastroenterology, – 2022, 33(6), – p. 485-490.
13. **Bayramov, B.I.** Investigation of the *DNMT3B* -579 G>T Promoter Polymorphism in Patients with Colorectal Cancer in an Azerbaijani Population / N.Y.Bayramov, H.M.Aslanov, M.Ə.Abbasov [et al.] // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention – Thailand: – 2022, 23(6), – p. 1879-1884.
14. **Bayramov, B.I.**, Bayramov, N.Y. Investigation of C609T polymorphism in the *NQO1* gene in patients diagnosed with colorectal cancer in the Azerbaijani population // – Baku: Journal of Life Sciences & Biomedicine, – 2022, vol. 4(77), No 1, – p. 90-96.
15. Aslanov, H.M. Lack of significant association between *MTHFR* gene C677T polymorphism and colorectal cancer in the Azerbaijani population / R.M.Agaev, **B.I.Bayramov**, A.F.Hadizade [et al.] // Genetics and Molecular Research, – Braziliya: – 2023,1(1), – p. GMR19100.
16. **Bayramov, B.I.** Association of *miR-149* T>C and *miR-196a2* C>T Polymorphisms with Colorectal Cancer Susceptibility: A Case-Control Study / N.Y.Bayramov, H.Aslanov, N.Karimova [et al.] // Biomedicines, –2023, 11(9), –p. 2341.
17. **Bayramov, B.I.**, Bayramov N.Y. Yoğun Bağırsağ Xərçəngində *DAPK* və *RAR-B2* Genlərinin Promotor Metilləşməsinin Müqayisəli Tədqiqi // –“1st International Azerbaijan Laboratory Medicine Congress & Lab Expo” – Baku: Azerbaijan Journal Of Laboratory Medicine, – 3-5May, 2023, –s. 184.

İXTİSARLARIN SİYAHISI

1xTBE	– 1x Tris-Bor turşusu-EDTA
cdDNT	– Sirkulyasiya Edən Sərbəst DNT
CGH	– Müqayisəli Genomik Hibridləşdirmə
CIMP	– CpG Adacıqlarının Metilləşmə Fenotipi
CIN	– Xromosomların Qeyri-Stabilliyi
CTC	– Sirkulyasiya Edən Xərçəng Hüceyrələri
DNMT	– DNT Metil Transferaza
EGFR	– Epidermal Böyümə Faktoru Reseptor
FAP	– Ailəvi Adenomatöz Polipoz Koli
FDA	– Qida və Dərman Administrasiyası
FIT	– Nəcisin immunokimyəvi testi
GWAS	– Genom boyu assosiasiya tədqiqatları
İBX	– İltihabi Bağırsağ Xəstəlikləri
miRNT	– Mikro RNT
MMR	– <i>Mismatch</i> Reparasiyası
MSI	– Mikrosatellit Qeyri-Stabilliyi
MSP	– Metilləşməyə Spesifik PZR
ncRNT	– Kodlaşdırmayan RNT
PI3K	– Fosfatidilinositid-3-kinaza
PZR	– Polimeraza Zəncirvari Reaksiyası
RFLP	– Restriksiya Edilmiş Fraqmentlərin Uzunluq Polimorfizmi
TNP	– Tək Nukleotid Polimorfizmi

Dissertasiyanın müdafiəsi “30” “sentyabr” 2024-cü il tarixində saat 14⁰⁰ da Azərbaycan Tibb Universitetinin nəzdində fəaliyyət göstərən BFD 4.27 Birdəfəlik Dissertasiya Şurasının iclasında keçiriləcək.

Ünvan: AZ 1022, Bakı şəhəri, Ə.Qasımsadə küçəsi 14 (konfrans zalı)

Dissertasiya ilə Azərbaycan Tibb Universitetinin kitabxanasında tanış olmaq mümkündür.

Dissertasiya və avtoreferatın elektron versiyaları Azərbaycan Tibb Universitetinin rəsmi internet saytında (www.amu.edu.az) yerləşdirilmişdir.

Avtoreferat “01” “iyul” 2024-cü il tarixində zəruri ünvanlara göndərilmişdir.

Çapa imzalanıb: 15.05.2024
Kağız formatı: A5
Həcm: 36616 işarə
Tiraj: 100