



AZƏRBAYCAN ELM FONDU

Azərbaycan Elm Fondunun
Ümummilli Lider Heydər Əliyevin 100-illik
yubileyinə həsr olunmuş
“Əsas qrant müsabiqəsi-2023” ün
(AEF-MCG-2023-1(43)) qalibi olmuş
layihənin yerinə yetirilməsi üzrə aralıq
(rüblük olaraq 2-ci mərhələ)

ELMI-TEXNİKİ HESABAT

Layihənin adı: **Azərbaycanda onkoloji xəstəliklər üzrə populyasiyaya spesifik genetik mutasiya spektrinin identifikasiyası**

Layihə rəhbərinin soyadı, adı və atasının adı: **Vəliyeva Həqiqət Qənimət qızı**

Layihənin nömrəsi: **AEF-MCG-2023-1(43)-13/08/3-M-08**

Müqavilənin imzalanma tarixi: **09 yanvar 2024-cü il**

Qrant layihəsinin yerinə yetirilmə müddəti: **24 ay**

Layihənin icra müddəti (başlama və bitmə tarixi): **01 fevral 2024-cü il – 01 fevral 2026-cı il**

Layihənin II mərhələ üzrə (rüb) məbləği:

Hesabatda aşağıdakı məsələlər işıqlandırılmalıdır:

1	<p>Layihənin həyata keçirilməsi üzrə cari rübdə yerinə yetirilmiş elmi işlər</p> <p>Cari layihənin II rübündə Azərbaycan Tibb Universitetinin Onkoloji klinikasına müraciət edən və süd vəzi xərçəngi, yumurtalıq, mədə və yoğun bağırsağ xərçəngi diaqnozu qoyulmuş pasiyentlərin anamnez məlumatları sistemləşdirilərək qan nümunələri toplanılmışdır. Belə ki, klinik laborator və instrumental müayinə üsulları vasitəsilə 37 xəstədə süd vəzi xərçəngi, 19 xəstədə yumurtalıq xərçəngi, 16 xəstədə mədə xərçəngi və 15 xəstədə isə yoğun bağırsağ xərçəngi diaqnozu təstiq edilmişdir. Tədqiqat qrupları yaş, cins və digər parametrlərə uyğun qruplaşdırılmışdır.</p> <p>Həmçinin, müqayisəli molekulyar analizlərin aparılması üçün irsiyyətində sadalanan xərçəng xəstəliyi olmayan, sağlam, yaş və cinsiyyət faktorları baxımından uyğun şəxslər isə kontrol qrupu kimi tədqiqata daxil edilmişdir. Tədqiqatın cari etapında 40 nəfər kontrol qrupuna daxil edilmiş və məlumatları sistemləşdirilmişdir. Xərçəng xəstəliyi aşkarlanan xəstələrdə ilkin etapda xərçəngin mərhələ və dərəcəsi təyin edilmişdir. Bədxassəli şiş aşkar edilən xəstələrin patohistoloji nəticələri Cədvəl 1-də təqdim olunmuşdur. Sonrakı etapda isə tədqiqat qruplarında genetik tədqiqatların</p>
----------	--

aparılması üçün 5 ml EDTA-lı qan nümunələri toplanılmış və əldə edilən biomateriallar AR ETN Genetik Ehtiyatlar İnstitutunun İnsan Genetikası Laboratoriyasına transfer edilmişdir. İnsan Genetikası Laboratoriyasında isə qanlardan DNT ekstraksiyası proseduru icra edilmişdir. Qandan DNT ekstraksiyası üçün aşağıdakı protokol tətbiq edilmişdir:

1. Eppendorf tüpünə 200 ul qan, 30 ul Proteinaz K və 250 lizis buferi əlavə edildi
2. Qarışım vorteks olunaraq qarışdırıldı və 56°C-də 2 dəq inkubasiya edildi
3. İnkubasiyadan sonra lizat spin kolona keçirilərək sentrifuqa edildi
4. Sonra Spin kolona 750 ul yuyucu məhlul əlavə edilərək DNT hüceyrəvi qalıqlardan təmizləndi
5. Hər bir spin kolona 150 ul *elution bufer* əlavə edilərək DNT çökdürüldü və -20C saxlandı

Cədvəl 1. Xərçəng xəstələrinin patohistoloji nəticələri

Xərçəngin dərəcəsi	Süd vəzi xərçəngi N=37 (%)	Yumurtalıq xərçəngi N=19 (%)	Mədə Xərçəngi N=16 (%)	Yoğun Bağırsağ Xərçəngi N=15 (%)
G1	12 (32,4)	5 (26,3)	3 (18,7)	6 (40)
G2	18 (48,6)	10 (52,6)	11 (68,8)	7 (46,7)
G3	7 (19)	4 (21,1)	2 (12,5)	2 (13,3)
Xərçəngin mərhələsi				
T I	7 (19)	3 (15,8)	5 (31,3)	3 (20)
T II	9 (24,3)	6 (31,6)	4 (25)	6 (40)
T III	17 (45,9)	8 (42,1)	6 (37,5)	4 (26,7)
T IV	4 (10,8)	2 (10,5)	1 (6,2)	2 (13,3)

DNT-nin kəmiyyət və keyfiyyəti spektrofotometrik üsulla Nanodrop 2000/2000c (Thermo Scientific) cihazı vasitəsilə təyin edilmişdir. DNT-nin miqdarı 1 µl məhlulda nanoqramlarla ölçülmüş və durulaşdırma əmsalına vurularaq total DNT miqdarı müəyyən edilmişdir. PZR reaksiyalarının aparılması üçün 25 µl/ng minimal rəqəm kimi qəbul edilmişdir. DNT-nin zülallar və kimyəvi birləşmələrlə çirklənmə dərəcəsi isə müvafiq olaraq 260/280 və 260/230 dalğa uzunluqlarının nisbəti əsasında hesablanmışdır. Belə ki, 260/280 nisbətinin 1,8 və 260/230 nisbətinin isə 2 olması, zülallar və kimyəvi maddələrlə çirklənməsi olmayan saf DNT etalonu kimi qəbul edilmişdir.

Tədqiqat işində ilkin etapda süd vəzi xərçəngində və kontrol qrupunda *TP53*, *hMLH1* və *hMSH2* genləri üzrə protokollar optimallaşdırılmışdır. Hər bir genin hədəflənən nahiyələrinə spesifik praymerlər vasitəsilə ilk növbədə PZR reaksiyaları üçün işçi məhlullar hazırlanmış, PZR reaksiyaları qoyulmuş və hər bir gen üzrə protokollar dəqiqləşdirilmişdir. PCR üçün lazım olan genlər və onların praymerlərinin nukleotid ardıcılığı Cədvəl 3-də təqdim edilmişdir.

Aqaroz gel elektroforezi vasitəsilə amplikonlar qiymətləndirilmiş və bir sonrakı mərhələ üçün hazır vəziyyətə gətirilmişdir. Aqaroz gel elektrofozeri üçün işçi məhlullar hazırlanmışdır:

10xTBE məhlulunun hazırlanması: 108 q Tris, 55 q bor turşusu və 7,5 q EDTA ölçülərək ölçü qabına əlavə edilir, üzərinə distillə suyu əlavə edilərək həcmi 1 litrə çatdırılır. Məhlul şəffaflaşana qədər qarışdırılır.

1xTBE-nin (89mM tris, 89mM bor turşusu, 2mM EDTA) hazırlanması: 100 ml 10X TBE götürülür, üzərinə 900 ml distillə suyu əlavə edilərək yaxşıca qarışdırılır və məhlul hazır vəziyyətə gətirilir.

P53 və hMLH1 gen polimorfizmi üzrə alınan nəticələr.

Cari rübdə P53 geni Arg72Pro polimorfizmi süd vəzi xərçəngi diaqnozu qoyulmuş 37 xəstədə və

40 kontrol qrupunda müqayisəli təhlil edilmişdir. İlk növbədə tədqiqat qruplarından alınan qanlardan DNT ekstraksiyası həyata keçirilmişdir. DNT-nin konsentrasiyası spektrofotometrik üsulla qiymətləndirilərək kəmiyyət və keyfiyyət göstəriciləri təyin edilmişdir. Ən azı 25 ng/ul və 1.8 saflıq göstəricisinə malik DNT-lər növbəti mərhələdə PCR edilmişdir. Gen spesifik praymer dəstindən istifadə etməklə PCR reaksiyaları qoyulmuş və nəticələr 1,5%-li aqaroz gəldə qiymətləndirilmişdir. PCR nəticəsində 296 bp-lik DNT fraqmenti əldə edilmişdir. NEB firmasının təqdim etdiyi *Hinf* restriktaza fermenti 296 bp-lik fraqmenti kəsmədikdə bu homoziqot GG (Arg/Arg), 296 bp, 169 bp və 127 bp-li fraqmentlər alındıqda bu heteroziqot GC, 169 bp və 127 bp-li fraqmentlər alındıqda isə bu homoziqot mutant CC (Pro/Pro) olaraq qiymətləndirilmişdir.

Tədqiqat qruplarında P53 geninin Arg72Pro (c.215G>C) polimorfizminin müqayisəli təhlili edilmişdir. GG, GC və CC genotiplərinin xəstələrdə tezlikləri müvafiq olaraq 37,9%, 43,2% və 18,9% şəkildə rast gəlinmişdir. Nəzarət qrupunda isə 60% GG, 32,4% GC və 7,5% CC genotip tezlikləri müəyyən edilmişdir. Xəstələrdə həm heteroziqot GC (43,2%) və həm də mutant CC (18,9%) nəzarət qrupu ilə müqayisədə çox rast gəlinmişdir. Həmçinin mutant C alleli nəzarət qrupu ilə müqayisədə xəstələrdə çox rast gəlinmişdir.

Layihənin cari rübündə həmçinin süd vəzi xərçəngi diaqnozu qoyulan 37 xəstədə və 40 praktik sağlam kontrol qrupunda DNT reparasiya prosesini tənzimləyən genlərdən biri olan hMLH1 geninin -93 G>A polimorfizmi tədqiq edilmişdir. *hMLH1* geni 3-cü xromosomun qısa çiyində 3p21.3-23 xromosom nahiyəsində lokalizasiya olunmuşdur. *HMLH1* geni, 19 ekzondan ibarətdir və 756 amin turşudan ibarət zülal kodlayır. *HMLH1* genində meydana gələn -93G>A polimorfizmi (rs1800734) genin transkripsiya fəaliyyətini tənzimləyir və əsasən promotor bölgəsində yerləşir. Bu bölgədəki polimorfizm variantlarının MLH1 protein ekspressiyasına təsir etdiyi təxmin edilir. Digər tərəfdən bu gəndə meydana gələn polimorfizm yoğun bağırsağ və mədə xərçəngi daxil olmaqla, həmçinin limfoma, anemiya və süd vəzi xərçəngi riskini artırma bildiyi məlum olmuşdur.

hMLH1 geninin -93G>A polimorfizminin genotip və allel tezlikləri hər iki qrup üçün hesablanmışdır. İlk öncə tədqiqata daxil edilən xəstə və kontrollerin qanından DNT ekstraksiya edilməklə PCR reaksiyaları qoyulmuş və uyğun şəkildə 386 bp-lik DNT fraqmentləri alınmışdır. Davamında isə alınan PCR DNT fraksiyaları restriktaza fermentləri vasitəsilə kəsilərək genotiplər 2%-li aqaroz gəldə təyin edilmişdir.

NEB firmasının təqdim etdiyi *PvuII* restriktaza fermentinin 386 bp-lik PCR amplikonlarına təsiri nəticəsində fraksiyalar alınmaqla genotiplər təyin edilmişdir. Belə ki, restrikt . *hMLH1* PCR-RFLP fraksiyalara ayrılmayan 386 bp DNT fraksiyası alındıqda bu homoziqot normal GG, 386, 207 və 180 bp-lik bəndlər alındıqda bu heteroziqot GA, 207 bp və 180 bp DNT fraqmentləri alındıqda isə bu homoziqot AA genotipi olaraq qiymətləndirilmişdir.

Alınan nəticələrə əsasən GG genotipinin xəstə qrupunda rastgəlmə tezliyi 35,1%, heteroziqot GA 48,7%, mutant AA genotipinin rastgəlmə tezliyi isə 16,2% təşkil etmişdir. Kontrol qrupunda isə GG genotipi 57,5%, GA genotipi 35% və mutant AA genotipinin rastgəlmə tezliyi isə 7,5 % olduğu qeyd alınmışdır. Bundan əlavə xəstələrdə G alleli 59,5% nəzarət qrupda isə 75% müşahidə olunmuşdur. Mutant A alleli isə xəstələrdə 40,5%, nəzarət qrupunda isə 25% rast gəlinmişdir. Ümumilikdə həm heteroziqot GA, mutant AA və mutant A alleli süd vəzi xərçəngi diaqnozu qoyulan xəstələrdə üstünlük

	təşkil etmişdir.
2	<p>Layihənin həyata keçirilməsi üzrə planda nəzərdə tutulmuş işlərin yerinə yetirilmə dərəcəsi (cari rüb üçün, faizlə qiymətləndirməli)</p> <p>Tədqiqat işində ilk hesabat dövrü ərzində aşağıda sadalanan işlərin görülməsi nəzərə tutulmuşdur:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nümunələrdən DNT ekstraksiya edilməsi - DNT-nin kəmiyyət və keyfiyyət göstəricilərinin təyini - Nəzərdə tutulan onkoloji xəstəliklər üzrə gen panellərinin sifariş edilməsi <p>Tədqiqat işi ilə əlaqədar olaraq Pubmed, Medline, Google scholar, Scopus, Nature və digər bazalarında çapda çıxmış ən yeni məqalələr toplanılmış, protokollar nəzərdən keçirilmişdir. Qeyd edək ki, layihədə ilkin rüb üzrə nəzərdə tutulmuş işin bu bölməsini 100% olaraq qiymətləndiririk.</p> <p>Xəstələrə aid klinik və demoqrafik göstəricilər dəqiqliklə toplanılmış və sistemləşdirilmişdir. Tədqiqat qruplarında həm xəstələrin həm də kontrolların sayı artırılmış və müvafiq olaraq tədqiqata daxil edilmişdir. Layihənin cari rübü üzrə iki gen üzrə - p53 və hMLH1 genləri üzrə təd nukleotid polimorfizmləri tədqiq olunmaqla mutant və riskli gen allelləri təyin edilmişdir. Tədqiqat işində müqayisəli genom analizlərinin aparılması üçün xəstə və kontrolların sayının 100-dən çox olması planlaşdırılmışdır. Ona görə də xəstə və kontrolların sayının artırılması işləri davam etdirilir. Eyni zamanda statistik olaraq P dəyəri və OR əmsalları növbəti rübdə hesablanmaqla xəstəlik riskləri təyin ediləcəkdir.</p>
3	<p>Hesabat dövründə alınmış elmi nəticələr, onların yenilik dərəcəsi</p> <p><i>(burada doldurmalı)</i></p> <p>Tədqiqatın bu rübündə mözu ilə əlaqəli ədəbiyyat məlumatları sistemləşdirilmiş, PCR reaksiyaları optimallaşdırılmış, aqaroz gel və RFLP metodikaları üzrə p53 və hMLH1 geni müqayisəli genotipləşdirilmişdir. Lakin əldə edilən nəticələr ilkin nəticələr olub, biostatistik analizlər icra olunmamışdır. Nümunə say azlığını nəzərə alaraq gələcək rüblər üzrə elmi yeniliklər təqdim olunacaqdır.</p>
4	<p>Layihənin yerinə yetirilməsi zamanı istifadə olunan üsul və yanaşmalar</p> <p><i>(burada doldurmalı)</i></p> <p>Layihənin yerinə yetirilməsi zamanı aşağıda sadalanan metodikalardan istifadə edilmişdir:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Anamnez məlumatlarının sistemləşdirilməsi - Xərçəngin mərhələ və dərəcəsinin təyini - Qandan DNT ekstraksiyası - PCR-in qoyulması - RFLP üsulu uli amplikonların işlənməsi - Aqaroz gel elektroforezi
5	<p>Layihə üzrə elmi nəşrlər (məqalələr, monoqrafiyalar, icmalar, konfrans materialları, tezlər) (dərc olunmuş, çapa qəbul olunmuş və çapa göndərilmişləri ayrılıqda qeyd etməklə) <i>(surətlərini əlavə etməli!)</i></p> <p><i>(burada doldurmalı)</i></p> <p>Layihənin hal-hazırdakı rübü üzrə elmi nəşrlər dərc edilməmişdir.</p>
6	<p>İxtira və patentlər, səmərələşdirici təkliflər</p> <p>Tədqiqat işində bu rüb üzrə ixtira və patent alınmamışdır</p>

7	Layihə üzrə ezamiyyətlər Bu rüb üzrə elmi ezamiyyət nəzərdə tutulmamışdır.
8	Layihə üzrə elmi ekspedisiyalarda iştirak Layihə üzrə elmi ekspedisiya nəzərdə tutulmamışdır
9	Layihə üzrə digər tədbirlərdə iştirak Bu rüb üzrə tədbirlərdə iştirak edilməmişdir.
10	Layihə mövzusu üzrə elmi məruzələr (seminarlar, konfranslar, dəyirmi masalar və s. çıxışlar) Bu rüb üzrə elmi məruzələr olmamışdır. Nəticələr əldə edildikdən sonra yerli və xarici konfranslarda iştirak və çıxış nəzərdə tutulmuşdur.
11	Layihə üzrə əldə olunmuş cihaz, avadanlıq və qurğular, mal və materiallar Bu rüb ərzində layihə üzrə heç bir cihaz, avadanlıq və materiallar əldə olunmamışdır. Belə ki, tədqiqatda istifadə edilən cihaz, avadanlıq və qurğular Azərbaycan Tibb Universiteti və Genetik Ehtiyatlar İnstitutunun maddi-texniki bazasında mövcud avadanlıqlar hesabına həyata keçirilmişdir.
12	Yerli həmkarlarla əlaqələr Tədqiqatın cari rübündə bu nəzərə alınmamışdır.
13	Xarici həmkarlarla əlaqələr Layihə çərçivəsində aparılan tədqiqat işləri yerli həmkarlar vasitəsilə həyata keçirilməsi nəzərdə tutulmuşdur.
14	Layihə mövzusu üzrə kadr hazırlığı Nəzərdə tutulmamışdır.
15	Sərgilərdə iştirak Nəzərdə tutulmamışdır.
16	Təcrübəartırmada iştirak və təcrübə mübadiləsi Nəzərdə tutulmamışdır.
17	Layihə mövzusu ilə bağlı elmi-kütləvi nəşrlər, kütləvi informasiya vasitələrində çıxışlar, yeni yaradılmış internet səhifələri və s. Nəzərdə tutulmamışdır.

Layihə rəhbərinin imzası _____ Vəliyeva Həqiqət Qənimət qızı

Tarix _____