

УДК 612.6.5  
AGRIS T10

https://doi.org/10.33619/2414-2948/90/45

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОСНОВА ГАЛАКТОЗЕМИИ

©*Гаджиева Н. М., Бакинский государственный университет,  
г. Баку, Азербайджан, niluferhaciyeva01@gmail.com*

## MOLECULAR BASIS OF GALACTOSEMIA

©*Gajiyeva N., Baku State University,  
Baku, Azerbaijan, niluferhaciyeva01@gmail.com*

*Аннотация.* Рассматриваются результаты проведенного генетического скрининга галактоземии на болезнь генетического обмена. Приведена структура праймеров, используемых в молекулярной диагностике гена GALT. У новорожденного выявлено патогенные мутации. GALTc.563 A>G (p.Gln 188 Arg). Замена A>G произошла в нуклеотиде 563 экзона 6 гена GALT. Проанализированы результаты ферментативного тестирования в препаратах лейкоцитов. Результаты молекулярно-генетического анализа гена GALT показало, заболевание галактоземии у населения страны носит исключительно редкий характер.

*Abstract.* The presented article discusses the results of the genetic screening of galactosemia for the disease of genetic metabolism. The structure of primers used in molecular diagnostics of the GALT gene is shown. The newborn has pathogenic mutations. GALTc.563 A>G (p.Gln 188 Arg). The A>G substitution occurred at nucleotide 563 of exon 6 of the GALT gene. The results of enzymatic testing in leukocyte preparations were analyzed. The results of molecular genetic analysis of the GALT gene showed that the disease of galactosemia in the population of the country is extremely rare.

*Ключевые слова:* галактоземия, галактозо-1-фосфатуридилтрансфераза, Галт, ПЦР.

*Keywords:* galactosemia, galactose-1-phosphate uridylyltransferase, Galt, PCR.

Галактоземия — это нарушение углеводного обмена, основанное на наследственном нарушении процесса превращения галактозы в глюкозу. В это время в организме накапливается избыток галактозы и ее метаболитов, что приводит к клинической картине заболевания и развитию отсроченных осложнений [1, 2].

Поскольку генетика галактоземии представляет собой наследственное заболевание гетерогенной природы, различные ее формы связаны с дефицитом различных ферментов. Заболевание зависит от нарушения активности трех разных генов, расположенных на аутосомных хромосомах I, IX и XVII.

1. Мутация в гене Galt фермента галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы, расположенного в p13-части короткого плеча хромосомы IX.

2. Мутация в гене Galk фермента галактокиназы, расположенном в q23-25 длинного плеча аутосомной хромосомы №XVII.

3. Мутация в гене Gale фермента УДФ-глюкозо-4-эпимеразы, расположенного в p35-p36 части короткого плеча хромосомы I.

Тип наследования всех трех генетических форм болезни наследственного обмена галактоземии является аутосомно-рецессивным.

Так как генетика заболевания разная, то и клиника разная. Легкий случай галактоземии приводит к неперевариванию молока организмом и образованию катаракты в глазу. Дюартовская форма болезни проходит бессимптомно, и человек склонен к заболеваниям печени. Наиболее распространенной причиной галактоземии является дефицит фермента галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы (GALT) [11]. Классическая галактоземия также известна как тип 1 [3-5].

Болезнь генетического обмена галактоземия не изучалась у населения Азербайджанской Республики, основной целью исследования является расширение знаний о молекулярной этиологии этого редкого заболевания. В гене Galt выявлено более 300 мутаций [6]. Классический диагноз галактоземии заключается в измерении активности энзим в эритроцитах. Газохроматографическое определение сахара и сахарного спирта в моче показывает высокое содержание галактозы и галактита. Для пациентов с классической галактоземией единственным методом лечения является диета с ограничением галактозы. Как только подозревается диагноз, первым шагом является удаление из рациона всей галактозы [12-14].

Галактоземия также гетерогенна с молекулярной точки зрения. При раннем выявлении заболевания у новорожденного и исключении из питания галактозного сахара можно обеспечить нормальное физическое и психическое развитие ребенка. Заболеваемость галактоземией в мире составляет от 1:40 000 до 1:60 000 в США и Европе, самая высокая — 1:20 000 в Ирландии и самая низкая — 1:1000 000 в Японии. Дефицит галактокиназы является редким аутосомно-рецессивным нарушением метаболизма галактозы. По данным литературы, у больных регистрировали катаракту [8-10].

#### *Материалы и методы*

В 2015-2022 гг среди детей, рожденных в государственных родильных домах Азербайджанской Республики, и больных детей, находящихся на лечении в Научно-исследовательском педиатрическом институте им. К. Фараджовой Министерства здравоохранения, был проведен генетический скрининг галактоземии на болезнь генетического обмена. Капиллярную кровь, взятую из подошв новорожденных, пропитывали хроматографической бумагой Whatman 907, высушивали и в конверте отправляли в лабораторию для анализа. Венозную кровь больных детей брали в специальные пробирки, содержащие ЭДТА или гепарин. Анализ проводили методом ИФА.

*Процесс выделения ДНК из венозной крови:* в тестовые флаконы eppendorf объемом 1,5 мл вносят 200 мкл буфера AL из набора ампгеномной ДНК и РНК QIA производства QIAGEN, 200 мкл венозной крови и 20 мкл фермента Protease (протеиназы) производства QIAGEN.

*Полимеразная цепная реакция:* для проведения полимеразной цепной реакции 30 мкл специальной дистиллированной воды, приготовленной для молекулярных исследований, 8,2 мкл 0,5 М буфера ТАЕ, по 2,5 мкл праймера F (прямого) и праймера R (обратного), 1,3 мкл добавить dNTP, 0,63 мкл фермента, и 5 мкл геномной ДНК и перемешивают на шейкере в течение 15 секунд. Затем мы помещаем тестовую бутылку в устройство, называемое термоциклером, и проектируем полимеразную цепную реакцию.

*Термоциклеры.* Для каждого отдельного образца ДНК использовали схему реакции, описанную ниже. 95<sup>0</sup>С — 2 мин (95<sup>0</sup>С — 30И, 60<sup>0</sup>С — 30И, 77<sup>0</sup>С — 2 минуты. Этот цикл повторялся 30 раз), 72<sup>0</sup>С-10 мин и перерыв 4<sup>0</sup>С. ПЦР проводили на аппарате немецкой фирмы “Professional Thermocycler Biometra”.

Для амплификации пяти различных частей гена GALT использовали десять различных праймеров. Для каждого фрагмента генома использовали пару прямых и обратных праймеров. В Таблице 1 приведена структура праймеров, используемых в молекулярной диагностике гена GALT.

Таблица 1

СТРУКТУРА ПРАЙМЕРОВ,  
ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ГЕНА GALT

Номер праймера	Номер экзона	Последовательность 5' - 3'	Продукт ПЦР
1	E1 and E2	F: 5'- AAAGTGAAAGGTGAGGCACG -3' R: 5'- TGACCCAGAAGGAGGTTCAC -3'	750 bp
2	E3 and E4	F: 5'- GCCTGTCCAGTCTTTGAAGC -3' R: 5'- GGTTTGAAAGTTGTAAGAGGGG -3'	350 bp
3	E5	F: 5'- CACAGCCAAGCCCTACCTCTC -3' R: 5'- ACCTCACAAACCTGCACCCAA -3'	190 bp
4	E6	F: 5'- CTTTTGGCTAACAGAGCTCCG -3' R: 5'- TTCCCATGTCCACAGTGCTGG -3'	200 bp
5	E7 and E8	F: 5'- ACCTGCCTGTTCTTCTCTGC -3' R: 5'- TACTGGGAGCAACCTCCATC -3'	700 bp
6	E9	F: 5'- GCTGAGAGTCAGGCTCTGATTCC -3' R: 5'- CCAGAAATGGTGTGGGGCT -3'	155 bp
7	E10	F: 5'- GGGTTTGGGAGTAGGTGCT -3' R: 5'- GGGCAACAGAAGTATCAGGT -3'	320 bp
8	E11	F: 5'- GAAGTCCATGCCACCATTCT -3' R: 5'- TTCAAGGCCCTTTCTGCTTA -3'	230 bp

*Электрофорез геномной ДНК и ее фрагментов в агарозном геле.* Интактная геномная ДНК, выделенная из венозной крови и электрофорез фрагментов ДНК в 1,7% агарозном геле после полимеразной цепной реакции. Для этого использовали электрофорезный аппарат Power PacBasic Gel DocIM EZ американской компании BioRad.

*Аппарат для электрофореза.* DNA Ladder 100 п.н. использовали для определения молекулярной массы вновь синтезированных фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции. Время электрофореза — 45-60 мин. Фрагменты ДНК окрашивали в водном растворе бромистого этидия в течение 5 мин.

*Очистка фрагментов ДНК после полимеразной цепной реакции.* Фрагменты ДНК очищали на специальных магнитах — Agencourt AMPure XP PCR Purification и SPRIPlate 96 Super Magnet Plate.

*Вторичная полимеразная цепная реакция.* Вторую амплификацию очищенных фрагментов ДНК проводили в следующем режиме: 95<sup>0</sup>С — 2 мин, 95<sup>0</sup>С-30И, 55<sup>0</sup>С-30И, 77<sup>0</sup>С-2 мин в течение 30 циклов и 72<sup>0</sup>С-10 мин, пауза при 4<sup>0</sup>С. Затем полученную амплификацию переносили на аппарат «Genome Lab GeXP™ Sequencing» и изучали последовательность

нуклеотидов. Это кросс-секционное исследование было проведено на новорожденных города Баку. Для исследования вариантов гена GALT у больных галактоземией всем больным проводили секвенирование экзонов гена GALT; соответственно образцы крови собирали у каждого пациента в пробирку, содержащую этилендиаминтетрауксусную кислоту. Геномную дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) экстрагировали из лейкоцитов периферической крови с помощью набора для выделения геномной ДНК (Add Bio Inc., Корея) в соответствии с процедурой производителя. Для секвенирования гена GALT было разработано восемь пар праймеров, охватывающих все 11 экзонов гена (Таблица 1).

Продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР) секвенировали методом секвенирования Сэнгера в автоматической системе секвенирования ABI 7500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), Фостер-Сити, Калифорния, США). Результаты исследовали с использованием программного обеспечения FinchTV (версия: 1.4.0; Geospiza, Сизтл, Вашингтон, США). Результаты секвенирования сравнивали с референсной последовательностью в базе данных GenBank.

### *Результаты и их обсуждение*

В городе Баку при анализе крови ребенка 2008 года рождения на фильтровальной бумаге получены следующие результаты. Анализ был сдан 3 июня 2019 г в Баку. У новорожденного выявлено патогенные мутации. GALTc.563 A>G (p.Gln 188 Arg).

Замена A>G произошла в нуклеотиде 563 экзона 6 гена GALT. В этой мутации аминокислота глицин была заменена аминокислотой аргинин в 188 аминокислотной позиции белка. Это была точечная мутация, вызванная заменой одного нуклеотида. Его цитогенетическая локализация — в 3 субсегменте 13-го сегмента малого плеча 9 хромосомы. Мутация произошла в нуклеотиде 34648170 9-й хромосомы. Это патогенная мутация. Тип наследования гетерозиготный A>G.

У новорожденного в г. Баку выявлено патогенные мутация GALTc.563 A>G (p.Gln 188 Arg). Кроме гена GALT, у больного обнаружены гетерозиготная форма ABCC2 гемизиготная форма гена IDS.

Таблица 2

ГЕТЕРОЗИГОТНАЯ ФОРМА ABCC2 ГЕМИЗИГОТНАЯ ФОРМА ГЕНА IDS

<i>Фермент</i>	<i>Эффект</i>	<i>Эталон</i>	<i>Интерпритация</i>	<i>Метод</i>
iduronate-2-sulfatase	< 0,8 (LOD) $\mu\text{mol/L/h}$	$\geq 5,6 \mu\text{mol/L/h}$	pathologic	fluorimetry

LOD = limit of detection

Флуориметрический анализ представляет собой аналитический метод с чувствительностью почти 100% и специфичностью 96%. Другими словами, он не так специфичен, как ферментативное тестирование в препаратах лейкоцитов. Поэтому всегда есть независимый подтверждающий тест, т.е. генетическое тестирование или специфический биомаркер обязательный анализ. Обнаружена мутация.

### *Вывод*

Впервые проведен молекулярно-генетический анализ гена GALT наследственного заболевания галактоземии в Азербайджанской Республике и идентификацию положения гена GALT c.563 A>G (p.Gln 188 Arg). Анализ показал исключительно редкий характер указанного заболевания у населения страны.

Таблица 3

ПОКАЗАТЕЛИ МУТАЦИИ

Ген	Вариант	Замена аминокислот	SNP	Зиготность	Параметры*	Частота аллелей**	Тип и классификация***
ABC C2	NM_000392.3:c.1834 C>T	p.(Arg612Trp)	N/A	heterozygous	PolyPhen: Probably damaging Align-GVGD: 41 C65 SIFT: 1000 G: Deleterious MutationTaste 7 r: DiseaseCentom causing Conservation_0.00006 nt: Moderate 6 Conservation_aa: high	gnomAD: 0.00000 ESP: (class 3) G: 0.00007	Missense Uncertain significance (class 3)
GALT A>G	NM_000155.2:c.563 A>G	p.(Gln188Arg)	rs75391579	heterozygous	PolyPhen: Probably damaging Align-GVGD: C35 SIFT: 0.0021 Deleterious MutationTaste 0.00060 r: DiseaseCentom causing Conservation_0.0012 nt: high Conservation_aa: high 2/2 likely splice effect	gnomAD: 0.0014 ESP: G: 1000 G: 0.00060	Missense Pathogenic (class 1)
IDS del	NM_000202.5:c.1215 del	p.(Leu406Phefs*34)	N/A	hemizygous	PolyPhen: N/A Align-GVGD: N/A SIFT: N/A MutationTaste D r: N/A	gnomAD: N/A ESP: 1000 G: N/A Centom	Frameshift Pathogenic (class 1)

Список литературы:

1. Succio, M., Sacchetti, R., Rossi, A., Parenti, G., & Ruoppolo, M. Galactosemia: Biochemistry, molecular genetics, newborn screening, and treatment // *Biomolecules*. 2022. V. 12. №7. P. 968. <https://doi.org/10.3390/biom12070968>
2. Daenzer J. M. I., Fridovich-Keil J. L. *Drosophila melanogaster* models of galactosemia // *Current topics in developmental biology*. 2017. V. 121. P. 377-395. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.07.009>
3. Ramani P. K., Arya K. Galactokinase Deficiency // *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing, 2022.
4. Badiu Tişa I., Achim A. C., Cozma-Petruţ A. The Importance of Neonatal Screening for Galactosemia // *Nutrients*. 2022. V. 15. №1. P. 10. <https://doi.org/10.3390/nu15010010>

5. Nyhan W. L., Hoffmann G. F. Atlas of inherited metabolic diseases. CRC Press, 2020.
6. Mitchel M. W., Moreno-De-Luca D., Myers S. M., Levy R. V., Turner S., Ledbetter D. H., Martin C. L. 17q12 recurrent deletion syndrome // GeneReviews®[Internet]. 2020.
7. García A., Combarros O., Calleja J., Berciano J. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with 17p duplication in infancy and early childhood: a longitudinal clinical and electrophysiologic study // Neurology. 1998. V. 50. №4. P. 1061-1067. <https://doi.org/10.1212/WNL.50.4.1061>
8. Rodan L. H., Qi W., Ducker G. S., Demirbas D., Laine R., Yang E., Udn U. D. N. 5, 10-methenyltetrahydrofolate synthetase deficiency causes a neurometabolic disorder associated with microcephaly, epilepsy, and cerebral hypomyelination // Molecular genetics and metabolism. 2018. V. 125. №1-2. P. 118-126. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.06.006>
9. Roehlen N., Hilger H., Stock F., Gläser B., Guhl J., Schmitt-Graeff A., Laubner K. 17q12 deletion syndrome as a rare cause for diabetes mellitus type MODY5 //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2018. V. 103. №10. P. 3601-3610. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00955>
10. Sperling O., De Vries A., Seegmiller J. E. Inborn errors of metabolism in man. S. Karger, 1978. V. 9.
11. Stanbury J. B. Metabolic basis of inherited disease. McGraw-Hill, 1983.
12. Berry G. T. Classic galactosemia and clinical variant galactosemia. 2021.
13. Bosch A. M. Classical galactosaemia revisited // Journal of Inherited Metabolic Disease: Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. 2006. V. 29. №4. P. 516-525. <https://doi.org/10.1007/s10545-006-0382-0>
14. Bosch A. M., Bakker H. D., Van Gennip A. H., Van Kempen J. V., Wanders R. J. A., Wijburg F. A. Clinical features of galactokinase deficiency: a review of the literature //Journal of inherited metabolic disease. 2003. V. 25. P. 629-634. <https://doi.org/10.1023/A:1022875629436>
15. Jezela-Stanek A., Bauer A., Wertheim-Tysarowska K., Bal J., Rygiel A. M., Sykut-Cegielska J. The genetic basis of classical galactosaemia in Polish patients //Orphanet Journal of Rare Diseases. 2021. V. 16. №1. P. 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13023-021-01869-3>
16. Cerone J., Rios A. Galactosemia. 2019.
17. Нагорнов И. О., Байдакова Г. В., Зинченко Р. А., Сайдаева Д. Х., Галушкин А. С., Нагорнова Т. С., Захарова Е. Ю. Особенности спектра мутаций при болезни Краббе в Российской Федерации // Медицинская генетика. 2021. Т. 20. №5. С. 41-47.

#### References:

1. Succoio, M., Sacchetti, R., Rossi, A., Parenti, G., & Ruoppolo, M. (2022). Galactosemia: Biochemistry, molecular genetics, newborn screening, and treatment. *Biomolecules*, 12(7), 968. <https://doi.org/10.3390/biom12070968>
2. Daenzer, J. M., & Fridovich-Keil, J. L. (2017). Drosophila melanogaster models of galactosemia. *Current topics in developmental biology*, 121, 377-395. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.07.009>
3. Ramani, P. K., & Arya, K. (2022). Galactokinase Deficiency. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
4. Badiu Tişa, I., Achim, A. C., & Cozma-Petruţ, A. (2022). The Importance of Neonatal Screening for Galactosemia. *Nutrients*, 15(1), 10. <https://doi.org/10.3390/nu15010010>
5. Nyhan, W. L., & Hoffmann, G. F. (2020). *Atlas of inherited metabolic diseases*. CRC Press.
6. Mitchel, M. W., Moreno-De-Luca, D., Myers, S. M., Levy, R. V., Turner, S., Ledbetter, D. H., & Martin, C. L. (2020). 17q12 recurrent deletion syndrome. *GeneReviews®[Internet]*.

7. García, A., Combarros, O., Calleja, J., & Berciano, J. (1998). Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with 17p duplication in infancy and early childhood: a longitudinal clinical and electrophysiologic study. *Neurology*, 50(4), 1061-1067. <https://doi.org/10.1212/WNL.50.4.1061>
8. Rodan, L. H., Qi, W., Ducker, G. S., Demirbas, D., Laine, R., Yang, E., ... & Udn, U. D. N. (2018). 5, 10-methenyltetrahydrofolate synthetase deficiency causes a neurometabolic disorder associated with microcephaly, epilepsy, and cerebral hypomyelination. *Molecular genetics and metabolism*, 125(1-2), 118-126. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.06.006>
9. Roehlen, N., Hilger, H., Stock, F., Gläser, B., Guhl, J., Schmitt-Graeff, A., ... & Laubner, K. (2018). 17q12 deletion syndrome as a rare cause for diabetes mellitus type MODY5. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 103(10), 3601-3610. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00955>
10. Sperling, O., De Vries, A., & Seegmiller, J. E. (1978). *Inborn errors of metabolism in man* (Vol. 9). S. Karger.
11. Stanbury, J. B. (1983). *Metabolic basis of inherited disease*. McGraw-Hill.
12. Berry, G. T. (2021). Classic galactosemia and clinical variant galactosemia.
13. Bosch, A. M. (2006). Classical galactosaemia revisited. *Journal of Inherited Metabolic Disease: Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism*, 29(4), 516-525. <https://doi.org/10.1007/s10545-006-0382-0>
14. Bosch, A. M., Bakker, H. D., Van Gennip, A. H., Van Kempen, J. V., Wanders, R. J. A., & Wijburg, F. A. (2003). Clinical features of galactokinase deficiency: a review of the literature. *Journal of inherited metabolic disease*, 25, 629-634. <https://doi.org/10.1023/A:1022875629436>
15. Jezela-Stanek, A., Bauer, A., Wertheim-Tysarowska, K., Bal, J., Rygiel, A. M., & Sykut-Cegielska, J. (2021). The genetic basis of classical galactosaemia in Polish patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13023-021-01869-3>
16. Cerone, J., & Rios, A. (2019). Galactosemia.
17. Nagornov, I. O., Baidakova, G. V., Zinchenko, R. A., Saidaeva, D. Kh., Galushkin, A. S., Nagornova, T. S., ... & Zakharova, E. Yu. (2021). Osobennosti spektra mutatsii pri bolezni Krabbe v Rossiiskoi Federatsii. *Meditinskaya genetika*, 20(5), 41-47. (in Russian).

Работа поступила  
в редакцию 30.03.2023 г.

Принята к публикации  
07.04.2023 г.

Ссылка для цитирования:

Гаджиева Н. М. Молекулярная основа галактоземии // Бюллетень науки и практики. 2023. Т. 9. №5. С. 371-377. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/90/45>

Cite as (APA):

Gajiyeva, N. (2023). Molecular Basis of Galactosemia. *Bulletin of Science and Practice*, 9(5), 371-377. (in Russian). <https://doi.org/10.33619/2414-2948/90/45>