

ANTALYA İL MERKEZİNDE PİRÜVAT KİNAZ YETMEZLİĞİ PREVALANSI ve ENZİMİN NORMAL DEĞERLERİ

Uzmanlık Tezi

T860/11-1

Dr.Hasan AKIN

Danışman Öğretim Üyesi

Prof.Dr.T.Aslan AKSU

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu
tarafından desteklenmiştir.

(Proje No : 91.02.0103.06)

(Tezinden, kaynakça gösterilerek yararlanılabilir.)

Antalya , 1994

İçindekiler

	<u>Sayfa No</u>
Genel Bilgiler	1 - 2
Giriş ve Amaç	3 - 17
Gereç ve Yöntem	18 - 32
Bulgular	33 - 46
Tartışma	47 - 62
Özet	63
Kısaltmalar	65
Kaynaklar	66 - 77

GİRİŞ ve AMAÇ

Eritrositler, nükleus mitokondri ve ribozom gibi çok önemli üç hücre organeline sahip bulunmadıkları için oksidatif fosforilasyon, Krebs siklusu, protein ve lipid sentezi gibi enzimatik mekanizmalardan yoksundurlar. Eritrositlerin yaşamları için gerekli enerji yalnızca anaerobik glikoliz ile (Embden-Meyerhof yolu) sağlanır(1,2,6). Olgun eritrosit 120 günlük yaşam süresi boyunca, yapısı ve fonksiyonları için gerekli protein ve lipid içeriklerini korumak zorundadır. Bu içerikler anaerobik glikolitik yolun enzimleri, eritrosit membranını oluşturan lipoprotein kompleksi ve hemoglobindir (1,2,3,4).

Bu içeriklerin yapılarını ve fonksiyonlarını yitirmelerine neden olabilen en önemli faktör eritrositlerin otooksidasyonudur(2,3,4). Yüksek oksidasyon potansiyeline sahip eritrositlerin otooksidasyondan korunmaları glukozun Heksoz Monofosfat (HMP) şantı üzerinden yıkılması ile sağlanırken, ATPaz'a bağımlı katyon pompası ve eritrositlerin yaşamları için gerekli enerji, anaerobik glikoliz ile temin edilmektedir (1,2,3,4,5,6).

Pirüvat kinazın (PK) metabolik önemi, eritrositlerin yaşamları için gerekli olan ATP'nin üretilmesinde rol alması ve glikolizin regülasyonunda hız kısıtlayıcı bir enzim olarak görev yapmasından kaynaklanır (4,5,6,7).

PK'nın kalıtsal ve edinsel metabolik hatalar sonucu aktivite göstermemesi veya çok az aktivite göstermesi, PK yetmezliği olarak bilinen anormal özellikte mutantların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (3,6,8,9,10,11).

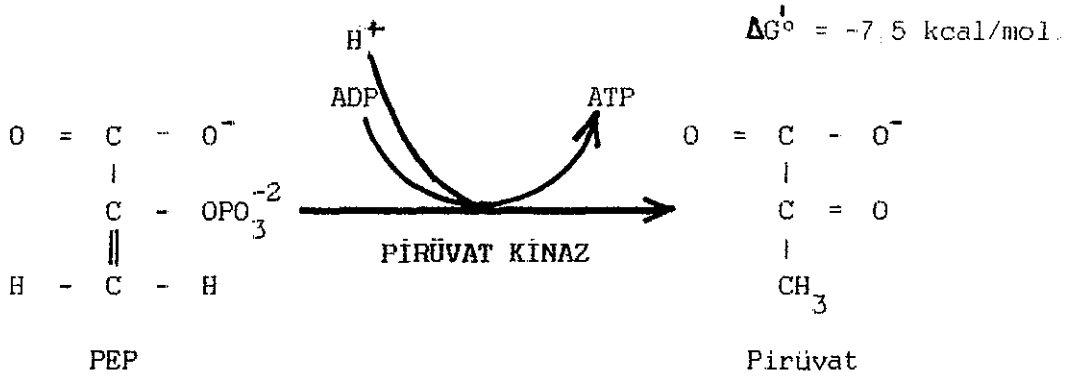
Dünyada oldukça yaygın ve gerektiğinde ölümcül olabilen G-6-PD yetmezliğinden sonra ikinci sıklıkta PK yetmezliği görülmektedir (1,3,6,10). Ayrıca konjenital non-sferositik hemolitik anemiye neden olabilen anaerobik glikolitik yolun enzimopatileri içinde PK yetmezliği % 95 oranında sorumlu tutulmaktadır (1,6).

Antalya'da yaşayan popülasyonda G-6-PD ve hemoglobinopatiler gibi hematolojik kalıtsal hastalıkların frekansının yüksek olması (12,13), buna ilaveten akraba evliliklerinin oranının yüksekliği (14) dikkate alınarak, **"Antalya il merkezinde pirüvat kinaz yetmezliği prevalansı ve enzimin normal değerleri"** konulu ve Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenen bir araştırma projesi (Proje No : 91.02.0103.06) planlanmıştır. Projenin tamamını kapsayan bu çalışmada ;

- a - Antalya il merkezinde PK yetmezliği prevalansının ve enzimin normal değerlerinin belirlenmesi,
- b - Yetmezlikli odakların ve risk altındaki grupların belirlenmesi,
- c - Toplum taramasında elde edilecek sonuçlara göre, PK yetmezliğinin Antalya ili için önemli bir sağlık sorunu olup olmadığının açıklığa kavuşturulması,
- d - PK yetmezliği prevalansının yüksek bulunması durumunda, gerekli kurumlara bilgi verilerek, gerekli tedbirlerin alınmasına katkıda bulunulması.
- e - Yetmezlikli bireylerin eğitilmesi,
- f - Antalya orijinli yetmezlikli bireylerin PK kantitatif aktiviteleri ölçülerek, yöremizde PK yetmezliğinin biyokimyasal görünümü için ileriye yönelik çalışmalara ışık tutulması amaçlanmıştır.

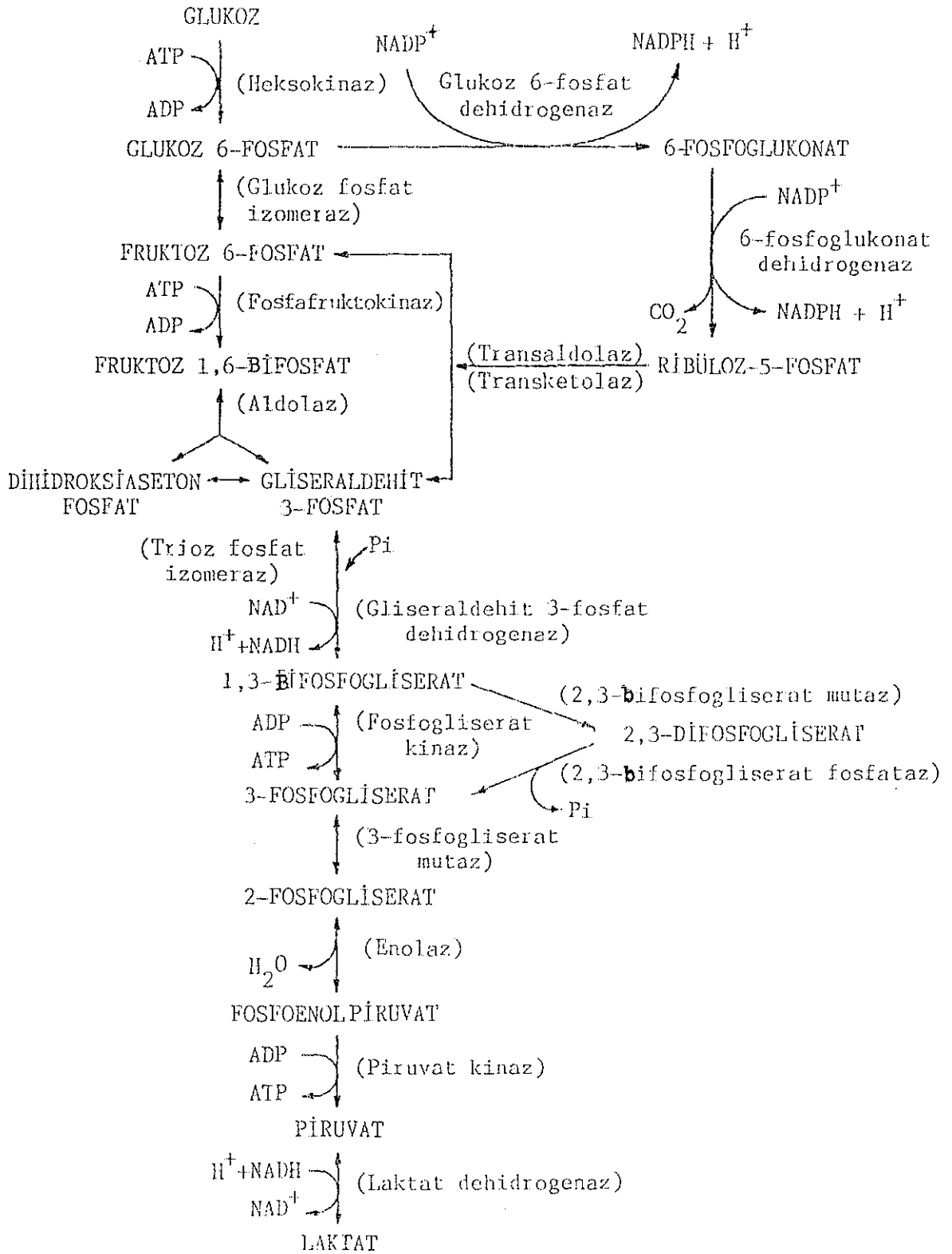
GENEL BİLGİLER

Pirüvat kinaz (AIP : pyruvate phosphotransferase E.C.2.7.1.40) şekil 1'de görüldüğü gibi Embden-Meyerhof şantının son kademesinde görev yapar. Bu enzim anaerobik glikolizin regülasyonundaki allosterik enzimlerden biridir. Pirüvat kinaz PEP'in pirüvata, ADP'nin AIP'ye dönüşümünü katalizlemektedir (1,3,4,6). PEP'in 3.karbonuna bir H^+ bağlanması ortamın pH'ının yükselmesine neden olmaktadır (4). Bu pH değişiminden yararlanılarak potansiyometrik yöntemle PK aktivitesi tayin edilebilmektedir (15).



PK'nın katalizlediği bu reaksiyon egzergonik özellikte olduğundan fizyolojik olarak irreversibildir (4,5). Anaerobik glikoliz 6C'lu ve 3C'lu olmak üzere iki safhada gerçekleşmektedir (Şekil 1). Tablo I'de AIP'nin yıkımı ve sentezini, Tablo II'de anaerobik glikolizde rol alan enzimatik reaksiyonları görmekteyiz (4).

G6P, glukoz fosfat izomeras ve G-6-PD enzimlerinin ortak substratıdır (Şekil 1). Normal şartlarda eritrositler G6P'nin % 90'ını anaerobik glikolizde, çokaz miktarını ise HMP şantında kullanırlar (3,4,5).



Şekil 1 : Glikoliz ve HMP şantı ile bağlantısı (Tietz'den).

		ATP değişimi/ Mol Glikoz
Glukoz	----> glukoz-6-fosfat	-1
Fruktoz-6-fosfat	----> fruktoz-1,6-bifosfat	-1
2 x 1,3-bifosfoglisierat	----> 2 x 3-fosfoglisierat	+2
2 x fosfoenolpirüvat	----> 2 x pirüvat	+2
NET DEĞİŞİM		+2

TABLO I : Glikolizde ATP Yıkımı ve Sentezi

Sıra	Reaksiyon	E n z i m	* AG°'	* AG
1	Glukoz + ATP --> G-6-P + ADP + H ⁺	Hekzokinaz	- 4,0	- 8,0
2	G-6-P ---> fruktoz-6-fosfat	Fosfoglukoz izomeraz	+ 0,4	- 0,6
3	Fruktoz-6-fosfat+ATP-->Fruktoz-1,6 bifosfat+ADP+H ⁺	Fosfofruk- tokinaz	- 3,4	- 5,3
4	Fruktoz-1,6-bifosfat-->dihidroksi- asetonfosfat+gliseraldehid-3-fosfat	Aldolaz	+ 5,7	- 0,3
5	Dihidroksiasetonfosfat --> glise- raldehid-3-fosfat	Triozfosfat izomeraz	+ 1,8	+ 0,6
6	Gliseraldahid-3-fosfat+Pi+NAD ⁺ --> 1,3 bifosfoglisierat+NADH+H ⁺	Gliseralde- hid-3fosfat dehidrogenaz	+ 1,5	- 0,4
7	1,3-Bifosfoglisierat + ADP ---> 3- fosfoglisierat + ATP	Fosfogli- sierat kinaz	- 4,5	+ 0,3
8	3-Fosfoglisierat--> 2-fosfoglisierat	Fosfoglise- rat mutaz	+ 1,1	+ 0,2
9	2-fosfoglisierat --> Fosfoenolpi- rüvat + H ₂ O	Enolaz	+ 0,4	- 0,8
10	Fosfoenolpirüvat + ADP + H ⁺ ---> pirüvat + ATP	Pirüvat kinaz	- 7,5	- 4,0

TABLO II : Glikolizdeki Enzimatik Reaksiyon Sırası.

* ΔG° ve ΔG kcal/mol olarak ifade edilmektedir.

ΔG° , tipik fizyolojik şartlardaki serbest enerji değişimi ($C = 1$ mol/L, $pH = 7$, $25^{\circ}C$, 1 atmosfer basınçta)

ΔG , reaksiyon sırasındaki serbest enerji değişimi (4,16).

Glikolizde rol alan allosterik enzimler hekzokinaz, fosfofrüktokinaz ve pirüvat kinazdır (3,4,5). PK, bu metabolik yolun sonuncu allosterik enzimidir. Allosterik enzimlerde birden fazla substrat bağlama bölgesi (n) bulunmaktadır. İlk bağlanan substrata göre enzimin diğer substrat bağlayan bölgelerine bağlanacak substratlara karşı enzimin afinitesi değişmektedir. ($K_{0.5S}$ değeri değişmektedir) (3,4,5,10).

nH (Hill coefficienti) kooperasyon parametresi olarak kabul edilir (10). Michaelis-Menten kinetiği gösteren enzimlerde nH değeri 1'e eşittir (5,10,95). Yani enzime substrat bağlanması ile enzimin substratına karşı afinitesi değişmez. Allosterik enzimlerde nH değeri 1'den büyük olmaktadır. Bu durumda enzim ve substrat arasında pozitif kooperasyon kinetiği söz konusudur. nH değeri 1'e eşit olduğunda nonkooperasyon, 1'den küçük olduğunda ise negatif kooperasyon kinetiği gerçekleşmektedir (10). PK varyantlarında enzimin allosterik özelliklerinin değişmesi sonucu nonkooperasyon veya negatif kooperasyon davranışı gerçekleşmektedir (10,11, 17,18). Michaelis-Menten eğrisinin sigmoidal yerine hiperbolik şeklinde olması, allosterik özelliklerin değiştiğini kanıtlamaktadır (10,11,19,51). PK yetmezlikli heterozigot olgularda normal ve mutant enzim karışımından dolayı miks kooperasyon kinetiği gerçekleşmektedir (10,11, 19). Miks kooperasyonda, düşük

substrat konsantrasyonlarında pozitif, yüksek substrat konsantrasyonlarında negatif kooperasyon kinetiği gerçekleşir (10,19).

PK yetmezliği, normal enzimin yokluğu veya sentezinin azalması değil, varyant enzimin yapısal olarak anormal oluşudur. Hemoglobinopatilerde olduğu gibi PK varyantlarında da genellikle monomeri oluşturan aminoasitlerden birinin nokta mutasyonla yer değiştirmesi sonucu, enzimin fiziksel özellikleri, biyolojik aktivite ve klinik görünümünde belirgin farklılıklar ortaya çıkmaktadır (20,21,22).

PK'nın Yapısal ve Kinetik Özellikleri :

PK, aminoasit dizilişi birbirine benzeyen 4 monomerdan oluşan bir allosterik enzimdir. NH_2 ucunda pro-Lys-pro, karboksil ucunda valin-prolin aminoasitleri bulunur (23). Son çalışmalar R-PK'nın molekül ağırlığının 240.000 Dalton olduğunu göstermektedir. Enzimin aktif formu tetramer yapısındadır (23,24,25,28,48).

4 tip PK izoenzimi vardır ;

M_1 = İskelet kası, kalp ve beyine spesifik,

M_2 = Özellikle lokosit, trombosit, böbrek adipoz doku ve bazı tümörlerde izole edilmiştir,

R = Eritrositlere spesifik,

L = Karaciğer, ince bağırsak ve renal kortekse spesifik (23,24,25,26,27,28,29,48).

M_1 -PK PEP'e karşı hiperbolik kinetik (Michaelis-Menten kinetiği) gösterir. F-1,6-BP ile etkileşmez (1,26,27,28). L ve R-PK PEP ile reaksiyonunda kooperasyon kinetiği gösterirler. F-1,6-BP L ve R-PK'nın allosterik aktivatörüdür

(1,10,26). L ve R-PK'nın kinetik, elektroforetik ve immünolojik özellikleri M_1 ve M_2 -PK'dan farklı olduğu bildirilmiştir (1,26,28,29,30).

M_1 ve M_2 -PK monomerlerinin intrinsek kinaz aktivitesine sahip olmasıyla birlikte sitozolik tiroid hormon bağlayan proteine (TBG) identik olduğu, fakat tetramerik M_1 ve M_2 PK'nın tiroid hormon bağlama aktivitesinden yoksun olduğu bildirilmiştir (31,32,33).

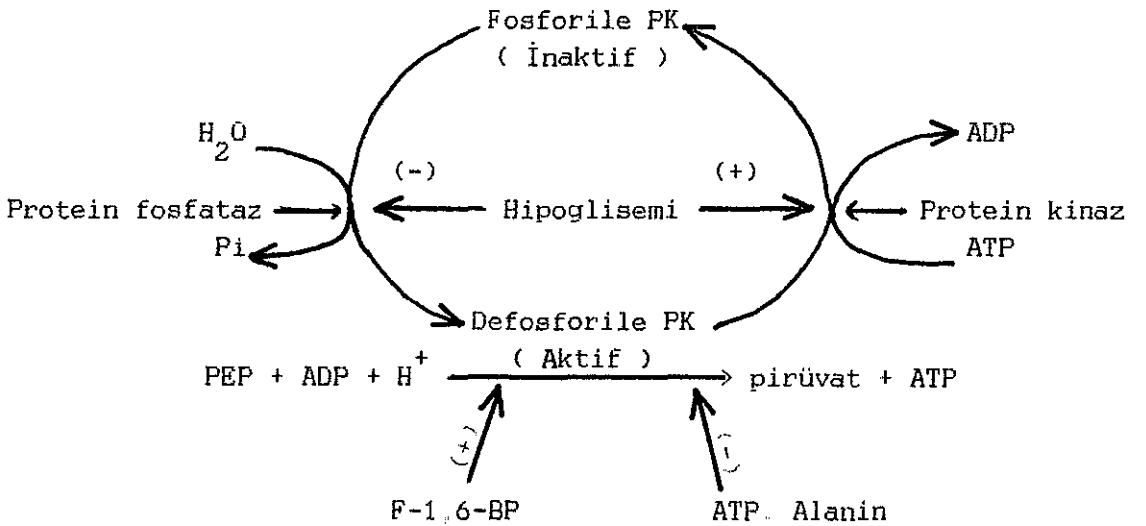
Proeritroblast devrede PK izoenzimleri arasında M_2 -PK dominantdır. Eritrosit maturasyonu ile M_2 tip azalarak L subüniteleri artmaktadır (34), (bazofilik ve polikromatik eritroblastlarda). Matür hücreler farklı 2 tip L subüniteleri içerirler (L ve L'). Bunlar tek bir genle kodlanmaktadır, ancak mRNA'ları farklıdır (1,35), genç eritrositlerde 4 tane L' subünitesi ihtiva eden R_1 izoenzimi, matür hücrelerde R_2 ile yer değiştirmesi sonucu heterotetramer yapıdaki R_1R_2 ($L'L_2$) izoenzimine dönüşmektedir (1,34,36). İn vitro şartlarda R_1 ve R_2 izoenzimleri proteolize uğratılarak L_4 izoenzimine dönüştüğü gözlenmiştir (1,36,37).

M_1 ve M_2 -PK izoenzimleri farklı genler tarafından kodlanmaktadır (26,29,46). M_1 -PK hiperbolik kinetik gösterir, dolayısıyla F-1,6-BP ile aktivitesinde artış olmaz. M_2 -PK, R-PK gibi allosterik özellik gösterir ve F-1,6-BP ile aktivitesi artmaktadır (1,23,38).

L-PK'nın aktivitesi, karbonhidrat'dan zengin bir diyet alındığında artarken, açlık ve diyabette azalmaktadır (5,50), enzimin sentesi glukokortikoidler ve tiroid hormonu tarafından arttırılmaktadır (39,40,41). AMP, F-6-P, F-1,6-BP

enzimin allosterik aktivatorleridir (4,6,38,47,49,51). Sitrat (yağ asitleri, keton cisimcikleri) AIP, glukagon (cAMP), alanin enzimin inhibitörleridir (4,5). İnsülin hormonu glukoz ile birlikte gen transkripsiyonunu arttırarak enzimin aktivitesini arttırmaktadır (39,40,50).

PK, protein kinaz'la fosforile edildiğinde enzimin katalitik aktivitesi azalırken, defosforile formunda aktivite artmaktadır (Şekil 2) (4,5,42,43,44). Mieskes ve arkadaşları, glikolizde rol alan anahtar enzimlerin cAMP'a bağımlı protein kinaz ile fosforile edildiği gibi CaM-PK tarafından da fosforile edilebildiklerini kanıtlamışlardır (42). Aynı araştırmacılar, L-PK'nın, bu iki protein kinazla beraber ya da herhangi birisiyle reaksiyona sokulduğunda fosforilasyonun 4 mol fosfat/mol tetramer olduğunu, ayrıca iki protein kinazla fosforile edilen bölgenin identik olduğunu bildirmişlerdir (42).



Şekil 2 : PK'nın enzimatik olarak fosforile ve defosforile edilmesi.

Yapılan pürifikasyon çalışmalarında, R-PK'yı 40.000 kez pürifiye etmek mümkün olmuştur (45). L' subünitesinin mol ağırlığı 63.000, L subünitesinin ise 60.000 Dalton olduğu bildirilmiştir (25,46). R-PK'nın PEP ve ADP substratlarına karşı affinitesi sırasıyla $K_{0.5S} = 0.40-1.20, 0.12-0.22$ mmol/L'dir (10).

L-PK ve R-PK'nın moleküler yapıları birbirine oldukça benzer bulunmuştur, yapılan immunodiffüzyon testlerinde (anti-eritrosit PK serumuyla) iki izoenzim arasında antijenik farkın olmadığı gözlenmiştir (30), bulgular her iki enzimin aynı genle kodlandığını teyid etmektedir (1,26, 35,46).

Lökosit orijinli M_2 -PK ve hiperaktivite gösteren PK yetmezlikli hastaların eritrositlerindeki M_2 -PK'nın kinetik sonuçları mukayese edildiğinde birbirine oldukça benzer bulunmuştur (26). F-1,6-BP ile, her iki enzimin PEP'e afinitesi artmıştır (hiperbolik kinetik), normalde M_2 -PK'nın PEP ile reaksiyonunda sigmoidal kinetik gözlenmektedir, eritrosit orijinli M_2 -PK'nın Hill Coefficienti (nH) 1 civarında olmaktadır (26). Her iki M_2 -PK'nın nükleotid spesifitesi sırasıyla, ADP > GDP > UDP > CDP şeklindedir. Termostabilite değerleri ise birbirine oldukça yakın değerlerde bulunmuştur (60 dak. 50°C'de % 56 civarında). Normalde eritrositler M_2 -PK içermezler. Hiperaktivite gösteren hasta bireylerde kompensatuar mekanizmayla M_2 -PK'nın arttığı düşünülmektedir (26,37,52,54,62).

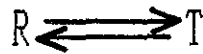
PEP'in artan konsantrasyonlarında pürifiye R-PK sigmoidal kinetik özelliği göstermektedir, F-1,6-BP, enzimin PEP bağlayan bölgelerini direkt etkileyerek sigmoidal eğriyi hiperboliğe dönüştürmektedir (1,24).

ATP, PK'nın kompetitif inhibitörüdür ($K_i = 3,5 \cdot 10^{-4}$ M), fizyolojik ATP konsantrasyonu yaklaşık 1 mmol düzeyindedir, böylece enzimin aktivitesi ATP tarafından önemli derecede inhibe edilmektedir (1,4,5,6,55).

K^+ , Mg^{++} , NH_4^+ , Na^+ enzimin aktivasyonunu arttırmaktadırlar (43,53). Berry ve arkadaşları, PK'nın enzim kinetiğinden yararlanarak serum K^+ değerlerini enzimatik olarak tayin edebildiklerini bildirmişlerdir (53).

Bir takım faktörler (sıcaklık, pH, üre, uzun süre bekletilme) enzimin post-translasyonel modifikasyonuna neden olmaktadır, bu faktörler F-1,6-BP'a duyarlı sigmoidal kinetik ve hiperbolik kinetik arasındaki değişimleri etkilemektedirler, in vitro deneylerde, enzimin yaşlanması FBP'ye duyarlı konformasyona geçişi kolaylaştırmaktadır (1,25,37,54).

Üre, pH=8.0 ($0^\circ C$) de enzimin aktivitesini azaltmaktadır, ayrıca pH=5,9 ve $25^\circ C$ 'de enzim üreye karşı stabil kalmaktadır, pH=5,9 ve $25^\circ C$ 'de F-1,6-BP enzimi stimüle etmez, fakat pH=5,9 ve $0^\circ C$ 'de stimülasyon gerçekleşmektedir. pH=8,2 ($5^\circ C$)'de, pH=8,2 ($25^\circ C$)'ye göre nH değerinde biraz yükselme olmaktadır. Bu bulgular enzimin iki konformasyon yapısında olduğunu kanıtlamaktadır (1,24,25).



$25^\circ C$ 'de ve düşük pH (5,9)'da eşitlik sol tarafa kaymaktadır (hiperbolik kinetik, F-1,6-BP tarafından stimülasyon gerçekleşmez), ancak $5^\circ C$ 'de stimülasyon olmasına karşın, hiperbolik kinetik devam etmektedir.

Eşitliğin üzerine ısıнын etkisi, pH etkisinden daha az olduğu anlaşılmaktadır (24,25). Enzimin T formu, üreye karşı R formundan daha labildir. Isının düşmesiyle eşitlik sağa kaymaktadır, pH = 8,2'de, ısı 25°C'den 5°C'ye getirildiğinde nH değeri 1,6'den 2,0'ye yükselmektedir (24,25).

Enzimin tiyol (-SH) gruplarının oksidasyonu ile birlikte kinetik değişimler gözlenmiştir, parachloromercuribenzoate (PCMB) enzimi inhibe etmektedir. İn vitro şartlarda bazı reaktiflerin enzimin tiyol gruplarını modifiye etmesiyle R-PK'nın PEP'e karşı afinitesi arttığı gibi termostabiliteyi de azalttığı bildirilmiştir (6,55,56). Eritrositler okside glutatyona maruz kaldığında ya da uzun süre bekletildiğinde PK'da, yetmezlikli olgularda olduğu gibi kinetik değişiklikler olmaktadır, bu değişiklikler sülfidril reaktifleri ile reversibl olarak normala dönüştüğü gibi, hemolitik anemili yetmezlikli hastalardaki kinetik değişimleri de düzeltebileceği bildirilmiştir (56,57). Yapılan çalışmalarda, sülfidril gruplarının enzimin PEP bağlama bölgesinde bulunduklarını düşündürmektedir (57,58). Bazı mutantlarda ise tiyol gruplarının oksidasyonu kinetik değişimlerin nedeni olmadığı bildirilmiştir (6,59).

İlk kez 1961'de Valentine ve arkadaşları tarafından bildirilen PK yetmezliğinde, yeterli ATP sentezi yapılamayacak ve glikoliz ara metabolitleri birikecektir, 2,3-BPG'nın artması Hb'nin O_2 'e karşı afinitesinin azalmasına neden olup, böylece dokulara O_2 salınımı kolaylaşacaktır (1,3,6). Glikoliz ara metabolitlerinden F-1,6-BP normal konsantrasyonlarda, G-6P 0,5 mmol düzeyde, pürifiye PK'ı aktivite ederken, diğer metabolitlerin etkisi görülmemiştir

(6,19,24). Trioz fosfatların aşırı biriktiği durumlarda dışardan pirüvat ya da diğer oksidan maddeler verildiğinde bu metabolitler normale dönmektedir (61). NAD^+ ve NADH miktarları PK yetmezlikli eritrositlerde düşük olmaktadır, taze hücrelerde NAD^+ konsantrasyonu normaldir, in vitro bekletilmekle hızlı bir şekilde NAD^+ miktarı azalmaktadır (1,61), PK yetmezlikli eritrositlerde 2,3-BPG normalin 3 katına çıkmaktadır, retikülosit sayısı bu hastalarda % 25'e yükseldiğinde ATP normal düzeyde tutulabilmektedir (1,6,10).

PK yetmezlikli eritrositler siyanür ile inkübe edildiğinde ATP sentezi azalmaktadır, oysa kontrol retikülositlerinde AIP sentezi gerçekleşmektedir. Fakat flor ilavesiyle normal retikülositlerde ATP sentezi azalmaktadır (1,63).

Yapılan ferrokinetik çalışmalarda PK yetmezlikli bireylerde hemolizin asıl nedeninin, yeni sentezlenen eritrositlerin karaciğer ve dalakta parçalanması sonucu olduğunu göstermektedir (1,64), kemik iliğinden salınan retikülositler derhal dalakta yıkılmaktadır, bu durum splenektomi yapılan hastalarda paradoksal retikülositozun nedenini açıklamaktadır (1,6,10).

PK Yetmezliğinin Genetiği

Otozomal resesif kalıtsal özellik gösteren PK yetmezliği, her iki cinsten eşit sıklıkta görülmektedir (1,6,8,10). Miwa ve arkadaşları (65), çeşitli lösemi ve prelösemili olgularda edinsel PK yetmezliği görüldüğünü bildirirken, Etiemble ve arkadaşları ise (66), kemoterapi sonrası birçok moleküler mekanizmaların PK yetmezliğine neden olabileceğini

bildirmişlerdir.

PK yetmezliğinin kalıtsal geçişi 3 şekilde olmaktadır ;

- 1- Heterozigot yetmezlik : Normal ve mutant PK allelinin neden olduğu kalıtsal yetmezlik.
- 2- Compound-Heterozigot yetmezlik : Ebeveynleri arasında kanbağı bulunmayan ve farklı iki mutant PK alleli taşıyan olgulardaki kalıtsal yetmezlik.
- 3- Homozigot yetmezlik : Ebeveynleri arasında kanbağı bulunan ve aynı özellikte iki mutant PK alleli taşıyan olgulardaki kalıtsal yetmezlik (6,10,62,67,68).

Dünyada yaklaşık 400'ün üzerinde yetmezlikli hasta vakaları bildirilmiştir. NSHA'ya neden olan eritrosit enzimopatileri içinde PK yetmezliği, G-6-PD yetmezliğinden sonra 2. sıklıkta görülmektedir (1,3,6,8,10).

Vakaların çoğu, Kuzey Avrupa ülkelerinde yaşayanlarda bildirilmiştir, sporadik vakalara Amerika'da yaşayan zencilerde, Japonya, Çin, Meksika, Güney Avrupa ülkelerinde ve Suriye ile Suudi Arabistan halkında rastlanmaktadır (1,3,6).

Almanya'da sağlıklı gençlerde yapılan bir çalışmada, heterozigot PK yetmezliği prevalansı % 1,4, Hong Kong'da % 3,7, Kanada'nın Quebec bölgesinde %1,22 bulunmuştur (1,69,70).

İspanya'da yapılan epidemiyolojik çalışmada G-6-PD yetmezliği erkeklerde % 0,79, bayanlarda % 0, PK yetmezliği ise % 0,24 bulunmuştur (71). Suudi Arabistan'ın değişik bölgelerinde yapılan çalışmalarda PK yetmezliği prevalansı % 0,8-6,6 arasında tesbit edilmiştir (72).

Daha sonraki yıllarda Suudi Arabistan'ın doğu bölgesinde yeni doğan 513 bebeğin kordon kanında floresans

spot testi ile heterozigot PK yetmezliği prevalansı % 3,12 bulunmuştur (73).

Literatür taramasında bugüne kadar Türkiye'nin herhangi bir bölgesinde epidemiyolojik PK prevalans çalışmasına rastlanılamadı.

Yetmezlikli Eritrositlerin Biyokimyasal Defekti

ATP konsantrasyonu normal düzeyde tutulamadığı için ATP'ye bağımlı katyon pompası eritrosit içine yeterli K^+ 'u pompalayamaz, PK yetmezlikli eritrositlerde net K^+ kaybı 0,2-6,3 mEq/1Hx1L eritrosit, arasında olmaktadır, bu K^+ kaybı bekletilmekle AIP azalması sonucu 20 mEq'a yükselmektedir. Böylece net katyon kaybıyla birlikte ozmotik basınç düşmesiyle, hücre volümü azalacaktır, eritrosit membranlarında dikensi çıkıntılar meydana gelecek, ayrıca vizkositenin artmasıyla eritrositlerde erken parçalanma meydana gelecektir, ayrıca enzimin katalitik etkinliğinin bozulmasıyla, eritrositlerde hızlı parçalanma meydana geldiği bildirilmiştir (1,74,75,76,77).

Fizyolojik şartlarda eritrosit PK'nın yaklaşık % 4'ü hücre membranlarına bağlıdır. Bu bağlı PK, AIPaz ve diğer ATP tüketen membran sistemlerinin ATP ihtiyacının karşılanmasında önemli rol oynamaktadır. PK yetmezlikli olgularda hemolizin şiddeti, membrana bağlı mutant PK oranıyla ilişkilidir (77,78,79,80).

PK Yetmezliğinin Kliniği

Bazı istisnai vakalar haricinde heterozigot bireylerde klinik ve hematolojik bulgular normaldir. Homozigotlarda olduğu gibi Compound-heterozigotlarda da aneminin şiddeti farklı derecede olmaktadır (6,8,10).

PK yetmezliği infantlarda KNSHA, çocuk ve erişkinlerde sık aralıklarla kan transfüzyonunu, bazen de splenektomiye gerektirecek derecede kronik hemolitik anemi'ye (hepatosplenomegali, sarılık, retikülosit, safra kesesi taşları) neden olmaktadır (9,60,82). Bildirilen vakaların çoğu süt çocukluğu, çocuk ve erişkin yaşta, kompanse yetmezliklilerde yalnızca sarılık görülmektedir (1,9, 23,84).

Yaşam boyu anemisi olanlarda, infeksiyonları takiben, eritroid serinin hipoplazisi nedeniyle aneminin şiddeti artmaktadır. Kronik bacak ülserleri dışında, hematopoetik sistem haricinde, klinik bulgulara rastlanılmamaktadır (1, 82). Hastaların % 10'unda rastlanılan safra kesesi taşlarına genellikle ilk 8 yaşta rastlanılmaktadır (1,9,23,84).

Periferik yaymada, makrositoz, bazen de akantozis ve iğ şeklinde eritrositlere rastlanılmaktadır, lokosit ve trombositlerin sayı ve morfolojileri normaldir (1).

PK yetmezlikli bireylerde, plazma lipit seviyelerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir, yetmezlikli bireylerde daha öncede belirttiğimiz gibi, splenektomi sonrası paradoksal retikülositoz olmaktadır. Ozmotik fragilite taze ve bekletilmiş eritrositlerde normaldir, otohemoliz artmıştır ve glukoz ilavesiyle düzelmemektedir (1, 6).

Yetmezlikli bireylerde retikülosit sayısı % 25'e yükseldiğinde, eritrositler glukozla inkübe edildiğinde

oksidatif fosforilasyonun inhibe olması sonucu, önemli derecede hemoliz meydana gelmektedir, bu fenomene *Crabtree etkisi* denilmektedir (1).

PK Yetmezliğinin Tanısı

Kalitatif tarama testi olarak Beutler'in (85) floresans spot testi ile yetmezlikli bireyler belirlenir, kesin tanı spektrofotometrik olarak enzim aktivitesinin belirlenmesi ile konulmaktadır. PK aktivitesi normalin % 10 - 30'u arasında olanlar homozigot, normal değerlere göre % 40 - 60 aktivite gösterenler heterozigot PK yetmezlikli kabul edilmektedir (10,11,19,71,72,77,86).

PK Yetmezliğinin Tedavisi

Bilürubin düzeyi yüksek hastalarda kan transfüzyonları yapılmaktadır. Sık sık kan transfüzyonuna ihtiyaç duyan hastalarda splenektomi önerilmektedir (1,9,82,87,96). Şimdilik komplikasyonlarından dolayı kemik iliği transplantasyonları düşünülmemektedir (1,6). Bazı vakalarda riboflavin ve folik asit tedavisinin hematolojik şikayetleri nispeten düzelttiği bildirilmiştir (1,6). PK yetmezlikli hastaların retikülositlerinde oksidatif fosforilasyonla ATP sentezlenmektedir. Aspirin ATP sentesini azaltacağından dolayı bu hastalara gerekmedikçe aspirin verilmemelidir (88,89).

Heterozigot bireylerin aile taraması yapılarak, diğer yetmezlikliler belirlenmeli ve genetik danışmanlık hizmeti verilmelidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, ilgili makamların izni ile, Nisan 1992 - Mart 1994 tarihleri arasında Antalya İl Merkezinde bulunan 1, 2, 3 ve 4 nolu Sağlık Ocaklarına bağlı mahallere ait ev halkı tesbit fişlerinden faydalanılarak yapılan 1/200 oranında sistematik örnekleme yöntemiyle belirlenen 1190 birey üzerinde yapıldı (90).

Çalışmamızın ilk bir ayında kalitatif ve kantitatif enzim tayinleri test edildikten sonra, altı aylık periyodlar halinde sırasıyla 1, 2, 3 ve 4 nolu Sağlık Ocaklarında belirlenen bireyler ile tek tek görüşülerek, sosyal özelliklerine (adı-soyadı, cinsiyeti, yaşı, aile kökeni, akraba evliliği durumu) ve ailede olası PK yetmezliğine yönelik soruları içeren anket formları dolduruldu, ve aynı zamanda bireylerin rızası ile en az 2 ml venöz kan alınarak heparinli tüplere aktarıldı. kullanılan anket formlarının bir örneği ek 1'de sunulmaktadır.

Prensip olarak iki kez arandığı halde adreslerinde bulunamayan 42 birey ve kan vermek istemeyen 65 birey yerine, örnekleme çizelgesinde belirlenen yedek bireylerden numune alındı.

Enzim aktivitesinde kaybın engellenmesi için heparinli tüplere alınan örnekler, test edilene kadar aşırı nakil kutusunda buz içinde muhafaza edildi. Her örneğin bulunduğu tüpe o bireyin anket formundaki kişi sıra numarası yazıldı.

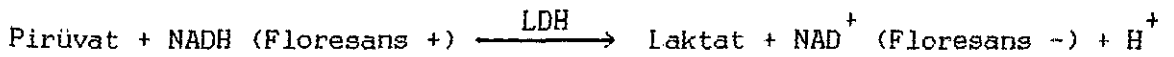
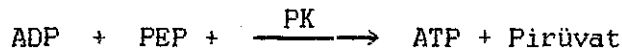
Günde yaklaşık 10-15 arasında toplanan kan örnekleri Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarına getirilerek, mümkün olduğunca aynı gün içinde kalitatif PK tayinleri yapıldı. Kalitatif enzim aktiviteleri normal bulunan bireylerin arasından, sistematik örnekleme yöntemi (90) ile belirlenen örneklerde enzimin normal değerlerini bulmak için, kantitatif enzim tayinleri yapıldı (3,26,86).

Kalitatif PK Tayini

Kalitatif PK ölçümünde Beutler tarafından tanımlanan "Floresans Spot Testi" uygulandı (85).

Prensip :

PK ve LDH'nin birleştirilmiş reaksiyonları sonucu oluşan pirüvatın LDH tarafından laktata indirgenmesiyle birlikte NADH'nin NAD^+ 'a oksitlenmesi oranında filtre kağıdına emdirilmiş reaksiyon karışımı uzun dalga UV ışığı ile aktive edildiğinde NADH'nin verdiği floresansın azalması esasına dayanmaktadır (85).



Ayıracılar

- 1 - PEP, 0,15 M : 40,1 mg Phosphoenolpyruvate Mono (Cyclohexylammonium) salt (Sigma P-3637) tartılarak 1 ml bidistile suda çözüldü.
- 2 - ADP, 0,03 M : 12,8 mg Adenosine Diphosphate Potassium salt (Sigma A-5285) tartılarak 1 ml bidistile suda çözüldü.
- 3 - NADH*, 0,06 M : 44,5 mg redükte β -Nicotinamide Adenozine dipotassium salt (Sigma N-4505) tartılarak 1 ml % 1'lik sodyum bikarbonat (NaHCO_3) çözeltisinde çözüldü.
- 4 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,08 M : 1972 mg magnezyum sulfat $7\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 100 ml distile suda çözüldü.
- 5 - Fosfat tamponu, 0,25 M, pH : 7,4.

K_2HPO_4 anhydrous (Merck) 34,8 g, KH_2PO_4 (Merck) 6,8 g tartılarak 800 ml distile suda çözüldü, pH kontrolü yapılarak, eğer gerekiyorsa 1 M HCl veya 1 M NaOH ile pH : 7,4'e ayarlandıktan sonra distile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

* : NADH stabil olmadığından dolayı (27) % 1'lik NaHCO_3 'da çözüldü, reaksiyon karışımında 0,015 M/L kullanılacağından, konsantrasyon ayarı spektrofotometrede (340 nm'de) molar extinction coefficient'tinden** yararlanarak gerçekleştirildi (27).

** : NADH'in $\epsilon_{340} = 6.3 \cdot 10^3 / \text{mol} \cdot \text{cm}$ 'dir (91).

Gereçler

- 1 - Test tüpü : 8 x 100 ml'lik.
- 2 - Pipet : 20 mikrolitrelik , sahli tipi, 1 ml'lik serolojik.
- 3 - Filtre Kağıdı : Whatman No : 1.
- 4 - Su banyosu : Nüve BM 100 marka.
- 5 - Soğutma santrifüj : Heraeus Christ Minifuge 2 model
- 6 - Hassas terazi : Sartorius 2472 marka.
- 7 - pH metre : Model 407 A, Orion marka.
- 8 - Derin dondurucu: Karteknik marka (- 20°C 'ye inebilen ilave motorlu).
- 9 - Vakum pompası : Beckman model, 260 vacuum pomp.
- 10- Ultraviyole lambası : Model UVSL-25 Mineralight Lamp Multiband, UV-254/366 NM.

Yöntem

a - Reaksiyon karışımının hazırlanışı ;

				<u>Son Konsantrasyon</u>
PEP	0,15	M	0,3 ml	4,5 mM
ADP	0,03	M	1,0 ml	3 mM
NADH	0,015	M	1,0 ml	1,5 mM
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,08	M	1,0 ml	8 mM
Fosfat tamponu	0,25	M	0,5 ml	12,5 mM
pH: 7.4				
Distile su	--		6,2 ml	--

22

25 ml'lik balon joje içinde yukarıdaki şekilde hazırlanan reaksiyon karışımı küçük test tüplerine 0,2 ml hacimde dağıtılarak -20°C'de donduruldu. Reaksiyon karışımı bu ısıda en az 10 gün stabildir (85).

b - Numunenin hazırlanışı ;

2 ml heparinli kan +4°C'de 1500xg/dak 10 dakika santrifüj edilerek plazma ve beyaz hücre tabakası dikkatle aspire edildi, en az 4 kez 10 hacim soğuk izotonik sodyum klorür ile yıkandı (3). Son yıkamadan sonra dipte kalan eritrosit paketinden 20 mikrolitre alınarak 80 mikrolitre izotonik NaCl ile % 20'lik eritrosit süspansiyonu hazırlandı (85), geri kalan eritrosit paketi kantitatif ezim tayinlerinde kullanılmak için buzdolabında 4°C'de saklandı (3,27).

c - Deneyin yapılışı ;

Deney yapılacağı gün çalışılacak örnek sayısı kadar reaksiyon karışımı içeren test tüpü dondurucudan çıkarılarak oda ısısında erimeye bırakıldı. Bu sırada, % 20'lik örnek eritrosit süspansiyonları, test tüpleri ve dikdörtgen şeklinde (3 x 4 cm) kesilmiş filtre kağıtları numaralandırıldı. Reaksiyon karışımları oda ısısına geldikten sonra her bir test tüpüne karışık olan numaralı 20 mikrolitre eritrosit süspansiyonu konuldu (85). Berrak bir hemolizat elde edilinceye kadar tüpler karıştırıldı. Karışımdan filtre kağıdının bir köşesine 1 cm çapında daire şeklinde bir damla emdirilerek " sıfır zamanı " olarak

işaretlendi, tüpler 37°C'de 10 dakika enkübe edildikten sonra, örnek için aynı filtre kağıdının ikinci köşesine bir damla daha emdirildi ve "10 dakika" olarak işaretlendi, aynı işlemler 20. ve 30. dakikada tekrarlanılarak filtre kağıdının 3. ve 4. köşesine uygulandı ve "20. ve 30 dakika" olarak işaretlendi. Damlalar tamamen kuruduktan sonra değerlendirilmeye geçildi.

d - Değerlendirilme ;

Filtre kağıtları karanlık bir ortamda uzun dalga UV ışığı altında gözlemlendi. "Sıfır zamanı" kontrol olarak kabul edildi. Kalitatif PK aktiviteleri Beutler tarafından önerilen şekilde yapıldı (85).

	<u>Floresans Şiddeti</u>	
Sıfır Zamanı	Çok parlak	Çok parlak
10. dakika	Hafif	Çok parlak
20. dakika	Çok hafif	Çok parlak
30. dakika	Yok	Çok parlak
Değerlendirme	(+)	(-)

30 dakika içinde floresansın kaybolması durumunda PK aktivitesi (+) olarak kabul edilmektedir (85).

e - Reaksiyon karışımının stabilitesi ;

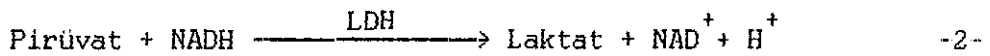
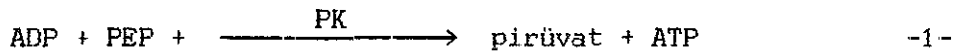
Reaksiyon karışımı +4°C'de 4 gün, -20°C'de 10 gün stabildir (85). N₂ ile liyofilize edildiğinde +4°C ve -20°C'de en az 3 ay stabil olduğu bildirilmektedir (85). PK ise tam kan halinde +4°C'de en az 6 gün stabildir (27).

KANTİTATİF PK TAYİNİ

Eritrosit hemolizatlarında kantitatif PK aktivitesi ICSH tarafından önerilen yöntemle ölçüldü (86).

Prensip ;

PK ve LDH'in enzimatik reaksiyonlarının birleştirilmesi sonucu, PK aktivitesi ile orantılı olarak oluşan NAD^+ 'ın 340 nm'de absorbanst azalışının kinetik olarak izlenmesi esasına dayanmaktadır (3,27,86).



Olası LDH yetmezliği durumunda yalancı negatif PK yetmezliği, reaksiyon karışımına 0,1 ml LDH (60 ü/ml) ilave edilmesiyle önlenmektedir.

A - HEMOLİZATIN HAZIRLANIŞI

Ayırıcılar

- 1 - İzotonik sodyum klorür : 9,0 gr NaCl (Merck) tartılarak 1000 ml distile suda çözüldü. 4°C'de saklandı.

2 - Stabilize edici solüsyon : 2,7 mM EDTA, 0,7 mM 2-mercaptoetanol.

100 mg Ethylenedinitrilotetraacetic acid (Merck) ve 5 mikrolitre 2-mercaptoetanol içinde 50 ml distile su bulunan 100 ml'lik balon jöjeye konuldu. EDTA çözölünceye kadar 10 M KOH damla damla eklenerek karıştırıldı. pH : 7,0'ye ayarlandıktan sonra hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Koyu renkli şişe içinde +4°C'de saklandı(27).

Gereçler

- 1 - Soğutmalı santrifüj : Heraeus Christ Minifuge 2 model,
- 2 - Derin Dondurucu : Karteknik marka dondurucu, (-20°C'ye inebilen ilave motorlu),
- 3 - Su banyosu : Nüve BM 100 marka,
- 4 - pH metre : Model 407 A Orion marka,
- 5 - Santrifüj tüpü : 15x 100 mm dibi konik,
- 6 - Otomatik pipet : 50 - 250 mikrolitrelik Socorex marka,
- 7 - Pipet : 0,2 ml. 1 ml. 2 ml ve 10 ml'lik serolojik.

Yöntem

Kalitatif PK tayinleri için hazırlanan ve +4°C'de saklanılan eritrosit paketi 1 hacim izotonik NaCl ile % 50 süspanse edildi. Eritrosit süspansiyonundan 0,2 ml alınarak üzerine 1,8 ml stabilize edici solüsyon ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra derin dondurucuda -20°C'de donduruldu. Tamamen dondurulduktan sonra oda ısısında su

banyosuna alınarak eritildi. Bu işlem den sonra 1/20 oranında dilüe edilmiş hemolizat hazırlandı (2,3). Şayet hemolizatta bulanıklık olduğu zaman 2250 xg/dak 30 dakika 4°C'de santrifüj edildi (3). Hemolizat diğer işlemler tamamlanıncaya kadar buzlu su banyosu içinde bekletildi.

B - HEMOLIZAT HEMOGLOBİN İÇERİĞİ ÖLÇÜMÜ

Prensip

Alkalen pH'da potasyum ferrisiyanür varlığında hemoglobin ve sulfhemoglobin haricindeki hemoglobin deriveleri methemoglobine oksitlenir. Methemoglobin potasyum siyanür ile siyanmethemoglobin bileşliğini oluşturur. Bu son bileşiğin maksimum absorpsiyon verdiği 540 dalga boyundaki renk şiddeti hemoglobin konsantrasyonu ile orantılıdır(2,3).

Ayırıcılar

- 1 - Drabkin ayıracı, stok : 1 gr sodyum bikarbonat, 200 mgr potasyum ferrisiyanür ve 50 mgr potasyum siyanür içeren kuru karışım oda ısısında ve karanlıkta saklandı.
- 2 - Drabkin solüsyonu : Stok, Drabkin ayıracı 1000 ml distile suda çözüldü. İyice karıştırıldıktan sonra koyu renkli şişede oda ısısında saklandı. Bu ısıda en az 4 ay stabildir (2,3).

Gereçler

- 1 - Spektrofotometre : Bausch-Lomb, Spectronic 21.
- 2 - Test tüpü : 16 x 160 mm'lik.
- 3 - Makro kuartz küvetler : Hellma marka, 10 mm'lik ışık yoluna sahip 100-QS tipindeki kuartz küvetler kullanıldı.
- 4 - Otomatik pipet : 50-250 mikrolitrelik Socorex marka.
- 5 - Pipet : 10 mm'lik serolojik.

Yöntem

- 1 - Çalışılacak örnek sayısından bir fazla test tüpü, kör, Örnek 1 ve Örnek 2 şeklinde işaretlendi.
- 2 - Bütün tüplere 4,9 ml Drabkin solüsyonu pipetlendi.
- 3 - Kör deneye 100 mikrolitre distile su, örnek tüplere 100 mikrolitre hemolizat ilave edildi. Karıştırılarak 15 dakika oda ısısında beklendi.
- 4 - 540 nm'de köre karşı örneklerin absorbansı kaydedildi.

C - HEMOLİZAT PK AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ

Ayırıcılar

- 1 - PEP 50 mM : 66,8 mg Phosphoenolpyruvate Mono (cyclohexylammonium) salt (Sigma P-3637) tartılarak 5 ml bidistile suda çözüldü (-20°C'de 3 ay stabildir)(3).
- 2 - ADP 30 mM : 64 mg Adenozine Diphosphate potassium salt (Sigma A-5285) tartılarak 5 ml bidistile suda çözüldü (-20°C'de 3 ay stabildir) (3).

- 3 - NADH 2 mM : β -Redükte Nicotinamide Adenine Dinucleotide dipotassium salt (Sigma N-4505) 5.93 mg tartılarak 1 ml % 1'lik NaHCO_3 'da çözüldü. Bu şartlarda NADH'in konsantrasyonu 8 mM'e eşit olmaktadır. Ölçüm sırasında NADH konsantrasyonu spektrofotometrede (340 nm) molar extinction coefficient'tinden yararlanılarak 2 mM'e ayarlandı (27,91).
- 4 - LDH 60 ü/ml : 16 mikrolitre Lactate Dehydrogenase (Sigma-L-2881) 2 ml bidistile suda çözüldü. +4°C'de bir hafta stabildir (3,27).
- 5 - KCL 1 M/L : 7,456 gr potasyum klorür (Merck) tartılarak 100 ml distile suda çözüldü.
- 6 - MgCl_2 0,1 M/L : 2032,1 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck) tartılarak 100 ml distile suda çözüldü.
- 7 - Tris-HCl tamponu 1 M/L, pH : 8,0 : 121,14 gr Tris (hydroxymethyl- aminomethan) tartılarak 1 litrelik balon jojeye kondu. Üzerine 800 ml distile su ile iyice çözüldü, damla damla HCl (1 Mol/L) eklenerek ve sürekli karıştırılarak pH : 8.0'e ayarlandıktan sonra hacim 1 litreye tamamlandı ve koyu renkli şişede +4°C'de buzdolabında saklandı (2,3).
- 8 - F-1,6-BP 0,01 M/L : 36,84 mg D-Fructose 1,6-Biphosphate Tetra (cyclohexylammonium) salt (Sigma F-0752) tartılarak 5 ml bidistile suda çözüldü. -20°C'de 1 ay stabildir (3).

9 - Stok ayıracı :

Ölçülecek numune sayısı :

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
Tris tamponu	0,9 ml	1,3 ml	2,1 ml
MgCl ₂ (0,1 M/L)	0,9 ml	1,3 ml	2,1 ml
KCl (1 M/L)	0,9 ml	1,3 ml	2,1 ml
Distile Su	2,97 ml	4,29 ml	6,93 ml

Stok ayıracı 1, 2 ve 4 numunelik ayrı ayrı hazırlanıp plastik tüplerde -20°C'de donduruldu, bu ısıda en az 1 ay stabildir (3).

Gereçler

- 1 - Spektrofotometre : Beckman model 26 Spectrophotometer.
- 2 - Yazdırıcı : Beckman model 39 printer.
- 3 - Derin dondurucu : Karteknik marka dondurucu, (-20°C'ye inebilen ilave motorlu).
- 4 - Mikro kuartz küvetler : 10 mm'lik ışık yoluna sahip, 90 tipinde kuartz küvetler kullanıldı.
- 5 - Test tüpü : 16 x 160 mm.
- 6 - Pipet : 1 ve 2 ml'lik serolojik.
- 7 - Otomatik pipet : 50-250 mikrolitrelik Socorex marka.
- 8 - Hassas terazi : Sartorius 2472 marka.
- 9 - pH metre : Model 407A Orion marka.
- 10- Coulter elektronik cihazı : Cobas Mines Stex marka.

Yöntem

Ayıraçlar	Kör	Standart Ölçüm	Düşük Substratlı	Düşük Substrat +FBP'lı	Son Konst
			Ölçüm	Ölçüm	
		1	2	3	
Stok Ayırıcı	0,630 ml	0,630 ml	0,630 ml	0,630 ml	-
NADH	0,100 "	0,100 "	0,100 "	0,100 "	0,2 mM
*ADP	-	0,050 "	0,020 "	0,020 "	0,15 mM(2) 0,06 mM(3-4)
*LDH	0,100 "	0,100 "	0,100 "	0,100 "	6 ü/ml
*FBP	-	-	-	0,050 "	0,5 mM
Hemolizat	0,020 "	0,020 "	0,020 "	0,020 "	-
H ₂ O	0,050 "	-	0,125 "	0,075 "	-
* PEP	0,100 "	0,100 "	0,005 "	0,005 "	5 mM (1) 0,25 mM (2,3)
Total Hacim	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

* Ayıraçlar ölçülecek numune sayısına karşılık gelecek şekilde 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, ml'lik hacimler halinde -20°C'de donduruldu.

Deneyin Yapılışı

Ölçüm yapılacağı gün gerektiği kadar dondurulmuş ayıraçlar, oda ısısında erimeye bırakıldı, test tüpleri kör, Örnek 1, 2, 3 olarak işaretlendi. PEP hariç Yöntemde

belirtildiği miktarlarda ayıraçlar test tüplerine ilave edildi. Test tüpleri parafilm ile kapatılarak iki kez alt üst edildikten sonra 37°C'de 10 dakika enkübe edildi. Kör ve Örnek 1 tüplerine 0,1 ml PEP ilave edildi. Tüpler karıştırıldıktan sonra, karışım kare kuartz mikroküvetlere konularak spektrofotometreye yerleştirildi. Absorbans 0,5'e ayarlandı. 340 nm'deki optik dansite (O.D) değerleri 15 dakika boyunca 60 saniyede bir yazdırıcıya kaydedildi. Daha sonra sırasıyla düşük substrat (Örnek 2) ve düşük substrat + FBP (Örnek 3) şartlarında, benzer şekilde optik dansite değerleri kaydedildi (3).

Değerlendirme

Yazdırıcıda, elde edilen sonuçların grafik analizi ile reaksiyon hızının en lineer olduğu aralık bulundu. Bu aralık O.D. farkının zamana bölünmesi ile dakikadaki O.D. azalışının ortalama değeri (OD/dak) bulundu. Bulunan değer aşağıdaki formüle uygulanarak gram Hb başına düşen enzim aktivitesi hesaplandı (3).

$$\text{PK IU/gHb} = \frac{804 \times \text{OD/dak.}}{*A_{540} \times \text{FHb}**}$$

* : Hemolizatta ölçülen Hb'nin absorbans değeri,

** : Siyanmethemoglobin faktörü = 5,48

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Elde edilen verilerin bir bölümü sayımla belirtilen karakterler olduğundan, iki veya daha çok grup arasında fark bulunup bulunmadığını belirlemek için, parametrik olmayan önemlilik testlerinden ki kare (gerekli yerlerde Yates düzeltmesi yapıldı) ve Fisher'in kesin ki kare testi uygulandı.

Verilerin ölçümle belirtilen ve parametrik varsayımları yerine getiren bölümünde iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi uygulandı.

BULGULAR

Antalya il merkezinde oturan 1190 denneğin cinsiyete, yaş gruplarına, aile kökenine ve akraba evliliği görülme sıklığına göre dağılımı Tablo 1, Tablo 2 ve Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 1 : Deneklerin cinsiyete ve yaş gruplarına göre dağılımı.

Yaş grubu	Erkek	%	Kadın	%	Toplam	%
0 - 14	202	52,19	185	47,81	387	100,00
15 - 44	246	45,22	298	54,78	544	100,00
45 ve üzeri	125	48,26	134	51,74	259	100,00
Toplam	573	48,15	617	51,85	1190	100,00

İncelenen deneklerin % 48,15'i erkek, % 51,85'i kadındı. Deneklerin % 32,52'si 0-14 yaş grubunda, % 45,72'si 15-44 yaş grubunda ve % 21,76'sı 45 ve üzeri yaş grubunda bulunuyordu.

Tablo 2 : Deneklerin aile kökenine göre dağılımı.

Aile kökeni	Denek sayısı	%
Merkez ilçe	508	42,68
Serik	44	3,69
Manavgat	24	2,03
Alanya	8	0,68
Gazipaşa	9	0,76
Gündoğmuş	11	0,93
Akseki	24	2,03
Kumluca	32	2,69
Elmalı	28	2,34
Korkuteli	50	4,20
Finike	8	0,67
Kaş	6	0,50
Antalya Dışı	438	36,80
T o p l a m	1190	100,00

Araştırılan 1190 denek aile kökenine göre, 508 kişi Merkez (% 42,68), 244 kişi diğer ilçeler (% 20,52) ve 438 kişi Antalya dışı (% 36,80) olmak üzere dağılım gösterdi.

Tablo 3 : Deneklerin aile kökeni ve akraba evliliğine göre dağılımı.

Aile kökeni	A k r a b a e v l i l i ğ i				Toplam
	Olan	%	Olmayan	%	
Antalya merkez ilçe	112	46,88	396	41,64	508
Diğer ilçeler	51	21,33	193	20,29	244
Antalya dışı	76	31,79	362	38,07	438
T o p l a m	239	100,00	951	100,00	1190

Nisan 1992 - Mart 1994 tarihleri arasında Antalya il merkezinde oturan deneklerde akraba evliliği sıklığı % 20,08 (239/1190) bulundu. Ebeveynleri akraba olan toplam 239 denek aile kökenine göre, 112 Merkez (% 46,88), 51 diğer ilçeler (% 21,33) ve 76 Antalya dışı (% 31,79) olarak dağılım gösterdi.

Aile kökeni merkez ilçe olan deneklerde akraba evliliği sıklığı % 22,04 (112/508), diğer ilçelerdeki deneklerde % 20,90 (51/244) ve Antalya dışı olanlarda % 17,35 (76/438) saptandı.

A - KALİTATİF ÖLÇÜMLERE AİT BULGULAR

573 erkek ve 617 kadından oluşan 1190 deneğin venöz kan örneklerinin floresans (85) spot test ile incelenmesi sonucunda, 7'si erkek ve 6'sı kadın olmak üzere toplam 13 olguda PK yetmezliği saptandı. Bu 13 deneğin kantitatif enzim aktiviteleri ölçüldüğünde tam yetmezlik bulgularına rastlanılmadı.

Heterozigot yetmezlik saptanan 13 denekte 10. 20. ve 30. dakikada floresans kaybı gözlenmedi. Heterozigot yetmezlik gösteren bu olgularda spot test (-) olarak değerlendirildi (85).

566 erkek ve 611 kadının 10.dakikadan itibaren spotlarında floresans kaybı gözlendi. 20. ve 30. dakikalar arasında floresansın tamamen kaybolduğu belirlendi. Normal aktivite gösteren bu olgularda spot test (+) olarak değerlendirildi (85).

Deneklerin PK aktivitesi ve cinsiyete göre dağılımı Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4 : Deneklerin PK aktivitesi ve cinsiyete göre dağılımı.

PK Aktivitesi	Erkek	%	Kadın	%	Toplam	%
Homozigot (tam) yetmezlik gösteren olgular	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Heterozigot yetmezlik gösteren olgular	7	1,2	6	0,98	13	1,10
Normal olgular	566	98,8	611	99,02	1177	98,90
T o p l a m	573	100,00	617	100,00	1190	100,00

Heterozigot PK yetmezliği sıklığı erkeklerde % 1,20, kadınlarda % 0,98 ve toplam olgularda % 1,10 olarak saptandı. Erkek ve kadın denekler arasında yetmezlik görülme sıklığı açısından istatistiksel olarak fark bulunmadı (Tablo 5).

Tablo 5 : Deneklerin PK aktivitesi ve cinsiyete göre dağılımı (önemlilik kontrolü).

	P K A K İ İ V İ T E S İ					
Cinsiyet	Heterozigot yetmezlik gösteren olgular	%	Normal olgular	%	Toplam	%
Erkek	7	53,84	566	48,08	573	48,15
Kadın	6	46,16	611	51,92	617	51,85
T o p l a m	13	100,00	1177	100,00	1190	100,00

$$\alpha = 0,05 \quad X_1^2 = 0,078 \quad X_2^2 = 0,095 \quad \sum X^2 = 1,73 \quad p > 0,05$$

Araştırmaya göre Nisan 1992 - Mart 1994 tarihleri arasında Antalya il merkezinde oturan kişilerde homozigot PK yetmezliği prevalansı % 0,0, heterozigot PK yetmezliği prevalansı % 1,10 bulundu.

Yaş gruplarına göre heterozigot yetmezlik görülme sıklığı. 0 - 14 yaş grubunda % 1,03, 15 - 44 yaş grubunda % 1,28, 45 ve üzeri yaş grubunda % 0,77 saptandı (Tablo 6).

Tablo 6 : Deneklerin PK aktivitesi ve yaş gruplarına göre dağılımı.

	Y a ş G r u b u						
	0-14	%	15-44	%	45-Üzeri	%	Toplam
Heterozigot yetmezlik gösteren olgular	4	1,03	7	1,28	2	0,77	13
Normal olgular	383	98,97	537	98,72	257	99,23	1177
T o p l a m	387	100,00	544	100,00	259	100,00	1190

Heterozigot yetmezlik gösteren 13 olgunun % 30,78'i 0-14, % 53,84'ü 15-44, % 15,38'i 45 ve üzeri yaş grubunda olup, birbirleri ile karşılaştırıldığında yetmezlik görülme sıklığı açısından yaş grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı (Tablo 7).

Tablo 7 : Deneklerin PK aktivitesi ve yaş gruplarına göre dağılımı (önemlilik kontrolü).

P K A k t i v i t e s i					
Yaş grubu	Yetmezlik gösteren olgular	%	Normal olgular	%	Toplam
0 - 14	4	30,78	383	32,54	387
15 - 44	7	53,84	537	45,63	544
45 - Üzeri	2	15,38	257	21,83	259
Toplam	13	100,00	1177	100,00	1190

$$\alpha = 0.05 \quad \chi^2_1 = 0,022 \quad \chi^2_2 = 0,168 \quad \chi^2_3 = 0,040 \quad \sum \chi^2 = 0,230 \quad p > 0,05$$

Yaş gruplarına göre erkeklerde heterozigot yetmezlik görülme sıklığı. 0-14 yaş grubunda % 0,99, 15-44 yaş grubunda % 1,65, 45 ve üzeri yaş grubunda % 0,80 bulundu (Tablo 8).

Tablo 8 : Erkek deneklerin PK aktivitesi ve yaş grupları göre dağılımı.

PK aktivitesi	Y A Ş G R U B U						Toplam
	0-14	%	15-44	%	45-Üzeri	%	
Heterozigot yetmezlik gösteren olgular	2	0,99	4	1,65	1	0,80	7
Normal olgular	200	99,01	242	98,35	124	99,20	566
T o p l a m	202	100,00	246	100,00	125	100,00	573

Heterozigot yetmezlik gösteren 7 erkek olgunun % 28,58'i 0-14, % 57,14'ü 15-44, % 14,28'i 45 ve üzeri yaş grubunda olup, birbirleri ile karşılaştırıldığında yaş grupları arasında yetmezlik görülme sıklığı açısından istatistiksel olarak fark bulunmadı (Tablo 9).

Tablo 9 : Erkek deneklerin PK aktivitesi ve yaş gruplarına göre dağılımı (önemlilik kontrolü).

Yaş grubu	P K A k t i v i t e s i				Toplam
	Heterozigot yetmezlik gösteren olgular	%	Normal olgular	%	
0 - 14	2	25,58	200	35,33	202
15 - 44	4	57,14	242	42,75	246
45 ve üzeri ¹⁾	1	14,28	124	21,92	125
Toplam	7	100,00	566	100,00	573

$$\alpha = 0,05 \quad \chi^2_1 = 0,150 \quad \chi^2_2 = 0,337 \quad \chi^2_3 = 0,333 \quad \sum \chi^2 = 0,820 \quad p > 0,05$$

Yaş gruplarına göre kadınlarda heterozigot yetmezlik görölme sıklığı, 0-14 yaş grubunda % 1,08, 15-44 yaş grubunda % 1,00, 45 ve üzeri yaş grubunda % 0,74 bulundu (Tablo 10).

Tablo 10 : Kadın deneklerin PK aktivitesi ve yaş gruplarına göre dağılımı.

PK Aktivitesi	Y a ş G r u b u						Toplam
	0-14	%	15-44	%	45-Üzeri	%	
Heterozigot yetmezlik gösteren olgular	2	1,08	3	1,00	1	0,74	6
Normal olgular	183	98,92	295	99,00	133	99,26	611
T o p l a m	185	100,00	298	100,00	134	100,00	617

Yetmezlik gösteren 6 kadın olgunun % 33,33'ü 0-14, % 50,00'si 15-44, % 16,67'si 45 ve üzeri yaş grubunda olup, birbirleri ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak fark bulunmadı (Tablo 11).

Tablo 11 : Kadın deneklerin PK aktivitesi ve yaş gruplarına göre dağılımı (önemlilik kontrolü).

Yaş grubu	P K A k t i v i t e s i				Toplam
	Heterozigot Yetmezlik Gösteren Olgular	%	Normal Olgular	%	
0 - 14	2	33,33	183	29,95	185
15 - 44	3	50,00	295	48,28	298
45 ve Üzeri	1	16,67	133	21,77	134
T o p l a m	6	100,00	611	100,00	617

$$\alpha = 0,05 \quad \chi^2_1 = 0,024 \quad \chi^2_2 = 0,036 \quad \chi^2_3 = 0,073 \quad \sum \chi^2 = 0,133 \quad p > 0,05$$

Yetmezlik gösteren 13 olgunun % 76,92'si Antalya kökenli ve % 23,08'i Antalya dışı kökenli olup, aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu (Tablo 12).

Tablo 12 : Deneklerin PK aktivitesi ve aile kökenine göre dağılımı (önemlilik kontrolü).

Aile kökeni	P K A k t i v i t e s i				Toplam
	Yetmezlik gös- teren olgular	%	Normal olgular	%	
Antalya	10	76,92	742	63,04	752
Antalya dışı	3	23,08	435	36,96	438
T o p l a m	13	100,00	1177	100,00	1190

$$\alpha = 0,05$$

$$\sum X^2 = 1,082$$

$$p > 0,05$$

Tablo 12'deki verilere göre PK yetmezliği Antalya kökenli deneklerde % 1,32 (10/752) olup, Antalya dışı kökenli deneklerde % 0,69 (3/438) bulundu.

Antalya İl Merkezinde oturan 1190 deneğin 239'unda anne-baba arasında akrabalık bulunduğu saptandı (% 20,08). Akraba evliliğine rastlanan olgularda PK yetmezliği sıklığı (% 2,51) akraba evliliği görülmeyen olgulardan (% 0,73) yüksek ve aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 13).

Tablo 13 : Deneklerin PK aktivitesine ve akraba evliliğine rastlanma sıklığına göre dağılımı.

PK Aktivitesi	A k r a b a E v l i l i ğ i				Toplam
	Olan	%	Olmayan	%	
Yetmezlik gösteren olgular	6	2,51	7	0,73	13
Normal olgular	233,	97,49	944	99,27	1177
T o p l a m	239	100,00	951	100,00	1190

B - KANTİTATİF ÖLÇÜMLERE AİT VERİLER

Floresans spot test ile PK yetmezliği saptanan 13 olguya ait veriler Tablo 14'de toplu halde gösterilmiştir.

Tablo 14 : PK yetmezlikli deneklere ait değerler (olgular standart ölçümdeki PK aktivitelerine göre sıralanmıştır).

Denek	Aile	Standart ölçümde	Düşük S'li ölçüm-	Düşük S + FBP'li
Sıra Seks Yaş Aile	PK aktivitesi	de PK aktivitesi	ölçümde PK akti-	
No kökeni	(IU/grHb)	(IU/grHb)	vitesi (IU/grHb)	
1 E 40 Antalya	7,48	1,94	6,12	
2 K 34 Antalya	8,73	1,82	5,93	
3 E 55 Eskişehir	9,10	2,50	6,82	
4 E 10 Finike	9,36	2,71	6,89	
5 E 37 Mersin	9,66	2,96	6,94	
6 K 33 Antalya	9,42	2,14	6,56	
7 K 53 Korkuteli	10,80	2,82	6,80	
8 K 47 Antalya	11,27	2,97	7,10	
9 E 14 Antalya	11,50	2,40	7,44	
10 K 12 Alanya	11,70	2,90	6,40	
11 E 42 Korkuteli	11,80	2,60	6,70	
12 E 25 Konya	12,10	3,32	7,15	
13 K 1,5 Antalya	12,20	3,12	7,20	
Normal	19,80 ± 4,10	3,4 ± 1,3	7,9 ± 0,8	
Değerler	n = 100	n = 10	n = 10	

PK enziminin standart ölçümde normal değerleri 14.8 - 25.7 IU/grHb, ortalama enzim aktivitesi 19.80 ± 4.10 IU/grHb olarak bulundu (Tablo 15). Düşük substratlı ölçümde ortalama enzim aktivitesi $3,4 \pm 1,3$ IU/grHb düşük substrat + FBP'li ölçümde ortalama enzim aktivitesi $7,9 \pm 0,8$ IU/grHb olarak bulundu (Tablo 14)

Tablo 15 : Normal deneklerin PK aktiviteleri Ort $\pm$ SD minimum ve maksimum değerleri.

PK Aktivitesi (IU/grHb)

Minimum	=	14,8
Maksimum	=	25,7
Ortalama	=	19,8
SD	=	4,1
n	=	100

Sekse göre PK aktivitesinde istatistiksel olarak fark bulunmadı $p > 0,05$ (Tablo 16).

	P K Aktivitesi (IU/grHb)	
	Kadın	Erkek
Minimum	15,70	14,80
Maksimum	25,70	24,20
Ortalama	20,44	19,67
SD	4,02	3,77
n	50	50

Tablo: 16

Ortalama enzim aktivitesi 0-14 yaş grubunda $22,8 \pm 3,6$ IU/grHb (n=21), 15-44 yaş grubunda $20,9 \pm 3,2$ IU/grHb (n=30), 45 ve üzeri yaş grubunda $19,0 \pm 3,0$ IU/grHb (n=21) ve tüm deneklerde $19,80 \pm 4,10$ IU/grHb olarak bulundu. Her iki cinste de yaş gruplarına göre enzim aktiviteleri kıyaslandığında 0-14 ve 15-44 yaş gruplarında, 45 ve üzeri yaş gruplarına göre enzim aktivitesi yüksek bulundu ($p < 0,05$).

Klinik olarak anemi şikayeti bulunmayan yetmezlikli deneklerin Hb ve hematokrit değerleri normal düzeydeydi. Yaş gruplandırması yapılmaksızın, bayanlarda ortalama Hb ve hematokrit değerleri 14,8 gr/dl, % 42, erkeklerde 15,3 gr/dl, % 48 bulundu. Seks ayrımı yapılmaksızın yetmezlikli deneklerde retikülosit sayısı % 1-4, indirekt bilüribin düzeyi 0,2 - 0,7 mg/dl arasında değişmekteydi (Tablo 17).

Tablo 17 : Yetmezlikli olguların hematolojik değerleri.

Denek No	Seks	Yaş	Hb (gr/dl)	Hematokrit (%)	Retikülosit %	İndirekt Bilüribin (mg/dl)
1	E	40	15,3	48	2,5	0,4
2	K	12	13,4	41	3,0	0,5
3	E	55	14,0	42	3,5	0,6
4	E	42	14,8	44	2,5	0,3
5	E	37	14,4	45	3,0	0,4
6	E	14	15,0	46	3,0	0,2
7	K	33	12,9	39	4,0	0,6
8	K	63	12,7	40	3,0	0,5
9	K	47	13,2	41	4,0	0,7
10	K	34	13,8	42	1,0	0,3
11	E	10	14,3	44	2,5	0,5
12	E	25	14,7	43	2,5	0,5
13	K	1,5	14,8	41	1,5	0,4
Normal Değerler			E=13,5- 17 K= 12 - 16	E= 37-53 K= 36-46	0,5 - 2	0,2 - 0,7

Aile kökeni Merkez ilçe olan heterozigot yetmezlikli olguların ortalama enzim aktivitesi, aile kökeni diğer ilçeler olan yetmezlikli olguların ortalama enzim aktivitesi ile kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak fark bulunmadı (Tablo 18).

Tablo 18 : Heterozigot yetmezlikli olguların aile kökenine ve ortalama PK aktivitesine göre dağılımı.

P K aktivitesi (IU/grHb)		
	Merkez ilçe	Diğer ilçeler
Ort.	9,80	10,62
SD.	1,52	1,22
n.	6	4
$\alpha = 0,05$ $t = 0,348$ $p > 0,05$		

Kantitatif olarakda heterozigot yetmezlikli oldukları belirlenen 13 olgunun eritrosit enzim aktivitesi ve cinsiyete göre dağılımı Tablo 19'da gösterilmiştir.

Tablo 19 : Heterozigot yetmezlikli olguların eritrosit PK aktiviteleri Ort $\pm$ SD değerleri ve cinsiyete göre dağılımı.

PK aktivitesi (IU/grHb)	
Erkek olgular (n = 7)	Ort = 9,63 SD = 1,37 CV = 14,22
Kadın olgular (n = 6)	Ort = 10,27 SD = 1,20 CV = 11,68
$\alpha = 0,05$ $t = 0,771$ $p > 0,05$	

Heterozigot yetmezlikli erkeklerin ortalama enzim aktivitesi, heterozigot yetmezlikli kadınların ortalama enzim aktiviteleri ile karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel olarak fark bulunmadı (Tablo 19).

TARTIŞMA

Eritrosit enzimopatileri arasında, hereditör hemolitik anemi G-6-PD'den sonra en sık PK yetmezliğinde görülmektedir (1,6,8,10,15). Bazı toplumlarda önemli bir sağlık sorunu olan PK yetmezliğinin tanısı için tarama testleri geliştirilmiştir (69,85). Antalya il merkezinde PK yetmezliği prevalansını saptamak için Beutler'in floresans spot testini kullandık (85). Bu test için kan örnekleri heparin, EDIA ve ASD gibi antikoagülanlar ile alınabilmektedir (85). Biz çalışmamızda kan örneklerini heparinli tüplere aldık ve aşı nakil kutusunda buz içerisinde saklayarak, enzim inaktivasyonunu minimuma indirerek yalancı (+) sonuçların çıkmasını engelledik (69,71,72).

PK yetmezliği taramasında Beutler'in spot testini tercih etmemizin başlıca nedenleri şunlardır :

- 1 - PK yetmezliği prevalans çalışmalarında araştırmacıların çoğunun bu testi kullanmaları,
- 2 - Testin ekonomik olması. Bugünkü fiyatlarla bir testin maliyeti 1.000.-TL (0,05 DM) civarındadır,
- 3 - Uygulanması basit olup, lokosit uzaklaştırma işleminden sonra yaklaşık 40 dakikada deneyin tamamlanması,
- 4 - Reaksiyon karışımının -20°C'de en az 10 gün stabil kalması (85). Bizim gözlemlerimize göre reaksiyon karışımı -20°C'de 7 güne kadar stabil kalmaktadır,
- 5 - Bekletilmiş kan örnekleri ile çalışılabilir. Antikoagülanlı kan örnekleri +4°C'de saklandığında, PK aktivitesi en az altı gün, +25°C'de bir gün stabildir (27). Hemolizatlardaki PK aktivitesinin 0°C'de en az

sekiz saat stabil kaldığı bildirilmiştir (86). Araştırmamızda kan örneklerinin +4°C'de en fazla beş gün stabil kaldığını gözledik.

- 6 - Hb ve aneminin neden olduğu interferans bu testte minimum düzeyde olmaktadır. NADH'ın verdiği floresansı aktive etmek için kullanılan U.V dalga boyunun Hb'nin maksimum absorpsiyon bandının (Soret bölgesi) altında kalması ve reaksiyon karışımının filtre kağıtlarına damlatılması ile bir miktar Hb'nin NADH'den kromatografik olarak ayrılması, Hb'nin baskılayıcı etkisini azaltmaktadır (85).

Anemik örneklerde enzim miktarındaki azalmaya bağlı olarak NADH'ın tüketilmesi azalacaktır. Ancak örneğin Hb miktarının da aynı oranda azalması ile bu durum dengelenmekte ve gözlenen floresans şiddetinde önemli bir değişiklik olmamaktadır (85).

- 7 - Çok az miktarda eritrosit paketi örnekleri ile çalışılabilir. Floresans spot testte kullanılan numune hacmi sadece 20 mikrolitredir (85). Bu, özellikle kitle taraması ve yenidoğanlar üzerinde büyük avantaj sağlar (69,73).
- 8 - Test sonuçları, kantitatif aktivite ölçümleri ile, normal ve yetmezlikli olguların belirlenmesinde iyi bir korelasyon gösterir. Spot teste sıfır, on, yirmi ve otuzuncu dakikada gözlenen floresans şiddetinin enzim aktivitesine bağımlı ve göreceli olarak değişmesi sonuçların semikantitatif değerlendirilmesine olanak verir. Böylece, yetmezlikli ve normal aktivite gösteren olgular spot test ile ayırtedilebilir (69,71,72,73,85).

Bütün bu avantajlara rağmen spot testin PK yetmezliği tanısında iki önemli dezavantajı vardır. Birincisi eritrositlerin lokositlerden izole edilmesi işleminin zahmetli ve bir saate yakın vakit alması, ikincisi ise yakın bir zamanda hemolitik atak geçirmiş ve retikülosit sayısı % 25'in üzerindeki olguların tanısıdır (1,6,10,19,92). Retikülosit PK aktivitesinin eritrositlere göre daha yüksek olması (1,6,10,19,82,92), hemolizden dolayı dolaşımdaki aktivitesi azalmış yaşlı eritrositlerin azalması (2,93,94) ve artan retikülosit sayısı ile ortalama eritrosit yaşının azalması bazı PK mutantlarında aktivitenin normal, hatta normalden yüksek bulunmasına neden olmaktadır (1,6,10,19,92).

Heterozigot yetmezlik gösteren olgularda normal ve mutant enzim karışımı vardır (6,10,19,78,92). Heterozigot yetmezliklerin % 50'sinde ara sıra nispeten yüksek enzim aktivitesine rastlanır ve birçok heterozigotlarda bu durum artmış retikülosit sayısı ile açıklanabilir (1,6,10,19,92). Böylece heterozigot bir olgu tamamen normal veya yetmezlikli bulunabilir (6,10,19,92). Bu nedenle heterozigot olgular tarama testinde ve hatta kantitatif yöntemlerde dahi kolaylıkla gözden kaçabilir (10,85,86).

Lakomek ve arkadaşları (10), heterozigot yetmezliklilerin belirlenmesinde rezidüel enzim aktivitesinin ölçülmesine ilaveten retikülosit sayısının ve eritrositlerde G-6P miktarının tayin edilmesini ve ayrıca PK ile PEP'in reaksiyon kinetiğinin gözlenmesini önermektedirler. Aynı araştırmacılar heterozigot yetmezlikli olgularda retikülosit sayısının % 5'e kadar çıktığını, G-6P miktarının ise normale göre iki kat yükseldiğini ve bu olgularda miks kooperasyon kinetiğinin gerçekleştiğini gözlemişlerdir (6,8,10,19,69).

PK yetmezlikli olgularda, lokositlerin PK aktivitesi normal düzeyde olduğundan (6,26,81,85) aktivite ölçümlerinden önce lokositlerin uzaklaştırılması için eritrosit paketini 4 kez serum fizyolojik solusyonu ile yıkadık (3,71,72). G-6-PD ve glutasyon reduktazın floresans spot test karışımlarında kullanılan digitonin veya saponin gibi deterjanları kullanmadık. Zira bu deterjanların kullanılması lokositlerden önemli miktarlarda PK salınmasına yol açmaktadır (85). Bu nedenle kalitatif ölçümlerde hipotonik liziz ile eritrositlerden PK salınması sağlanmış ve bu yolla lokositlerden ihmal edilebilir oranda PK salındığı bildirilmiştir (85).

Reaksiyon karışımında digitonin veya saponin kullanıldığında ya da reaksiyon karışımının hızlı bir şekilde dondurulup 25°C'de su banyosunda çözülmesi sonucu lokositlerden aynı oranda PK enzimi salınmaktadır (85). Bu bulguyu yakın zamanda Feng ve arkadaşları yaptıkları çalışmada doğrulamışlardır (69). Bu araştırmacılar hipotonik liziz yerine reaksiyon karışımını dondurup çözdükten sonra yaptıkları ölçümlerde, enzim aktivitesindeki artışın lokositlerden kaynaklandığını tespit etmişlerdir (69).

PK yetmezliği prevalans çalışmalarında Beutler'in önerdiği şekilde (85), normal aktivitenin % 60-40'ı arasında aktivite gösteren olgular heterozigot PK yetmezlikli, normal aktivitenin % 30-10'u arasında aktiviteye sahip olgular homozigot yetmezlikli olarak tanımlanmaktadır (69,71,72,85). Bizim çalışmamızda floresans spot testle yakalayabildiğimiz olgularda kantitatif PK aktiviteleri normal değerlerin % 61-38'i arasında bulundu. Floresans spot test ile yakaladığımız heterozigot olgulara ait en yüksek enzim

aktivitesinin kantitatif olarak 12.20 IU/grHb (normal değerin % 61'i) bulunması yakalayamadığımız heterozigotların enzim aktivitelerinin büyük olasılıkla daha yüksek olduğunu ve normal fenotipe kaydığını düşündürür. Floresans spot test ile yakaladığımız yetmezlikli olguların tamamında kantitatif enzim aktivitesi % 30'un altında bulunmadığından dolayı bu olgulardan hiçbirisini homozigot yetmezlikli olarak kabul edemedik (10,19,86,92).

ICSH (86) normal ve yetmezlikli olguların daha sağlıklı bir şekilde ayırt edilebilmesi için, 1) Standart yöntemle, 2) Düşük S'li ortamda, 3) Düşük S + FBP'li ortamda PK aktivitelerinin tayin edilmesini önermektedir. Homozigot yetmezlikli olgular 2 ve 3 nolu ölçümlerde normale göre oldukça düşük aktivite gösterirken heterozigot olgular normale göre % 50 - 100 arasında değişen oranda aktivite göstermektedir (3,15,60,68,86).

Araştırmamızda standart yöntemle yetmezlikli olarak belirlediğimiz olguların tanısını desteklemek için 2 ve 3 nolu ölçümlerle enzim tayinlerini yaptık (60,86). Elde ettiğimiz sonuçlara göre bu olguları heterozigot PK yetmezlikli olarak kabul ettik. Bu üç yöntemle elde ettiğimiz PK normal değerlerinin sonraki çalışmalara oldukça yararlı veriler olacağı kanısındayız.

Düşük substratlı ölçümlerde belirlediğimiz heterozigot olgularda enzim aktiviteleri normal değerin $(3,4 \pm 1,3 \text{ IU/grHb})$ % 54-92'si arasında, düşük substrat + FBP'li ölçümlerde enzim aktiviteleri normal değerin $(7,9 \pm 0,8 \text{ IU/grHb})$ % 75-94'ü arasında değişmekteydi. Bulunan bu değerler heterozigot yetmezliklilerin düşük substrat konsantrasyonunda pozitif kooperasyon kinetiği gösterdiğini

ve normal PK'nın FBP tarafından allosterik olarak aktive edildiğini doğrulamaktadır (10,11,86).

Bugüne kadar yöremizde PK yetmezliği prevalansına yönelik epidemiyolojik bir çalışmaya rastlanılamadı. Aksu ve arkadaşları Antalya il merkezinde G-6-PD yetmezliği prevalansını saptamak amacıyla yaptıkları epidemiyolojik çalışmada G-6-PD yetmezliğini erkeklerde % 7.4, bayanlarda % 1.8 bulmuşlardır (13).

Eritrosit enzimopatileri arasında G-6-PD'den sonra en sık PK yetmezliğine rastlanılmaktadır (1,6,10,15). Bu bilgilere dayanarak, Antalya il merkezinde PK yetmezliği prevalansını saptamak amacıyla yaptığımız epidemiyolojik çalışmada yetmezlik prevalansını % 1.10 olarak saptadık. PK yetmezliğinin cinsiyete göre dağılımı incelendiğinde, prevalans erkeklerde % 1.20, kadınlarda % 0.98 olarak bulundu. Erkek ve kadınlar arasında PK yetmezliği prevalansı açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). Bu sonuç, PK yetmezliği kalıtımının otozomal resesif olması nedeniyle beklediğimiz bir bulgudur (1,6,8). Tablo 20'de değişik araştırmacıların tespit ettikleri PK yetmezliği prevalans oranları gösterilmiştir.

Tablo 20 : Bu çalışma ve diğer çalışmalardaki floresans spot test sonuçları.

Kaynak	Bölge	Seks	Numune sayısı	Heterozigot PK yetmezliği (%)
Bu çalışma	Antalya	E	573	1,2
		K	617	0,98
El-Hazmi ve ark.	El-Hafouf	E	190	3,0
		K	120	0,0
El-Hazmi ve ark.	Riyadh	E	784	6,0
		K	678	1,5
El-Hazmi ve ark.	Khaiber	E	457	6,6
		K	206	5,0
El-Hazmi ve ark.	Jaizan	E	119	0,8
		K	147	0,0
El-Hazmi ve ark.	Najran	E	267	0,8
		K	152	0,0
Garcia ve ark.	Madrid	Toplam	1636	0,24
Feng ve ark.	Hong Kong	Toplam	619	3,7

Homozigot PK yetmezliğinin sık görüldüğü ülkelerde araştırmacılar PK yetmezliği prevalans çalışmalarından ziyade proband ve ailelerinde PK varyantlarının karakteristik özelliklerini belirleyici araştırmalara yöneldiklerinden, bu popülasyonlarda PK yetmezliği prevalansının muhtemelen yüksek olabileceğini düşünüyoruz.

Taramada, her iki cinsin yaş gruplarında yetmezlik görülme sıklığı kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0,05$). Geniş çaplı literatür taramasında yaş grupları arasında bu kıyaslamayla ilgili detaylı bir bilgiye rastlanılmadığından, tüm yaş gruplarında aynı oranda PK yetmezliği görülebileceği kanısına vardık.

Araştırmamızda PK yetmezlikli olguların % 63,04'ünü teşkil eden Antalya kökenli deneklerde yetmezlik sıklığı % 1,32, yetmezliklilerin % 36,96'sını oluşturan Antalya dışı değişik kökenli olgularda ise sıklık % 0,69 bulunmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0,05$). Yetmezliğin Antalya kökenli deneklerde diğerlerine göre daha yüksek bulunmasının nedeni de bu grubun örnekte sayıca daha fazla olmasından kaynaklanabilir. Bu durum hakkında kesin bir kanıya varabilmek için Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde benzer çalışmaların yapılması gerekir.

Denekler arasında anne ve babası akraba olanların oranı % 20,08 olarak saptandı. Hacettepe Üniversitesi'nin Nüfus Etütleri Enstitüsünün 1987 yılında Türkiye çapında yaptığı araştırmada akraba evliliği oranı, nüfusu 50.000'den fazla olan yerleşim yerlerinde % 19.06 bulunmuştur (97). Güz'ün yaptığı araştırmada Antalya yöresinde akraba evliliği oranı % 28.33 olarak tespit edilmiştir (14). Araştırmamız Antalya merkezini kapsadığı için bulduğumuz oran, Hacettepe Üniversitesi Nüfus Etütleri Enstitüsünün tespit ettiği orana yakındır.

Genetik bozukluğun kalıtımla, sonraki nesillere aktarılmasında akraba evliliğinin büyük rolü olduğu bilinen bir gerçektir. Çalışmamızda akraba evliliğine rastlanan deneklerde PK yetmezliği sıklığının (% 2.51), akraba evliliği görülmeyen deneklerden (% 0.73) belirgin olarak yüksek bulunması ($p < 0,05$), akraba evliliklerinde kalıtsal hastalıkların görülme sıklığının arttığı fikrini desteklemektedir.

Yetmezlikli olguların % 80'inde, diğer araştırmacıların da belirlediği şekilde (6,10,15,19), hematolojik parametrelerden sadece retikülosit sayısının % 4'e varan oranlarda arttığını gözledik. Retikülositlerin enzim aktivitesi eritrositlere göre oldukça yüksek olduğu bilinmektedir (6,10,15,26). Yetmezliklilerde enzim aktivitesindeki azalmayı kompanse etmek için retikülosit sayısının arttığını düşünmekteyiz. Lakomek ve arkadaşları (10), heterozigot olguların % 90'ında retikülosit sayısında % 5'e kadar hafif bir artışın olabileceğini vurgulamaktadırlar (6,9,15,83). Heterozigot yetmezliklerin belirlenmesinde enzim aktivitesi ile birlikte, bu olgularda retikülosit sayısı ölçülmesinin önemli bir hematolojik bulgu olacağı kanısındayız.

PK variant çalışmalarında ICSH eritrositlerin α -selüloz ve mikrokristal selülozdan filtre edilerek lokositlerden izole edilmesini önermektedir (86). Araştırmamızın bir prevalans çalışması olması nedeniyle eritrositleri %0,9'luk NaCl çözeltisi ile 4 kez yıkayarak lokositlerden izole ettik. Bu işlemten sonra eritrosit enzimlerinin kantitatif tayinlerinde belirtildiği şekilde hazırlanan hemolizatlarda kantitatif enzim aktivitelerini belirledik (3,69,71,72).

Bu yöntemde uygulanan yıkama işlemlerinin, yaşlı eritrositlerin hemolizine neden olduğu ve bu hemolize bağlı olarak genç eritrositlerin sayıca arttığı, bunun da aktivitenin gerçek değerden daha yüksek bulunmasına yol açtığı belirtilmiştir (2,93,94). Santrifügasyon işlemi sırasında dansite gradientine bağlı olarak tüpün alt kısmında toplanan yaşlı eritrositleri almaya özen gösterdik.

Hemoliz işlemi aşamasında ortama konulan 2-merkaptoetanol sülfidril (-SH) gruplarını koruyarak enzimin inaktivasyonunu önlemektedir (3,27,86). Yetmezlikli

bireylerde enzimin yarı ömrünün çok kısa olduğu düşünülerek 2-merkaptoetanol içeren stabilize edici solusyonla hazırladığımız hemolizatlarda aktivite ölçümlerini sekiz saat içinde tamamladık.

Enzim aktivitesi ölçmeden önce bulanıklık olmadığında hemolizatları santrifüj etmedik. Beutler ve arkadaşları (86), hemolizatta stroma bulunmasının interferansa neden olmadığını bildirmişlerdir. Bu nedenle stroma varlığının enzimin in vivo koşullarına daha uygun olacağı düşünülerek santrifügasyondan kaçındık.

Hipotonik şok yaratılarak elde edilen hemolizatlarda kısmen membrana bağlı bulunan PK'nın rezolüsyonu yeterli olmadığından, eritrosit paketini -20°C'de dondurup 25°C'de çözerek elde ettiğimiz hemolizatlarda kantitatif aktivite tayini yaptık (3,27,86).

ICSH PK referans değerlerinin tayininde aktivite ölçümlerinin 37°C'de yapılmasını önermektedir (86). Biz ölçümlerimizi 30°C'de yaptık ve düzeltme faktörünü ($30^{\circ}\text{C}/37^{\circ}\text{C} = 0,578$) kullanarak 37°C'deki PK referans değerlerini elde ettik (27).

Antalya bölgesinde bugüne kadar olasılıklı örnek seçimi yapılarak PK aktivitesinin normal düzeylerinin belirlenmesine yönelik bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle yetmezliklerin belirlenmesi ve daha sonra yapılacak çalışmalara ışık tutması amacıyla Antalya il merkezinde enzim aktivitesi referans değerlerini tespit ettik.

Kayrın ve arkadaşları (98), Adana bölgesinde yaptıkları çalışmada üç etnik grupta ortalama PK aktivitelerini sırasıyla, 18.74 ± 4.61 , 18.69 ± 4.53 ve 14.84 ± 4.00 IU/grHb olarak bulmuşlardır. Sekse göre enzim aktivitesinde anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir (98). Mossa ve

arkadaşları (15), kadınların erkeklere göre daha yüksek enzim aktivitesine sahip olduklarını tespit ettikleri için, PK referans değerlerinin cins olarak 2 grupta tayin edilmesini önermişlerdir.

Bu nedenle biz de çalışmamızda, her iki cinsten PK referans değerlerini belirledik. Kadınların ortalama enzim aktivitesini daha yüksek bulmamıza rağmen, iki seks arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadık ($p > 0,05$).

Tablo 21'de araştırmamızda ve bazı çalışmalarda elde edilen PK kantitatif aktivitelerin ortalama $\pm$ SD değerleri verilmiştir.

Tablo 21 : Bu çalışma ve diğer çalışmalardaki normal PK aktiviteleri (kantitatif ölçüm).

Çalışmacılar	Çalışmanın yöresi	PK aktivitesi(IU/grHb) (Ortalama $\pm$ SD)
Bu çalışma	Antalya	19.80 $\pm$ 4.10 *
Kayrın ve arkadaşları	Grup I	18.74 $\pm$ 4.61 *
	Grup II	18.69 $\pm$ 4.53
	Grup III	14.84 $\pm$ 4.00
Mossa ve arkadaşları	Madrid	17.50 $\pm$ 2.40 *
Beutler ve arkadaşları	California	15.00 $\pm$ 1.99 *
Feng ve arkadaşları	Hong Kong	15.20 $\pm$ 5.20 *
Corrons ve arkadaşları	Barcelona	10.10 $\pm$ 1.30 **
Schroter ve arkadaşları	Göttingen	11.03 $\pm$ 1.59 **

* 37°C'de ortalama enzim aktivitesi,

** 25°C'de ortalama enzim aktivitesi.

Tablo 22'de normal deneklerde düşük substrat ve düşük substrat + FBP'li ölçümlerde elde edilen PK kantitatif aktivitelerin ortalama $\pm$ SD değerleri verilmiştir.

Tablo 22 : Bu çalışma ve diğer çalışmalardaki düşük S ve düşük S + FBP'li ölçümlerdeki PK aktiviteleri (normal deneklerde kantitatif ölçüm).

Çalışmacılar	Çalışma Yöresi	Düşük S'li ölçüm (IU/grHb)	Düşük S + FBP'li ölçüm (IU/grHb)
Bu çalışma	Antalya	3.40 $\pm$ 1.30	7.90 $\pm$ 0.80
Mossa ve ark.	Madrid	3.10 $\pm$ 1.13	7.42 $\pm$ 0.58
Beutler ve ark.	California	2.25 $\pm$ 0.3	6.25 $\pm$ 0.36

Standart ölçümle normal deneklerde elde ettiğimiz ortalama PK aktivitesini, daha önceki yıllarda diğer araştırmacılar tarafından elde edilen sonuçlarla kıyasladığımızda, Kayrın ve arkadaşlarının (98) sonuçlarıyla bizim sonuçlarımızın yakın olmasına rağmen, diğer sonuçlara göre biraz yüksek olduğunu gözledik. Akdeniz bölgesinde PK değerlerinin, kıyasladığımız popülasyonlardaki PK değerlerine göre daha yüksek olabileceğini ve bu yüksekliğin aile yapısı, beslenme şartları, örf ve âdetler gibi bölgemizin spesifik özelliklerini yansıttığını düşünmekteyiz. Kayrın ve arkadaşları kendi sonuçlarının yüksekliğini ve gruplar arasındaki farkı, toplumun beslenme şartlarına etnik grup varlığına ve pirüvat kinaz varyantlarının varlığı ile izah etmişlerdir (98).

Düşük S ve düşük S + FBP'li ölçümlerde elde ettiğimiz ortalama PK aktiviteleri, diğer araştırmacıların elde ettikleri değerlere göre, standart ölçümde olduğu gibi biraz yüksek bulundu (Tablo 22).

Kayrın ve arkadaşları yaş artışıyla birlikte enzim aktivitesinin de arttığını, ancak bunun anlamlı olmadığını gözlemişlerdir (98). Bu bulguya paradoks olarak çalışmamızda her iki cinste 0-14 ve 15-44 yaş gruplarında, 45 ve üzeri yaş grubuna göre aktivitenin arttığını gözledik ($p < 0,05$). Literatür taramasında detaylı bir bilgiye rastlayamadığımız için, bu konu hakkında kesin bir yorum yapamamaktayız. Muhtemelen yaşlanmayla paralel olarak in vitro şartlarda olduğu gibi, enzimin I formuna geçişinin kolaylaştığını (1, 37, 54) ve oksijen radikallerinin protein sentezi üzerine olumsuz etkisini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda enzim aktivitelerini IU/grHb şeklinde ifade ettik (3,27,86). Eritrosit PK aktiviteleri Hb konsantrasyonundan çok eritrosit sayısı ile orantılıdır. Eritrosit sayısının "Counter" ile yapılmadığı laboratuvarlarda aktivitenin gram Hb başına ifade edilmesi önerilmektedir (2,15). Mossa ve arkadaşları farklı tipte anemisi olanlar ve normal bireylerin PK aktivitesini tayin ettiklerinde, en yüksek PK aktivitesinin hemolitik aneminin nedeni belli olmayan ve yetersiz Hb sentezi nedeniyle mikrositozu bulunan bireylerde gözlemişlerdir. Aynı araştırmacılar enzim aktivitesini IU/grHb'den başka bir birimle ifade edildiğinde, bu artışın muhtemelen göze daha az çarpıcı geleceğini bildirmişlerdir (15). Araştırmamızda deneklerin hiçbirinde belirgin anemi bulguları olmadığından, enzim aktivitelerini IU/grHb şeklinde ifade ettik.

Çalışmamızda Merkez ilçe kökenli ve yetmezlikli olguların ortalama enzim aktivitesi (9.80 ± 1.52 IU/grHb) ve aile kökeni Antalya'nın diğer ilçeleri olan yetmezlikli olguların ortalama enzim aktiviteleri (10.62 ± 1.22 IU/grHb) arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p > 0,05$). Merkez ilçe dışındaki ilçelerden ayrıca örnek seçmediğimiz için yetmezlikli deneklere ait enzim aktivitesi ve aile kökeni arasındaki ilişki hakkında kesin bir yargıya varamadık.

Heterozigot yetmezlikli erkeklerin ortalama enzim aktivitesi (9.63 ± 1.37 IU/grHb) ve yetmezlikli kadınların ortalama enzim aktivitesi (10.27 ± 1.20 IU/grHb) kıyaslandığında, erkek ve kadınların ortalama normal enzim aktivitelerinde olduğu gibi anlamlı bir fark görülmedi ($p > 0,05$). Enzimin ortalama normal değerleri açısından erkek ve kadınlarda belirgin bir farkın olmaması nedeniyle yetmezlikli erkek ve kadın olguların enzim değerleri arasında anlamlı bir farkın olmaması beklenen bir bulgudur. Araştırmamızda elde ettiğimiz bulgular, bizi şu sonuçlara götürmektedir :

Yöremizde G-6-PD yetmezliğinde olduğu gibi, PK yetmezliğinin çok önemli bir sağlık sorunu olduğunu düşünmüyoruz. Ancak, akraba evliliği sıklığının yüksekliği ve PK yetmezliği prevalansının da % 1.10 düzeyinde olması, yetmezlikli olgularda aile taraması yapılarak diğer fertlerdeki yetmezliklilerin belirlenmesini ve genetik danışmanlık hizmeti verilmesini gerekli kılmaktadır.

Yöremizde akraba evlilikleri oranının yüksek olmasının, otozomal resesif kalıtsal geçiş gösteren PK yetmezliğinin sonraki nesillere aktarılmasında önemli rolü olacaktır. Gelecekte sağlıklı bir topluma kavuşmamız çok iyi planlanmış genetik danışmanlık hizmeti ile sağlanabilir. Örf ve

âdetlerine çok sıkı bağılı olan etnik gruplarda akraba evliliğini azaltmak ve genetik defekti olan bireyler arasında evlenmeyi engellemek oldukça güçtür. Genetik tavsiyeler kültürel faktörler gözönünde bulundurularak yapılmalıdır.

Deneklerin istatistiksel yöntemle seçilmesi (90) ve PK yetmezliği prevalansının % 1.10 olarak bulunması nedeniyle, yaptığımız bu epidemiyolojik çalışmanın Antalya il merkezinde PK yetmezliği prevalansını gerçeğe en yakın bir biçimde yansıtabildiğini düşünmemekyiz. Antalya ilini kapsayacak şekilde PK yetmezliği prevalansını saptamak için yapılacak epidemiyolojik çalışmanın maddi kayıp dışında bir yarar taşıyacağını düşünmemekteyiz.

Çalışmamızın sonunda elde ettiğimiz kalitatif ve kantitatif sonuçlar, 1) NSHA'lilerin ayırıcı tanısı için kantitatif yöntemle PK aktivitelerin tayinine, 2) Aile kökenine göre yetmezlik prevalansının ve kantitatif aktivitelerin değişip değişmediğinin incelenmesine, 3) Muhtemelen sonraki yıllarda teşhis edilecek homozigot yetmezlikli olguların enzim kinetik özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalara ışık tutacağı inancındayız.

Araştırmada kazandığımız deneyimlere göre, bundan sonra yapılacak çalışmalarda araştırmacılara tavsiye edebileceğimiz önerilerimiz şunlardır ;

1 - Yetmezlikli olgularda varyant çalışması planlandığında, eritrositlerin α -selüloz ve mikrokristal selülozdan filtre edilerek izole edilmesi (86).

2 - Heterozigot yetmezlikli olguların teşhisinde enzim aktivitesi ve retikülosit sayısının belirlenmesine

ilaveten, eritrositlerde G-6-P miktarının ölçülmesi ve enzim ile PEP arasında miks kooperasyon kinetiğinde belirlenmesi (10,19).

- 3 - Hb'nin eritrositlere nazaran daha çok azaldığı hemolitik anemili olgularda aktivite ünitesini IU/grHb'den ziyade mU/ml eritrosit veya $\text{mU}/10^9$ eritrosit şeklinde ifade edilmesi (15).

ÖZET

Bu çalışmada 1190 (573 erkek, 617 kadın) denekten heparinli tüplere alınan intravenöz kan örnekleri Beutler'in floresans spot testi ile tarandı. Erkekler arasında % 1.20, kadınlar arasında % 0.98 olmak üzere, ortalama % 1.10 oranında PK yetmezliği saptandı.

Ebeveynleri akraba olan olgularda PK yetmezliği sıklığı, anne babası akraba olmayan olgulara göre belirgin bir şekilde yüksek bulundu ($p < 0,05$).

Heterozigot yetmezlikli 13 olguda standart ölçümle kantitatif enzim aktiviteleri 7,48 - 12,20 IU/grHb arasında değişmekteydi.

Spot testleri pozitif 100 örnekte, standart ölçümle kantitatif enzim tayinleri yapıldı. Ortalama PK aktivitesi, kadınlarda 20.44, erkeklerde 19.67, her iki cinste 19.80 IU/grHb, PK referans değerleri 14.80 - 25.70 IU/grHb olarak bulundu.

Ortalama enzim aktivitesi 0-14 yaş grubunda 22.80 ± 3.6 , 15-44 yaş grubunda 20.90 ± 3.2 , 45 ve üzeri yaş grubunda 19.0 ± 3.0 , tüm olgularda 19.80 ± 4.10 IU/grHb bulundu. Her iki cinste 0-14 ve 15-44 yaş gruplarında, 45 ve üzeri yaş gruplarına göre enzim aktivitesi yüksek bulundu ($p < 0,05$).

Düşük S ve düşük S + FBP'li ortamda normal PK aktivitesi sırasıyla $3,4 \pm 1,3$, $7,9 \pm 0,8$ IU/grHb olarak tespit edildi.

Floresans spot test sonuçları ve kantitatif enzim aktiviteleri arasındaki uyumun oldukça iyi olduğunu gözledik. Aktiviteleri 12.20 IU/grHb ve daha az olan yetmezlikli olguları spot test ile yakalayabildik.

Ek 1 : Antalya ilinde PK yetmezliği prevalansı anket formu.

TANIIM KODU

Kişi sıra no :

Adı ve soyadı :

Ev adresi :

A) Cinsiyeti

1 - Erkek

2 - Kadın

B) Yaşı ()

1 - 0-14

2 - 15-44

3 - 45 ve üzeri

C) Aile kökeni

1 - Merkez

8 - Kumluca

2 - Serik

9 - Elmalı

3 - Manavgat

10- Korkuteli

4 - Alanya

11- Finike

5 - Gazipaşı

12- Kaş

6 - Gündoğmuş

13- Antalya dışı ()

7 - Akseki

D) Anne baba arasında akrabalık olup olmadığı

1 - Var

2 - Yok

3 - Bilinmiyor

E) Şimdiye kadar sarılık geçirip geçirmediği

1 - Evet

2 - Hayır

3 - Hatırlamıyor

F) Ne kadar sürdüğü (gün olarak) ?

Kısaltmalar

ADP	: Adenozin difosfat
ASD	: Asit - sitrat - dekstroz
ATP	: Adenozin trifosfat
2,3-BPG	: 2,3-bifosfoglisarat
CaM-PK	: Kalsiyum/kalmodüline bağımlı protein kinaz
c-AMP	: Siklik adenozin monofosfat
CDP	: Sitidin difosfat
EDIA	: Etilendinitrilo tetraasetik asit
FBP	: Fruktoz - 1,6 - bifosfat
GDP	: Guanidin difosfat
G-6P	: Glikoz -6-fosfat
G-6-PD	: Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz
Hb	: Hemoglobin
HMP	: Heksoz monofosfat
ICSH	: Hematolojide standardizasyonu belirleyen Uluslararası komite.
KNSHA	: Konjenital non-sferositik hemolitik anemi
LDH	: Laktat dehidrogenaz
NAD ⁺	: Nikotin adenin dinükleotit
NADH	: Redükte nikotin adenin dinükleotit
PEP	: Fosfoenopirüvat
PK	: Pirüvat kinaz
S	: Substrat
-SH	: Redükte sülfidril grubu
TBG	: Tiroksin bağlayan protein
UDP	: Üridin difosfat

KAYNAKLAR

- Nathan, G.; Oski, A.F. : Hematology of Infancy and childhood. 1981.
- Dolunay, M. : Antalya İl Merkezinde G-6-PD yetmezliği prevalansı ve Antalya kökenli yetmezlikli bireylerde biyokimyasal görünüm. Uzmanlık Tezi, Antalya, 1988.
- Tietz, W.N. : Textbook of Clinical Chemistry. 1986.
- Stryer, L. : Biochemistry. 1988.
- Murray, K.R.; Mayes, A.P.; Granner, K.D; Rodwell, W.V. : Harper's Biochemistry. 1990.
- Miwa, S. : Hereditary disorders of red cell enzymes in the Embden-Meyerhof pathway Am J.Hem. 14 : 381-391, 1983.
- Zanella, A.; Brovelli, A.; et al : Membrane Abnormalities of PK deficient Red Cells, Br.J.Haem. 1979, 42 : 101-108.
- Valentine, W.N.; Tanaka, K.R.; Miwa, S. : A specific erythrocyte glycolytic enzyme defect pyruvate kinase in three subjects with congenital non-spherocytic hemolytic anemia. Trans.Ar.Am. ph 74 : 100-110, 1961.
- Miwa, S.; Fujii, H.; et al : Seven pyruvate kinase variants characterized by the ICSH recommended methods. Bri.J.Heam. 1980, 45 : 575-583.
- Lakomek, M.; Winkler, H.; et al : Erythrocyte pyruvate kinase deficiency : A kinetic method for differentiation between heterozygosity and compound-heterozygosity. A.J.Hem. 31 : 225-232, 1989.

Miwa,S., Boivin,P., Blume,G.K., et al : Recommended Methods for the Characterization of red cell pyruvate kinase variants. British J. of Heam. 43 : 275-286, 1979.

Güven,A. :Antalya'da β Talasemi taşıyıcı sıklığı. Uzmanlık Tezi, Antalya, 1989.

Aksu,.A.T., Esen,F., Dolunay,S.M., et al : Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase (1.1.1.49) deficiency in Antalya province, Turkey. An epidemiologic and biochemical study. Am J.of Epi. 131 : 6, 1990.

Güz,K. : Antalya yöresinde akraba evliliği sıklığı ve tıbbi sonuçları. Yüksek lisans tezi, Antalya, 1987.

Mossa,A., Tagarelli, A., Poleari,R.,; et al : Rapid determination of erythrocyte pyruvate kinase activity. Clin Chem. 39/3 : 512-516, 1993.

Gözükara,M.E. : Biyokimya, Ankara, 1990.

Kaplan,C.J.; Kahn,A. : Advances in hereditary red cell enzyme anomalies. Hum.Gen. 50, 1, 1979.

Staal,G.E.; Koster,J.F. : A new variant of red blood cell pyruvate kinase deficiency. Biochem.Biophys.Acta. 258 : 685, 1972.

Lakomek,M.; Winkler,H.; Tillmann,W.; Marti, H.R. : Erythrocyte pyruvate kinase deficiency : Characterization of a new variant (PK"Aarau"). Blut. 48 : 123-129, 1984.

Neubauer,B., Lakomek,M., Winkler,H., Parke,M., et al : Points mutations in the L-type pyruvate kinase gene of two Children with hemolytic anemia caused by pyruvate kinase deficiency. Blood., 1991 May, 1 77 (9).

- 29- Kechemir,D., Audit,M.A., Rosa,R, et al : Purification of human leucocyte pyruvate kinase. J.of Chromat., 383 : 43-50, 1980.
- 30- Marie,J.; Kahn,A. : Human erythrocyte pyruvate kinase total purification and evidence for antigenic identity with L-type enzyme. Bio. et Bioph. Acta. 481 : 916-924, 1977.
- 31- Ashizawa,K., Fukuda,T., Cheng,S.Y. : Transcriptional stimulation by thyroid hormone of a cytosolic thyroid hormone binding protein which is homologous to a subunit of pyruvate kinase M_1 . Biochemistry 1992, 17 31(10) : 2774-2778.
- 32- Parkinson,C., Ashizawa,K., Cheng,S.Y., et al : The monomer of pyruvate kinase subtype M_1 , is both a kinase and a cytosolic thyroid hormone binding protein. Biochem. Bioph. Res. Commun., 30 : 179 (1) : 668-674, 1991.
- 33- Ashizawa,K., Mc Phie, P., Lin,K.H., Cheng, S.Y. : An in vitro novel mechanism of regulating the activity of pyruvate kinase M_2 by thyroid hormone and fructose 1,6-bisphosphate. Biochemistry, 23; 30(29) : 7105-7111, 1991.
- 34- Takegawa,S.; Fujii,H. : Change of pyruvate kinase isozymes from M_2 to L-type during development of the red cell. Br.J.Haem. 1983, 54 : 467-474.
- 35- Marie,J.; Simon,M.P. : One gene but two messenger RNAs encode liver L and red cell L' pyruvate kinase subunits. Nature. 293 : 7, 1981.
- 36- Marie,J.; Kahn,A. : Proteolytic processing of human erythrocyte pyruvate kinase study of normal and

- 21- Johnson, M.L., Jones,D.P., Freeman J.M., Wang,W. : Biochemical and molecular characterization of variant pyruvate kinase enzymes and genes from three patients with red blood cell pyruvate kinase deficiency. *Acta Haemat.*, 1991, 86 (2) : 79-85.
- 22- Kanno, H., Fujii,H., Miwa,S. : Low substrate affinity of pyruvate kinase variant (PK Sapporo) caused by a single amino acid substitution. (426 Arg --> Gln) associated with hereditary hemolytic anemia. *Blood*, 81(9) : 2439-2941, 1993.
- 23- Saheki,S.; Tanaka,T. : Peptide structures of pyruvate kinases isozymes. *Biochem et Biophys Acta*. 704 : 494-502, 1982.
- 24- Staal,J.; Koster,F. : Human erythrocyte pyruvate kinase its purification and some properties. *Biochem et al Bio Acta*. 227 : 86-96, 1971.
- 25- Koster,F.; Staal,J.; et al : The effect of urea and temperature on red blood cell pyruvate kinase. *Biochim. Biophys. Acta*. 236, 362-65, 1971.
- 26- Kechemir,D.; Audit-Max,I.; Rosa,R. : Comparative study of human M₂ type pyruvate kinases isolated from leukocytes and erythrocytes of a patient with red cell pyruvate kinases hyperactivity. *Enzymes*. 1989, 41 : 121-130.
- 27- Bergmeyer, U.H. : Methods of enzymatic analysis. Third edition. Vol III, 1987.
- 28- Shinohara,K., Miwa,S., Nakashima,K., et al : A new pyruvate kinase variant (PK Osaka) demonstrated by partial purification and condensation. *Am J.Hum.Genet.*, 28 : 474-481, 1976.

- 7- Miwa,S.; Tanaka,T. : Four new pyruvate kinase variant and a classical pyruvate kinase deficiency. Br.J.Haem. 1975.29.157.
- 8- Audit,M.; Rosa,R. : Pyruvate kinase hyperactivity genetically determined : Metabolic consequences and molecular characterization. Bioc et al Bio Acta. 447 : 86, 1976.
- 9- Vaulant,S.; Munnich,A.; Kahn,A. : Transcriptinal and post-transcriptional regulation of L-type pyruvate kinase gene expression in rat liver. The J.Biological Chem. 261, 17 : 7621-7625, 1986.
- 0- Raymondjean,M.; Vaulont,S.; Kahn,A. : Positive and negative regulation of gene expression by insulin and glucagon : the model of L-type pyruvate kinase gene. Biochimie (1991). 73 : 41-45.
- 1- Yorek,A.; Rufo,A.; Ray,D. : Gluconeogenesis in rabbit liver IV. the effects of glucagon, epinephrine, Alfa and β adrenergic agents on gluconeogenesis and pyruvate kinase in hepatocytes given dihydroxyacetone or fructose. Bioc. et Biophysica Acta. 675(1981) : 309-315.
- 2- Mieskes,G.; Kuduz,J. : Are calcium-dependent protein kinases involved in the regulation of glycolytic / gluconeogenetic enzyems. Eur. J.Bioch. 167 : 384-389, 1987.
- 3- Berkel,V.; Kruijt,K.J.; Koster,F. : Hormone-Induced changes in pyruvate kinase activity in isolated hepatocytes II. regulation to the hormonal regulation of gluconeogenesis. Biocimica et Biophysica Acta. 500(1977) : 267-276.

- Titanji, P.K., Engström, L., et al : Regulation in vitro of rat liver pyruvate kinase by phosphorylation - dephosphorylation reactions, catalyzed by cyclic-AMP dependent protein kinases and a histone. Bioch. Bioph. Acta, 422, 98-108, 422. 1976.
- Nakashima, K.; Miwa, S.; Tanaka T.; et al : Electroforetic and kinetic studies of mutant erythrocyte pyruvate kinases. Blood. 40:143-4. 1974.
- Etiemble, J.; Picot, C. : A red cell pyruvate kinase mutant with normal L-type pyruvate kinase in the liver. Hum. Gen. 61 : 256-258. 1982.
- Munro, F.G., Miller, R.D. : Mechanism of fructose diphosphate activation of a mutant pyruvate kinase from human red cells. Bioch. et Bioph. Acta, 206 : 87-97, 1970.
- Corcoran, E., Phelan, J.J., Fottrel, F.P. : Purification and properties of pyruvate kinase from human lung. Bioch. et Bioph. Acta. 446 : 96-104, 1976.
- Blume, G.K., Busch, D., Hoffbauer, W.R., et al : The polymorphism of nucleoside effect in pyruvate kinase deficiency. Human. genetic, 9 : 257-259, 1970.
- Noguchi, T., Inoue, H., Tanaka, T. : Transcriptional and post-transcriptional regulation of L-type pyruvate kinase in diabetic rat liver by insulin and dietary. The J Biol. Chem., 260, 26 : 1493-1497, 1987.
- Rozengurt, E., Carminatti, H., et al : Some kinetic properties of liver pyruvate kinase (type L) II. Effect of pH on its allosteric behavior. The J Bio. Chem. 244, 12 : 3142-3147, 1969.

- 52- Imamura,K., Tanaka,T., Nishing,T., et al : Electroforetic, kinetic and immunological studies on pyruvate kinase of erythrocytes and other tissues. J Biochem, Tokyo, 74 : 1165-1175, 1973.
- 53- Berry,N.; Mazzachi,D.; et al : Enzimatic determination of potassium in serum. Clin.Chem. 35/5 : 817-820, 1989.
- 54- Kahn,A.; Marie,J. : Molecular mechanism of erythrocyte pyruvate kinase deficiency. Hum.Gen. 29 : 271-280, 1975.
- 55- Berkel, Van C.; Staal,J.; et al : On the molecular basis of PK deficiency II. role of thiol groups in PK from PK deficient patient. Bio et Bioph Acta. 1974, 334 : 361-367.
- 56- Valentine,W.N.; Paglia,D.E. : Studies with human erythrocyte pyruvate kinase : effect of modification of sulfhydryl groups. Br.J.Heam. 53 : 385, 1983.
- 57- Badwey,J.; Westhead,A. : Post-translational modification of human erythrocyte pyruvat kinase. Bioc.Res.Comm. 74 : 1326, 1977.
- 58- Kılınç,K.; Özer,N. : İnsan alyuvarlar pirüvat kinazda sülfidril grupların önemi ve fonksiyonu. Doğa Tıp ve Eczacılık Dergisi. C: 12, S: 2, 1988.
- 59- Blume,K.G.; Arnold,H.; et al : On the molecular basis of pyruvate kinase deficiency. Biochim.Biophys.Acta. 370 : 601, 1974.
- 60- Blume,K.G.; Arnold,H.; Lohr,G.W.; Beutler,E. : Additional diagnostic procedures for the detection of abnormal red cell pyruvate kinase. Clin.Chim.Acta. 1993, 43 : 443-446.

- 61- Rose, I.; Warms, J.V.; et al : Control of glycolysis in the human red blood cell. J.Biol.Chem. 241 : 4848, 1966.
- 62- Etiemble, J., Picat, C., Ohermy, D., Boivin, P., et al : Erythrocytic pyruvate kinase deficiency and hemolytic anemia inherited as a dominant trait. Am J of Hemat., 17 : 251-260, 1984.
- 63 - Keitt, A.S. : Pyruvate kinase deficiency and related disorders of red cell glycolysis. Am.J.Med. 41 : 762, 1966.
- 64- Nathan, D.G.; Oski, F.A.; et al : Life-span and organ sequestration of the red cell in pyruvate kinase deficiency. New Engl.J.Med. 278 : 73, 1968.
- 65- Miwa, S.; Fujii, H. : Pyruvate kinase deficiency. Clin Biochem. 1990, 23 : 155-157.
- 66- Etiemble, J.; Picat, C.; Boivin, P. : Immunological studies of PK and PFK deficiencies induced by chemotherapy. Scant.J.Heamatol. 1983, 31 : 215-220.
- 67- Valentine, W.N.; Paglia, D.E. : Erythroenzymopathies and hemolytic anemia : the many faces of inherited variant enzymes. J.Lab.Clin.Med. 1990, 115 : 12-20.
- 68- Paglia, E.D., Valentine, N.W., Rucnagel, L.D. : Defective erythrocyte pyruvate kinase with impaired kinetics and reduced optimal activity. British J of Heam., 22, 651, 1972.
- 69- Feng, C.S., Tsang, S.S., Mak, Y.T. : Prevalence of pyruvate kinase deficiency among the Chinese : determination by the quantitative assay. Am.J.Hematol, 43(4) : 271-273, 1993.

- 0- Medicis, E., Ross, P., Friedman, R., Hume, H., et al :
Hereditary non spherocytic hemolytic anemia due to
pyruvate kinase deficiency : a prevalence study in
Quebec (Canada). *Hum. Hered.*, 42 (3) : 179-183, 1992.
- 1- Garacia, C.; Moragon, C.; Fernandez, L. : Frequency of
glutathione reductase pyruvate kinase and G-6-PD
deficiency in a Spanish population. *Hum. Her.* 29 :
310-313, 1979.
- 2- El-Hazmi, F.; Al-Swailem, R.; et al : Frequency of
G-6-PD, PK, and Hexokinase deficiency in the Saudi
population. *Hum. Hered.* 36 : 45-49, 1986.
- 3- Abu-Melha, A., Ahmed, M.; Knox-Macaulay, H.; et al :
Erythrocyte pyruvate kinase deficiency in newborns of
eastern Saudi Arabia. *Acta Haem.*, 1991; 85 (4) :
192-194.
- 4- Nathan, D.G.; Oski, F.A.; et al : Extreme hemolysis and
red cell distortion in erythrocyte deficiency.
II. measurements of erythrocyte glucose consumption,
potassium flux and adenosine triphosphate stability.
New Engl. J. Med. 272 : 118, 1965.
- Paglia, D.E.; Valentine, W.N. : Evidence of molecular
alteration of pyruvate kinase as a consequence of
erythrocyte aging. *J. Lab. Med.* 76 : 202, 1970.
- Oski, F.A.; Nathan, D.G. : Extreme hemolysis and red cell
distortion in erythrocyte pyruvate kinase deficiency.
I. Morphology, erythrokinetics, and family enzyme
studies. *New Engl. J. Med.* 270 : 1023, 1968.
- Mentzer, W.C.; Baehner, R.L.; et al : Selective
reticulocyte destruction in erythrocyte pyruvate kinase
deficiency. *J. Clin. Invest.* 50 : 688, 1972.

- 78- Axel,K.; Joella,M.; Juan,L. : Search for a relationship between molecular anomalies of the mutant erythrocyte pyruvate kinase variants and their pathological expression. Hum.Genet. 57 : 172-175, 1981.
- 79- Schröter,W.; Tillmann,W. : Membrane localized pyruvate kinase of red blood cells in hemolytic anemia associated with pyruvate kinase deficiency. Clin.Wochenschr. 53 : 1131-1132, 1975.
- 80- Zanella,A.; Rebulli,P.; Vullo,C.; Izzo,C.; et al : Hereditary pyruvate kinase deficiency : Role of the abnormal enzyme in red cell pathophysiology. British J of Haem., 40 : 551-562, 1978.
- 81- Eng Luan,I.L.; Wan Pui,W.; NG.T. : Reduced glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase and PK in erythrocytes of human newborns and adults in Malaysia. Br.J. of Haem., 25 : 577-585, 1973.
- 82- Vives,L.; Marie,J. : Hereditary erythrocyte PK deficiency and chronic hemolytic anemia : Clinical Genetic and Molecular studies in six new Spanish patients. Br.J.Haem. 1988, 54 : 467-474.
- 83- Shinohara,K.; Tanaka,K.R. : Pyruvate kinase deficiency hemolytic anemia : enzymatic characterization studies in twelve patients. Hemoglobin. 1980 : 4-611-625.
- 4- Bossu,M.; Dache,M. : Neonatal hemolysis due to a transient severity of inherited PK deficiency. Acta Haem. 40 : 116, 1968.
- 5- Beutler,E. : A series of new screening procedures for PK, G-6-PD and glutathione reductase deficiency. Blood. 28 : 553-562, 1966.

- 86- Beutler, E.; Blume, K.G.; Kaplan, J.C.; Valentine, W.N. : International Committee for Standardization in Haematology Recommended methods for red-cell enzyme analysis. Br.J.Haemat. 35 : 331-340, 1977.
- 87- Vives-Corrons, J.L.; Marie, J.; Pujades, M.A.; Kahn, A. : Hereditary erythrocyte pyruvate kinase deficiency and chronic hemolytic anemia : clinical, genetic and molecular studies in six new Spanish patients. Hum.Genet. 53 : 401-408, 1980.
- 88- Glader, B.E. : Salicylate-induced injury of pyruvate kinase deficiency erythrocytes. N.Engl.J.Med., 22; 294(17) : 916-918., 1976.
- 89- Yanagi, S.; Yamashita, M.; Hiasa, Y. : Aspirin shares a short-term effect, inhibition of pyruvate kinase activity with tumor promoting agents, but fails to promote rat liver carcinogenesis. Oncology, 50, 4 : 275-278, 1993.
- 90- Sümbüloğlu, K. : Sağlık Bilimlerinde Araştırma ve İstatistik. Çağ Matbaası, Ankara, 1978.
- 91- Plummer, F.D. : Practical Biochemistry. Third Edition, 1983.
- 92- Schroter, W.; Lakomek, M.; Tillmann, W.; Winkler, H. : Pyruvate kinase "Gottingen_{1,2}" : Congenital hemolytic anemia evidence of double heterozygosity, and lack of enzyme cooperativity. Hum.Genet. 60 : 381-386, 1982.
- 93- Beutler, E. : How do red cell enzymes age ? Hypothesis and facts. Br.J.Haematol. 64 : 408-409, 1986.
- 94- Piomelli, S.; Seamon, C.; Corash, L. : How do red cell enzymes age ? Hypothesis and facts. Br.J.Haematol. 64 : 407-408, 1986.

- 95- Marie,J.; Vives-Corrons,J.L.; Kahn,A. : Hereditary erythrocyte pyruvate kinase deficiency : molecular and functional studies of four mutant PK variants detected in Spain. Clin.Chim.Acta. 81 : 153-162, 1977.
- 96- Marie,J.; Zanella,A.; Vives-Corrons,J.L; Najman,A.; Kahn,A. : Significance of the electrophoretic modifications of defective pyruvate kinase variants. Study of six new observations. Clin.Chim Acta. 93 : 61-69, 1979.
- 97- H.Ü.N.E.E. : Türkiye'de Akraba Evlilikleri ve Çocuk Ölümlerine Etkisi. Ed.Tunçbilek,E., Nüfusbilim Dergisi, 9 : 7-26, 1987.
- 98- Kayrın,L.; Yüreğir,I.G. : Çukurova bölgesinde pirüvat kinaz referans değerleri. Bio.J.of Biochem vol: XVI, No:2, 1991.