



TC
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

GLUKOZ 6 FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİM EKSİKLİĞİ OLAN ÇOCUKLARDA MUTASYON ANALİZİ ÇALIŞMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. ENGİN TETİK

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Yusuf Ziya ARAL

AYDIN-2013

TC
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**GLUKOZ 6 FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİM
EKSİKLİĞİ OLAN ÇOCUKLARDA MUTASYON
ANALİZİ ÇALIŞMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. ENGİN TETİK

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Yusuf Ziya Aral

AYDIN-2013

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, ayrıca tezimin yürütülmesinde de bana yol göstererek ilgi, yardım ve desteklerini esirgemeyen tez danışmanı değerli hocam sayın Yrd. Doç.Dr. Yusuf Ziya Aral'a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, emeği geçen hocalarım Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Ferah Sönmez'e, Prof. Dr. Ayşe Yenigün'e, Prof. Dr. Münevver Kaynak Türkmen'e, Doç. Dr. Ayşe Tosun'a, Doç.Dr. Emre Çeçen'e, Yrd. Doç.Dr. Ayvaz Aydoğdu'ya, Yrd. Doç. Dr. Tolga Ünüvar'a, Uzm. Dr. Murat Deveci'ye, Uzm. Dr. İlknur Girişgen'e, Uzm. Dr. Özlem Sancaklı'ya, Uzm. Dr. Defne Engür'e, Uzm. Dr. Dilek Yılmaz'a, Uzm. Dr. Hamdi Oğrağ'a, Uzm. Dr. Derya Çolak 'a, Uzm. Dr. Pınar Uysal'a, teşekkür ederim.

Tezin genetik analizlerinin yapılmasında büyük emeği geçen Genetik Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Gökay Bozkurt'a ve Uzm. Dr. Serkan Kurtgöz 'e teşekkür ederim.

İhtisasım süresince birlikte olduğum, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, pek çok şeyi paylaştığımız tüm asistan, hemşire ve personel arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca maddi manevi her türlü desteği sağlayan canım aileme ve desteğini ve sevgisini hep yanımda hissettiğim aynı zamanda meslektaşım sevgili eşim Uz. Dr. Serap Tetik 'e, dünya tatlısı ikizlerim Arda ve Toprak' a teşekkür ederim.

Dr. Engin Tetik

15.01.2013

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
SİMGELER VE KISALTMALAR	iii
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
EKLER DİZİNİ	vi
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
1. Anemi	2
2. Hemolitik anemi	3
2.1. Hemolitik Anemilerde Laboratuvar Bulguları	6
3. Eritrositte enerji sağlanması	7
3.1. Glikoliz	7
3.2. Eritrositin oksidasyondan korunması	8
3.3. Pentoz fosfat yolu	9
3.4. Glutasyon yolu	10
4. Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz enzimi (G6PD)	12
4.1. G6PD geni	12
4.2. G6PD geni kalıtım	13
4.3. G6PD enzimi	14
4.4. G6PD varyantları	14
4.5. G6PD yetmezliğinin tanısı için uygulanan yöntemler	17
4.5.1. Kalitatif floresan spot test	17
4.5.2. Kantitatif spektrofotometrik yöntem	17
4.5.3. RFLP; Gen ürününün restriksiyon endonükleazlar ile kesilmesi	18
4.5.4. Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP)	18
4.5.5. Mikroarray ile G6PD Gen Mutasyonlarının Tespiti	19
4.6. G6PD Eksikliğinde Klinik Bulgular	19
4.6.1. Yenidoğan sarılığında görülen hemolitik anemi	19
4.6.2. İlaçlara bağlı görülen hemolitik anemi	20
4.6.3. Enfeksiyonla görülen hemolitik anemi	21
4.6.4. Favizm	22
4.6.5. Konjenital non sferositik hemolitik anemi	23
4.7. G6PD eksikliğinde hemoliz mekanizması	23
4.8. G6PD Enzim Eksikliği: Sınıflandırma	24

4.9. G6PD Enzim Eksikliği: Tedavi	25
5. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	26
5.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar	26
5.2. DNA İzalasyonu Kiti	27
5.3. Polimorfizmlerin Analizi İçin Çalışma Protokolü	27
5.3.1. DNA İzalasyon Aşamaları.....	27
5.3.2. DNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi.....	29
5.3.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	29
5.3.3.1. LightCycler Sistemi İçin Kullanılan Floresan Boyalar ve Ölçüm Yapan Kanallar	30
5.3.3.2. Erime Eğrisi (Melting Curbe) Analizi.....	31
5.3.4. LightCycler Mutasyon Belirleme Kiti Karışımı ve Çalışma Protokolü.....	31
6. BULGULAR.....	34
7. TARTIŞMA.....	40
ÖZET	47
İNGİLİZCE ÖZET.....	49
KAYNAKÇA	51
EKLER.....	66

KISALTMALAR

G6PD	: Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz
GSH	: Redükte glutatyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HMP	: Heksoz monofosfat
NADP	: Nikotin adenin dinükleotid fosfat
NADH	: nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Redükte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
YDS	: Yenidoğan sarılığı
IHB	: İndirekt hiperbilirubinemi
2-3 DPG	: 2-3 Difosfogliserat
ATP	: Adenozin trifosfat

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo I: Eritrosit hacimlerine göre yapılan anemilerin sınıflandırılması.....	2
Tablo II: Hemolitik anemilerin etiyolojik ve patogenetik sınıflaması.....	4
Tablo III: G6PD varyant ve mutasyonlarının dağılımı, WHO sınıflaması ve yaygın olduğu bölgeler.....	16
Tablo IV: Hemoliz yapan ilaç listesi G6PD varyant ve mutasyonlarının dağılımı, WHO sınıflaması ve yaygın olduğu bölgeler.....	21
Tablo V: G6PD S218F termal profili.....	32
Tablo VI: RT-PCR karışımı.....	33
Tablo VII: Cinsiyete göre favizm ve yenidoğan sarılığı olgularının dağılımı.....	34
Tablo VIII: Hastaların ortalama yaş, G6PD, hemoglobin ve indirekt bilirubin düzeyleri.....	35
Tablo IX: Favizm ve yenidoğan sarılığı olgularının yaş, G6PD enzim aktivitesi, hemoglobin, indirekt bilirubin düzeyi ortalama değerleri.....	35
Tablo X: Olguların cinsiyete göre yaş, G6PD enzim aktivitesi, hemoglobin, indirekt bilirubin düzeyi ortalama değerleri.....	36
Tablo XI: Favizimli olguların cinsiyete göre yaş, G6PD enzim aktivitesi, hemoglobin, indirekt bilirubin düzeyi ortalama değerleri.....	37
Tablo XII: Yenidoğan sarılıklı olguların cinsiyete göre yaş, G6PD enzim aktivitesi, hemoglobin, indirekt bilirubin düzeyi ortalama değerleri.....	37
Tablo XIII: G6PD enzim eksikliği saptanan hastalarda G6PD S218F mutasyonlarının varlığı.....	38
Tablo XIV: Yenidoğan sarılığı (n=29) ve favizimli (n=31) olgularda cinsiyete göre homozigot ve heterozigot G6PD S218F mutasyonunun dağılımı.....	39

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Pentoz fosfat yolu.....	10
Şekil 2: Pentoz fosfat yolu ile glikolitik yolun bağlantısı ve hidrojen peroksidin glutatyon aracılığıyla indirgenmesi.....	11
Şekil 3: G6PD enzim eksikliğinin dünya üzerindeki coğrafi dağılımı ve en sık görülen varyantlar.....	17
Şekil 4: G6PD eksikliğinde periferik kan yaymasında eritrositlerde Heinz cisimcikleri.....	24
Şekil 5: G6PD S218F mutasyonunu için G6PD geninin 218. pozisyonunda görülebilecek gnotiplerin erime eğrisi analiz sonuçla.....	33

EKLER DİZİNİ

EK 1: Etik kurul onayı.....	67
EK 2: Tablo XV: Favizmlı olguların doğum yerleri, yaş, cinsiyet, hemoglobin, indirekt bilirubin ve G6PD enzim düzeyleri, eritrosit transfüzyonu durumu ve mutasyon analiz sonucu.....	68
EK 3: Tablo XVI: Yenidoğan sarılığı olgularının doğum yerleri, yaş, cinsiyet, hemoglobin, indirekt bilirubin ve G6PD enzim düzeyleri, eritrosit transfüzyonu durumu ve mutasyon analiz sonucu	69

GİRİŞ VE AMAÇ

Eritrositler organizmanın yaşamı için gerekli olan O_2 temini, CO_2 'nin uzaklaştırılması, kan pH'sının ayarlanması gibi hayati işlevlerde rol alırlar. Taşıdığı yüksek derişimdeki O_2 'ne bağıli reaksiyonlar sırasında süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi oksidatif hasara yol açan metabolitler oluşur. Oluşan bu reaktif türevler hücre için zararlıdır. Bazı ilaçlar, bakla ve enfeksiyon gibi oksidatif ajanlara yönelik korunmada eritrositler redükte glutatyonlardan (GSH) yararlanır. GSH yolunun ko-faktörü olan Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADPH), Pentoz Fosfat Yolundan (PFY) elde edilir. Glukoz-6 -fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi PFY'nun birinci basamağında bulunan önemli enzimdir. Bu enzimdeki herhangi bir fonksiyon kaybı NADPH oluşumunun durmasına neden olarak eritrositleri oksidatif hasarlara açık bırakır (1-6) .

G6PD eksikliği olan kişiler asemptomatik olabileceğı gibi, yenidoğan sarılığı, kronik nonsferositik anemi, akut hemolitik anemi ile başvurabilir (7-9).

G6PD enzim eksikliğinde yeni doğanda, doğumdan sonraki ilk günlerde karaciğer fonksiyonlarındaki yetersizlik ve enzim eksikliği sebebiyle bilirubin gereğı kadar hızlı metabolize edilemez ve yeni doğan sarılığı ortaya çıkar. (10,11)

Dünyadaki en yaygın enzimopatilerden biri olan G6PD enzim eksikliği, 400 milyon kişinin taşıdığı tahmin edilen, kalıtsal bir hastalıktır. Enzimin, değışik özellikler gösteren 400' ün üzerinde varyantı ve yaklaşık 170 mutasyonu saptanmıştır (12,13).

Dünya üzerinde G6PD eksikliğinin sıklığı coğrafi bölgeye ve etnik kökene göre farklılıklar göstermektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 1989 yılında yayınlanmış olan listede Türkiye, G6PD enzim eksikliğinin en sık görüldüğü bölgeler sıralamasında İtalya, Yunanistan, Batı Afrika ve Güneydoğu Asya ülkeleriyle birlikte yer almaktadır (5). Tanımlanan 400 varyanttan Dünya'da ve Türkiye'de daha çok Akdeniz yöresinde en sık görüleni G6PD Mediterranean (G6PD Akdeniz) tipidir (14,15).

Çalışmamızda Dünya'da ve Türkiye'de en sık rastlanan mutasyon olan G6PD Akdeniz mutasyonunun favizm ve yenidoğan sarılığı ile başvuran olgulardaki sıklığını belirlemek amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

1. Anemi

Anemi, hemoglobin değerinin yaş ve cinse göre normal kabul edilen değerlerin altında olmasıdır. Eritrositlerin ve hemoglobinin asıl fonksiyonu, akciğerlerden dokulara oksijen transportudur. Anemide, kanın oksijen taşıma kapasitesi azaldığından, dokulara gerekli oksijen miktarı da azalarak doku hipoksisi gelişir. Hipoksi sonucu, dokuların fonksiyonları bozulur; ve aneminin belirtileri pek çok sistemde ortaya çıkar. Özellikle kas, kardiyovasküler sistem ve santral sinir sistemi belirtileri daha sık rastlanan bulgulardır (16).

Solukluk, en sık görülen karakteristik bulgudur. Deri, tırnak yatakları, müköz membranlar ve konjunktivada görülebilir. Efor dispnesi ve çarpıntı diğer sık rastlanan semptomlardır. Hastaların çoğunda dispne eksersiz veya emosyonla ortaya çıktığı halde aneminin ağır olduğu (Hemoglobin; 3 g/dl veya daha az) hallerde ve kalp yetmezliği olanlarda istirahat halinde de dispne vardır. Anemik hastalarda, kalpte üfürüm çoğunlukla vardır ve aneminin ağırlığı ile şiddeti ve görülme sıklığı artar (16).

Anemiler için en yaygın kullanılan sınıflandırma fizyolojik sınıflandırma ve eritrosit boyutlarına göre yapılan sınıflandırmadır. Tablo I'de eritrosit hacimleri esas alınarak yapılan sınıflandırma verilmiştir (16).

Tablo I: Eritrosit hacimlerine göre yapılan anemilerin sınıflandırılması.

A. Mikrositik anemiler

- a. Demir eksikliği anemisi
- b. Kronik kurşun zehirlenmesi
- c. Talasemik sendromlar
- d. Sideroblastik anemiler
- e. Kronik enflamasyon
- f. Unstable hemoglobinopatiler

B. Makrositik anemiler

1. Megaloblastik kemik iliği ile birlikte

- a. Vitamin B12 eksikliğine bağlı anemiler

- b. Folik asit eksikliğine bağlı anemiler
- c. Herediter orotik asidüri
- d. B1 vitaminine cevap veren megaloblastik anemi

2. Megaloblastik değişiklik olmaksızın

- a. Aplastik anemi
- b. Diamond-Blackfan sendromu
- c. Hipotiroidizm
- d. Karaciğer hastalığı
- e. Kemik iliği infiltrasyonu
- f. Diseritropoetik anemi

C. Normositik anemiler

1. Konjenital hemolitik anemiler

- a. Hemoglobinopatiler
- b. Enzim defektleri
- c. Membran defektleri

2. Akkiz hemolitik anemiler

- a. Antikora bağlı anemiler
- b. Mikroanjiopatik hemolitik anemiler
- c. Enfeksiyona bağlı anemiler

3. Akut kan kaybı

4. Splenik göllenme

5. Kronik renal hastalık

1. Hemolitik anemiler

Hemoliz; eritrositlerin normal yaşam sürelerini tamamlamadan yıkılmasına denir. Hemolitik anemilerde eritrositlerin yaşam süresi kısalmıştır. Eritrositlerin yaşam süresi ortalama 120 gündür. Hemolitik anemiler eritrositlerin normal yaşam sürelerinin eritrosit dışı sebeplere veya eritrositlere ait yapısal bozukluklara bağlı olarak kısalmamasından kaynaklanır. Eritrositlerin erken yıkımında, kemik iliği eritrosit yapımını arttırarak cevap verir ve gerektiğinde eritrosit yapımı hızla artabilir (17).

Hemolitik olaylar, eritrositlerin travma ve eksternal toksinlerin etkileri gibi sebeplerle intravasküler hemolizle dolaşımda ve immünglobulin bağlanmış eritrositlerin dalak ve

karaciğer makrofaj reseptörlerine bağlanmasıyla veya deforme eritrositlerin ekstrasvasküler hemolizle dalak ve karaciğerde parçalanmasıyla gerçekleşmektedir (17).

Hemolitik anemilerin yaygın olarak kullanılan etyolojik ve patogenetik sınıflaması Tablo II'de verilmiştir (17).

Tablo II: Hemolitik anemilerin etyolojik ve patogenetik sınıflaması.

I. Kongenital Hemolitik Anemiler

A. Eritrosit membran defektleri

1. Herediter sferositoz
2. Herediter eliptositoz
3. Herediter stomatositoz

B. Eritrosit glikolitik enzimlerinin eksikliği (Emden-Meyerhof yolu)

1. Piruvat kinaz eksikliği
2. Hegzokinaz eksikliği

C. Eritrosit nükleotid metabolizma bozuklukları

1. Pirimidin 5'-nükleotidaz eksikliği

D. Pentoz fosfat yolu ve glutatyon metabolizması enzim eksiklikleri

1. Glukoz 6-Fosfat Dehidrojenaz
2. Glutamin-sistein sentetaz

E. Globin yapısı ve sentezindeki defektler

1. Orak hücreli anemi
2. Diğer hemoglobinopatiler
3. Talasemiler
4. Hemoglobin S hastalığı

II. Edinilmiş Hemolitik Anemiler

A. İmmunohemolitik anemiler

1. Uyumsuz kan transfüzyonu
2. Yeni doğanın hemolitik hastalığı
3. Otoimmün hemolitik anemiler

B. Travmatik veya mikroanjiopatik hemolitik anemiler

1. Kardiyak hastalıklar
2. Hemolitik üremik sendrom
3. Greft rejeksiyonu

C. İnfeksiyöz ajanlar

1. Protozoa
2. Bakteri

D. Kimyasal maddeler ve ilaçlar

1. Oksidan ilaçlar ve kimyasal maddeler
2. Non-oksidan ilaçlar ve kimyasal maddeler

E. Fizik ajanlar (ısı)

F. Hipofosfatemî

G. Karaciğer hastalığı (spur cell anemi)

H. Yeni doğan E vitamini eksikliği

2.1 Hemolitik Anemilerde Laboratuvar Bulguları

Hemolitik anemideki laboratuvar testleri kendi içerisinde üç gruba ayrılabilir(11):

1. Eritrosit yıkımındaki artışla ilgili olanlar
 - Eritrosit yaşam süresi kısalır.
 - Hem katabolizması (Hiperbilirubinemi) vardır.
 - Hemoglobinemi, hemoglobinüri görülür.
 - Laktat dehidrojenaz (LDH) serumda artar.
 - Haptoglobin azalır.

2. Eritrosit yapımındaki artışla ilgili olanlar

- Kemik iliği hiperplazisi
- Retikülositoz
- Demir turn-over'inin artışı

3. Ayırıcı tanıda yararlı olabilen testler

- Direkt Coomb's testi
 - İndirekt Coomb's testi
-

3. Eritrositte Enerji Sağlanması

Glukoz, eritrositlerin gereksinim duyduğu ana metabolizma yakıtıdır. İnsülin bağımsız hücreler olan eritrositlere glukoz girişi hücre membranında yer alan glukoz taşıyıcı moleküller (Glu T-1 ve Glu T-3) aracılığı ile gerçekleşir. Bu taşıyıcılar düşük kan insülin ve glukoz düzeylerinde de hücreye glukoz girişine olanak tanır (18).

Eritrosit içine alınan glukoz; glikoliz ve HMP yollarıyla metabolize edilir. Mitokondri ve diğer sitoplazmik organelleri olmayan eritrositlerde Krebs siklusu ve oksidatif fosforilasyon gerçekleşemez. Bu hücreler 120 günlük ömürlerini idame ettirebilmek için gerekli enerjiyi glukozun aerobik koşullarda bile laktik aside kadar yıkılmasını sağlayan glikoliz yoluyla sağlarlar (18).

Normal şartlarda eritrositteki glukozun %90'ı glikoliz (Embden-Meyerhof yolu) ile kullanılır. HMP yolu glukozun oksidasyonu için ikinci bir yoldur ve eritrosite alınan glukozun %10 kadarı bu yolda kullanılarak NADPH elde edilir (18).

3.1. Glikoliz

Olgun eritrositlerde adenosin trifosfat (ATP) sentezi için kullanılabilecek tek yol glikolizdir. Hücrenin sitozolünde gerçekleşen glikoliz ile 1 molekül glukoz, 2 molekül piruvata dönüşürken net 2 molekül ATP sentezlenir. Eritrositlerde piruvatın oksidasyonu için gerekli enzim sistemlerini içeren mitokondri olmadığı için piruvat, laktat dehidrogenaz enziminin katalizlediği reaksiyonla laktata dönüşür (18).

Glikolizden sağlanan ATP hücrenin bikonkav şeklinin korunması, membran deformabilitesinin sürdürülmesi, aktif sodyum ve potasyum transportu, hücre içindekalsiyumun düşük seviyede tutulması, membran proteinlerinin fosforilasyonu gibi enerjigerektiren reaksiyonlarda kullanılır (19,20).

Eritrositlerde glikolizin diğer fonksiyonu da 2,3 difosfogliserat (2,3-DPG) sentezidir. Rapaport Luebering şantı olarak isimlendirilen ve glikolizde bir ara yolla sentezlenen 2,3-DPG hemoglobine bağlandığında oksijene olan afinitesini azaltarak dokularındaha rahat oksijenlenmesini sağlar (19).

Eritrosit 2,3-DPG düzeyinin azalması durumunda ise hemoglobinin oksijene afinitesi artar, periferik dokulara oksijen salınımı azalır. Eritrosit 2,3-DPG konsantrasyonu kan hemoglobin düzeyiyle ters orantılı olarak değişir ve anemilerde önemli bir adaptasyon mekanizmasıdır (21).

3.2 Eritrositin Oksidasyondan Korunması

Yađlar, proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi tüm hücrenel bileşenler, reaktif oksijen metabolitlerine maruz kaldıklarında, metabolik ve hücrenel kusura yol açacak şekilde hasar görebilirler. Hidroksil ve hidroperoksil radikaller, hücre membranının önemli bileşenleri olan fosfolipidlerin ve poliansatüre yağların oksidasyonuna yol açabilmekte, sonuçta membranın yapısı ve fonksiyonları bozulmaktadır. Proteinlerin oksidasyonu ise proteolize duyarlılığı artırmaktadır (22).

Reaktif oksijen metabolitlerinin hasar yapıcı etkilerine karşı hücrenel savunma sistemleri mevcuttur. Katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi enzimler ile C vitamini, ürik asit, glutatyon, taurin, E vitamini, β-karoten ve bilirubin bunlar arasında sayılabilir (22).

Hemoglobinin hem kısmındaki iki değerlikli (ferröz) demir atomlarının üç değerlikli olan ferrik (Fe⁺³) hale oksidasyonuyla methemoglobin oluşur. Bu haliyle hemoglobin oksijen veya CO₂ taşıyamadığından, fonksiyonel bir anemi ortaya çıkar. Bazı ilaçlar (lidokain, sülfonamidler, dapson, klorokin, primakin, fenasetin), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve serbest radikaller gibi endojen ürünler methemoglobin oluşumuna neden olurlar (22).

Sağlıklı kişilerde methemoglobin oranı toplam hemoglobinin en fazla %1.5’u kadardır. Methemoglobin oluşumu belli bir seviyeye kadar geri dönüşümlü olur. Normal şartlarda methemoglobin, en önemlisi nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) bağımlı methemoglobin redüktaz olan sistemle (diğerleri rezerv sistemler olan; redükte glutatyon askorbik asit, NADPH bağımlı methemoglobin redüktaz) indirgenerek ferröz demirli hemoglobin haline dönüşür (23).

Oksidasyonun devam etmesi durumunda geri dönüşümsüz konformasyonel değişimlerle sülfhemoglobin ortaya çıkar. Hemoglobin denatüre olarak eritrosit içinde presipite olur. Sülfhemoglobin presipitatları eritrosit hücre membranındaki sülfhidril grupları ile disülfid bağları yaparlar. Membrana bağlı görülen bu presipitatlar “Heinz cisimcikleri” olarak isimlendirilir (24).

Eritrositlerde peroksitlerin artışı hemoglobinin methemoglobine dönüşümüne, membran lipidlerinin ve hücre için yaşamsal önemi olan enzim yapısındaki proteinlerin oksidasyonuna neden olur. Eritrositlerde H_2O_2 ’nin yıkımında katalaz enzimi aktif rol üstlenir. Katalaz enzimi yapısında dört molekül NADPH taşımaktadır. NADPH yokluğunda bu enzim aktivite gösteremez. GSH, methemoglobinin redüksiyonu yanı sıra, katalaz enzimi ile birlikte hücre içinde H_2O_2 ve organik peroksitlerin birikimini engelleyerek de eritrositleri korumaktadır. Okside glutatyonun GSH’ye dönüşümü glutatyon redüktaz enzimi ile olmaktadır. Bu reaksiyon NADPH gerektirir (25,26).

Hemoglobin presipitatlarının membrana bağlanması, membran lipidlerinin oksidasyonu eritrositin stabilitesini bozar. Eritrosit membranının rijiditesi artar, deformabilitesi azalır. Damar içi hemolize ya da hasarlı hücrenin retiküloendotelyal sistem tarafından yıkılmasına neden olur (24).

Sonuç olarak eritrosit hücre bütünlüğünün ve işlevlerinin sürdürülebilmesi için GSH’ye; sürekli tüketilen GSH’nin rejenerasyonu, NADPH bağımlı methemoglobin redüktaz sisteminin ve katalaz enziminin işlevi için de NADPH’ye gereksinim vardır (23). Eritrositte NADPH oluşumu için tek kaynak ise HMP metabolik yoludur (24).

3.3. Pentoz Fosfat Yolu

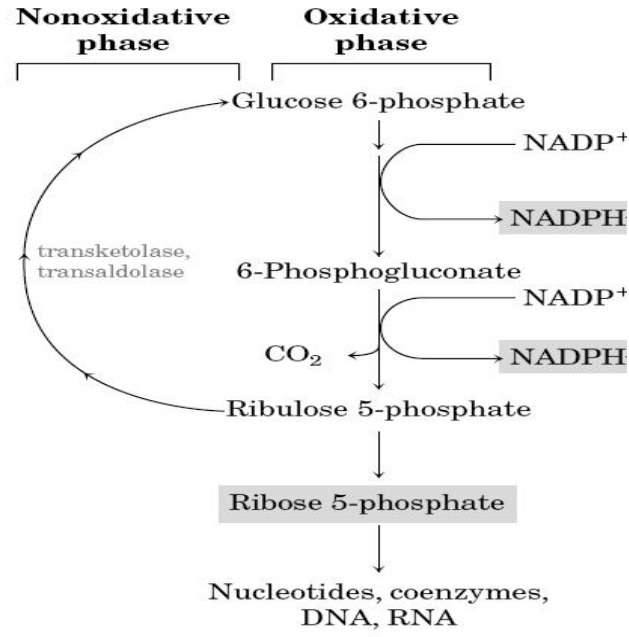
Pentoz fosfat yolu alyuvarlar ve beyin doku hücreleri gibi bazı hücrelerin temel enerji kaynağı olan glukozun oksidasyonu için başvurulmuş alternatif bir oksidatif yoldur. Eritrosit içine giren glukozun %90'ı glikolitik yolla okside olurken, %10'luk bir kısmı ise pentoz fosfat yolu ile metabolize edilir (27) .

Pentoz fosfat yolunda indirgeyici biyosentez reaksiyonları için gerekli NADPH'lar üretilmektedir. Olgun eritrositlerin biyosentez yeteneğinin olmaması nedeniyle pentoz fosfat yolunun eritrositler için önemi indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeylerini dengede tutabilmek için gerekli NADPH'ların elde edilmesidir. GSH'nın görevi ekzojen ve endojen kaynaklı peroksit ve diğer reaktif oksijen türlerine karşı eritrositleri korumaktadır (28).

Heksoz monofosfat yolu da denen bu yolun temel görevi, eritrositlerin savunma sisteminde kullanılan NADPH'nin üretilmesidir. Üretilen NADPH'lar genel olarak; İndirgenmiş glutatyon, steroidler, bazı amino asitler, yağ asitlerinin sentezi ve DNA sentezi için ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere dönüşmesi gibi birçok reaksiyonda kullanılırlar (3,15,28,29).

Pentoz fosfat yolu, glukoz 6-fosfatın 1 nolu karbonunun dehidrogenasyonu ile başlar. Bu reaksiyon glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenir. Reaksiyonun ürünü 6-fosfoglukono- δ -laktondur. Bir sonraki basamak 6-fosfoglukono δ -laktunun laktonaz enzimi katalizörlüğünde 6-fosfoglukonata hidrolizidir. 6 karbonlu şeker daha sonra oksidatif dekarboksilasyonla ribuloz 5-fosfata dönüşür. Pentoz fosfat yolu reaksiyonları sonucu bir glukoz molekülü başına iki NADPH ve bir riboz 5-fosfat meydana gelmektedir. Pentoz fosfat yolunda oksidatif reaksiyonla glukoz 6-fosfat riboz 5-fosfata oksitlenirken toplam 2 NADPH üretilir (2,28).

Pentoz fosfat yolunda oksidatif ve non-oksidatif faz olarak iki yol bulunmaktadır. Oksidatif fazda son ürün olarak riboz 5 fosfat üretilir, çoğu dokuda yol burada noktalanır ve oluşan riboz 5-fosfat, nükleotid sentezine yönelir. Eritrositlerde olduğu gibi primer ihtiyacı NADPH olan dokularda ise nonoksidatif fazda riboz 5-fosfattan önceki ara ürün olan ribuloz 5-fosfat transaldolaz ve transketolaz enzimleriyle tekrar Glukoz 6-fosfata katalizlenir (Şekil 1)(23).

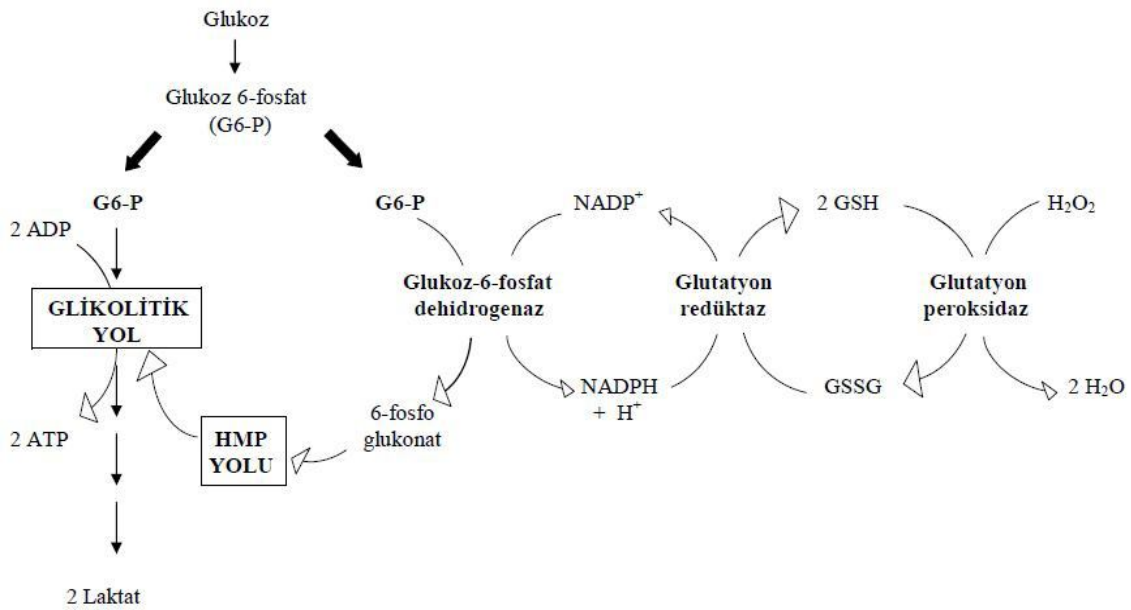


Şekil 1: Pentoz fosfat yolu (23).

3.4. Glutasyon Yolu

GSH hemoglobin ve bazı eritrosit proteinlerini oksidatif hasardan koruyan bir tripeptiddir. Metabolik yol glutasyon redüktaz enzimi tarafından NADP 'nin reversible oksidasyon ve redüksiyonu aracılığı ile pentoz fosfat yoluna bağlanır. Glutasyon peroksidaz, H₂O₂ 'nin suya dönüşümünü katalizler (Şekil 2) (3,30).

Glutasyonun eritrositlerde devamlı olarak sentezi gerekir. Bu sentezde glutamil sistein sentetaz ve glutasyon sentetaz enzimleri görev alır. Glutamil sistein sentetaz, glutamik asit ve sisteinden dipeptid oluştururken, glutasyon sentetaz dipeptideglisin bağlanarak glutasyon oluşumunu katalizler. Her iki reaksiyon için ATP gerektirir (Şekil 2) (28,31).



Şekil 2: Pentoz fosfat yolu ile glikolitik yolun bağlantısı ve hidrojen peroksidin glutatyon aracılığıyla indirgenmesi.

Oksidatif ajanlardan (enfeksiyonlar, bazı ilaçlar, bakla) kaynaklanan H_2O_2 , süperoksit anyonu (O_2^-) ve serbest hidroksil radikalleri (OH^-) hücre için son derece toksiktir. GSH, H_2O_2 ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek zehirsizleştirme işlemlerinde görev yapar (28).

Hemoglobine oksijen bağlanması sırasında da güçlü bir oksidan olan süperoksit anyonu oluşur. Son derece toksik olan süperoksit anyonu, süperoksit dismutaz etkisiyle H_2O_2 'e dönüşür (28,30).

Hidrojen peroksidin ve diğer peroksitlerin glutatyon peroksidaz etkisiyle etkisiz hale getirilmesi sırasında GSH yükseltgenir ve yükseltgenmiş glutatyon haline dönüşür. Yükseltgenmiş glutatyonun glutatyon redüktaz vasıtasıyla indirgenerek yeniden kullanılabilir hale dönüşmesi için NADPH gerekmektedir (3,30,32,33).

Eritrositlerde hemoglobin yapısındaki demirin indirgenmiş halde (Fe^{+2}) tutulmasında glutatyonun da rolü bulunmaktadır. Methemoglobinin yapısındaki yükseltgenmiş demirin (Fe^{+3}) indirgenmesi sırasında glutatyon tüketilmektedir. Bu nedenle eritrositlerin indirgenmiş glutatyonla olan gereksinimleri oldukça fazladır (34).

4. Glukoz 6. Fosfat Dehidrogenaz Enzimi

Pentoz fosfat yolunun ilk ve hız kısıtlayıcı enzimi olan G6PD sitozolik bir enzimdir. İlk kez 1931 yılında Otto Warburg ve Christian tarafından keşfedilmiş, “Zwischenferment” olarak adlandırılmıştır (35,36).

Prokaryotlardan mayalara, protozoalara, bitki ve hayvanlara kadar tüm canlılarda bulunan enzim, aynı monomerlerin bir araya gelmesiyle oluşan dimerik ve tetramerik yapılar şeklindedir. Monomer halde iken inaktif, polimerik halde aktiftir. Enzimin monomerleri 515 aminoasit subüniti içerirler ve 59265 Dalton molekül ağırlığına sahiptirler. Monomerler dimerleri oluştururken, her dimer iki molekül NADP⁺'yi sıkıca bağlar. Enzim hücre içerisinde çoğunlukla dimer-tetramer karışımı halinde bulunur (1,4).

İnsan G6PD enziminin glukoz 6-fosfat bağlayan bölgesinin merkezinde 205. amino asit olan lizin bulunmaktadır. NADP⁺'nin bağlandığı bölge ise henüz kesin olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte 386 ve 387 numaralı amino asitler olan arginin ve lizinin bulunduğu bölge olduğu tahmin edilmektedir (4).

Normal eritrositlerde G6PD enziminin yarılanma ömrü 62 gündür. İlk kez 1959 yılında enzimin aktivitesinin yaşlı eritrositlerde düşük, genç eritrositlerde daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Retikülositlerde en yüksek (yaşlı eritrositlere göre 5 kat daha fazla) düzeydedir (37,38).

Normal şartlarda G6PD enzimi maksimum kapasitesinin %0.1-0.2'si ile çalışırken, oksidatif stres durumu ortaya çıktığında aktivitesi çok artar (36).

4.1. G6PD Geni

G-6-PD enzimini kodlayan gen 20114 baz çifti uzunluğunda, 13 ekzon ve 12 intron bölgesinden oluşur, X kromozomu üzerinde q28 lokusuna yerleşmiştir. G-6-PD geni yaklaşık 20 Kb, geninin kodladığı mRNA ise 2,269 baz çifti uzunluğundadır. 515 amino asit uzunluğundaki G6PD enzimini, genin 1545 baz çifti (bç) uzunluğundaki şifrelenen bölgesi kodlamaktadır (39,40,41).

4.2. G6PD Geninin Kalıtımı

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz geni X kromozomunun uzun kolunun distalinde, 28. band bölgesinde (Xq28) kodlanmıştır (1). Genin tam dizi analizi 1991 yılında Chen ve ark. (48) tarafından tamamlanmış ve 20114 baz çiftinden meydana geldiği saptanmıştır.

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği X'e bağlı resesif geçiş gösterir (42). Erkekler hemizigot normal (Gd^{+}) ya da hemizigot yetmezlikli (Gd^{-}); kadınlar ise homozigot normal (Gd^{+}/Gd^{+}), homozigot yetmezlikli (Gd^{-}/Gd^{-}) veya heterozigot yetmezlikli (Gd^{+}/Gd^{-}) olabilirler (43). Kadınlar iki X kromozomu taşıdıklarından, hastalığın ortaya çıkabilmesi için mutant genin her iki X kromozomunda da bulunması gereklidir. Erkeklerde ise tek X kromozomu olduğundan resesif karakterli mutasyon fenotipik olarak kendini gösterebilmektedir. Bu nedenle X'e bağlı resesif hastalıklar genellikle erkeklerde görülür. Bu erkeklerin anneleri taşıyıcıdır. Hasta bir baba erkek çocuklarına sadece Y kromozomunu vereceğinden, hastalığı erkek çocuklarına geçirmez. Ancak kız çocuklarına zorunlu olarak mutant geni taşıyan X kromozomunu vereceğinden, böyle bir babadan doğacak tüm kız çocukları taşıyıcı olacaklardır. Bu kız çocukları ise taşımakta oldukları mutant geni kendi erkek çocuklarına %50 olasılıkla geçirecekler, kız çocukları ise %50 olasılıkla normal, %50 olasılıkla taşıyıcı olacaklardır (44).

Ekspresyondaki bu değişkenlik X inaktivasyonu işleminden kaynaklanmaktadır (Lyon hipotezi) (45). Erken embriyo döneminde inaktive X kromozomlu bir hücreden yeni oluşacak olan bütün hücrelerde ilgili X kromozomu inaktif kalacaktır. Kadınlarda inaktive olan X kromozomu klinik tablonun çok hafif ya da çok ağır olmasından sorumlu olacaktır. Bu hipoteze göre;

1. Kadınların her bir hücresinde iki X kromozomundan sadece biri aktif, diğeri inaktiftir (Barr cisimciği).
2. İki X kromozomundan hangisinin aktif kalacağı embriyonun erken gelişim aşamalarında rasgele tayin edilir.
3. Her bir hücrenin çoğalmasında aynı X kromozomu bundan sonra inaktif kalır.

X kromozomunda G6PD yetmezlik geni taşıyan erkek klinik bulgu verir ve hemizigot G6PD yetmezlikli olarak tanımlanır. Dişi bireyler ise XX genotipine sahipse normal, X- X- genotipine sahipse homozigot ve X-X genotipine sahipse heterozigot G6PD yetmezlikli olarak tanımlanırlar. Heterozigot yetmezlikli kadınlar az veya çok ama mutlaka yetmezlikli hücrelere sahiptirler ve klinik olarak değişik şiddetlerde yetmezlik gösterirler. Bireyin her hücresinde enzim aktivitesi eşit derecede azalmış olarak bulunamaz. Kadınlarda, tüm hücrelerde yalnızca bir X kromozomu aktif olduğundan, kadın heterozigotlar normal (sağlıklı) ve enzim defektli olmak üzere iki eritrosit popülasyonuna sahiptir (4,44-47).

G6PD eksikliği açısından heterozigot olan dişiler, enzim eksikliği gösteren eritrositler ve normal eritrositler olmak üzere iki çeşit eritrosit popülasyonuna sahiptirler. İki değişik enzim tipine sahip olsalar da her bir eritrositte G6PD enziminin sadece bir tipi bulunur. Bu iki tip eritrosit popülasyonunun her birinin olabilme şansı teorik olarak %50'dir. Fakat bazen bu kişilerde enzim eksikliği gösteren hücrelerin normal hücrelere oranı yüksek olmaktadır. Bu durum "Aşırı Lyonizasyon" olarak ifade edilir. Sonuçta, eksik enzim taşıyan eritrosit popülasyonunu daha fazla içeren dişi heterozigotlarda hastalık görülecek, normal eritrosit popülasyonunun daha baskın olduğu dişi heterozigotlarda ise normal fenotip söz konusu olacaktır (16,49-51). Heterozigot bireylerin fenotipik özellikleri, varyantı taşıyan eritrositlerin oranının yanı sıra, taşınan varyantın özelliklerine göre de değişmektedir (52).

4.3. G6PD Enzimi

Pentoz fosfat yolunun ilk ve hız kısıtlayıcı enzimi olan G6PD sitozolik bir enzimdir. G6PD enzimi monomeri 515 aminositt'ten oluşur, molekül ağırlığı insanda 59 kDa'dur. Enzimin doğal substratı glukoz 6 fosfattır (G6P) ve 205. aa olan lizin bağlanır. Çeşitli türlerden elde edilen enzim, koenzim özgüllüğü bakımından NADP+ ye spesifiktir. NADP+ ise 386 ve 387. aa'lere bağlanır. Bir enzim dimerinde 2 koenzim bağlama bölgesi ve 2 substrat bağlama bölgesi bulunur (4,6,35).

4.4. G6PD Varyantları

Dünyadaki en yaygın enzimopati olma özelliğini gösteren G6PD enzim eksikliği hemoglobopatilerden sonra ikinci sıklıkta görülen kalıtsal bir hastalıktır. Dünya üzerinde 400 milyon kişinin enzim eksikliği taşıdığı saptanmıştır. Böyle bir yaygınlığa sahip enzimin,

değişik kinetik özellik gösteren 400'ün üzerinde varyantı olduğu bildirilmektedir. Biyokimyasal özellikleri birbirinden farklı olan bu varyantların moleküler düzeyde çok farklı olmadığı gözlenmiştir. Bu varyantların çoğu dengeli bir polimorfizm göstermeleri nedeniyle herhangi bir oksidan ajanla karşılaşarak akut hemoliz atağı gösterinceye kadar asemptomatik olarak kalırlar (12,13).

İlk olarak 1950'nin başlarında, Amerikalı zencilerde, antimalaryal ilaçların araştırılması sırasında ortaya çıkan hemolitik tablolar ile G6PD yetmezliği tanımlanmış ve daha sonra ilerleyen çalışmalarla Akdeniz yöresinde yaygın olarak bulunduğu tesbit edilmiştir. Enzim yetmezliğinin en sık görüldüğü bölgeler, ekvatoryal kuşakta bulunan tropikal nitelikli bölgelerdir. Bu bölgelerin diğer bir ortak özelliği de sıtma endemisi görülen bölgeler olması ve yetmezlikli bireylerin sıtmaya karşı dirençli olmalarıdır (4,5,8,53).

Yaygın olarak görülen G6PD A varyantı bu alelleri taşıyan heterozigot bireyleri *P. falciparum* ve *P. malariae* infeksiyonuna karşı korumaktadır. G6PD A varyantının normal enzime göre aktivitesi 10 kez daha düşük olduğundan parazitin eritrositlerdeki normal gelişimi için gerekli olan GSH yetersiz kalmaktadır. Ayrıca, oksidatif hasarlara karşı daha duyarlı olan bu eritrositlerin yaşam sürelerinin kısalması eritrosit düzeyinde bir koruma sağlamaktadır (4,5,8,35,53).

Normal G6PD'nin, A+ (Afrika tipi) ve B+ (Akdeniz tipi) olmak üzere 2 tipi vardır. G6PD B wild-type allel olarak kabul edilir. Enzimin Afrika'lılarda görülen ve normal aktivite gösteren, hemoliz görülmeyen A tipinin, B tipine göre yalnız bir amino asit farklılığı vardır ve B tipine göre elektroforezde daha hızlı yürür. Siyah Amerikan erkeklerinin yaklaşık %20'lik bir kısmı bu varyant A allelini taşımaktadır. A- olarak adlandırılan tip ise klinik olarak önemli olan anormal G6PD enzim tipi olup, siyah Amerikan erkeklerinde %11 ile en sık görülen tiptir. İlaça bağlı hemolitik anemi ile yakın ilişkisi vardır. G6PD A ve A- sıtmanın yaygın olarak görüldüğü Afrika'ya özgü olarak tanımlanmasına rağmen İtalya, İspanya, Güneydoğu Asya, Orta Doğu ve Güney Amerika kökenli beyazlarda da görülmektedir (54).

Beyazlar arasında en yaygın görülen enzim defekti G6PD Mediterranean tipidir. G6PD B- olarak ta isimlendirilir. Enzim aktivitesi normalin %1'inden daha azdır ve daha çok Akdeniz bölgesindeki beyazlarda daha fazla bulunan yaygın bir varyanttır (2,4,36-38,54,55).

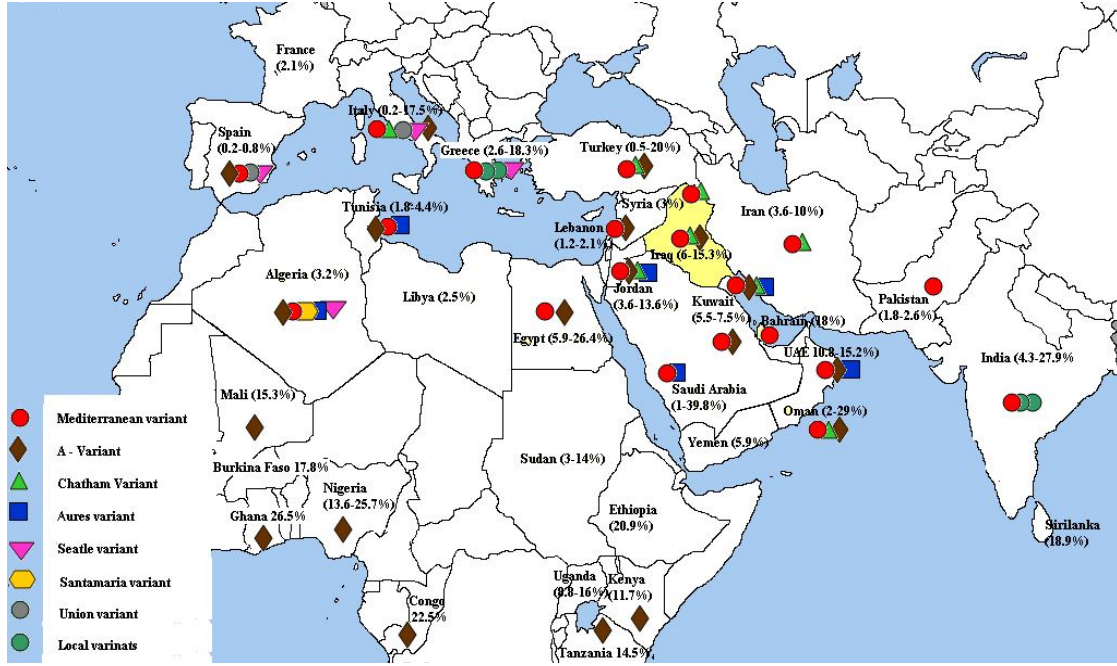
Enzim eksikliği sıklığının bazı bölgelerde %15'e ulaştığı Güney Doğu Asya'da en yaygın varyantların, Mahidol ile Canton olduğu gözlenmiştir (43).

G6PD gen anomalilerinin en çok görüleni tek bir amino asit değişikliğine neden olan nokta (Missense/nonsense) mutasyonlarıdır. Bunun yanında delesyon ve splicing mutasyonları da vardır (56).

Dünya'da yaygın olarak tespit edilen varyant ve mutasyonların dağılımı, WHO sınıflaması ve yaygın olduğu bölgeler Tablo III'de; G6PD enzim eksikliğinin dünya üzerindeki coğrafi dağılımı ve en sık görülen varyantlar Şekil 3'de gösterilmiştir. (4,35,56,57).

Tablo III: G6PD varyant ve mutasyonlarının dağılımı, WHO sınıflaması ve yaygın olduğu bölgeler.

Variant ismi	Exon	Nükleotid	Aminoasit	WHO sınıfı	Yaygın olduğu yerler
Gaohe	2	95 A>G	32 His>Arg	2	Çin
Aures	3	143 T>C	48 Ile>Thr	2	Cezayir, S. Arabistan, İspanya
Asahi	4	202 G>A	68 Val>Met	3	Afrika, İtalya, İspanya, Kanarya Adaları, Meksika
A	5	376 A>G	126 Asn>Asp	4	Afrika, İspanya, Kanarya Adaları
Mahidol	6	487 G>A	163 Gly>Ser	3	Güney Asya, Çin, Tayvan
Santamaria	6	542 A>T	181 Asp>Val	2	İtalya, Kanarya Adaları
Mediterranean	6	563C>T	188 Ser>Phe	2	İtalya, Yunanistan, S. Arabistan, Türkiye, İran, Irak, İsrail, Mısır, Yahudiler
Seattle	8	844 G>C	282 Asp>His	2	İtalya, İspanya, Sardinya, Kanarya Adaları
Vianchan	9	871 G>A	291 Val>Met	2	Hindistan, Çin, Laos, Filipinler
San Antioco	11	1342 A>G	448 Ser>Gly	?	Sardinya
Union	11	1360 C>T	454 Arg>Cys	2	Filipinler, Çin, Japonya, İtalya, İspanya
Canton	12	1376 G>T	459 Arg>Leu	2	Çin, Tayvan



Şekil 3: G6PD enzim eksikliğinin dünya üzerindeki coğrafi dağılımı ve en sık görülen varyantlar (57).

4.5. G6PD yetmezliğinin tanısı için uygulanan yöntemler

G6PD yetmezliğinin tanısı için enzim aktivitesi ölçümü yapılır. Dünyada yaygın olarak kullanılan 2 G6PD enzim aktivitesi ölçüm yöntemi ve 2 DNA analizi yöntemi vardır.

4.5.1. Kalitatif floresan spot test

G6PD aktivitesiyle oluşan NADPH'ın tayini esasına dayanır. NADPH aktive edilerek UV ışığı ile floresan oluşumu miktarı gözlenir. Niteliksel olarak enzimin varlığını gösterir fakat bu test enzimin miktarına yönelik bilgiler vermemektedir. Kalitatif bir testtir ve sayısal bir değer verilemez. Basit, hızlı ve ucuz olması nedeniyle tarama amaçlı enzim tayinleri için kullanılabilir.

4.5.2. Kantitatif spektrofotometrik yöntem

Spektrofotometrik olarak yapılan bu testler bireyin enzim miktarını tam olarak gösterebilmektedir. Hemizigot, heterozigot ve homozigot bireylerin tümü belirlenebilmektedir. Bu yöntem NADPH'ın 340 nanometrede verdiği absorbans değerinin ölçülmesine dayanır. Biyokimya laboratuvarlarında rutin olarak kullanılan yöntemdir.

Çalışma sistematğinde 25 C de 1 dakikada 1 mM NADP'yi NADPH'a katalizleyen enzim miktarı, enzim aktivite ünitesi olarak tanımlanır ve değerlendirilir (58-59).

4.5.3. Restriction fragment length polymorphism (RFLP; Gen ürününün restriksiyon endonükleazlar ile kesilmesi)

Restiksiyon endonükleaz enzimleri, nükleik asit zinciri içinde yalnızca belirli baz dizisini tanıyıp zinciri bu diziden hidrolitik olarak kesen enzimlerdir. Böylece genin içinde olan mutasyonlar bu endonükleazlar ile kesilerek var olan kesilmemiş parçaların yapısından farklı olacaktır. Bu değişim agaroz elektroforezinde gösterilerek mutasyon noktasının ortaya çıkarılması sonucu moleküler düzeyde hastalık tanısı konmaktadır. İncelenecek olan G6PD gen bölgesi PCR da çoğaltılır. Mutasyon bölgesini tanıyan restriksiyon enzimiyle uygun ölçeklerde karıştırılarak, enzimin aktif olduğu sıcaklık ve sürede inkübasyon yapılır. İnkübasyon ürünü %2'lik agaroz jelde yürütülerek DNA'nın kesilip kesilmediği kontrol örnekle karşılaştırılarak değerlendirilir (60-61).

4.5.4. Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP)

Tek zincirli DNA'da molekül içi etkileşim nedeniyle her bir zincir farklı formda katlanıp kıvrılır ve zincirde değişik konformasyonlar oluşur. PCR-SSCP, değişik konformasyonlar içeren aynı uzunluktaki baz dizilerinin poliakrilamid jel elektroforezinde farklı hızda hareket etmesi üzerine kurulmuş bir yöntemdir. Mutasyon içeren DNA molekülü normal diziden farklı bir yapı oluşturacağından, jel elektroforezinde normalden farklı yerde bant verecektir. Normal ve incelenen örnek beraber jele yüklenerek karşılaştırıldığında normalden farklı bantların bulunması örnekte mutasyonun varlığını gösterir. İncelenecek olan G6PD bölgesi PCR ile çoğaltılır. Amplikonlar PCR'da 90-95°C'ye kadar ısıtıldığı zaman DNA hidrojen bağlarından ayrılarak iki ayrı tek zincir haline gelir. Ortam hızla 0°C'ye kadar soğutulduğunda zincirler karşılıklı birleşemeyerek ve kendi içinde kıvrılıp katlanarak ayrı ayrı iki yapı oluştururlar. Mutasyon içeren DNA molekülü normal halinden farklı konformasyonlar oluşturup elektroforezde farklı hızda yürüdüğünden jel elektroforezde normalinden ayırt edilirler. Bu yöntemle DNA fragmentinde baz değişiminin bulunduğu belirlenebilir fakat mutasyonun türü tespit edilemez (62,63).

4.5.5. Mikroarray ile G6PD Gen Mutasyonlarının Tespiti

Mikroarray, hücre ve dokulardaki gen ekspresyonu profillerindeki global değişikliklerin incelenmesinde kullanılan yeni ve güçlü bir teknolojidir. Transkripsiyonun genomik bir ölçekte değerlendirilmesi, düzenli bir mozaik şeklinde tüm genomu ve bireysel genleri temsil eden PCR ürünleri tanımlamak yeni DNA mikroarray teknolojisi ile sağlanmıştır. Bir mikroorganizmanın tüm genleri “tırnak” boyutunda olan bir alanda mikroarraylenebilir ve binlerce genin ekspresyon seviyeleri tek bir deneyde simultane olarak çalışılabilir. Otomatize ve minyatürize olması ile öne çıkan bu teknoloji, çeşitli spesifik genlerin ya da gen polimorfizminin araştırılması ve ekspresyon analizinde kullanılmaktadır. Arrayler polimorfizm analizinin yanında mutasyon analizi, evölüsyoner çalışmalar ve sekans analizlerinde, potansiyel terapötik ajanların tespiti, geliştirilmesi, optimizasyonu ve klinik değerlendirmelerinde de kullanılabilmektedir (64,65).

4.6. G6PD Eksikliğinde Klinik Bulgular

G6PD eksikliğinde özellikle yenidoğanda sarılık ve belirli ilaçlara karşı hassasiyet artarken, bakla ve enfeksiyonlar hemolitik anemiyi provake edebilmektedir. G6PD eksikliğinin yol açtığı önemli sağlık sorunları şunlardır:

1. Belirli ilaçların ve bakla gibi besinlerin vücuda alımı sonrasında açığa çıkan ekstra oksitleyici ajanlar tarafından uyarılan hızla ve aniden gelişen ölümcül olabilen akut hemolitik kriz.
2. G6PD eksikliğine sahip yeni doğan bebeklerin bazılarında doğum sonrası ortaya çıkan ciddi yenidoğan sarılığı ve önlem alınmazsa buna bağlı kernikterus.
3. G6PD eksikliğine bağlı kalıtsal nonsferositik hemolitik anemi (7,48,66).

4.6.1. Yenidoğan sarılığında görülen hemolitik anemi

Anemiden daha çok sarılık görülür ve aneminin şiddeti azdır . Yeni doğan bebeklerde G6PD enzim eksikliği varlığında, doğumun ilk günlerinde karaciğer fonksiyonlarının bazal düzeyde olması ve ciddi enzim eksikliği nedeniyle bilirubinin yeterli hızda metabolize edilemez ve sarılığa yol açar. Yenidoğan eritrositlerinin, glutatyon peroksidaz, katalaz ve

vitamin E eksikliği sonucu olarak ortaya çıkan oksidatif stresle başa çıkma kapasiteleri düşük olduğundan, hemolitik anemi oluşma riski, yetişkinlerden daha fazladır (35).

İndirekt hiperbilirubinemi tedavi edilmediğinde kernikterusa neden olur. Kernikterusta, kanda yükselen bilirubin kan beyin bariyerini geçerek beyin bazı çekirdeklerine zarar verir, çocukta zeka geriliği ve spastik felce neden olabilir. Aneminin erken teşhisi norolojik defisitlerden kaçınma açısından oldukça önemlidir (4,11,67).

4.6.2.İlaçlara bağlı görülen hemolitik anemi

Amerikan siyah ırkta ve Akdeniz mutasyonu tipinde ilaçlara bağlı hemolitik anemi görülür. Ciddi düzeyde G6PD eksikliği olan kişilerde oksidatif ilaç alımından 18-72 saat sonra ani ve hızlı gelişen akut hemolitik anemi ortaya çıkabilmektedir. İlaçların (Primakin, Nitrofuranlar, Sulfonlar, Naftalin, Aspirin vb) metabolizması sırasında üretilen serbest oksijen radikalleri G6PD eksikliğinde eritrositleri hasara uğratmaktadır. Aynı etken madde, G6PD eksikliği olan bireylerde her defasında aynı etkiyi yapmayabilir, ayrıca farklı bireylerde de, heterojen klinik seyir gösterebilmektedir. Akut hemolitik anemide, hemoglobinüri, retikülositozis, periferik kanda Heinz cisimcikleri, parçalanmış eritrositler görülür. Akut hemolitik anemi atakları arasında hemoglobin düzeyi normaldir (4,35,50).

Sitokrom p 448 ve sitokrom p 450 enzim sistemi, asetilasyon polimorfizmi gibi kişiler arasındaki genetik farklılıklar ilacın hemolitik ajan olup olmayacağını belirlemede rol oynar. Bir ilacın aktif hemolitik metabolitini metabolize edebilen G6PD yetmezlikli bireylerde akut hemolitik kriz oluşmazken, aynı ilacın hemolitik metabolitini etkin bir şekilde metabolize edemeyen bireylerde ise hemoliz gözlenir (68).

Akut hemolitik krizin erken döneminde eritrositler kristal violet ile boyanırsa koyu mor renkli inklüzyon cisimcikleri olan Heinz cisimcikleri gözlenebilir (68).

En iyi tanı koydurucu bulgu, dalak tarafından Heinz cisimciklerinin uzaklaştırılması sırasında oluşan, bir veya daha fazla ısırlıklı eritrositlerdir (blister hücreleri) (68). Tablo IV’de hemoliz yapan ilaç listesi belirtilmiştir (2,35). .

Tablo IV. Hemoliz yapan ilaç listesi belirtilmiştir

İlaçlar	Kesin İlişki	Olası İlişki	Şüpheli İlişki
Antimalaryal İlaçlar	Primakin Pamakin Pentakin	Klorokin	Kinakrin Kinin
Sülfonamidler	Sülfanilamid Sülfasetamid Sülfapiridin Sülfametoksazol	Sülfasalazin Sülfadimidin Sülfamerazin Glyburide	Sülfokson Sülfadiazin Sülfisoksazol
Sülfonlar	Tiyazolsülfon Dapson *		
Nitrofüranlar	Nitrofurantoin Furazolidon		
Antipiretik/Analjezik	Asetanilid	Asetilsalisilikasit **	Aminopirin Asetaminofen *** Fenasetin
Diğer İlaçlar	Nalidiksik asit Niridazol Metilen mavisi Fenazopiridin	Siprofloksasin **** Norfloksasin Kloramfenikol Vitamin K analogları Askorbik asit	PAS L-DOPA Doksorubisin Probenesid Dimerkaprol
Diğer Kimyasal Maddeler	Naftalin Trinitrotoluen Tohidin mavisi Ürat oksidaz	Kına	

* Hemoliz G6PD eksikliği olmayanlarda da görülebilir;

** Yüksek dozlarda;

*** Aşırı dozu hemolize neden olur;

**** Hemolize neden olduğu kişisel gözlemlere dayanmaktadır.

4.6.3. Enfeksiyonla görülen hemolitik anemi

Enfeksiyonla ortaya çıkan hemoliz klinik olarak görülen hemolizlerin daha yaygın bir sebebidir. Birçok farklı enfeksiyon, G6PD eksikliği taşıyan hastalarda hemolizi indükleyebilir. Herhangi bir travmaya veya enfeksiyona maruz kalan dokular, immunolojik olan veya olmayan bir etkene karşı, fagositik hücrelerle korunmaya çalışırlar. Enfeksiyon durumlarında nötrofillerin ve makrofajların aktivasyonu gözlenir. Bu da Pentoz fosfat yolu üzerinde glukoz metabolizmasını ve oksijen tüketimini 2-20 kat artırır. Oksijen tüketimindeki

artışla birlikte nötrofillerin ve makrofajların O_2^- ile H_2O_2 salgıladıkları ve bunların dokularda birikimi ile eritrositleri hasara uğrattıkları düşünülmektedir (51).

4.6.4.Favizm

Baklanın (*Vicia Faba*) hemolitik etkisi, “vicine” ve “convicine” olarak adlandırılan iki glukozidik pirimidin türevine ve bunların “glucoside divicine” ve “isouramil” denilen hidrolitik ürünlerine bağlanmaktadır. Bu ajanlar otooksidasyona giderek reaktif oksijen radikalleri oluşturur. Vicine, convicine, askorbat, ve L-dopa baklada fazla miktarda bulunan ve toksik olarak düşünülen bileşiklerdir. Bu bileşikler serbest oksijen radikalleri üreterek redükte glutasyonu oksitler ve G6PD eksikliği görülen bireylerde hemolize neden olur. Favizm geçirmiş kişiler, kesin olarak G6PD eksikliğine sahiptirler. Ancak G6PD eksikliği olan her birey, bakla yediğinde, akut hemolitik krize girmesi söz konusu değildir (4,52).

Favizm, G6PD eksikliği olan kişilerde çiğ bakla yenilmesinden veya polenlerinin inhale edilmesinden sonra ortaya çıkan ve akut hemolizle seyreden bir hastalıktır. Yaş, kuru ya da dondurulmuş bakla tanelerinin yenmesi, hatta annenin yediği baklanın anne sütü yoluyla yenidoğan bebeğe geçmesiyle hemoliz oluşabilir (69).

Bakla özellikle Akdeniz havzasında yetiştirilip tüketilmekte olduğundan dolayı favizm İtalya, Yunanistan, İspanya, Portekiz ve Türkiye gibi ülkelerde salgın şeklinde; Kuzey Afrika, Orta Doğu ve Uzak Doğu ülkelerinde daha nadir görülmektedir. Sıklıkla G6PD Akdeniz varyantında fava fasulyesi yenmesine bağlı akut ve çok şiddetli hemolitik kriz görülmekte, hatta ölüme neden olabilmektedir (70).

Favizm en sık 2-5 yaş arası çocuklarda, erkeklerde kızlardan 2-3 kat daha fazla görülmektedir. Çünkü her toplumda hemizigot erkekler heterozigot kadınlardan daha fazla sayıdadır. Hemolitik kriz en sık Mayıs ve Haziran aylarında ve çoğu kez taze bakla yenmesini takiben gelişir. Kuru bakla alımı sonrası gelişen hemolize daha çok Ocak ve Şubat aylarında rastlanır (52).

Favizmde klinik bulgular ilaca bağlı ortaya çıkan hemolitik krizlere oranla daha erken ortaya çıkar ve daha şiddetlidir. Çoğu kez bakla alımından 24 saat geçtikten sonra hemoliz aniden başlar ve hemoglobinüri günlerce devam eder. Nadir de olsa bakla poleni inhalasyonu sonucu saatler içinde hemoliz görülebilir. Hastada hemoglobinüri ve solukluğun yanı sıra

sarılık, baş ağrısı, sırt ağrısı, bulantı, ateş, titreme gibi akut hemolizin tüm bulguları görülür (52).

Akut böbrek yetmezliği gelişimi çocuklarda çok nadirdir. Favizimli her hastada G6PD enzim eksikliği varken, her G6PD yetmezlikli kişide bakla alımından sonra hemolitik reaksiyon oluşmayabilir. Aynı ailenin G6PD eksikliğine sahip her bireyi bakla yediğinde aynı şekilde etkilenmez. Diğer taraftan aynı kişinin farklı zamanlarda bakladan etkilenmesinde de değişiklikler gözlenmektedir. Kişiler arasındaki genetik varyasyonlar, bakladaki aktif metabolitlerin metabolizmasına ilişkin farklılıklar favizmin değişken karakterinden sorumlu olabilir (52).

4.6.5..Konjenital non sferositik hemolitik anemi

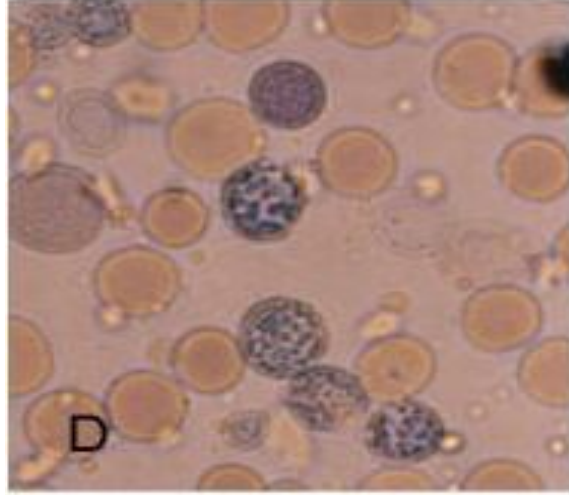
Bu grup hastalar azalmış eritrosit yaşam süresine sahiptirler. Birçoğu klinik olarak normaldir ve düşük hemoliz gösterdikleri için laboratuvar metodlarıyla tespit edilemeyebilirler. Küçük bir bölümü konvansiyonel metodlarla kolaylıkla tespit edilebilen hemoliz derecesine sahiptirler ve açıklanamayan sarılıkları vardır. Sıklıkla başlangıcı doğumla birlikte, yeni doğan sarılığına dayanır, ileri yaşlarda anemi tekrar eder. Hemoliz, çok değişik şiddetlerde ortaya çıkabilmektedir. Kronik hemoliz, genelde hafif veya orta şiddette ortaya çıkmaktadır. Ancak nadir rastlanılan bazı G6PD varyantlarında sürekli transfüzyon gerektirecek kadar şiddetli hemoliz olabilir. (4).

4.7. G6PD eksikliğinde hemoliz mekanizması

G6PD eksikliği olan hücrelerde oksidatif ajanların neden olduğu hemoliz genel olarak 2 yolla gerçekleşir:

1-Heinz cisimciklerinin oluşumuyla beraberdir. Oksidan ajanlara mazur kalan eritrositlerde G6PD eksikliğide hidrojen peroksit ve serbest radikal artışıyla GSH okside olmaktadır. Okside glutatyon ve hemoglobinde mevcut sülfidril (SH) gruplarıyla oluşan sülfidril miksleri hemoglobinde konformasyonel değişim meydana getirerek geri dönüşümsüz denatürasyon ve Heinz cisimciklerinin presipitasyonuna neden olmaktadır (Şekil 4). Heinz cisimcikleri eritrositin yassılaşmış bölgesinde membranın iç tarafındaki proteinlere bağlanarak görünür bir şekilde şişlik verebilirler. Bir veya birkaç tane olabilen Heinz cisimciği inklüzyonları dalaktan geçerken fagositoz yoluyla alınır, önce eritrosit membranında

kayıp sonra da eritrositin tamamen parçalanmasına neden olur. Normal eritrositlerde okside glutasyon, glutasyon redüktaz enziminin kataliziyle redükte glutatyona çevirerek hemoglobin ve diğer sülfidril gruplarını oksidasyondan korurken, G6PD eksikliği olan hücreler bu işlemi gerçekleştiremediğinden hemoliz oluşmaktadır (3,4,71,72).



Şekil 4: G6PD eksikliğinde periferik kan yaymasında eritrositlerde Heinz cisimcikleri (73).

2- Serbest O_2 radikalleri ve H_2O_2 eritrosit membranındaki protein ve lipidleri okside ederek kümeleşmesine sebep olur. Membran ve sitoplazma proteinlerinin sülfidril gruplarını etkileyerek disülfid köprüleriyle birbirlerine bağlanarak çökmesine ve mebran bütünlüğünün bozulmasına neden olur. Lipidlerde ise doymamış yağ asitlerinin çift bağlarına bağlanarak membranın lipid kompozisyonunu değiştirir. Böylelikle hücre membranı esnekliğini kaybeder.

4.8.G6PD Enzim Eksikliği: Sınıflandırma

Dünya sağlık örgütü, G6PD enzim eksikliklerini enzim aktivite düzeyi ve klinik bulgulara göre beş sınıfa ayırmıştır.

Sınıf 1: G6PD aktivitesi normalin %10 kadar altında ve kronik hemolitik anemiye neden olanlar

Sınıf 2: Şiddetli, enzim eksikliği (%1-10) olan ve akut hemolitik anemi görülenler

Sınıf 3: Normalin (%10-60) mın altında aktiviteye sahip, ilaçlarla ve enfeksiyonla birlikte ılımlı hemoliz görülenler

Sınıf 4: Normal aktivitesi (%60-150) olan ve hemoliz görülmeyenler. Klinik bulgu yok

Sınıf 5 : Enzim aktivitesi yüksek (%150 üzerinde) olanlar. Klinik bulgu vermezler.

Sık görülen G6PD enzim defekti tipleri:

G6PD B : Vahşi tip olarak değerlendirilir, Beyaz ırkta, Asya' da ve zencilerde görülür.

G6PD A: Siyah Afrikalıların %10-20 sinde görülür. Normal fenotipe sahiptir.

G6PD A - :En sık görülen tip olup orta ve ağır hemoliz ile bağlantılıdır. Siyah Afrikalılarda ve Afrika kökenli Amerikalılarda %10-15 oranında bulunur. %10-15 enzim aktivitesine sahiptir.

G6PD Akdeniz: Beyaz ırkta en sık görülen tiptir. 563. nükleotidde tek baz yer değişimi, serin fenilalanin baz değişimi bu tipe yol açar. Protein sentezi ve enzimin katalitik etkisi azalır ve ağır hemoliz görülür (74).

4.9. G6PD Enzim Eksikliği:Tedavi

Nadir form olan kronik nonsferositik hemolitik anemi dışında, oksidatif ekzojen stres olmadığı sürece olgular hematolojik olarak normaldir. Hemolize yol açan nedenlerden korunmaya dikkat edilirse G6PD eksikliği, kişilerin yaşam kalitesini etkilemez. Tanı konunca sakınması gereken ilaç ve yiyecekleri içeren bir liste verilmelidir (140).

G-6-PD eksikliği bulunan bireylerde ilaç ya da enfeksiyonlara bağlı olarak hemolize neden olan ajan mümkün olduğunca hızlı bir şekilde temizlenmelidir. Nadiren kan transfüzyonu gerektirecek kadar ağır anemi gelisebilir. Kesin kural olmamakla birlikte Hb 7gr/dl altında olduğunda ya da Hb 7-9gr/dl ve hemoglobinüri devam ediyorsa transfüzyon önerilmektedir. Hemoglobini çok düşük olan hastalarda transfüzyon çok yavaş yapılmalıdır. Splenektominin faydalı olmadığı bildirilmekteyken, E vitamini, selenyum gibi antioksidan ajanların kullanımı tartışmalıdır (4,40).

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Çalışmamıza Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematolojisi ve Neonatoloji Bilim Dalları'nda 2004-2012 yılları arasında Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği tanısı alan, enzim düzeyi düşük (<6 U/grHb) saptanan ve mutasyon çalışması yapılmış olan hastalar dahil edildi. Bu hastaların dosyaları retrospektif olarak incelendi. Bütün hastaların enzim düzeyinin Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda çalışıldı. Çalışmaya başladıktan sonra tanı konulan yeni olgular gözlemsel olarak çalışmaya dahil edildi. Hastaların başvuru yakınması ve öyküsü, fizik inceleme bulguları, laboratuvar sonuçları (tam kan sayımı, karaciğer fonksiyon testleri, enzim düzeyleri) kaydedildi.

G6PD enzim eksikliği saptanan olguların moleküler genetik analizleri Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışıldı. EDTA'lı tüplere alınan 2 cc'lik kan örneklerinden Roche DNA izolasyon kiti (spin kolon yöntemi) ile DNA izolasyonu yapıldı ve DNA örnekleri spektrofotometrede ölçülüp değerleri kaydedildi. S218F mutasyon bölgesine spesifik primer-prob çifti (G6PD S218F S: 5' TGCGGTAGATCTGGTACTCA-3', G6PD S218F R: 5'-CGCATCATCGTGGAGAA-3', floresan işaretli prob: 5'-CATCTCCTCCCTGTTCCG-3' ve anchor prob: 5'-CTCTGACCGGCTGTCCAACC-3', (TIB-Molbiol)) kullanılarak LightCycler 1.5 real-time PCR cihazında melting-curve analizi ile mutasyonlar araştırıldı.

5.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar

Cihazlar	Marka
• Buzdolabı	Arçelik
• Derin dondurucu (-20 °C)	Uğur
• LightCycler 1.5 real-time PCR cihazı	Roche
• Otomatik mikropipet seti	Eppendorf
• Mikrosantrifüj	Nüve
• Termomikser	Eppendorf
• Spektrofotometre	Thermo
• Vorteks	Nüve

Kimyasal Maddeler

- DNA izolasyon kiti (Roche High pure PCR template preparation kit)
- Etanol (Merck Chemicals International)
- İsoopropanol (AppliChem)

5.2. DNA İzolasyonu Kiti

5.2.1 High pure PCR DNA izolasyon kiti içeriği

1. Binding Buffer: 6 M guaninidine-HCl, 10 Mm urea, 10 Mm Tris –HCl, %20

Triton X-100 (v/v), pH 4.4 (25°C)

2. Proteinaz K (4,5 mL steril distile su ile çözüldükten sonra küçük miktarlara bölünüp - 20°C’de çalışılmak üzere saklandı)

3. İnhibitor Removal Buffer: 5 M guanidine–HCL, 20 mM Tris– HCL, pH6.6, 25°C (20 ml ethanol ilave edildikten sonra kullanılmıştır)

4. Wash Buffer: 20 mM NaCl, 2 mM Tris–HCl, pH 7.5, 25°C (80 ml ethanol ilave edildikten sonra kullanılmıştır)

5. Elution Buffer: 10 mM Tris, pH 8.5, 25°C

6. High Pure filtreli tüpler

7. Toplama (Collection) tüpleri

5.3. Polimorfizmlerin Analizi İçin Çalışma Protokolü

5.3.1 DNA izolasyon aşamaları

1. EDTA’lı tüp içerisine alınan kan örneğinden 200 µl steril bir eppendorf tüp içerisine alınır.

2. Üzerine 200 µl Binding Buffer ve 40 µl Proteinaz K pipetlenir.

3. Karışım, pipet ile iyice karıştırıldıktan sonra daha önce 72°C'ye getirilmiş olan 'thermomikser' cihazında 10 dakika inkübasyona bırakılır.
4. İnkübasyonun sonunda karışıma 100 µl isopropanol eklenir ve pipet ile iyice karıştırılır.
5. Karışım bir toplama tüpün içine yerleştirilmiş filtreli tüp içine pipetlenir.
6. 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
7. Altta biriken sıvı toplama tüpü ile birlikte atılır. Filtre temiz bir toplama tüp içine yerleştirilir.
8. Filtreli tüpün üzerine 500 µl inhibitör removal buffer pipetlenir. 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
9. Altta biriken sıvı toplama tüp ile birlikte atılır. Filtre temiz bir toplama tüp içine yerleştirilir. Filtreli tüpün üzerine 500 µl wash buffer pipetlenir.
10. 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
11. Altta biriken sıvı toplama tüpü ile birlikte atılır. Filtre temiz bir toplama tüp içine yerleştirilir.
12. Filtreli tüpün üzerine tekrar 500 µl wash buffer pipetlenir.
13. 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
14. Toplama tüpte biriken sıvı dökülür ve filtreli tüp aynı toplama tüp içine yerleştirilir.
15. 8.000 rpm'de 10 saniye santrifüj edilir.
16. Altta biriken sıvı toplama tüp ile birlikte atılır. Filtre temiz bir eppendorf tüp içerisine yerleştirilir.
17. Önceden thermomixer'de 70°C'de 10dk ısıtılmış elution buffer'dan 200 µl filtreli tüp içine pipetlenir.

18. 8.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.

19. Filtreli tüp atılır. İzole DNA içeren eppendorf tüp üzerine hasta adı-soyadı, numarası yazılır ve DNA -20 °C’de saklanır.

5.3.2. DNA konsantrasyonunun ölçülmesi

İzole edilen DNA’nın miktarı ve saflığı Nanodrop 2000C cihazında 2 µl DNA örneği kullanılarak ölçüldü. Örnekler spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boyları arasında okutuldu. A260 nm dalga boyunda DNA konsantrasyonunu, A280 nm dalga boyunda protein konsantrasyonunu, OD260/OD280 formülü ise DNA saflığını vermektedir. A260/A280 oranının 1.8 ile 2.0 arasında olması beklenir. OD’nin 2.0’nin üzerinde olması protein kontaminasyonuna, 1.8’in altında olması RNA kontaminasyonuna işaret eder. Bu durumda PCR sonuçlarının sağlıklı çıkması için DNA’nın temizlenmesi gerekir. Gerçek zamanlı PCR mutasyon analizi için istenilen optimum DNA konsantrasyonu 1-100 ng/ µl ve DNA miktarı 5-500 ng/reaksiyon değerleri arasındadır.

5.3.3. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RealTime PCR)

LightCycler (LC) cihazı, kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PCR reaksiyonu, moleküler genetikte bir reaksiyonda polimorfik DNA bölgelerinin kantifikasyonunun ve tek nükleotid polimorfizm genotiplendirilmelerinin yapılabildiği yeni bir tekniktir (75). Bu teknik kullanılarak nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalinin ölçülmesiyle kısa sürede kantitatif değerler elde edilebilmektedir. Hızlı ısıtma ve soğutma özelliğine sahip olan LC cihazı, 20-30 dakika içinde 30-40 PCR döngü gerçekleştirdiğinden çalışmalarda oldukça avantaj sağlamaktadır (75,76). Gerçek zamanlı PCR cihazı yüksek hızı yanında, kontaminasyon riskini de minimuma indirmektedir. Ayrıca, amplifikasyon işlemi eş zamanlı olarak bilgisayarda görüntülenebildiği için PCR döngüsü başarısız olduğunda, reaksiyon çok geçmeden sonlandırılabilen ve döngü artışı yapılabilmektedir. Elektroforeze gerek kalmadan amplifikasyon ürünlerinin gözlenmesi en büyük kolaylığı sağlamaktadır (75).

LC cihazı ile genotipleme çalışmalarında özgün primerlerin yanında testin özgüllüğünü arttırmak amacıyla hedefe özgü hibridizasyon problemleri kullanılmaktadır. Bu hibridizasyon problemleri, floresans boyalarla işaretlenen diziye özgü oligonükleotid problemleridir.

DNA zincirine baş ve kuyruk pozisyonunda hibridize olacak şekilde dizayn edilen bu problemler, DNA zincirindeki polimorfik bölgeyi örten sensör hibridizasyon probu ile bu proba yakın bir bölgeye bağlanan anchor problemlerden oluşmaktadır (75).

Hibridizasyon problemleri amplifikasyon süresi boyunca DNA segmentine bağlıdır. Problemler hedef DNA dizisi üzerinde birbirine 1-5 nükleotit uzaklıktaki mesafede bağlanmakta ve floresan boya ile işaretlenmiş olan uçlar yan yana gelmektedir. LC cihazının ışık kaynağından (LED: Light Emitting Diode) yayılan 470 nm'deki mavi ışık, fluorescein ile işaretlenmiş olan sensör probunu uyararak daha uzun dalga boyundaki (530 nm) yeşil floresans ışığın yayılmasına neden olmaktadır. İki floresan boya ile işaretlenmiş olan problemlerin yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji, ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmakta ve yeşil ışığın enerjisi LC Red 640 boyası içinde farklı bir dalga boyundaki (640 nm) kırmızı floresans ışığın yayılmasına neden olmaktadır. İki prob arasında meydana gelen bu enerji transferi Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) olarak adlandırılmaktadır. Bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine diğer bir ifadeyle PCR siklusu süresince oluşan ampliconların miktarına bağlı olarak artmaktadır. LC cihazının optik ile ilgili birimi olan F2 kanalı, 640 nm'deki kırmızı ışığın yoğunluğunu ölçmektedir. Ölçüm, ısıtmanın maksimum olduğu annealing fazı sonunda yapılabilmektedir. Annealing fazından sonra, sıcaklık artar ve hibridizasyon problemleri başlayan uzama (elongation) aşaması sırasında amplicondan ayrılırlar. Elongation aşamasından sonra oluşan ampliconlar çift iplikli olduklarından hibridizasyon problemleri ile hibridize olamazlar. Bu durumda, iki prob birbirlerinden uzakta ve serbest halde oldukları için FRET gerçekleşemez (75).

5.3.3.1 LightCycler sistemi için kullanılan floresan boyalar ve ölçüm yapılan kanallar

LC cihazının optik ünitesi, 3 farklı kanal ile aynı zamanda floresans ölçümü yapabilmektedir. 530 nm'de Kanal 1 (F1) SYBR Green I ve fluorescein boyaalarını kullanarak, 640 nm'de LC Red 640 boyasını kullanarak Kanal 2'de (F2), 705 nm'de LC Red 705 boyası kullanarak Kanal 3'de (F3) sinyalleri ölçer (75).

5.3.3.2. Erime eğrisi (melting curve) analizi

Amplifikasyon metodunun online olarak görüntülenmesine ek olarak amplifikasyondan sonra erime eğrisi analizi aşamasında diziye özgü hibridizasyon problemlerinin tek iplikli DNA'ya hibridizasyonu ile mutasyonların, SNP'lerin belirlenmesini ve online olarak görüntülenmesi gerçekleştirilmektedir. Her çift sarmal DNA (dsDNA), kendine özgü %50'sinin tek zincirli hale geçmesi için gerekli olan erime sıcaklığı (melting temperature= T_m) değerine sahiptir. Bu erime sıcaklıkları öncelikle çift sarmal DNA'nın uzunluğuna (Zincirin uzunluğu arttıkça T_m sıcaklığı artar), GC içeriğinin derecesine (GC' den zengin fragmentlerde T_m sıcaklığı yüksektir), zincirler arasındaki bütünlüğün derecesine (zincirlerden bir tanesinin farklı bir baz içermesi T_m sıcaklığını düşürür) bağlı olarak belirlenmektedir. Bu aşamada sıcaklık yavaş yavaş 40°C'den 75°C'ye yükselir. Hibridizasyon problemlerinin DNA zincirine hibridizasyonunu sağlayan kritik sıcaklık (T_m), mutasyon veya SNP'nin var olup olmadığının belirleyicisidir (75). Herhangi bir baz değişikliğinin oluşmadığı bir durumda, hibridizasyon probu DNA kalıbı ile tam olarak eşleşir. Baz değişikliğinin söz konusu olduğu durumlarda ise hibridizasyon probu DNA kalıbı ile tam olarak eşleşemez. İki eşleşme karşılaştırıldığında baz değişikliğini içermeyen DNA kalıbı, baz değişikliğini içeren DNA kalıbına göre daha yüksek erime sıcaklığı derecesine sahip olmaktadır. İki T_m derecesi arasındaki fark ile DNA zincirinde mutasyon olup olmadığı belirlenebilmektedir (76).

Bu erime eğrisi analizi sonucunda, floresan şiddetinin düşüşüne neden olan sıcaklık derecesine göre değerlendirilerek hastanın o gen için genotiplendirilmesi yapılmaktadır. Buna göre homozigot wild type genotipler yüksek sıcaklıkta tek pik, homozigot mutant genotipler düşük sıcaklıkta tek pik, ve heterozigot genotipler ise düşük ve yüksek sıcaklıkta 2 pik olusturmasına göre 3 farklı genotip belirlenebilmektedir (76).

5.3.4. LightCycler mutasyon belirleme kiti karışımı ve çalışma protokolü

G6PD geninin mutasyon bölgelerine özgül primerleri ve hibridizasyon probu karışımını içermektedir.

1. Primerler ve problemlerin karışımını içeren reagent mix (Fluorescein / LCRed640 ile işaretli)
2. Enzim karışımı (FastStart mix)
3. $MgCl_2$

4.H₂O

5.Pozitif kontrol

6.Negatif kontrol

S218F mutasyon bölgesini belirleme için termal profil; denatürasyon, amplifikasyon, erime eğrisi analizi ve soğutma programlarından oluşmaktadır (Tablo V).

Tablo V. G6PD S218F mutasyonu için belirtilen termal profil.

Denatürasyon		Amplifikasyon			Melting curve					Cooling
Parametre										
Analiz modu	yok	Kuantifikasyon modu			Erime Eğrisi modu					Yok
Döngü	1	45			1					1
Hedef [°C]	95	95	60	72	72	95	40	40	85	40
Süre [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:10	00:00:30	00:00:20	00:00:01	00:00:30	00:00:01	00:00:30
Ramp.Rate [°C/s]	20	20	20	20	20	20	0.2	20	0.5	20
Acquisition Mode	Yok	yok	single	yok	yok	yok	yok	yok	step	yok

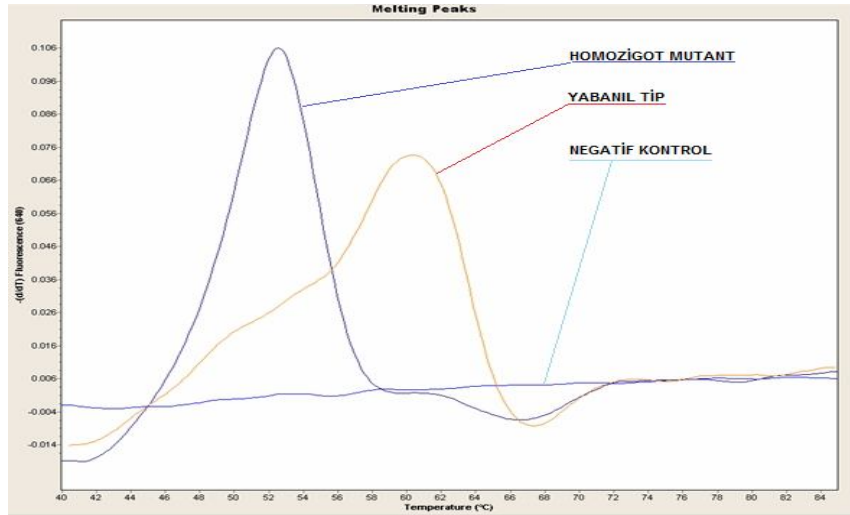
Protokol şu programları içerir:

- Program 1: Örneklerin denatürasyonu ve enzimlerin aktivasyonu
- Program 2: Hedef DNA'nın PCR-amplifikasyonu
- Program 3: Genotiplerin belirlenmesi için erime eğrisi (melting curve analizi)
- Program 4: Soğutma (cooling)

Her bir hasta örneği G6PD S218F mutasyonunu belirlemek için aşağıda Tablo VI'da belirtilen karışımlara göre ayrı ayrı hazırlandıktan sonra, LC cihazına ait özel camdan yapılmış 20 µl'lık kapiller tüp içerisine koyuldu. Kapiller tüpler 2500 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi. Reaksiyon karışımının her bir kapiller tüpün dibine çöktüğü kontrol edildi. Tüpler reaksiyon tepsisine dizildikten sonra tepsi ile birlikte LC cihazına yerleştirildi. Real-time PCR'a başlandı ve yaklaşık bir saat sonra sonuçlar elde edildi (76).

Tablo VI. RT-PCR karışımı.

	Miktar (μl)
Reagent mix	4.0
FastStart Mix	2.0
H ₂ O	7.4
MgCl ₂	1.6
Genomik DNA	5.0
Toplam	20



Şekil 5. G6PD S218F mutasyonunu için G6PD geninin 218. pozisyonunda görülebilecek genotiplerin erime eğrisi analiz sonuçları.

G6PD S218F homozigot yabanıl tip (wild tip) (60°C) ve homozigot mutant genotiplerde (52°C) tek sıcaklık derecesinde erime piki oluşmaktadır. G6PD S218F mutasyonu için önerilen çalışma protokollerine göre her hasta örneği için çalışma yapıldı ve analizler kaydedildi (76).

İstatistiksel değerlendirme

SPSS 17.0 paket programı kullanılarak nonparametrik testler (Ki-kare ve Manny Whitney U testi) uygulandı.

BULGULAR

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji ve Neonatoloji Bilim Dalları'nda 2004-2012 yılları arasında G6PD eksikliği tanısı konulan 60 hasta çalışmaya alındı. Bu hastalardan 52'si retrospektif, 8'i gözlemsel olarak çalışmaya dahil edildi. 54 (%90) hasta Aydın, 5 hasta (%8) Muğla, 1 hasta (%1.7) Denizli'de yaşıyordu. Hastaların 31' i (%51.7) favizm, 29'u (%48,3) yenidoğan sarılığı ile başvurdu.

G6PD enzim eksikliği saptanan hastaların 44'ü erkek (%73,3), 16'sı (%26,7) kız; favizm tanısı konulan olguların 27'si (%87.1) erkek, 4'ü (%12.9) kız; yenidoğan sarılığı olgularının 17'si (%58.6) erkek, 12'si (%41,4) kızdı (TabloVII). Favizm ve yenidoğan sarılıklı olguların cinsiyet dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.011$). Favizm olgularının cinsiyet dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P= 0.028$).

Tablo VII: Cinsiyete göre favizm ve yenidoğan sarılığı olgularının dağılımı.

	Erkek	Kız	Toplam
Favizm	27 (%45)	4 (%6.7)	31 (%51,7)
Yenidoğan sarılığı	17 (%28.3)	12 (%20)	29 (%48,3)
Toplam	44 (%73,3)	16 (%26,7)	60 (%100)

Tüm hastaların yaş ortalaması $38,5\pm45,3$ ay (dağılım, 1 - 196), G6PD enzim aktivitesi ortalaması $2,57\pm1,51$ U/grHb (dağılımı, 0.15-5.0), ortalama hemoglobin değeri $10.7\pm3,9$ gr/dl (dağılımı, 3,5-17) ve ortalama indirekt bilirubin düzeyi $10.2\pm6,6$ mg/dl (dağılımı: 2,7-33) bulundu (Tablo VIII).

Tablo VIII: Hastaların yaş, G6PD enzim aktivitesi, hemoglobin ve indirekt bilirubin ortalama düzeyleri.

	Yaş (ay)	G6PD (U/grHb)	Hemoglobin (gr/dl)	İndirekt bilirubin (mg/dl)
Ortalama±SS	38.5±45,3	2,57±1,51	10,7±3,9	10,2±6,6

Favizmlı olguların yaş ortalaması 6,05±3,27 (dağılım 2-16 yaş), G6PD enzim aktivitesi ortalaması 2,23±1,58 U/grHb (dağılım 0,15-5), ortalama hemoglobin değeri 7,34±2,22 gr/dl (dağılımı 3,5-9,8) ve ortalama indirekt bilirubin düzeyi 6,06±1,97 mg/dl (dağılımı 2,70-10) bulundu. Yenidoğan sarılığı olan hastaların yaş ortalaması 2,17±6,31 gün (dağılımı 1-35 gün), G6PD enzim aktivitesi ortalaması 2,96±1,37 U/grHb (dağılım, 0,90-4,90), ortalama hemoglobin değeri 14,43±0,85 gr/dl (dağılımı 13-17) ve ortalama indirekt bilirubin düzeyi 14,81±6,94 mg/dl (dağılım, 6,50-33) bulundu. Favizm ve yenidoğan sarılığı olan hastalar arasında yaş, G6PD enzim aktivitesi, hemoglobin, indirekt bilirubin düzeyi ortalama değerleri arasında istatistiksel anlamlılık mevcuttu. G6PD enzim düzeyi favizmlı olgularda daha düşüktü (Tablo IX) .

Tablo IX. Favizm ve yenidoğan sarılığı olgularının yaş, G6PD enzim aktivitesi, hemoglobin ve indirekt bilirubin düzeyi ortalama değerleri.

	Favizm ortalama±SS	Yenidoğan sarılığı ortalama±SS	P değeri
Yaş (ay)	72.61±39,18	2,17±6,31	0,001
G6PD enzim aktivitesi (U/grHb)	2,23±1,58	2,96±1,37	0,047
Hemoglobin (gr/dl)	7,34±2,22	14,43±0,85	0,001
İndirekt bilirubin (mg/dl)	6,06±1,97	14,81±6,94	0,001

Kız hastaların yaş ortalaması $26 \pm 47,34$ ay (dağılım 1-120 ay), G6PD enzim aktivitesi ortalaması $3,07 \pm 1,4$ U/grHb (dağılım 0,47-4,90), ortalama hemoglobin değeri $12,78 \pm 3,59$ gr/dl (dağılımı 4,90-17) ve ortalama indirekt bilirubin düzeyi $13,06 \pm 6,63$ mg/dl (dağılım 4,20-29);

Erkek hastaların yaş ortalaması $43,14 \pm 44,31$ (dağılım 1-196 ay), G6PD enzim aktivitesi ortalaması $2,41 \pm 1,54$ U/grHb (dağılım 0,15-5), ortalama hemoglobin değeri $10,03 \pm 3,86$ gr/dl (dağılımı 3,5-15,5) ve ortalama indirekt bilirubin düzeyi $9,29 \pm 6,45$ mg/dl (dağılımı 2,70-33) bulundu. Erkeklerde hemoglobin ve indirekt bilirubin düzeyinin yüksek oluşu istatistiksel olarak anlamlı idi (p değeri sırasıyla 0010, 0025). Yaş ve G6PD enzim aktivitesi ile cinsiyet arasında anlamlı fark saptanmadı (Tablo X)

Tablo X: Olguların cinsiyete göre yaş, G6PD enzim aktivitesi, hemoglobin ve indirekt bilirubin düzeyi ortalama değerleri.

	Kız (n=16) ortalama$\pm$SS	Erkek (n=44) ortalama$\pm$SS	P değeri	Toplam (n=60) ortalama$\pm$SS
Yaş (ay)	26 $\pm$ 47,34	43,14 $\pm$ 44,31	0.069	25 (1-72)
G6PD enzim aktivitesi (U/grHb)	3,07 $\pm$ 1,4	2,41 $\pm$ 1,54	0.150	2.5 (1.07-4.0)
Hemoglobin (gr/dl)	12,78 $\pm$ 3,59	10,03 $\pm$ 3,86	0.019	9.7 (7.8-14.4)
İndirekt bilirubin (mg/dl)	13,06 $\pm$ 6,63	9,29 $\pm$ 6,45	0.025	8.2 (5.6-14)

Favizimli kız olguların yaş ortalaması $101 \pm 34,75$ (dağılım 49-120 ay), G6PD enzim aktivitesi ortalaması $2,09 \pm 1,77$ U/grHb (dağılım 0,47-4,20), ortalama hemoglobin değeri $7,02 \pm 2,32$ gr/dl (dağılımı 4,90-8,20) ve ortalama indirekt bilirubin düzeyi $5,72 \pm 1,89$ mg/dl (dağılım 4,20-8,20) ; erkek olguların yaş ortalaması $68,4 \pm 38,60$ (dağılım 24-196 ay), G6PD enzim aktivitesi ortalaması $2,25 \pm 1,58$ U/grHb (dağılım 0,15-5), ortalama hemoglobin değeri $7,38 \pm 2,32$ gr/dl (dağılımı 3,50-9,80) ve ortalama indirekt bilirubin düzeyi $6,11 \pm 2,01$ mg/dl (dağılımı 2,70-10) bulundu Kız ve erkek olgular arasında hemoglobin düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı fark saptanırken (p=0,040), yaş, G6PD düzeyleri, indirekt bilirubin ortalamaları arasında fark saptanmadı (Tablo XI)

Tablo XI: Favizimli olguların cinsiyete göre yaş, G6PD enzim aktivitesi, hemoglobin ve indirekt bilirubin düzeyi ortalama değerleri.

	Kız (n=4) ortalama±SS	Erkek(n=27) ortalama±SS	P değeri	Toplam (n=31) ortalama±SS
Yaş (ay)	101±34,75	68,4±38,60	0,158	72.61±39,18
G6PD enzim aktivitesi (U/grHb)	2,09±1,77	2,25±1,58	0,379	2,23±1,58
Hemoglobin (gr/dl)	7,02±2,32	7,38±2,32	0,040	7,34±2,22
İndirekt bilirubin (mg/dl)	5,72±1,89	6,11-2,01	0,459	6,06±1,97

Yenidoğan sarılığı olan kız olguların yaş ortalaması 2±1,4 gün (dağılım,1-30gün), G6PD enzim aktivitesi ortalaması 3,39±1,16 U/grHb (dağılım, 1,80-4,90), ortalama hemoglobin değeri 14,70±0,94 gr/dl (dağılımı, 13,90-17) ve ortalama indirekt bilirubin düzeyi 15,50±5,70 mg/dl (dağılımı: 8-29); erkek olguların yaş ortalaması 3±8,24 (dağılım, 1-35 gün), G6PD enzim aktivitesi ortalaması 2,65±1,46 U/grHb (dağılım, 0,90-4,90), ortalama hemoglobin değeri 14,24±0,75 gr/dl (dağılımı, 13-15,50) ve ortalama indirekt bilirubin düzeyi 14,3±7,8mg/dl (dağılımı:6,50-33) bulundu. Kız ve erkek olgular arasında yaş, G6PD, hemoglobin ve indirekt bilirubin düzeyleri arasında fark saptanmadı (Tablo XII).

Tablo XII: Yenidoğan sarılıklı olguların cinsiyete göre yaş, G6PD enzim aktivitesi, hemoglobin ve indirekt bilirubin düzeyi ortalama değerleri.

	Kız (n=12) ortalama±SS	Erkek (n=17) ortalama±SS	P değeri	Toplam (n=29) ortalama±SS
Yaş (gün)	2±1,4	3±8,24	0,892	2,17±6,31
G6PD enzim aktivitesi (U/grHb)	3,39±1,16	2,65±1,46	0,568	2,96±1,37
Hemoglobin (gr/dl)	14,70±0,94	14,24±0,75	0,668	14,43±0,85
İndirekt bilirubin (mg/dl)	15,50±5,70	14,3±7,80	0,234	14,81±6,94

Yenidoğan döneminde sarılık ile başvuran olguların üçünde patolojik sarılık (ilk 24 saat içinde başlayan sarılık), 16'sında uzamış sarılık (2 haftadan uzun süren sarılık) öyküsü mevcuttu. Toplam 4 bebeğe yüksek indirekt hiperbilirubinemi (dağılım, 28-33 mg/dl) nedeniyle kan değişimi yapıldı. Kan değişimi yapılan 4 bebeğin üçü erkek, biri kızdı.

Favizm tanısı konulan 31 olgunun 30'unda halsizlik 28'inde sarılık ve 22'sinde kusma yakınması mevcuttu. Hiçbirinde ilaç alım öyküsü yoktu. Bakla yedikten sonra semptomların görülmesi arasında geçen süre ortalama 6 saat (dağılım (2-24 saat) idi. Favizimli olguların 13'ünde(%42), yenidoğan sarılıklı olguların 8'inde (%27) G6PD S218F mutasyonu saptandı (Tablo XIII).

Tablo XIII: G6PD enzim eksikliği saptanan hastalarda G6PD S218F mutasyonlarının varlığı.

	Mutasyon		Toplam
	Var	Yok	
Favizm	13 (%21,7)	18 (%30)	31 (%51,7)
Yenidoğan sarılığı	8 (%13,3)	21(%35)	29 (%48,3)
Toplam	21 (%35)	39 (%65)	60 (%100)

G6PD eksikliği saptanan 60 olgunun 15'inde (%25) homozigot, 6'sında (%10) heterozigot mutasyon olmak üzere 21 hastada (%35) G6PD S218F Akdeniz mutasyonu tespit edildi. G6PD S218F homozigot mutasyonu saptanan 15 hastanın 1'si (%6,6) kız, 14'ü (%93,4) erkekti Bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($P<0.001$). G6PD S218F heterozigot mutasyonu saptanan 6 hastanın hepsi kızdı (Tablo XIV).

Tablo XIV. Yenidoğan sarılığı (n=29) ve favizmli (n=31) olgularda cinsiyete göre homozigot ve heterozigot G6PD S218F mutasyonunun dağılımı.

	Mutasyon Tipi				Toplam
	Homozigot		Heterozigot		
	Kız	Erkek	Kız	Erkek	
Yenidoğan sarılığı	0	4	4	0	8
Favizm	1	10	2	0	13
Toplam	1	14	6	0	21

G6PD S218F mutasyon görülme sıklığı açısından favizm ve yenidoğan sarılığı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($P=0.130$). G6PD eksikliği saptanan bireylerde tespit edilen mutasyonların klinik ile ilişkilendirilemeyeceği görüldü.

TARTIŞMA

Dünya’da ve Türkiye’de bugüne kadar yapılan çok sayıdaki G6PD enzim eksikliği prevalans çalışmasında değişik oranlar bildirilmiştir. Tüm dünya nüfusunun %4.9’unda G6PD eksikliği olduğu ve toplam 330 milyon kişinin etkilendiği düşünülmektedir (77). Yahudi Kürtlerinde %62 gibi yüksek prevalanslar gözlenirken, Japonlarda <%0.1 gibi düşük oranlar bildirilmiştir (78). İran’da, Kürt nüfusun yaşadığı Batı Bölgesinde, Rahimi ve ark. (79) tarafından yapılan, yaşları 14-18 arası değişen 1000 erkek öğrenciyi kapsayan çalışmada G6PD enzim eksikliği insidansı %5.3 olarak bulunmuştur. Warsy ve El-Hazmi (80) 1982-1993 yılları arasında, Suudi Arabistan’da, 31 farklı bölgede yaşayan, yaşları 2-70 arasında değişen, 13796’sı erkek, 13613’ü kadın toplam 27409 kişide G6PD enzim eksikliğinin sıklığını erkeklerde %9.05, kadınlarda %4.1 bulmuştur. Tsagaraki ve ark. (81) Yunanistan’da, 1977-1989 yılları arasında, 1286000 yenidoğan bebekte, fenilketonüri tarama programıyla birlikte yürütülen G6PD prevalans çalışmasında, erkeklerde %4.45, kızlarda %1.84 ve her iki cins birlikte düşünüldüğünde %3.14 oranında G6PD eksikliği saptamışlardır. Khneisser ve ark. (82) Lübnan’da yaşları 14 ve üzeri olan 3000 erkek olguda, G6PD enzim eksikliği sıklığını %1.2 olarak bulmuşlar ve G6PD enzim eksikliğinin bu ülkede en sık görülen genetik hastalık olduğunu bildirmişlerdir. Meloni ve ark. (83) Kuzey Sardunya bölgesinde yaptıkları çalışmada erkeklerde G6PD enzim eksikliğini %7.5 oranında bulmuşlardır. Bu çalışmadan sonra 1971 yılında aynı bölgede G6PD enzim düzeyine bakılması rutin tarama programına alınmış ve 1961-1970 yılları arası ile 1981-1990 yılları arasında gözlenen favizm vakaları karşılaştırıldığında %75 azalma olduğu görülmüştür. İtalya’da Sansone ve ark.(84) tarafından immünolojik olmayan hiperbilirubinemiye sahip Sardunya kökenli 302 yenidoğanın kord kanı ve İtalyan kökenli 201 yenidoğanın periferik kanı kullanılarak yapılan bir çalışmada, 43 vakada (%8.6) G6PD enzim eksikliği saptamışlardır. Abolghasemi ve ark.(85) tarafından, Tahran’da miadında doğan, 2000 İranlı bebeğin kordon kanında yapılan çalışmada, G6PD enzim eksikliği sıklığı kantitatif yöntemle erkeklerde %3.6, kızlarda %0.6, her iki cins birlikte düşünüldüğünde %2.1 bulunmuştur. Hiperbilirubinemiye, G6PD yetmezliğine sahip yenidoğanlarda, G6PD enzim düzeyi normal olanlara göre 3 kat daha sık gördüklerini vurgulamışlardır. Drousiotou ve ark.(86) Kıbrıs’ta Talasemi Koruma Programıyla birlikte yürütülen, erişkin yaştaki 172’si erkek, 140’ı kadın toplam 312 olguluk araştırmalarında G6PD enzim eksikliği sıklığını kantitatif testle erkeklerde %6.4, kadınlarda %5.7 olarak bulmuşlardır. Asya’da, aynı ülkenin farklı etnik gruplarında yapılan çalışmalarda Çin’de %0-

17.4, Hindistan'da %5.7-27.9 arasında değişen oranlar saptanmıştır (87,88). Noraihan ve ark. (89) Malezya'da 18 aylık peryotta doğan 34109 olguda konjenital defektler ve kromozom anomalilerini araştırmışlar, bu çocuklarda en sık gözlenen konjenital sorunun %1.57 ile G6PD enzim eksikliği olduğunu bulmuşlardır. Singapur'da G6PD enzim eksikliği önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmiş ve yenidoğan bebekler enzim düzeyi açısından tarama kapsamına alınmıştır (90).

Türkiye'de de G6PD eksikliği prevalansı coğrafi bölgeler ve etnik gruplar arasında farklılıklar göstermektedir. Ankara ve Erzurum'da <%1 (91,92), Güneydoğu Anadolu'da %2.3 (93), Güneybatı Anadolu'da %5-20 (94) oranında G6PD eksikliği bildirilmiştir. Aksu ve ark. (95) Antalya yöresinde 1521 olguda yaptıkları çalışmada G6PD enzim eksikliğini erkeklerde %7.4, kızlarda %1.8 olarak bulmuşlardır. Erbağcı (23) Gaziantep'te, yaşları 1-80 arasında değişen 166'sı kadın, 140'ı erkek toplam 306 kişiyi kapsayan çalışmasında enzim eksikliği sıklığını erkeklerde %2.9, kadınlarda %1.8, erkek ve kadınlar birlikte düşünüldüğünde %2.3 olarak bulmuştur. G6PD aktivitesinin cinsiyetler arası veya yaşa bağlı olarak anlamlı bir farklılık göstermediğini bildirmiştir. Özdeş (96), Denizli'de yaşları 14-17 arası değişen, 918'i kız, 1032'si erkek olmak üzere toplam 1950 öğrenci üzerinde yaptığı prevalans çalışmasında, G6PD eksikliğinin sıklığı erkeklerde %1.45, kızlarda %0.98, tüm olgular birlikte düşünüldüğünde %1.23 olarak bulmuştur. Kılınç (97) Çukurova bölgesinde 277 olguluk kordon kanı çalışmasında G6PD enzim eksikliğinin sıklığını erkeklerde %22.1, kızlarda %18.7 bulmuştur. Özlü (98) Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yaptığı tez çalışmasında G6PD eksikliği sıklığını erkek bebeklerde %3 olarak bulmuştur. Menziletoğlu Yıldız ve ark. Çukurova bölgesinde 450 klinik olarak sağlıklı kişilerde G6PD eksikliği sıklığını %7.11 bulmuşlardır (99). Turan (100), Balıkesir ve Çanakkale'de yaşayan 1421 klinik olarak sağlıklı kişide yaptıkları çalışmada G6PD eksikliği sıklığını kadınlarda %7.24, erkeklerde %6.2, tüm olgularda %6.9 bulmuştur.

Bazı çalışmalarla G6PD aktivitesinin term yenidoğan bebeklerde yetişkinlere göre, preterm doğanlarda da term doğanlara göre doğum sırasında daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu konuyla ilgili olarak Mesner ve ark. (101) tarafından İsrail'de, sağlıklı 118 erkek bebekte, doğduktan sonraki 48 saat içinde alınan kan örnekleriyle yapılan bir çalışmada, 29-32 haftalık doğanlarda G6PD aktivitesinin 29 haftadan daha önce veya 32 haftadan daha sonra doğan pretermilere ve term doğanlara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. 29 haftadan

önce veya 32 haftadan sonra doğan pretermiler ile term doğan yenidoğanların G6PD düzeyleri arasında ise farklılık olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda yenidoğan sarılığı olan bebeklerin 5'i premature idi ve hepsi 33 haftadan büyüktü.

Dünya'da bugüne kadar 400'ün üzerinde G6PD varyantı rapor edilmiştir (12,13). Akdeniz bölgesi ve Orta Doğu'da G6PD eksikliği saptanan kişilerde en sık rastlanan mutasyonun Akdeniz mutasyonu olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Kıbrıs'ta Drousiotou ve ark. (86) %52.6; Yunanistan'da Beutler ve ark. (141) %77, İtalya'da di Montemuros ve ark. (102) %70, Sansone ve ark. (84) %90.7; Ninfali ve ark. (103) %66.6; Pietrapartezzo ve ark. (104) %48.3; Birleşik Arap Emirlikleri'nde Bayoumi ve ark. (105) %77.7; Umman'da Daar ve ark. (106) %75; Kuveyt'te Alfadhli ve ark. (107) %74.2; Suudi Arabistan'da Al-Ali ve ark. (108) %84; Irak Kürtlerinde Hilmi ve ark. (109) %54.8, Al-Allawi ve ark. (110) %87.8; Mısır'da Arnaout ve ark. (111) 62%, Hafez ve ark. (111) 60% , Rizk ve ark. (111) % 28.6; İran'da Karimi ve ark. Kuzey Fars bölgesinde 66.2%, Güney Fars bölgesinde % 83.8 (112), Noori-Dalooi ve ark. (113) Gilan, Mazandaran and Golestan bölgesinde %70.8, Noori-Dalooi ve ark. (114) Hormozgan'da %79.5, Noori-Dalooi ve ark. (115) Khorasan 'da %66, Mortazavi ve ark. Zanjan'da %72.7, Zahedan'da (116) %84.2 oranında Akdeniz mutasyonu saptadıklarını bildirmişlerdir.

Ülkemizde tüm Türkiye'yi içine almış geniş çaplı mutasyon analizleri bulunmamaktadır. Daha çok bölgesel ve dar kapsamlı çalışmalar vardır. Bu çalışmalarda en sık rastlanan mutasyon Akdeniz mutasyonudur. Keskin ve ark. (117) Denizli'de Akdeniz mutasyonunu 24 hastanın 19'unda (%79) saptamışlardır. Tüli (118) Adana'da Mediterranean mutasyonunu %53 oranında bulmuştur. Bağcı ve ark. (119) Antalya'da 20 ailenin hepsinde Akdeniz mutasyonu saptamışlardır. Keskin ve ark.(117) Denizli'de 24 G6PD eksikliği olan kişide %79 oranında Akdeniz mutasyonu saptamışlardır.

Öner ve ark. (120) Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne refere edilen 50 G6PD eksikliği olgusunda %80 oranında Akdeniz mutasyonu saptamışlardır. Ayrıca 2 olguda (%4) G6PD A- (376G/202A), bir olguda (%2) G6PD Chatam (1003A) mutasyonu bulmuşlar, 7 (%14) olguda ise mutasyonu tespit edememişlerdir.

Özmen ve ark. (27) Doğu Anadolu Bölgesi'nde 1183 olgu üzerinde yaptıkları tarama çalışmasında exon 5'de 2 adet ve exon 6 ve 7'de 1 adet olmak üzere toplam 3 (%0.25) olguda tipini tanımlayamadıkları mutasyonlar bulmuşlardır.

Aksoy ve ark.'nın Çukurova bölgesinde 1987 yılında yaptıkları çalışmada G6PD Adana, G6PD Samandağ ve G6PD Balcalı varyantlarını tarif etmişlerdir. Daha sonra G6PD Adana varyantının G6PD Akdeniz ve 1311 polimorfik mutasyonu taşıdığı gösterilmiştir (121,15).

Açıkbaz ve ark. 1999 yılında Antalya yöresinde Akdeniz mutasyonunu %76 oranında saptamışlardır (122).

Çalışmamızda G6PD eksikliği olan çocuklarda, ülkemiz, Orta Doğu ve Akdeniz ülkelerindeki diğer çalışmalarda olduğu gibi en sık Akdeniz mutasyonunu bulduk. Ancak diğer çalışmalardan farklı olarak G6PD Akdeniz mutasyonu oranımız (%35) düşüktü. Bu durum bölgesel farklılıklara bağlı olabileceği gibi çalışmalardaki olgu sayılarının ve olgu özelliklerinin farklılığından da kaynaklanabilir. Çalışmamızın devamında DNA dizi analizi ile var olabilecek yeni mutasyonların tespiti planlanmaktadır.

Lyon hipotezine göre kızlarda aktive olan X'e bağlı olarak lyonizasyon derecesine göre şiddeti değişken hastalık tabloları olabilir (4). Çalışmamızda favizimli olguların %12,9'u, indirekt hiperbilirubinemi olguların ise %41,3'ü kızdı. Kan değişimi yapılan yenidoğan sarılıklı 4 bebeğin üçü erkek, biri kızdı. Bu sonuçlar bize G6PD eksikliğinin X'e bağlı resesif geçen bir hastalık olmasına karşın kızlarda da belirgin olarak klinik bulgu oluşturduğu ve favizm ve yenidoğan sarılıklı kız çocuklarında düşülmesi gerekliliğini düşündürdü.

G6PD eksikliği olan kişiler asemptomatik olabileceği gibi, yenidoğan sarılığı, kronik nonsferositik anemi, akut hemolitik anemi ile başvurabilir. Asya'da görülen G6PD eksikliklerine bağlı yeni doğan hemolitik anemiler erkek çocuklarda %4.47, kız çocuklarda ise %0.27 olarak tespit edilmiştir (4,123). Öner ve ark. (120) Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne refere edilen 50 olgunun 40'ında indirekt hiperbilirubinemi; 10'unda hemolitik kriz olduğunu bildirmişlerdir. Yıldırım ve ark. (127) İstanbul Şişli Etfal Hastanesi'nde 2000-2007 yılları arasında G6PD enzim eksikliği tanısı konulan 19 bebeğin 10'unun enfeksiyona sekonder akut hemolitik atak, 7'sinin yenidoğan sarılığı, ikisinin favizm

nedeniyle başvurduklarını bildirmişlerdir. Özlü Adana’da yaptığı tez çalışmasında (98) 200 yenidoğan bebeğin 6 ‘sında G6PD eksikliği ve bunların üçünde de Akdeniz mutasyonu saptamışlardır. Mutasyon saptanan 3 yenidoğan bebeğin ikisinde bilirubin düzeylerinin yüksek olduğunu ve kliniklerinin ağır olduğu bildirmişlerdir. Kan değişimi yapılan bir olgu da ise Akdeniz mutasyonu saptamamışlar ve bu olguda hiperbilirubinemiye neden olan diğer bir mutasyona sahip olabileceğini düşünmüşlerdir.

Menziletoğlu Yıldız ve ark. (125) mikroarray tekniğiyle Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği saptanan 25 olgunun 13’ünde homozigot, ikisinde heterozigot Akdeniz mutasyonu saptamışlardır.

Çalışmamızda 15 homozigot 6 heterozigot G6PD S218F mutasyonu saptandı. Homozigot mutasyon saptanan olguların 4’ü YDS, 11’i bakla yeme sonrası sarılık; heterozigot mutasyon saptanan olguların ise 4’ü YDS, ikisi bakla yeme sonrası sarılık yakınmasıyla başvurdu.

Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz eksikliğinde ortaya çıkan neonatal hiperbilirubinemide hemolizden çok karaciğerdeki bozulmuş konjugasyonun rol oynadığı bildirilmiştir (4,126). Çalışmamızda yenidoğan sarılığı olan ve G6PD eksikliği saptanan 29 olgunun dördüne kan değişimi uygulamayı gerektiren hiperbilirubinemi olmasına karşın hiçbirisinde anemi saptanmaması konjugasyon bozukluğunun temel mekanizma olduğunu düşündürdü.

Bülbül ve ark. (124) İstanbul Şişli Etfal Hastanesi’nde 2008-2009 yılları arasında hiperbilirubinemi nedeniyle izledikleri 496 bebeğin 4’ünde G6PD enzim eksikliği saptadıklarını; bebeklerin 2, 6, 21 ve 30.gün başvurduklarını ve total bilirubin düzeylerinin sırasıyla 14, 41, 20 ve 15 mg/dl olduğunu yüksek bilirubin düzeyi olan bebeğe 2 kez kan değişimi uyguladıklarını ve kernikterus geliştiğini bildirmişlerdir.

Hiperbilirubinemili bebeklerde G6PD enzim eksikliği sıklığı farklı oranlarda bildirilmiştir. Nuchprayoon ve ark. (128) Tayland’da hiperbilirubinemili erkek bebeklerde %22.1 (n=140), kız bebeklerde ise %10.1 (n=89); Atay ve ark. (129) İstanbul Zeynep Kamil Doğumevi’nde takip ettikleri indirekt hiperbilirubinemili 330’u erkek, 294’ü kız toplam 624 term yenidoğanda %3.8; Satar ve ark. (130) Adana’da 83 infantta %10,5, Say ve ark. (131)

İstanbul'da 68 yenidoğan bebekte %2.94; Tekinalp ve ark. (132) Ankara'da 82 hiperbilirubinemili yenidoğanda %1.2 oranında G6PD enzim eksikliğini saptamışlardır.

G6PD eksikliği olan yenidoğanlarda sarılık ciddi olabilir ve tedavi edilmezse kernikterus ile sonuçlanabilir, ölüme veya kalıcı nörolojik hasarlara neden olabilir (67,49,133,134). Umman'da 1995-2001 yılları arasında kernikterus gelişen 14 bebeğin 10'unda (%71,4) G6PD eksikliği saptandığı ve ölen 4 bebeğin 2'sinde G6PD eksikliği olduğu bildirilmiştir (133). Johnson ve ark.(134) total bilirubin düzeyi 21.5-50 arasında değişen 61 yenidoğan bebekte G6PD enzim eksikliği sıklığını %31.5 olarak saptamışlardır. Tiker ve ark.(133) Adana Başkent Üniversitesi'nde izledikleri yenidoğan sarılığı olan 774 bebeğin 93'ünde (%12) total bilirubin düzeyini 25 mg/dl ve üzerinde (ortalama 30 ± 5.7 mg/dl, dağılım 25-57 mg/dl) saptamışlar ve bu 93 bebeğin 39'unda G6PD düzeyi bakmışlar ve ikisinde (%5) G6PD eksikliği saptamışlardır. Katar (135) Güneydoğu Anadolu bölgesinde 2005-2006 yılları arasında kan değişimi yapılan 56 bebeğin 10'unda (%18) G6PD eksikliği saptamışlar ve bunların 5'inde kernikterus geliştiğini bildirmiştir. Nijerya'da 1991-92 yılları arasında çok yüksek serum total bilirubin düzeyi olan bebeklerin %31'inde (14/45) G6PD enzim eksikliği saptanmıştır. Kernikterus gelişen 8 bebeğin 6'sında (%75) G6PD eksikliği saptanırken kernikterus gelişmeyen 37 bebeğin 8 inde (%22) G6PD eksikliği saptanmıştır. Ölüm G6PD eksikliği olan 14 bebeğin 5 inde (%36), G6PD eksikliği olmayan 31 bebeğin 1 inde (%3) gözlenmiştir (136). Nijeryada 2001-2004 yılları arasında bilirubin ensefalopatisi saptanan ve çoğu naftalin ve mentolle maruz kalan 115 bebeğin 42'sinin öldüğü ve 40'ında (%34,8) G6PD eksikliği saptandığı bildirilmiştir (137). Batı Nijerya'da 2001-2003 yılları arasında kan değişimi yapılan yenidoğan bebeklerin %34'ünde 11/32 G6PD eksikliği saptanmıştır (138).

Çalışmamızda ilk gün ortaya çıkan sarılık olguların 3'ünde gözlemlendi. Bu olguların 3'ü de term bebektir ve ortalama bilirubin düzeyleri 7.9 ± 1.3 (dağılım 6-9) mg/dl idi. Bu bebeklere fototerapi uygulandı, kan değişimi ihtiyacı olmadı. Onbeş bebek ortalama 22.8 ± 5.59 günde (dağılım 15-30) uzamış sarılık nedeniyle başvurdu. Bu bebeklerin ortalama bilirubin düzeyleri 13.09 ± 4.6 (dağılım 8-16) idi. Uzamış sarılıklı bebeklerin ikisinde başka bir merkezde fototerapi alma öyküsü vardı: Bebeklerden birine 4 günlükken, diğerine bir günlükken sırasıyla 4 ve 6 gün süreyle fototerapi uygulanmıştı. Dört bebeğe kan değişimi yapıldı. Kan değişimi uygulanan bebeklerin biri 33 haftalık premature idi ve 2.gün kan değişimi öncesi indirekt bilirubin düzeyi 28 mg/dl idi. Diğer 3 bebek matürdü ve hepsi de 3 günlükken

sırasıyla 28, 29 ve 33 mg/dl indirekt bilirubin değerleriyle kan değişimi uygulandı. Kan değişimi uygulanan bir bebekte heterozigot Akdeniz mutasyonu saptandı. Mutasyon saptanan bebek matürdü ve indirekt bilirubin düzeyi 29 mg/dl idi.

Pietrapertosa ve ark. (104) İtalya’da G6PD eksikliği olan 54 hastanın 32’sinde (%59.2) klinik bulgu olmadığını ve bunların 10’unda Akdeniz varyantı, 17 sinde Seattle varyantı, 2 sinde Montralbano varyantı saptandığını; Akut hemolitik kriz görülen 20 hastanın 14’ünde favizm olduğunu, favizm görülen olguların %85’inde Akdeniz varyantı saptandığını, akut hemolitik krizin Akdeniz varyantı bulunanlarda %53.8, Seattle varyantlılarda %5.5, Montalbano varyantlılarda %0, A- varyantlılarda ise %100 oranında saptandığını, yenidoğan sarılığı görülen 2 olgunun da Akdeniz varyantı olduğu, hemolitik kriz etyolojisi saptanamayan 5 olgunun 2’sinin Akdeniz, üçünün A- varyantı olduğunu bildirmişlerdir. Ainoon O ve ark. (139) Malezya’da G6PD enzim eksikliği olan %82,6’sında yenidoğan sarılığı gözlenen 86 bebekte G6PD Viangchan, G6PD Akdeniz ve G6PD Mahidol mutasyonlarını sırasıyla %37,2,%26,7, %15,1 oranında bulmuşlar, fototerapi ihtiyacı ve süresi, ortalama ve zirve bilirubin düzeyleri açısından üç mutasyon arasında fark saptamadıklarını bildirmişlerdir. Biz çalışmamızda favizimli olguların %42, indirekt hiperbilirubinemili bebeklerin ise %27 ‘sinde Akdeniz mutasyonu saptadık. Bu da bize bölgemizde Akdeniz mutasyonunun G6PD eksikliğine bağlı favizm ve yenidoğan sarılığının önemli bir nedeni olduğunu göstermektedir. G6PD eksikliğine neden olabilecek diğer mutasyonların DNA dizi analizi ile belirlenmesi, mutasyonların favizm ve yenidoğan sarılığı ile ilişkisini daha net ortaya koyacaktır.

ÖZET

AMAÇ: Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği olan çocuklarda Dünya’da ve Türkiye’de en sık rastlanan mutasyon olan G6PD S218F Akdeniz mutasyonunun görülme sıklığını belirlemek.

GEREÇ ve YÖNTEMLER: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematolojisi ve Neonatoloji Bilim Dalları’nda 2004-2012 yılları arasında Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği tanısı alan, enzim düzeyi düşük saptanan (<6 U/grHb) ve mutasyon çalışması yapılmış olan hastalar dahil edildi. Hastaların başvuru yakınması ve öyküsü, fizik inceleme bulguları, laboratuvar sonuçları (tam kan sayımı, karaciğer fonksiyon testleri, enzim düzeyleri, mutasyon analizi sonuçları) kaydedildi. Enzim düzeyi biyokimya laboratuvarında quantitative spectrophotometry yöntemi ile, mutasyon analizi genetik laboratuvarında lightcycler 1.5 real-time PCR cihazında melting-curve analizi ile yapıldı.

BULGULAR: G6PD enzim eksikliği anemisi tanısı konulan 60 hastanın, 29’u yenidoğan sarılığı, 31’i favizm nedeniyle başvurdu. Hastaların 44’ü erkek (%73,3), 16’sı (%26,7) kız; favizm tanısı konulan olguların 27’si (%87) erkek, 4’ü (%13) kız; yenidoğan sarılığı olgularının 17’si (%58) erkek, 12’si (%41,3) kız idi. Favizm tanısı konulan 31 olgunun 30’unda halsizlik 28’inde sarılık ve 22’sinde kusma yakınması mevcuttu. Bakla yedikten sonra semptomların görülmesi arasında geçen süre ortalama 6 saat (dağılım (2-24 saat) idi. Yenidoğan döneminde sarılık ile başvuran olguların üçünde patolojik sarılık (ilk 24 saat içinde başlayan sarılık), 16’sında uzamış sarılık öyküsü mevcuttu. Sarılıklı bebeklerin hiçbirisinde anemi saptanmaması konjugasyon bozukluğunun temel mekanizma olduğunu düşündürdü. Toplam üçü erkek, biri kız 4 bebeğe hiperbilirubinemi nedeniyle kan değişimi yapıldı. G6PD eksikliği saptanan 60 olgunun 15’inde (%25) homozigot, 6’sında (%10) heterozigot olmak üzere 21 hastada (%35) G6PD S218F Akdeniz mutasyonu tespit edildi. Mutasyon saptanan olguların 13’ünde (%42) favizm, 8’inde (%27) yenidoğan sarılığı mevcuttu. Homozigot mutasyon saptanan 15 hastanın 1’si (%6,6) kız, 14’ü (%93) erkekti. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.001$). G6PD S218F heterozigot mutasyonu saptanan 6 hastanın hepsi kızdı. Homozigot mutasyon saptanan olguların 4’ü YDS, 11’i bakla yeme sonrası sarılık; heterozigot mutasyon saptanan olguların ise 4’ü YDS, ikisi bakla yeme sonrası sarılık yakınmasıyla başvurdu. G6PD S218F mutasyon görülme sıklığı açısından favizm ve yenidoğan sarılığı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($P=0.130$).

SONUÇ: Çalışmamızda G6PD S218F Akdeniz mutasyonu sıklığını %35 olarak saptadık. Bu oran ülkemizdeki diğer çalışmalarda belirtilen oranlardan (%53-80) düşüktü. Bu durum bölgesel farklılıklara bağlı olabileceği gibi çalışmalardaki olgu sayılarının ve olgu özelliklerinin farklılığından da kaynaklanabilir. Akdeniz mutasyonu dışındaki diğer mutasyonların DNA dizi analizi ile saptanması bölgemizin özelliklerini daha iyi yansıtacaktır.

Anahtar sözcükler: G6PD S218F mutasyonu, Akdeniz mutasyonu, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği, yenidoğan sarılığı, favizm

ABSTRACT

OBJECTIVE : To determine the incidence of Mediterranean G6PD S218F mutation which is the most common mutation among glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency cases both in the world and in our country.

MATERIALS AND METHODS: Were included G6PD deficiency cases whose enzyme levels <6 with mutation analysis, and diagnosed between 2004-2012 at neonatology and hematology department in Adnan Menderes University Hospital. The presenting complaints and history, physical examination findings, laboratory results (complete blood count, liver function tests, enzyme levels, mutation analysis of the results) of patients were recorded. G6PD activity was determined by quantitative spectrophotometry in biochemistry and G6PD mutations were analyzed with LightCycler 5.1 real-time PCR melting-curve analysis in genetics.

RESULTS: Totally 60 patients with the diagnosis of G6PD deficiency anemia admitted to hospital; 29 have neonatal jaundice and 31 have favizm. 44 patients (73.3%) were male, 16 (26.7%) were female; favizm cases diagnosed 27 (87%) patients were male and 4 (13%) were females. 17 cases of neonatal jaundice (58%) were male and 12 (41.3%) were female. In 28 of 31 patients diagnosed with favizm have fatigue, 30 patients have jaundice and 22 have vomiting. The average time between the occurrence of symptoms after eating fava is 6 hours (range, 2-24 hours). Three patients who presented with jaundice in neonatal period had pathological jaundice (jaundice beginning in the first 24 hours), 16 patients had a history of prolonged jaundice. Anemia was not detected, in any of the babies who have jaundice, seemed to be the principal mechanism is conjugation disorder. Exchange transfusion was applied to 4 patients with hyperbilirubinemia, 3 of them were male and 1 was female. Totally in 21 patients (35%) G6PD deficiency has been detected; 15 patients (25%) were homozygously, 6 (10%), patient were heterozygous of G6PD Mediterranean S218F mutation was detected. Mutations detected in 13 (42%) favizm, 8 patients (27%) had neonatal jaundice. 1 of 15 patients with homozygous mutation (6.6%) were female and 14 (93%) were male. The difference was statistically significant ($p < 0.001$). All 6 patients with G6PD mutation S218F heterozygous were female. 4 of homozygous mutation detected patients had neonatal jaundice, 11 had jaundice after eating beans, 4 of patients with heterozygous mutations had neonatal jaundice, and 2 had jaundice after eating bean. There is no statistically difference

between G6PD S218F mutation incidence of favizm and neonatal jaundice in the newborns (p= 0130).

CONCLUSION: We determined the incidence of mutations in G6PD Mediterranean S218F as 35%. This ratio is lower than the other investigations in our country with the ratio of 53-80%. This situation may be due to regional differences in the number of cases and case studies, such as caused by differences in characteristics. DNA sequence analysis of mutations other than the detection of mutations in the Mediterranean region determination better reflect the characteristics of our region.

Key words: S218F mutation of G6PD, Mediterranean mutation, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, neonatal jaundice, favizm.

KAYNAKLAR

1. Persico MG, Viglietto G, Martini G. Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 5' non-coding region. *Nucleic Acids Res* 1986; 14(6): 2511-22.
2. Beutler E, Kuhl W, Gelbart T, Forman L. DNA sequence abnormalities of human glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *J Biol Chem* 1991; 266: 4145-50.
3. Scott MD, Zuo L, Lubin BH, Chiu DT. NADPH, not glutathione, status modulates oxidant sensitivity in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes. *Blood* 1991; 77(9): 2059-64.
4. Beutler E. G6PD deficiency. *Blood* 1994; 84(1): 3613-36.
5. Martini G, Ursini M. A new lease of life for an old enzyme. *Bioessays* 1996; 18(8): 631-7.
6. Naylor CE, Rowland P, Basak AK, Gover S, Mason PJ, Bautista JM, Vulliamy TJ, Luzzatto L, Adams MJ. Glucose 6-phosphate dehydrogenase mutations causing enzyme deficiency in a mode human enzyme. *Blood* 1996; 87(7): 2974-82.
7. Au SW, Gover S, Lam VM, Adams MJ. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP (+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure* 2000; 8(3): 293-303.
8. Pietrapetosa A, Palma A, Campanale D, Delios G, Vitucci A, Tannoia N. Genotype and phenotype correlation in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Haematologica* 2001; 86(1): 30-35.
9. Karadsheh NS, Moses L, Ismail SI, Devaney JM, Hoffman E. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Jordan. *Haematologica* 2005; 90(12): 1693-4.
10. Kaplan M, Hammerman C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: potential source of severe neonatal hyperbilirubinaemia and kernicterus. *Semin Neonatol* 2002; 7(2): 121-8.

11. Köksal N. Hemolitik anemi. Türkiye Klinikleri J Ped 2004; 2(1): 747-53.
12. Vulliamy TJ, Urso MD, Battistuzzi G, Estrada M, Foulkes NS, Martini G, Calabro V, Poggi V, Giordano R, Town M. Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:(14) 5171-5.
13. “<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>” Human Gene Mutation Database (HGMD). 30.08.2012.
14. Aksoy M, Dincol G, Erdem S. Survey on haemoglobin variants, beta-thalassaemia, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and haptoglobin types in Turkish people living in Manavgat, Serik and Boztepe (Antalya). Hum Hered 1980; 30(1): 3-6.
15. Yalın S, Yalın E, Ünlükurt İ, Aksoy K. Çukurova bölgesinde saptanan G6PD varyantlarının kinetik özellikleri. Türk Biyokimya Dergisi 2001; 26(2): 83-89.
16. Oski FA, Brugnara C, Nathan DG. A diagnostic approach to the anemic patient. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look AT (eds). Hematology of infancy and childhood, 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2003: 409-18.
17. Öngören Ş. Hemolitik anemiler. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri. anemiler sempozyumu 2001: 49-60.
18. Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell WW (Çeviri: Dikmen N, Özgünen T). Harper’ın biyokimyası. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2004: 219-29.
19. Nelson DA, Davey FR. Erythrocytic disorders. In: Henry JB (ed.). Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 18th ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1991; 660-2.
20. Pasternak CA (Çeviri: Ciliv G, Emerk K., Karan A). İnsan biyokimyasına giriş. Ankara: Çağ Matbaacılık; 1980:196-205.
21. Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical aspects of hematology. Tietz textbook of clinical chemistry. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1999: 1642-55.

22. Martinez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* 1995; 77(3): 147-61.
23. Erbağcı AB. Gaziantep il merkezinde eritrosit G6PD referans sınırları ve G6PD eksikliği sıklığının araştırılması. Uzmanlık Tezi, Gaziantep: Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi; 1997.
24. Glader BE, Lukens JN. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and related disorders of hexose monophosphate shunt and glutathione metabolism. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM (eds.). *Wintrobe's clinical hematology*, 10th ed. London: WB Saunders Co; 1999: 1176-90.
25. Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman HN. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood* 1996; 87(4): 1595-9.
26. Gaetani GF, Rolfo M, Arena S, Mangerini R, Meloni GF, Ferraris AM. Active involvement of catalase during hemolytic crises of favism. *Blood* 1996; 88(3): 1084-8.
27. Özmen İ. Erzurum yöresinde yaşayan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz eksikliği tespit edilen şahıslarda glukoz 6-fosfat dehidrogenaz kinetiğinin incelenmesi ve mutasyon noktalarının moleküler tekniklerle taranması. Doktora Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 2002.
28. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. 4th Edition, New York: W. H. Freeman and Company, 2005: 551-7.
29. Özmen İ, Küfrevioğlu Oİ, Gül M. Effects of some antibiotics on activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes in vitro and effect of isepamicin sulfate on activities of antioxidant enzymes in rat erythrocytes. *Drug Chem Toxicol* 2005; 28(4): 433-45.
30. Izawa S, Maeda K, Miki T, Mano J, Inoue Y, Kimura A. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 1998; 330(2): 811-7.

31. Kondo T, Dale OL, Beutler E. Glutathione transport by inside-out vesicles from human erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77(11): 6359-62.
32. Bilmen S, Aksu TA, Gumuslu S, Korgun DK, Canatan D. Antioxidant capacity of G6PD deficient erythrocytes. *Clin Chim Acta* 2001; 303: 83-6.
33. Özmen İ, Kufrevioglu İ. Effects of antiemetic drugs on glucose 6dehydrogenase and some antioxidant enzymes. *Pharmacol Res* 2004; 50(5): 499-504.
34. Szweda LI, Stadtman ER. Iron catalyzed oxidative modification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*, structural and functional changes. *J Biol Chem* 1992; 267(5): 3096-100.
35. Luzzatto L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and hemolytic anemia. In: Nathan DG, Orkin SH (eds). *Nathan and Orki's hematology of infancy and childhood*. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2005; 704-26.
36. Yoshida A. Hemolytic anemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Science* 1973; 179(73): 532-7.
37. Champe PC, Harvey RA (Çeviri: Toklugil A, Dirican M, Ulukaya E). *Biyokimya*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1997: 25-38.
38. Kern WF (Çeviri: Ferhanoğlu B.). *PDQ hematoloji*. İstanbul: Medikal Yayıncılık 2005: 100-5.
39. Poggi V, Town M, Foulkes NS, Luzzatto L. Identification of a single base change a new human mutant glucose-6-phosphate dehydrogenase gene by polymerase-chain reaction amplification of the entire coding region from genomic DNA. *Biochem J* 1990; 271(1): 157-60.
40. Telören B. Edirne il merkezinde 7-12 yaş grubu çocuklarda glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği taraması. Uzmanlık Tezi, Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, 2008.

41. Cheney CA, Lee A. Sequence of human G-6-PD cloned in plasmids and a yeast artificial chromosome (yac). *Genomics* 1991; 10:(3) 79-86.
42. Hay WW, Groothuis JR, Hayward AR, Levin MJ. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency. In: Williams WJ, Groothuis JR, Hayward AR Levin MJ (eds). *Current pediatric diagnosis and treatment*. 16th ed. New York: McGraw Hill Co, 2003: 856-7.
43. Luzzatto L. G6PD deficiency and hemolytic anemia. In: Nathan DG, Oski FA (eds) *Hematology of infancy and childhood*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1993: 674-95.
44. Yan T, Cai R, Mo O, Zhu D. Incidence and complete molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Guangxi Zhuang autonomous region of southern China: description of four novel mutations. *Haematologica* 2006; 91(10): 1321-28.
45. Apak MY, Semerci CN. Tek gen hastalıkları ve genetik danışma. *Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci* 2005; 1(2): 24-9.
46. Gürbüz N. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) yetmezliğinde heterozigot vakaların eritrosit deformabilitesi ölçümü ve G6PD boyanması tekniği ile değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Antalya: Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, 2003
47. Hansen RS, Canfield TK, Fjeld AD, Gartler SM. Role of late replication timing in the silencing of X-linked genes. *Hum Mol Genet* 1996; 5(9): 1345-53.
48. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41(12 Pt 2): 1819-28.
49. Au WY, Ma SK, Lie AK, Liang R, Cheng T, Kwong YL. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29(5): 399-402.

50. Ganczakowski M, Town M, Bowden DK, Vulliamy TJ, Kaneko A, Clegg JB, Weatherall DJ, Luzzatto L. Multiple glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient variants correlate with malaria endemicity in the vanuatu archipelago (southwestern Pacific). *Am J Hum Genet* 1995; 56(1): 294-301.
51. Reglinski J, Hoey J, Simith W, Sturrock RD. Cellular response to oxidative stress at sulfhydryl group receptor sites on the erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 1988; 263(25): 12360-6.
52. Meloni T, Forteleoni G, Dore A, Cutillo S. Favism and hemolytic anemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient subjects in North Sardinia. *Acta Haematol* 1983; 70(2): 83-90
53. Doğan H. Doğu Anadolu Bölgesi'nde hemolitik anemili çocuklarda glukoz 6 fosfat dehidrogenaz genindeki mutasyonların microarray sistemi ile tespiti. Doktora tezi, Erzurum: Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 2007.
54. Lattanzio V, Bianco VV, Lafiandra D: High-performance reversed-phase liquid chromatography (HPLC) of favism inducing factors in *Vicia faba* L. *Experienti* 1982; 38(7): 789-90.
55. Luzzatto L, Poggi V. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency 2008.
56. Martinez di Montemuros F, Dotti C, Tavazzi D, Fiorelli G, Cappellini MD. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Italy. *Haematologica* 1997; 82(4): 440-5.
57. Al-Musawi BM, Al-Allawi N, Abdul-Majeed BA, Eissa AA, Jubrael JM, Hamamy H. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient variants in Baghdad city- Iraq. *BMC Blood Disord* 2012; 12: 4.
58. Tabata M, Kido T, Totani M, Murachi T. Direct spectrophotometry of magnesium in serum after reaction with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Clin Chem* 1985; 31(5): 703-705.

59. Altikat S, Ciftci M, Buyukokuroglu ME. In vitro effects of some anesthetic drugs on enzymatic activity of human red blood cell glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Pol J Pharmacol* 2002; 54(1): 67-71.
60. Gurbuz N, Aksu TA, Van Noorden CJ. Biochemical and cytochemical evaluation of heterozygote individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Acta Histochem* 2005; 107(4): 261-6.
61. Noori-Dalooi MR, Najafi L, Mohammad Ganji S, Hajebrahimi Z, Sanati MH. Molecular identification of mutations in G6PD gene in patients with favism in iran. *J Physiol Biochem* 2004; 60(4): 273-7.
62. Beutler E, Westwood B, Melemed A, Dal Borgo P, Margolis D. Three new exon 10 glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations. *Blood Cells Mol Dis* 1995; 21: 64-72.
63. Menounos PG, Garinis GA, Patrinos GP. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency does not result from mutations in the promoter region of the G6PD gene. *J Clin Lab Anal* 2003; 17(3): 90-92.
64. Yoltaş A, Karaboz İ. DNA mikroarray teknolojisi ve uygulama alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR* 2010; (8)1: 1-2.
65. Thistlethwaite WA, Moses LM, Hoffbuhr KC, Devaney JM, Hoffman EP. Rapid genotyping of common MeCP2 mutations with an electronic DNA microchip using serial differential hybridization. *J Mol Diagn* 2003; 5(2): 121-6.
66. Özkan A. Eritrosit enzim eksiklikler. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri. *Anemiler sempozyumu* 2001; (4): 143-8.
67. Roos D, Van Zwieten R, Wijnen J. Molecular basis and enzymatic properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase volendam, leading to chronic nonspherocyticanemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infections. *Blood* 1999; 94(9): 2955-62.

68. Magon AM, Leipzig RM, Zannoni VG, Brewer GJ. Interactions of glucose-6 phosphate dehydrogenase deficiency with drug acetylation and hydroxylation reactions. *J Lab Clin Med* 1981; 97(6): 764-70.
69. Büyükokuroğlu ME, Süleyman H. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği. *T Klin J Med Sci* 2001; 21(5): 415-9.
70. Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical aspects of hematology. In: Burtis CA, Ashwood ER (eds.). *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1999: 1642-55.
71. Morelli A, Grasso M, Meloni T, Forteleoni G, Zocchi E, De Flora A. Favism: impairment of proteolytic systems in red blood cells. *Blood* 1987; 69(6):1753-58.
72. Turrini F, Naitana A, Mannuzzu L, Pescarmona G, Arese P. Increased red cell calcium, decreased calcium adenosine triphosphatase, and altered membrane proteins during fava bean hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient (Mediterranean variant) individuals. *Blood* 1985; 66(2): 302-5.
73. <http://www.kanbilim.com/images/dhlatlas/Slide17.JPG>. 13.10.2012
74. Şaşmaz İ. Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği. *Türk Pediatri Arşivi* 2009; 44: 35-8.
75. Reuter M, Küpper Y, Schmitz A, Breuer JP, Wend U, Hennig J. Detection of new single nucleotide polymorphisms by means of real time PCR. *J Genet* 2005; 84(3).
76. Lohmann S, Lehmann L, Tabiti K. Fast and flexible single nucleotide polymorphism (SNP) detection with the light cycler system. *Biochemica* 2000; 4(1): 23-8.
77. Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, Hall SA, Beutler E. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood Cells Mol Dis* 2009; 42(3): 267-78.
78. Sodeinde O. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bailliere's Clin Haematol* 1992; 5(2): 367-82.

79. Rahimi Z, Vaisi-Raygani A, Nagel RL, Muniz A. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the kurdish population of western iran. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 37(2): 91-4.
80. Warsy AS, El-Hazmi MA. G6PD deficiency distribution and variants in Saudi Arabia: an overview. *Ann Saudi Med* 2001; 21(3-4): 174-7.
81. Missiou Tsagaraki S. Screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency as a preventive measure: prevalence among 1.286.000 greek newborn infants. *J Pediatr* 1991; 119(2): 293-9.
82. Khneisser I, Adib SM, Loiselet J, Megarbane A. Prevalence of G6PD deficiency and knowledge of diagnosis in a sample of previously unscreened Lebanese males: clinical implications. *J Med Screen* 2006; 13(1): 26-8.
83. Meloni T, Forteleoni G, Meloni GF. Marked decline of favism after neonatal G6PD screening and health education: the northern Sardinian experience. *Acta Haematol* 1992; 87(1-2): 29-31.
84. Sansone G, Perroni L, Yoshida A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase variants from Italian subjects associated with severe neonatal jaundice. *Br J Haematol* 1975; 31(2): 159-65.
85. Abolghasemi H, Mehrani H, Amid A. An update on the prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and neonatal jaundice in Tehran neonates. *Clin Biochem* 2004; 37(3): 241-4.
86. Drousiotou A, Touma EH, Andreou N, Loiselet J, Angastiniotis M, Verrelli BC. Molecular characterization of G6PD deficiency in Cyprus. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 33(1): 25-30.
87. Jiang W, Yu G, Liu P, Geng Q, Chen L, Lin Q. Structure and function of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient variants in Chinese population. *Hum Genet* 2006; 119(5): 463-78.

88. Sukumar S, Mukherjee MB, Colah RB, Mohanty D. Molecular basis of G6PD deficiency in India. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 33(2): 141-5.
89. Noraihan MN, See MH, Raja R, Baskaran TP, Symonds EM. Audit of birth defects in 34.109 deliveries in a tertiary referral center. *Med J Malaysia* 2005; 60(4): 460-8.
90. Weatherall DJ, Kwiatkowski D. Hematologic disorders of children in developing countries. *Pediatr Clin N Am* 2002; 49(6): 1149-64.
91. Say B, Ozand P, Berkel İ, Cevik N. Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Turkey. *Acta Paediatr Scand* 1965; 54(2): 319-24.
92. Aksu TA, Yanarates E. A preliminary study over glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in eastern Anatolia. *Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 1972; 4(1): 313-6.
93. Erbagci AB, Yilmaz N. Erythrocyte glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency in Gaziantep, Turkey. *Eastern J Med* 2002; 7:15-8.
94. Aksoy M, Dincol G, Erdem S. Survey on haemoglobin variants, beta-thalassaemia, glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency and haptoglobin types in Turkish people living in Manavgat, Serik and Boztepe (Antalya). *Hum Hered* 1980; 30(1): 3-6.
95. Aksu TA, Esen F, Dolunay S, Alicigüzel Y, Yücel G, Çalı Ş. Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Antalya Province, Turkey: an epidemiologic and biochemical study. *Am J Epidemiol* 1990; 131(6): 1094-7.
96. Özdeş İ. Denizli yöresinde glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim yetmezliği sıklığının araştırılması. Uzmanlık Tezi, Denizli: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı; 2001.
97. Kılınç Y. The incidence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in cord blood in mid-south part of Turkey. *Ç.Ü. Tıp Fak Dergisi* 1982; 3: 233-6.

98. Özlü F. Çukurova bölgesinde kordon kanı glukoz 6 fosfat dehidrogenaz aktivitesi, yapısı, moleküler özelliği ve yenidoğan hiperbilirubinemi üzerine etkisi. Yan Dal Uzmanlık Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Neonatoloji Bilim Dalı, 2007.
99. Menziletoglu Yildiz S, Yuzbasioglu Ariyurek S, Tahiroglu M, Aksoy K. Detection of 1311 polymorphism in the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene by microarray technique. Arch Med Sci 2011; 7(4): 586-91.
100. Turan Y. Prevalence of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in the population of western Turkey. Arch Med Res 2006; 37(7): 880-2.
101. Mesner O, Hammerman C, Goldschmidt D, Rudensky B, Bader D, Kaplan M. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in male premature and term neonates. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2004; 89(6): 555-7.
102. Martinez di Montemuros F, Dotti C, Tavazzi D, Fiorelli G, Cappellini MD. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in Italy. Haematologica 1997; 82(4): 440-5.
103. Ninfali P, Baronciani L. Molecular analysis of G6PD variants in northern Italy: study on the population from the Ferrara district. Hum Genet 1993; 92:139-42.
104. Anna P, Antonio P, Daniela C, Grazia D, Angelantonio V, Nunzia T. Haematologica 2001; 86(1): 30-5.
105. Bayoumi RA, Nur M, Kamal S, Tadayyon M. Molecular characterization of erythrocyte glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency in Al Ain District, United Arab Emirates. Hum Hered 1996; 46: 136-41.
106. Daar S, Vulliamy TJ, Kaeda J. Molecular characterization of G6PD deficiency in Oman. Hum Hered 1996; 46(2) 172-6.
107. Alfadhli S, Kaaba S, Elshafey A. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene defect in the Kuwaiti population. Arch Pathol Lab Med 2005; 129: 1144-7.

108. Al-Ali AK, Al-Mustafa ZH, Al-Madan M. Molecular characterization of glucose-6 phosphate dehydrogenase deficiency in the Eastern Province of Saudi Arabia. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40(4): 814-6.
109. Hilmi FA, Al-Allawi NA, Rassam M. Red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase phenotypes in Iraq. *East Mediterr Health J* 2002; 8(1): 42-8.
110. Al-Allawi N, Eissa AA, Jubrael JM. Prevalence and molecular characterization of Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficient variants among the kurdish population of Northern Iraq. *BMC Blood Disord* 2010; 10(1): 6.
111. Arnaout HH, El-Gharbawy NM, Shaheen IA, Afifi RA, Abd EL Dayem OA. Incidence and association of 563 C/T mediterranean and the silent 1311C/T g6pd mutations in g6pd deficient Egyptian children. *Lab Medicine*. 2011; 42: 6.
112. Karimi M, Martinez di Montemuros F, Danielli MG, Farjadian S, Afrasiabi A, Fiorelli G, Cappellini MD. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Fars province of Iran. *Hematologica* 2003; 88(3): 346-7.
113. Noori Dalooi, MR, Hajebrahimi Z, Najafi L, Mesbah N, Mawjoodi A, Ganji M, Yekaninejed S, Sanati M. Acomprehensive study on 2007. The major mutations in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency polymorphic variants identified in the coastal provinces of Caspian Sea in the north of Iran. 2007; 40(9-10): 699-704.
114. Noori-Dalooi MR, Hejazi SH, Yousefi A, Mohammad S, Soltani S, Javadi KR, Sanati MH. Identification of mutations in G6PD gene in patients in Hormozgan province of Iran. *J Sci I R Iran* 2006; 17(4): 313-6.
115. Noori-Dalooi MR, Soltanian S, Ganji SM. Molecular identification of the most prevalent mutation of glucose 6 phosphate dehydrogenase gene in deficient patients in Khorasan province of Iran. *J Sci I R Iran* 2006; 17(2): 103-106.
116. Mortazavi Y, Mirzamohammdi F, Ardestani MT. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Tehran, Zanjan and Sistan-Balouchestan provinces: prevalence and frequency of mediterranean variant of g6pd. *Iran J Biotechnol* 2010; 8(4): 229-233.

117. Keskin N, Ozdes I, Keskin A, Acikbas I, Bagci H. Incidence and molecular analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the province of Denizli, Turkey. *Med Sci Monit* 2002; 8(6): 453-6.
118. Tüli A. Adana ve yöresinde G6PD yetmezliği. Uzmanlık tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, 1994
119. Bagci H, Canatan D, Samakoğlu S. Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Antalya, Turkey. A study on the 563 mutation of G6PD gene. *Br J Haematol* 1998; 102: 297.
120. Reyhan Ö, Fatma G, Ceren A, Cihan Ö, Aytemiz G, Çigdem A. Molecular characterization of glucose-6-phosphatedehydrogenase deficiency in Turkey. *Haematologica* 2000; 85(3): 320-1.
121. Aksoy K, Yuregir GT, Dikmen N, Unlukurt I. Three new G6PD variants, G6PD Adana, G6PD Samandag, and G6PD Balcali in Cukurova, Turkey. *Hum Genet* 1987; 76(2): 199-201.
122. Açıkbaç İ. Antalya yöresinde glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) eksikliğinin genetiği üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, Antalya: Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1999.
123. Au WY, Ma SK, Lie AK, Liang R, Cheng T, Kwong YL. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 399-402.
124. Bülbül A, Uslu S, Bolat F, Karaman S, Can E, Arslan S, Nuhoglu A. Indirekt hiperbilirubinemi nedeni: glukoz 6 fosfat dehidrogenaz eksikliği. *Türk Çocuk Hematoloji Dergisi* 2010; 4(1): 7.
125. Yıldız Ş, Arıyürek S, Aksoy K. Glukoz-6-Fosfat dehidrogenaz genindeki Akdeniz mutasyonunun mikroarray tekniğiyle saptanması. *Türk Biyokimya Dergisi* 2010; 35 (1) ; 63-6.

126. Kaplan M, Herschel M, Hammerman C, Hoyer JD, Heller GZ, Stevenson DK. Neonatal hyperbilirubinemia in African American males: the importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *J Pediatr* 2006; 149: 83-8.
127. Yıldırım Yıldız, Uslu S, Telhan L, Salihoğlu Ö, Nuhoglu A. Farklı klinik tablolarla başvuran glukoz 6 fosfat dehidrogenaz olguları. *Türk Çocuk Hematoloji Dergisi* 2010; 4(1): 9.
128. Nuchprayoon I, Sanpavat S, Nuchprayoon S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Thailand g6pd Viangchan (871G>A) is the most common deficiency variant in the Thai population. *Hum Mutat* 2002; 19: 185.
129. Atay E, Bozaykut A, Ipek I. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in neonatal indirect hyperbilirubinemia. *J Trop Pediatr* 2006; 52(1): 56.
130. Satar M, Atici A, Oktay R. The influence of clinical status on total bilirubin binding capacity in newborn infants. *J Trop Pediatr* 1996; 42:(1) 43-5.
131. Say A, İnan S, Acunaş B, Yıldız F. Yenidoğan sarılıklarında G6PD enzim düzeyi. *Haseki Tıp Bülteni* 1991; 29(2): 139-43.
132. Tekinalp G, Ergin H, Erdem G, Yurdakök M, Yiğit Ş. Yenidoğan döneminde uzamış sarılıklar: 82 vakanın değerlendirilmesi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 1996; 39(3): 441-8.
133. Tiker F, Gulcan H, Kilicdag H, Tarcan A, Gurakan B. Extreme hyperbilirubinemia in newborn infants. *Clin Pediatr (Phila)* 2006; 45(3): 257-61.
134. Johnson LH, Bhutani VK, Brown AK. System-based approach to management of neonatal jaundice and prevention of kernicterus. *J Pediatr* 2002 140(4): 396-403.
135. Katar S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and kernicterus of south east anatolia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007; 29(5): 284-6.

136. Slusher TM, Vreman HJ, McLaren DW, Lewison LJ, Brown AK, Stevenson DK. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and carboxyhemoglobin concentrations associated with bilirubin-related morbidity and death in Nigerian infants. *J Pediatr* 1995; 126(1): 102-8.
137. Ogunlesi TA, Dedeke IO, Adekanmbi AF, Fetuga MB, Ogunfowora OB. The incidence and outcome of bilirubin encephalopathy in Nigeria: a bi centre study. *Niger J Med* 2007; 16(1): 354-9.
138. Owa JA, Ogunlesi TA. Why we are still doing so many exchange blood transfusions for neonatal jaundice in Nigeria. *World J Pediatr* 2009; 5(2): 51-5.
139. Ainoon O, Yu YH, Amir Muhriz AL, Boo NY, Cheong SK, Hamidah NH. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Malaysian Malays. *Hum Mutat* 2003; 21: 101.
140. Orhaner BB. Eritrosite ait nedenler: enzim eksiklikleri. *Türk Hematoloji Derneği* 2009; 289.
141. Beutler E, Kuhl W, Gelbart T, Forman L. DNA sequence abnormalities of human glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *J Biol Chem* 1991; 266:4145-50.

EK 1:



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



Sayı : B.30.2.ADÜ.0.20.05.00/050.04- 151
Konu : Çalışmanız hk.

20.06.2012

Sayın, Yrd.Doç.Dr. Yusuf Ziya ARAL
Çocuk Sağ. ve Hast. AD

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 14.06.2012 tarihinde yapılan olağan toplantısında çalışmanızla ilgili alınan 5 nolu karar aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinize sunarım.

Prof.Dr. M. Selim ÖZKÖK
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

KARAR 5

Protokol No : 2012/70
Sorumlu Yürütücü : Yrd.Doç.Dr. Yusuf Ziya ARAL
Çocuk Sağ. ve Hast. AD

Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Yusuf Ziya ARAL'ın "**Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği olan hastalarda mutasyon analizi çalışması**" başlıklı klinik araştırmasının 31.05.2012 tarihli kurul kararında eksiklikler saptanmıştı. 08.06.2012 tarihli gelen dilekçesi ve ekleri görüldü. İstenen bilgi ve belgelerin dosyaya konulduğu görülmüştür.

Sonuçta, yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Adres: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Merkez Kampüsü – Kepez Mevkii- AYDIN
Tel: 256- 225 31 66
Faks : 256-212 31 69
Web : <http://www.site.adu.edu.tr/etikkurulu/goek/>
e-posta: goetik@adu.edu.tr

EK 2:**Tablo XV:** Favizimli olguların doğum yeri, yaş, cinsiyet, G6PD enzim aktivitesi, hemoglobin düzeyi, indirekt bilirubin düzeyi, eritrosit transfüzyonu durumu ve G6PD S218F mutasyon analizi sonucu.

Olgu No	Adı Soyadı	Doğum Yeri	Yaş (yıl)	Cins	G6PD (U/grHb)	Hgb (gr/dl)	İ.Bil (mg/dl)	ERT	G6PD S218F
1	H.E	Aydın	4	E	0.93	4	3	var	Hmzgt
2	E.O	Aydın	3	E	0.77	3.5	2.7	var	yok
3	B.K.1	Aydın	3	E	0.77	4.8	7.7	var	yok
4	B.K.2	Aydın	8	E	0.44	9.6	4.2	yok	yok
5	M.B.A	Aydın	4	E	2.1	9.5	5.2	yok	yok
6	T.S.	Aydın	16	E	0.15	5.7	8.2	var	Hmzgt
7	B.Ç.	Aydın	6	E	1.06	6.5	9.2	var	Hmzgt
8	N.Ş.	Aydın	5	E	1.07	4.2	5.6	var	Hmzgt
9	B.U.	Aydın	5	E	2.09	9.5	7.2	yok	Yok
10	S.İ.Ö	Muğla	4	E	1.1	7.5	5	var	Hmzgt
11	İ.G.	Aydın	10	K	0.47	7	6.2	var	Yok
12	M.T.	Aydın	2	E	4	9.6	5.5	yok	Yok
13	B.T.	Aydın	6	E	3.9	9.5	5.9	yok	Yok
14	T.H.D.	Muğla	7	E	4.4	8.9	3.5	yok	Yok
15	Y.P.	Aydın	8	E	4.1	4.6	7.8	var	Yok
16	M.E.C	Aydın	4	E	2.9	9.2	3.5	yok	Yok
17	M.Y.	Aydın	7	E	3.1	8.6	7.5	var	Yok
18	M.B.E	Aydın	4	E	3	6.5	5.2	var	Yok
19	M.A.	Aydın	6	E	3	9.8	8	var	Yok
20	A.D.	Aydın	2	E	1.1	9.5	5.8	yok	Hmzgt
21	S.K.	Aydın	4	K	2.9	8.2	4.2	var	Htrzgt
22	A.Ö.	Aydın	10	K	0.8	4.9	8.2	var	Hmzgt
23	F.Ç.	Aydın	3	E	0.7	8.9	10	var	Hmzgt
24	K.K.	Aydın	3	E	1.1	9.5	7	yok	Hmzgt
25	Ö.E.Y.	Aydın	12	E	5	9.6	3.5	yok	Yok
26	B.T.	Aydın	11	K	4.2	8	4.3	yok	Htrzgt
27	A.K.Ö	Aydın	2	E	1	4	7.7	var	Hmzgt
28	A.V.P	Aydın	8	E	0.2	5	7	var	Hmzgt
29	Y.C.Y	Aydın	12	E	3.5	4	9	var	Yok
30	M.Y.	Aydın	9	E	4.5	9.5	4.5	yok	Yok
31	K.K.	Muğla	6	E	4.8	7.8	5.6	var	Yok

*ERT: Eritrosit transfüzyonu, Hmzgt: Homozigot, Htrzgt: Heterozigot, İ.Bil: İndirekt bilirubin

EK 3:

Tablo XVI: Yenidoğan sarılığı olgularının doğum yeri, yaş, cinsiyet, G6PD enzim aktivitesi, hemoglobin düzeyi, indirekt bilirubin düzeyi, kan değişimi varlığı ve G6PD S218F mutasyon analizi sonucu.

Olg uNo	Ad Soyad	Doğum Yeri	Yaş (gün)	Cins	G6PD (U/grHb)	Hgb (gr/dl)	İ.Bil (mg/dl)	Kan değişimi	G6PD S218F
1	D.E	Aydın	16	E	1	14.6	15	yok	Hmzgt
2	A.B.	Aydın	18	E	2.5	15.5	14	yok	Yok
3	Y.S.E	Aydın	5	K	2.1	14	17	yok	Yok
4	A.C.K	Aydın	3	E	4.5	15	33	var	Yok
5	A.Ç.	Aydın	7	E	2.5	13.9	11.1	yok	Yok
6	E.C.A	Aydın	3	E	4.1	14.6	16	yok	Yok
7	E.Y.	Aydın	2	K	4.6	15	18	yok	Yok
8	Ş.K.	Denizli	19	K	3.2	14	9	yok	Yok
9	H.AK	Aydın	2	E	1.3	13.1	28	var	yok
10	Y.Y.	Aydın	28	E	1.1	14.1	9.6	yok	Hmzgt
11	İ.R.G.	Aydın	27	E	4.1	14.9	9.1	yok	Yok
12	Z.Z.	Aydın	24	K	4.9	15	8.1	yok	Yok
13	C.Ş.	Aydın	25	K	4.5	14.6	8	yok	Yok
14	B.G	Aydın	5	K	4.9	14.2	18	yok	Yok
15	M.D.	Muğla	3	E	4.8	15	28	var	Yok
16	M.AA	Aydın	15	E	4.9	14.5	9.5	yok	Yok
17	E.K.	Aydın	3	K	3.9	16	29	var	Htrzgt
18	M.EA	Aydın	20	E	1.5	14.5	10	yok	Yok
19	A.Ö.	Aydın	25	E	2.3	14	9.4	yok	Yok
20	B.G.	Aydın	23	K	2.9	13.9	18	yok	Yok
21	O.E.E	Aydın	13	E	1.9	15	9.1	yok	Yok
22	N.B.	Aydın	28	K	3.5	14.5	15	yok	Yok
23	R.C.Ö	Aydın	25	E	0.9	13.9	15,4	yok	Hmzgt
24	Y.Y.	Aydın	20	E	0.9	13	6.5	yok	Hmzgt
25	Z.Ç.	Aydın	20	K	1.8	14.1	15	yok	Htrzgt
26	N.S.	Aydın	4	K	1.9	14.1	17	yok	Htrzgt
27	İ.R.G	Aydın	30	E	2.9	13.1	10.1	yok	Yok
28	M.AA	Aydın	21	E	4	13.5	9.8	yok	Yok
29	B.D.	Aydın	3	K	2.5	17	14	yok	Htrzgt

*Hmzgt: Homozigot, Htrzgt: Heterozigot, İ.Bil: İndirekt bilirubin.