

**GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**BİYOKİMYA VE KLİNİK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZIANTEP İL MERKEZİNDE**  
**ERİTROSİT G6PD REFERANS SINIRLARI VE**  
**G6PD EKSİKLİĞİ SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**TEZ YÖNETİCİSİ**  
**Yrd.Doç.Dr. Necat YILMAZ**

58833

**Dr. Ayşe Binnur ERBAĞCI**  
**UZMANLIK TEZİ**  
**GAZIANTEP-1997**

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
Tablo Listesi .....	i
Şekil Listesi .....	ii
Teşekkür .....	iv
Kısaltmalar .....	v
Giriş ve Amaç .....	1
Genel Bilgiler .....	3
Eritrositler .....	3
Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz .....	24
Gereç ve Yöntem .....	67
Bulgular .....	80
Tartışma .....	95
Sonuçlar .....	106
Özet .....	108
Summary .....	109
Kaynaklar .....	110

## TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1. G6PD eksikliğinin olası biyokimyasal nedenleri.....	38
Tablo 2. Türkiye’de saptanan G6PD varyantları.....	43
Tablo 3. Türkiye’de saptanan G6PD varyantlarının biyokimyasal özellikleri.....	44
Tablo 4. G6PD’nin kinetik özelliklerinin eritrosit yaşamsallığına etkisi.....	47
Tablo 5. G6PD eksikliğinde hemolize yol açan ilaçlar.....	50
Tablo 6. Türkiye’de bölgesel çalışmalarda saptanan G6PD eksikliği sıklıkları.....	58
Tablo 7. Eritrosit G6PD’sinin +4 °C’da stabilitesi .....	70
Tablo 8. Nicel spektrofotometrik G6PD analizinde alternatif kör tüplerinin bileşimi.....	73
Tablo 9. Gaziantep il merkezi örneklem grubunda eritrosit sayısı ve hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktivitelerinin dağılımına ait istatistiksel veriler.....	80
Tablo 10-a. Örneklem grubunda eritrosit sayısına oranlanan G6PD aktivitesi dağılımının normal dağılım ile karşılaştırılması.....	82
Tablo 10-b. Örneklem grubunda hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktivitesi dağılımının normal dağılım ile karşılaştırılması.....	82
Tablo 11. Kadın ve erkek altgruplarında G6PD aktivitelerinin istatistiksel verileri.....	84
Tablo 12. Gaziantep il merkezi toplumunda bir yaş üzeri bireyler için saptanan referans G6PD aktivitesi sınırları.....	86
Tablo 13. G6PD aktivitesi, referans sınırın altında bulunan yedi olguya ait veriler.....	86
Tablo 14. Gaziantep il merkezi örneklem grubunda eritrosit G6PD eksikliği oranı.....	87
Tablo 15. G6PD aktivitesi ile eritrosit sayısı ve hemoglobin konsantrasyonu arasındaki korelasyon katsayıları.....	88
Tablo 16. G6PD aktivitesi ile eritrosit indisleri, eritrosit süspansiyonunun lökosit ve trombosit içeriği arasındaki korelasyon katsayıları.....	89
Tablo 17. Direkt enzim aktvitesi ile eritrosit indisleri ve eritrosit süspansiyonlarının trombosit içeriği arasındaki kısmi korelasyon katsayıları.....	89
Tablo 18. Hemoglobin konsantrasyonu ve eritrosit sayısına oranlanarak tanımlanan G6PD aktiviteleri ile eritrosit indisleri, eritrosit süspansiyonun lökosit ve trombosit içeriği arasındaki korelasyon katsayıları.....	90

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. İnsan eritrosit membran proteinlerinin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid-jel elektroforezi.....	5
Şekil 2. Eritrosit membran proteinlerinin modeli.....	5
Şekil 3. Hematopoez ve normoblastik olgunlaşmanın evreleri.....	7
Şekil 4. Anaerobik koşullarda veya mitokondria yokluğunda glikolizin işleyişi.....	10
Şekil 5. Rapaport Luebering şantı.....	11
Şekil 6. Moleküler oksijenin sıralı, ünivalan redüksiyonu.....	12
Şekil 7. Hemoglobinin oksidasyonu.....	14
Şekil 8. Glutasyon.....	16
Şekil 9. Pentoz fosfat yolunda oksidatif faz reaksiyonları.....	19
Şekil 10. Pentoz fosfat yolunun oksidatif fazında oluşan pentoz-fosfatlar non-oksidatif fazda yeniden heksoz fosfatlara dönüşerek, oksidatif reaksiyonların sürmesini sağlarlar.....	20
Şekil 11. Pentoz fosfat yolunun non-oksidatif fazı.....	21
Şekil 12. Eritrositlerin CO <sub>2</sub> taşınması ve tamponlama.....	22
Şekil 13. G6PD'nin kataliz ettiği reaksiyon.....	24
Şekil 14. İnsan G6PD'sinin dimer modeli.....	26
Şekil 15. Gd B <sup>+</sup> 'nin sıcaklık stabilitesi.....	28
Şekil 16. Gd B <sup>+</sup> 'nin 25, 37, 45, 50, 60 °C'larda 10 dakika inkübasyon sonrası aktivitesi... 28	
Şekil 17. Gd B <sup>+</sup> 'nin optimal pH eğrisi.....	28
Şekil 18. İnsan X kromozomu üzerinde genlerin yerleşimi.....	30
Şekil 19. G6PD genomunun yapısı.....	30
Şekil 20. İnsan G6PD geninin baz dizisi.....	32
Şekil 21. Dişi somatik hücrelerinde rasgele X inaktivasyonu.....	34
Şekil 22. 365 sağlıklı kadının lenfositlerinde X inaktivasyon fenotipine göre sıklık dağılımı.....	36
Şekil 23. G6PD miktarının eritrosit yaşıyla değişimi.....	48
Şekil 24. G6PD aktiviteleri normal, kısmi ve tam yetmezlikli yenidoğanların	

plazma bilirubin düzeyleri.....	54
Şekil 25. Hemolizatta G6PD stabilitesi.....	71
Şekil 26. Çalışma tablosu.....	75
Şekil 27-a. Örneklem grubunda eritrosit sayısına oranlanan G6PD aktivitesinin dağılımı ve kümülatif sıklığı.....	81
Şekil 27-b. Örneklem grubunda hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktivitesinin dağılımı ve kümülatif sıklığı.....	81
Şekil 28. Örneklem grubunda eritrosit G6PD aktivitesinin bireylerin yaşına göre dağılımı.....	85
Şekil 29. Hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktivitesinin MCV'ye göre dağılımı.....	91
Şekil 30. Eritrosit sayısı ve hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktivite arasındaki ilişki.....	92
Şekil 31. Regresyon eşitliği ile hesaplanarak bulunan ve gerçek enzim aktivite arasındaki ilişki.....	93
Şekil 32. Regresyon eşitliği ile saptanan ve gerçek enzim aktivite arasındaki farkların MCV'ye göre dağılımı.....	94

Uzmanlık eğitimim süresince biyokimya alanındaki bilgi birikimi ve deneyimi, hoşgörölü ve otoriter yöneticilik yaklaşımı, araştırmacılık ufku ile bizlere iyi bir örnek oluşturan değerli hocam, tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Sayın Necat YILMAZ' a, biyokimya eğitiminin temelini, bilgiye ulaşma yollarını ve araştırmacılık disiplinini öğreten, Biyokimya ve Klinik Biyokimya ABD başkanımız değerli hocam Doç. Dr. Sayın Yüksel ÖZDEMİR'e ve katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Sayın İclal MERAM' a;

Tez hazırlıklarım sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Sayın Emin ERDAL ve Yrd. Doç. Dr. Sayın Ali İhsan BOZKURT'a, Yük. Bio. Sayın Sibel OğUZKAN' a ;

G6PD varyant analizini uygulamalı olarak öğrenme olanağını sağlayan Çukurova Üniversitesi Biyokimya ABD öğretim görevlileri Prof. Dr. Sayın Güneş YÜREGİR, Prof. Dr. Sayın Kıymet AKSOY ve Yük. Kim. Müh. Sayın İsa ÜNLÜKURT'a,

Ayrıca başta Dr. Hatice ÖZHASIRCI ve Yük.Kim. Jale ÖZASLAN olmak üzere eğitim sürecini birlikte geçirdiğim araştırma görevlisi ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma, merkez biyokimya laboratuvarında görevli arkadaşlarıma her türlü destek ve katkıları, dostlukları için teşekkür ediyorum.

Dr.Ayşe Binnur ERBAğCI

## KISALTMALAR

A	: Adenin veya adenozin
AMP, ADP, ATP	: Adenozin 5'-mono-, di-, trifosfat
ASD	: Asit-sitrat-dekstroz
AST	: Aspartatamino transferaz
ATP az	: Adenozin trifosfataz
BFU-E	: İnterlökin 3
C	: Sitozin veya sitidin
c AMP	: 3', 5'-siklik AMP
c DNA	: Komplementer DNA
CFU-E	: Eritropoetin
Da	: Dalton
DNA	: Deoksiribonükleik asit
2,3-DPG	: 2,3- difosfogliserat
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EC	: Enzim Komisyonu
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EP-h	: Eritrosit progenitör hücre
G	: Guanin veya guanozin
GA3-P	: Gliseraldehit 3-fosfat
G6-P	: Glukoz 6-fosfat
G6PD	: Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
GS-H, GS-SG	: Glutatyon ve okside formu
Hb, metHb, SHb	: Hemoglobin, methemoglobin, sulfhemoglobin
IFCC	: Klinik Kimya Uluslararası Federasyonu
Km	: Michaelis - Menten sabiti
KoA	: Koenzim A
LD	: Laktat dehidrogenaz

MA	: Moleküler ağırlık
MA <sub>NADPH</sub>	: NADPH molar absorpsivitesi
MCH	: Ortalama eritrosit hemoglobini
MCV	: Ortalama eritrosit hacmi
MMT	: 3(4,5 Dimetilthiazolil) 2,5 difenil tetrazolyum bromid
NAD <sup>+</sup> , NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid ve redükte formu
NADP <sup>+</sup> , NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat ve redükte formu
NCCLS	: Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesi
nt	: Nükleotid
pH	: $\log 1/[H^+]$
RBC	: Eritrosit
T	: Timin veya timidin

### Amino Asit Kısaltmaları

A,	Ala	: Alanin
D,	Asp	: Aspartat
H,	His	: Histidin
I,	Ile	: İzolösin
K,	Lys	: Lizin
M,	Met	: Metiyonin
N,	Asn	: Asparajin
R,	Arg	: Arginin
S,	Ser	: Serin
V,	Val	: Valin
Y,	Tyr	: Tirozin



## GİRİŞ VE AMAÇ

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (D-glukoz 6-fosfat NADP<sup>+</sup> oksidoredüktaz, G6PD) tüm bitkisel ve hayvansal dokularda bulunan adaptif bir enzimdir. Hücreye glukozun oksidasyonu ile NADPH formunda indirgen güç sağlayan pentoz fosfat yolunun ilk tepkimesini katalize eder. Eritrositlerde yetersizliği, oksidan ajanlarla karşılaşıldığında hemoglobin denatürasyonuna ve hemolize yol açabilmektedir.<sup>1, 2, 3</sup>

1926 yılında Cordes sıtma tedavisi amacıyla primakin alan bazı hastalarda ölümle sonuçlanan hemolitik anemi gözlemlemiştir. 1931 yılında Christian ve Warburg enzimi izole etmiş ve tanımlamışlardır.<sup>4,5</sup> Günümüze dek yaklaşık 400 G6PD varyantı saptanmıştır.<sup>6,7</sup> Genetik heterojenite enzim eksikliğinde görülen klinik tabloların da çeşitliliğine yol açmaktadır.

G6PD genomu X kromozomunun q28 bölgesinde lokalizedir. Bu nedenle enzim kusurunun tam ifadesi erkek hemizigot bireylerde görülür. Heterozigot dişi bireylerde ise normal ve enzim eksikliği olan iki farklı eritrosit populasyonu vardır.<sup>8,9</sup>

G6PD eksikliği eritrosit enzim kusurları içinde en yüksek prevalansa sahiptir.<sup>10,11,12</sup> G6PD kusurunun dünya üzerinde yaklaşık 400 milyon insanı etkilediği düşünülmektedir. Türkiye genelinde sıklığı % 0.5 olarak bulunmuştur ancak coğrafi bölgelere ve etnik kökene göre önemli farklılıklar göstermektedir. G6PD eksikliği Çukurova bölgesinde % 8.2, Tarsus ve Hatay yöresinde % 11.4, Antalya'da % 9.2 oranında görülmektedir.<sup>13,14</sup>

G6PD eksikliği tarama çalışmalarında sıklıkla nitel yöntemlerle saptanmaya çalışılmıştır. Ancak nitel yöntemler enzim aktivitesinin kısmen azaldığı varyantların ve aktivitenin düşük olduğu varyantlarda da heterozigot bireylerin saptanmasına olanak tanımamaktadır.<sup>15</sup> Bu nedenle çalışmamızda nicel G6PD analizi tercih edilmiştir. Yöntemi kolaylaştıran ve sonuçların değerlendirilmesinde hata oranını azalttığı düşünülen bazı modifikasyonlar uygulanmıştır.

**G6PD eksikliğinde görülebilen akut hemolitik krizlerden korunma, hastalığın bilinmesi ve buna yol açan oksidan ajanlardan kaçınmakla mümkün olabilmektedir. Bu nedenle G6PD eksikliği halk sağlığı açısından önem taşır. Gaziantep il merkezinde 306 birey üzerinde yaptığımız GGPD eksikliği sıklığı çalışmasının bu konuda çalışacak araştırmacılara yardımcı olacağına inanıyoruz.**



## GENEL BİLGİLER

### ERİTROSİTLER

#### Tanımı ve İşlevi

Eritrositler (RBC) içerdikleri hemoglobin (Hb) ile dokular arası oksijen (O<sub>2</sub>) ve karbondioksit (CO<sub>2</sub>) transferini gerçekleştiren kan hücreleridir. Öncül eritrositer hücrelerde üretilen hemoglobini taşır ve işlev görmesi için uygun ortamı sağlarlar.<sup>9</sup>

#### Eritrositlerin Yapısı

Eritrositler bikonkav şekilli ortalama 7 µm çapında kan hücreleridir. Kalınlıkları merkezde 1 µm veya altında, kalınlığın en fazla olduğu kısımda 2.5 µm'dir.<sup>9</sup>

İnsan eritrositleri çekirdek, mitokondri, ribozom, endoplazmik retikulum ve diğer iç zar sistemlerini içermezler. En önemli bileşenleri homojen dağılım gösteren hemoglobindir. Eritrosit içi diğer maddeler sitozolik enzimler, ara metabolizma ürünleri ve elektrolitlerdir.<sup>5, 16</sup>

Eritrosit membranı yapısındaki amfipatik fosfolipid molekülleri iki tabakalı bir yapı oluşturmaktadır. Bu moleküller buldukları tabaka içinde kolaylıkla yer değiştirirken, diğer tabakaya geçişleri (flip-flop hareketi) seyrek olarak gerçekleşmektedir. Çift tabakalı lipid yapının akışkanlığı bileşimiyle ilgilidir. Kolesterol küçük moleküllü, suda çözülebilir maddelere geçirgenliği kısıtlamakla ve hücre deformabilitesini azaltmakla birlikte hidrokarbon zincirlerinin kristalleşmesini de engellemektedir. Eritrosit membran lipidleri ağırlık olarak % 23 kolesterol, % 18 fosfatidiletanolamin, % 18 sfingomyelin, % 17 fosfatidilkolin, % 7 fosfatidilserin ve % 7 glikolipidlerden oluşmaktadır.<sup>17</sup>

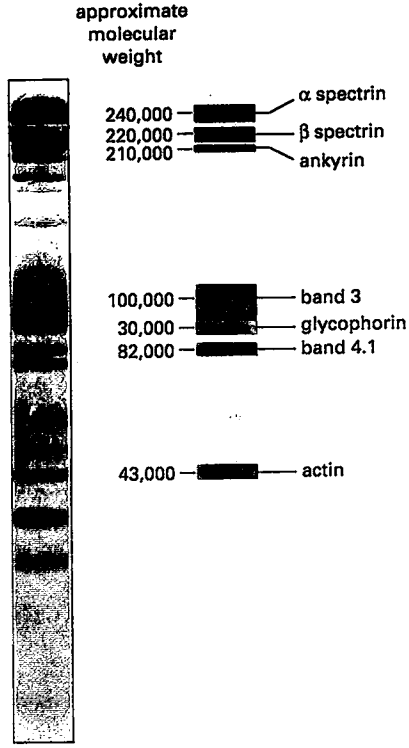
İnsan eritrosit membran proteinlerinin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid-jel elektroforezi ile incelenmesi sonucu moleküler ağırlıkları (MA) 5000 - 250 000 Da arasında değişen 15 protein bandı izlenmiştir (Şekil 1). Bu proteinlerden spektrin, glikoforin ve band 3 proteini ağırlık olarak total membran proteinin % 60'ını oluşturmaktadır.<sup>17, 18</sup>

Spektrin eritrosit membranının protein iskeletini oluşturur. Çift tabakalı lipid membranın sitoplazmik yüzünde yer alan bu protein, hücrenin yapısal bütünlüğünün ve bikonkav şeklinin sürdürülmesini sağlar. Spektrin molekülleri birbirine kısa aktin filamanları ile plazma membranına ankrin köprüleri ile tutunmaktadır. Ankrin molekülleri spektrini band 3 proteininin sitoplazmik bölümüne bağlamaktadır. Band 4.1 proteini de spektrin ve aktin moleküllerini glikoforin ve band 3 proteinine bağlayarak deformabilitesi yüksek membran protein iskeletinin yapısına katkıda bulunur. Eritrosit membran proteinlerinin modeli Şekil 2'de görülmektedir.<sup>17, 18</sup>

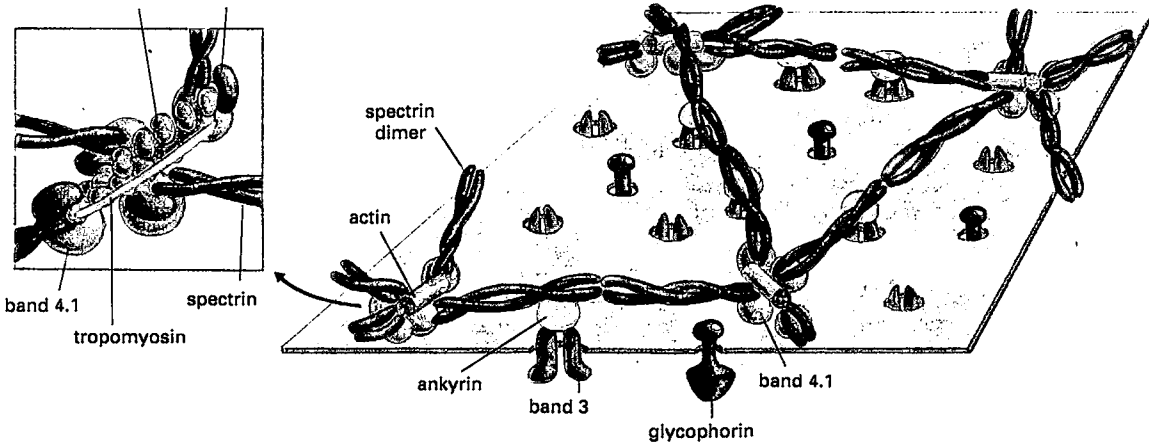
Gliforin glikoprotein yapısında küçük bir moleküldür. % 90'ını siyalik asit gruplarının oluşturduğu yüzey karbonhidratlarının ve yüzey negatif yükünün büyük bir kısmı glikoforin yapısında bulunmaktadır.

Band 3 proteini membranı yaklaşık 14 kez katedecek şekilde katlanmış bir transmembran proteindir. Eritrosit membranında klorür (Cl<sup>-</sup>) ve bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) iyonlarının karşılıklı değişimini sağlar. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonlarına geçirgenliği artıran bu anyon transport proteini, kanın akciğerlere taşıyacağı CO<sub>2</sub> miktarını artırmaktadır.

Eritrosit membranı yapısında bulunan Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> pompası ATP az aktivitesiyle elektrokimyasal gradiyente karşı hücre içine K<sup>+</sup>, dışına Na<sup>+</sup> aktarımını gerçekleştirmektedir. Bu işleviyle membran potansiyeli, hücre içi osmolalite ve dolaylı olarak hücre hacmi üzerinde etkili olabilmektedir.<sup>17, 18</sup>



Şekil 1. İnsan eritrosit membran proteinlerinin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid-jel elektroforezi.<sup>17</sup>



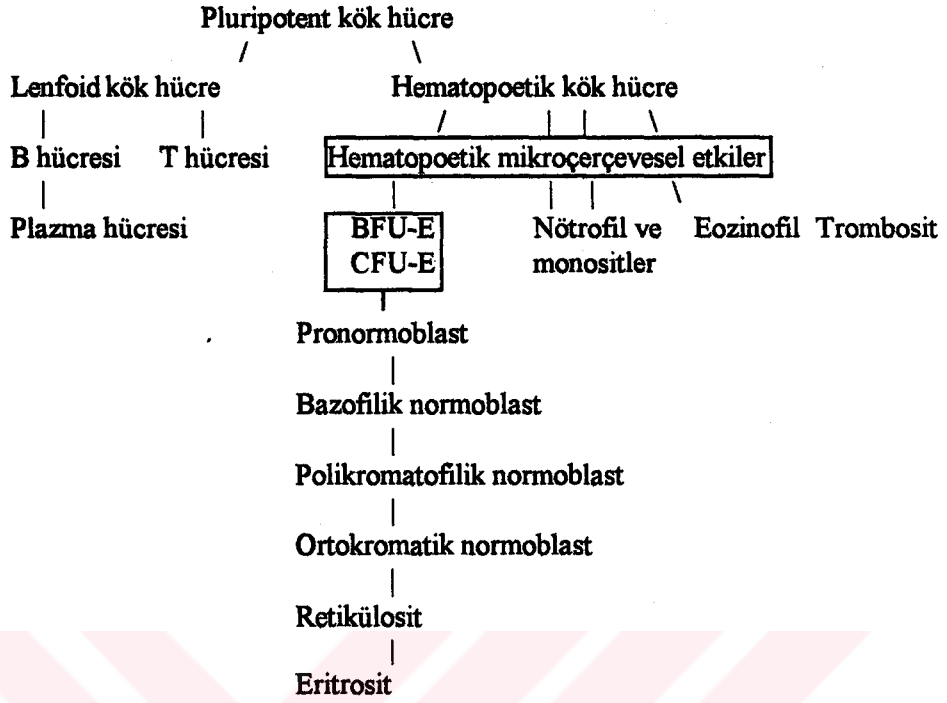
Şekil 2. Eritrosit membran proteinlerinin modeli.<sup>17</sup>

## Eritrosit Üretimi

Pluripotent kök hücrenin bazı mikroçevresel etkilerle eritroid progenitör hücreye (EP-h) dönüştüğü düşünülmektedir. EP-h, interlökin 3 ve eritropoetin aktivitesi ile morfolojik olarak tanınabilir eritroid hücreler ve normoblastlar üretir. İnterlökin 3 ve eritropoetin etkileri in vitro kültür sistemlerindeki davranışlarına göre deneysel olarak gösterilmiş ve sırasıyla burst forming units-eritroid (BFU-E) ve colony forming units-eritroid (CFU-E) olarak tanımlanmıştır.<sup>9,17, 19</sup>

İlk eritroid öncülü pronormoblasttır. Mitoz bölünmeyle iki bazofilik normoblasta dönüşür. Sitoplazmanın bazofilik oluşu bol miktarda RNA içermesine bağlıdır. Bazofilik normoblastın mitoz bölünmesinden sonra, hemoglobin sentezi, iki yavru hücrenin sitoplazmasının polikromazi göstermesiyle görünür hale gelir. Bu hücelere polikromatofilik normoblastlar denilir. Bir veya iki mitoz bölünme sonrası çekirdek küçülerek ortokromatik normoblast evresine gelinir. Artık bu eritroid hücrelerin mitoz bölünmesi mümkün değildir. Sitoplazmik kontraksiyonlarla çekirdek hücre dışına atılarak retikülosit meydana gelir. Retikülosit mevcut RNA ile kemik iliğinde bir kaç gün protein ve hem sentezini sürdürebilir. RNA ve mitokondrisini kaybettikten sonra dolaşıma verilir. Dolaşımda ribozomlarını ve diğer organellerini kaybederek olgun eritrosit formunda yaklaşık 120 gün kalır (Şekil 3).<sup>9</sup>

Dolaşımdaki eritrosit sayısı üretim hızının değişimi ile düzenlenir. Doku hipoksisi üretim hızını arttırıcı başlıca faktördür.



Şekil 3. Hematopoez ve normoblastik olgunlaşmanın evreleri.<sup>9</sup>

BFU-E: İnterlökin 3, CFU-E: Eritropoetin.

### Eritrosit Yıkımı

Eritrositler 120 günlük yaşam süreleri boyunca çeşitli metabolik değişiklikler gösterirler. Hücre yaşlandıkça bazı sitozolik enzimlerin aktivitesi azalır, hücre yüzey alanı darlaşır ve membrandaki siyalik asit gruplarını kaybederek antijenik bir yapı açığa çıkarırlar (Ganzoni, 1971). Asiyaloglikoforin denilen bu yapıya karşı oluşan otoantikörlerin bağlanması ile hücre retiküloendotelyal sistem (RES) tarafından dolaşımdan uzaklaştırılır (Alderman 1980 ve 1981).<sup>9</sup> Band 3 proteininin proteolitik parçalanma veya agregasyonu ile modifikasyonunun da hücre yüzeyinde Ig G birikimine yol açan antijenik bir yapı açığa çıkardığı gösterilmiştir (Turrini ve ark. 1991, Kay ve ark. 1983). Low ve arkadaşları (1985) denatüre hemoglobinden oluşan hemikromların band 3 proteininin sitoplazmik kısmına bağlandığını, membranda kümelenerek otolog Ig G bağlanmasını kolaylaştırdığını ileri sürmüştür. Bu modele

göre antijen bağlanmasını başlatan olay hemoglobin oksidasyon ürünlerinin oluşumudur. Yaşlı eritrositlerde glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, G6PD ve süperoksit dismutaz gibi enzimlerin miktarındaki azalma hemikrom artışının nedeni olarak düşünülmektedir (Clark, 1988).<sup>20</sup>

Eritrosit membran proteinlerinin fosforilasyonu sonucu membranın mekanik özelliklerinin etkilenmesi de dolaşımdaki yaşam sürelerini etkileyebilmektedir. Band 4-1 proteinlerinin cAMP bağımlı kinaz veya sitozolik protein kinaz ile fosforilasyonu spektrin ile etkileşimini bozmaktadır. Spektrin moleküllerinin fosforilasyonu ile eritrosit membranının mekanik özelliklerinin değiştiği gösterilmiştir (Manno ve ark., 1995). Sürfaktan yoğunluk gradiyentinde ayrılan insan eritrositlerinde, eritrosit yaşı arttıkça cAMP bağımlı protein kinaz ve sitozolik protein kinaz aktivitelerinde azalmanın gösterilmesi yaşlanma eyleminin sanılandan daha karmaşık olduğunu düşündürmektedir. Bu çalışmada insan eritrositlerinde laktat dehidrogenaz (LD), fosfogliserat kinaz, pirüvat kinaz ve asit fosfataz aktivitelerinin eritrosit yaşamı boyunca değişmediği de gösterilmiştir.<sup>20</sup>

Patolojik durumlarda duyarlanmış veya anormal yapısal özellik gösteren genç hücreler de parçalanmakta veya RES tarafından dolaşımdan uzaklaştırılmaktadır.<sup>9</sup>

### **Eritrosit Metabolizmasının Özellikleri**

İnsan eritrositleri çekirdek, mitokondria, ribozom, endoplazmik retikulum ve diğer iç zar sistemlerini içermezler. Bu nedenle nükleik asit, protein, fosfolipid veya karbonhidrat sentezleyemezler.

Eritrosit metabolizması hemoglobinin işlevini optimal koşullarda sürdürmesine ve kendi bütünlüğünü korumaya yöneliktir.



## Eritrositlerde Enerji Sağlanması

Eritrositler gerekli enerjinin yaklaşık % 90'ını glikolizden (Embden-Meyerhof Yolu) sağlar. Bu nedenle glukoz, eritrositlerin gereksinim gösterdiği ana metabolizma yakıtıdır. Glukoza duyarlı, insülininden bağımsız hücreler olan eritrositlere glukoz girişi hücre membranında yer alan glukoz taşıyıcı moleküller (Glu T-1 ve Glu T-3) aracılığı ile gerçekleşir. Glukoz için düşük Michaelis-Menten sabitine (Km) sahip olan bu taşıyıcılar hücreye düşük kan insülin ve glukoz düzeylerinde de glukoz girişine olanak tanır.<sup>21</sup>

Hücresinin sitozolünde meydana gelen ve anaerobik koşullarda gerçekleşebilen glikoliz ile 1 molekül glukoz 2 molekül piruvata dönüşürken, net 2 molekül ATP sentezlenir ve 2 molekül NAD<sup>+</sup> indirgenir (Reaksiyon 1).



Aerobik koşullarda piruvat özgün bir transport sistemiyle mitokondri içine taşınır. Burada piruvat dehidrogenaz enzim kompleksi ile asetil koenzim A'ya (asetil KoA) dekarboksile olur (Reaksiyon 2).

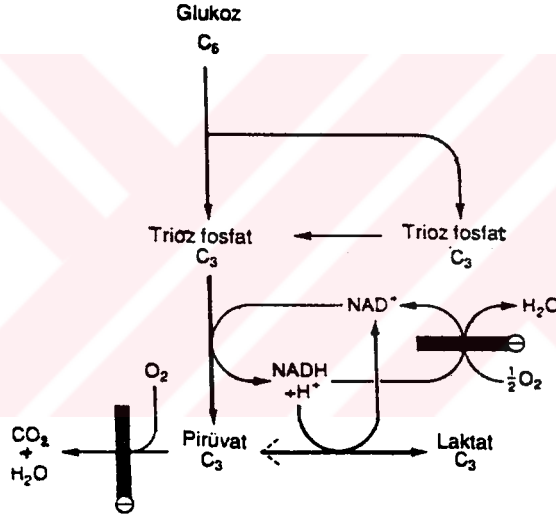


2 molekül asetil KoA'nın Krebs döngüsü ve mitokondrial elektron transport zincirinde CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'ya ileri oksidasyonu sonucu 1 molekül glukozun yıkımından net 38 molekül ATP elde edilebilir.<sup>22</sup>

Anaerobik koşullarda ise piruvat LD ile laktata dönüşürken 1 molekül NADH okside olur (Reaksiyon 3).



Eritrositler içinde glikoliz aerobik koşullarda bile daima laktat oluşumuyla sonlanır, çünkü piruvatın oksidasyonu için gerekli enzim sistemlerini içeren mitokondri yoktur. Eritrositlerin Krebs döngüsü ve oksidatif fosforilasyon aktivitelerinden yoksun oluşu, sırasıyla piruvat ve NADH'ın  $H_2O$  ve  $CO_2$ 'e oksidasyonunu ve daha fazla ATP sentezlenebilmesini engeller. NADH piruvatın laktata redüksiyonu ile eşleşerek reokside olur ve böylece glikolizin devamı sağlanabilir (Şekil 4).<sup>22,23</sup>



Şekil 4. Anaerobik koşullarda veya mitokondria yokluğunda glikolizin işleyişi.<sup>22</sup> ■⊖ Bloke olan metabolik yollar.

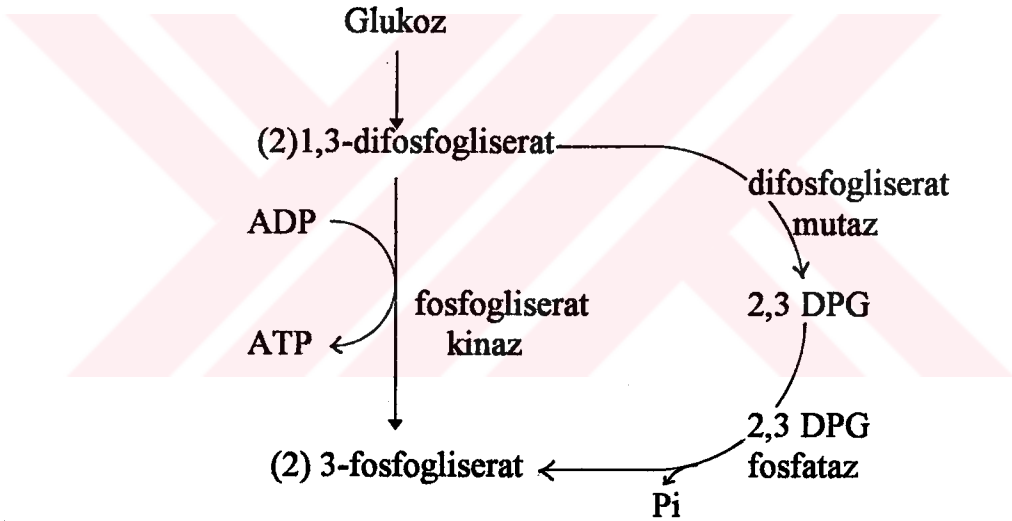
Sonuç olarak belirli bir miktar enerjiyi sağlamak için daha fazla glukoz glikolize uğramak zorundadır.<sup>4,16,23</sup>

Glikolizden sağlanan ATP membrandan aktif katyon transportu, membran deformabilitesinin sürdürülmesi ve hücrenin bikonkav şeklinin korunması gibi enerji gerektiren reaksiyonlarda kullanılır.<sup>9,16</sup>

## 2,3-Difosfogliserat Sentezlenmesi

Eritrositlerde glikolizin diğerk fonksiyonu da 2,3-difosfogliserat (2,3-DPG) sentezlenmesidir. 2,3-DPG hemoglobine bağlandığında oksijene afinitesini azaltarak dokuların daha iyi oksijenlenmesini sağlar. Eritrosit 2,3-DPG konsantrasyonu kan hemoglobin konsantrasyonu ile ters orantılı olarak değışir ve anemilerde önemli bir kompensasyon mekanizması oluşturur.<sup>18</sup>

2,3-DPG sentezi, glikolizde fosfogliserat kinazın kataliz ettiği reaksiyonun atlanması ile olur (Şekil 5).



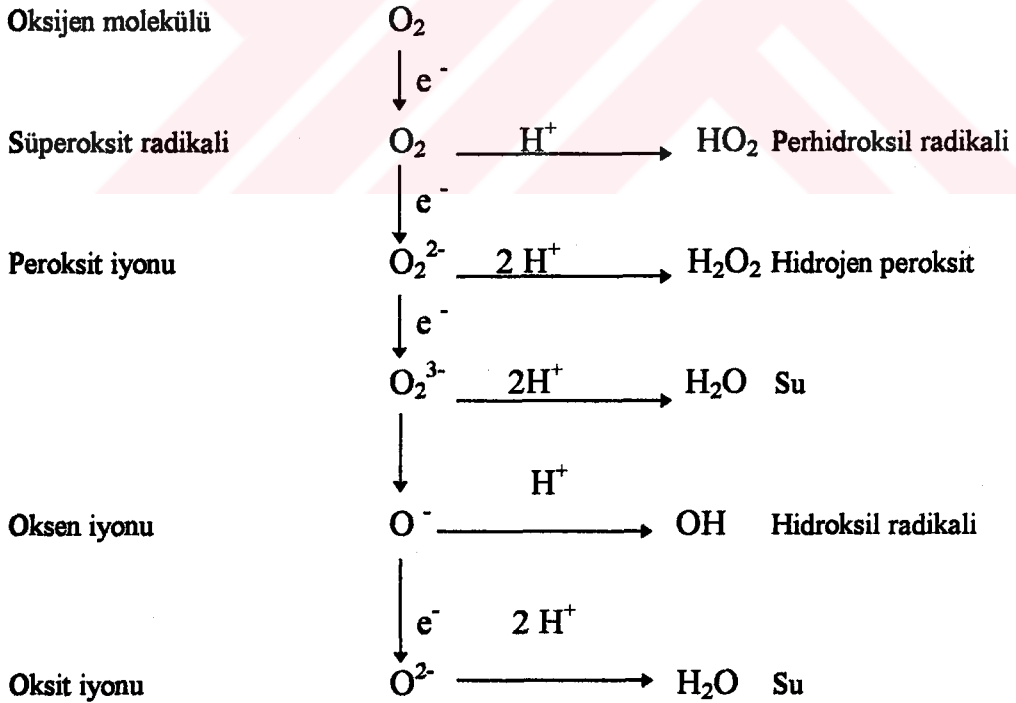
Şekil 5. Rapaport Luebering şantı.<sup>22</sup>

1,3-difosfogliserat, mutaz enzimi ile 2,3-DPG'ye dönüşürken yapısındaki yüksek enerjili fosfat bağı, serbest enerjiyi ısı olarak ortama verir. ATP gereksiniminin minimal olduğu koşullarda da glikolizin sürdürülmesini ve 2,3-DPG sentezini sağlayan bu yola Rapaport Luebering şantı adı verilir.<sup>22</sup>

## Hemoglobin ve Hücre Zarının Oksidasyondan Korunması

Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin fazla üretimi veya antioksidan savunma sistemlerindeki zayıflama hücresel hasara yol açabilmektedir. Serbest radikal eşleşmemiş elektronu olan atom veya molekül olarak tanımlanmaktadır. Bu oluşumların termodinamik stabilitesi, lokal kinetik reaktiviteleri ve fiziksel özellikleri hücresel toksisitelerini etkilemektedir.

Moleküler oksijenin suya dönüşümü süperoksit anyon radikali ( $O_2^-$ ), hidroksil radikali ( $OH^\cdot$ ) gibi radikal olan ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi radikal olmayan reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumlarını içeren sıralı, tek elektron eklenmesiyle seyreden dört basamaklı bir reaksiyonlar dizisidir (Harber ve Willistatler, 1931) (Şekil 6).<sup>24</sup>



Şekil 6. Moleküler oksijenin sıralı, ünivalan redüksiyonu.<sup>24</sup>

Serbest radikallerin eksojen kaynakları iyonizan radyasyon, sigara tüketimi, pestisitler ve bazı medikasyonlardır. Hücre içinde de çeşitli serbest radikal kaynakları vardır. Katekolaminler, flavinler, tiyoller ve kinonların otooksidasyonu O<sub>2</sub>'nin redüksiyonu ile reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumuna yol açabilmektedir. Ksantin oksidaz ve aldehit dehidrogenaz gibi sitoplazmik enzimlerin katalitik döngüsü, lökotrien, tromboksan ve prostaglandin sentezlerinde lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzimlerinin kataliz ettiği reaksiyonlar da reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumuyla ilgilidir. Mitokondrial elektron transport sistemi ve mikrozomik elektron transport sistemi O<sub>2</sub><sup>-</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimine yol açmaktadır.<sup>22, 24</sup>

Serbest radikallerin yüksek reaktivitesi hem yarı ömürlerinin hem de aktivasyon yarıçaplarının kısa olmasına neden olur. Bu moleküller non radikal bileşiklerle birleşerek yeniden reaksiyona girebilecek serbest radikaller oluşturabilirler. Böylece ilk radikali oluşturan sistemden uzak biyolojik etkiler ortaya çıkabilmektedir. Bunun bir örneği ikincil radikallerin ve yıkım ürünlerinin son derece hasar verici etkiler gösterdiği lipid peroksidasyonudur.

Tüm hücrenel bileşenler; yağlar, proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar reaktif oksijen metabolitlerinin reaksiyonlarıyla metabolik ve hücrenel kusura yol açacak şekilde hasar görebilirler.

**Yağlar :** Hidroksil ve hidroperoksil radikaller önemli hücre membranı bileşenleri olan fosfolipidlerin ve poliansatüre yağların oksidasyonuna yol açabilmektedir.

3 veya fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan malondialdehidin de membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlar oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir.

Lipid peroksidasyonu membran yapısında önemli hasara neden olmakta akışkanlığını ve fonksiyonunu bozmaktadır.<sup>24</sup>

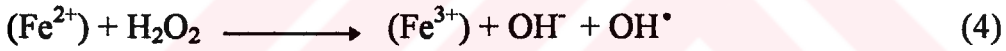
**Proteinler :** Genel olarak proteinlerin oksidasyonu proteolize duyarlılığını da arttırmaktadır. İntra ve inter moleküler disülfid bağlarının oluşumuyla agregasyon fenomenine, çapraz bağlar oluşumuna ve yapısal bozukluklara yol açmaktadır.

Peptid bağları, serbest oksijen radikalleri etkisi ile hidroliz olarak protein fragmentasyonu ile sonuçlanabilmektedir.<sup>24</sup>

Nükleik asitler ve karbonhidratlar da reaktif oksijen metabolitlerinin hedef molekülleri arasındadır. Bu moleküllerin oksidasyonu ile ilgili çalışmalar sürmektedir.<sup>24</sup>

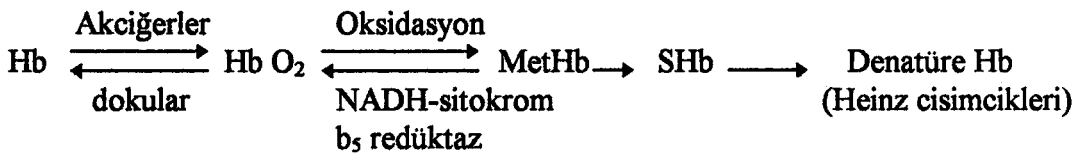
Reaktif oksijen metabolitlerinin hasar verici etkilerine karşı hücrel savunma sistemleri de vardır. Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, DT-diaphoraz gibi enzimler, glutatyon, askorbik asit, ürik asit ve taurin gibi küçük moleküller birincil savunma sistemlerini oluşturmaktadır. Peroksidaz aktivitesi gösterilebilen glutatyon transferaz enzimleri, hasarlı moleküllerin yıkımını gerçekleştiren proteolitik enzimler ve DNA onaran nükleik enzimlerin yanı sıra  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten ve bilirubin ikincil savunmada etkili olmaktadır.<sup>24</sup>

**Hemoglobin:** Hemoglobin yapısındaki iki değerlikli demir atomlarının ( $Fe^{2+}$ ), üç değerlikli ferrik iyonlara ( $Fe^{3+}$ ) oksidasyonu ile methemoglobin (MetHb) oluşur. (Reaksiyon 4).<sup>24</sup>



MetHb,  $O_2$  veya  $CO_2$  bağlama özelliğini kaybetmiştir. Sağlıklı bireylerde toplam hemoglobinin % 1.5 veya daha azını (ortalama %  $0.78 \pm 0.37$ , 95. persantil : % 1.28) oluşturan MetHb oranının artışı fonksiyonel anemiye yol açmakta, % 60 üzerinde olması öldürücü seyrebilmektedir.<sup>9, 18, 22</sup>

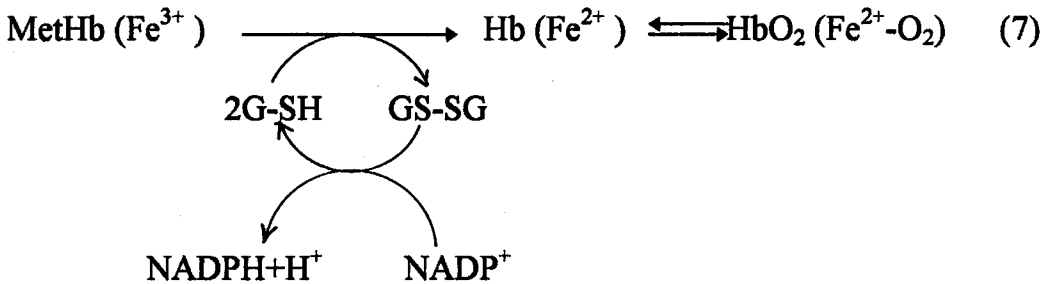
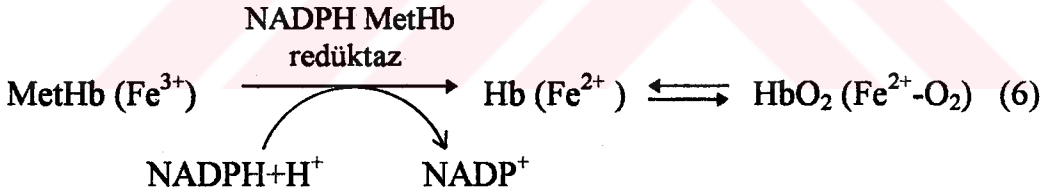
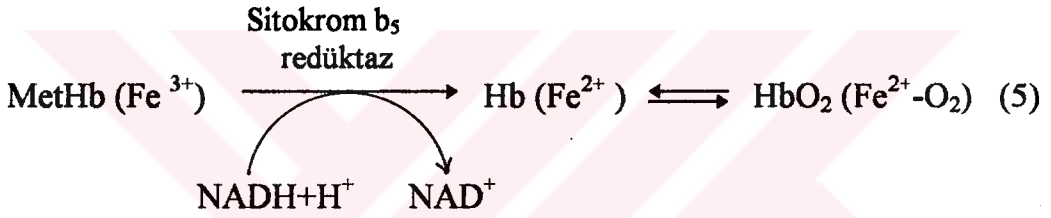
$Fe^{2+}$  iyonlarının oksidasyonu ile MetHb oluşumu eritrositlerde sınırlı bir düzeye kadar geri dönüşebilir. Oksidasyonun sürmesi geri dönüşümsüz konformasyonel değişimlere, sulfhemoglobin (SHb) oluşumuna, hemoglobinin denatüre olarak eritrosit içinde presipitasyonuna yol açmaktadır (Şekil 7).<sup>10</sup>



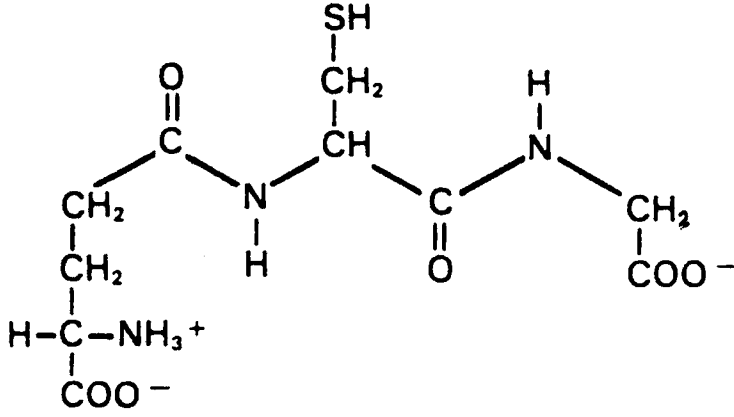
Şekil 7. Hemoglobinin oksidasyonu.<sup>10</sup>  $HbO_2$  : oksihemoglobin.

Sulfhemoglobin presipitatları hücre membranındaki -SH grupları ile disülfid bağları oluşturabilir. Sıklıkla hücre membranına bağlı görülen bu presipitatlara Heinz cisimcikleri denilir.<sup>9, 25</sup>

Normal koşullarda eritrosit içinde az miktarda oluşan MetHb, enzim sistemlerince indirgenir. En önemlisi NADH bağımlı MetHb redüktaz (NADH sitokrom b<sub>5</sub> redüktaz) sistemidir (Reaksiyon 5). Diğerleri rezerv sistemleridir; askorbik asit, redükte glutatyon, NADPH bağımlı MetHb redüktaz (Reaksiyon 6,7). NADPH MetHb redüktaz sistemi doğal bir kofaktör veya metilen mavisi gibi otooksidasyona uğrayan bir boya gerektirir.<sup>9, 26</sup>

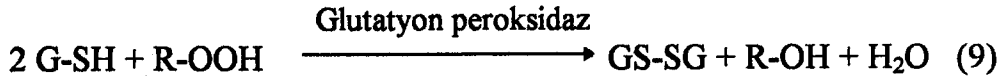
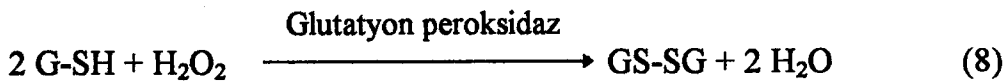


Glutatyon N-terminal glutamatın α peptidil olmayan bir bağ aracılığı ile sisteine bağlandığı atipik bir tripeptiddir (Şekil 8).<sup>22</sup>

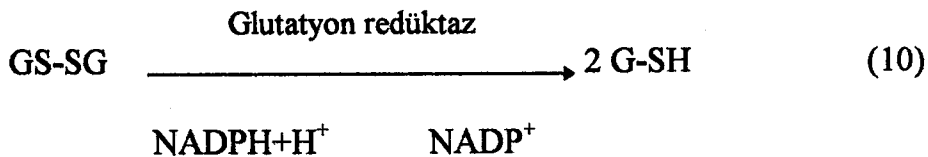


Şekil 8. Glutatyon ( $\gamma$ -glutamil-sisteinil-glisin).<sup>22</sup>

Sistein kalıntısının sülfür atomunun redükte (-SH) olduğu durumda molekül redükte glutatyon (G-SH) olarak adlandırılır. 2 molekül G-SH disülfid bağı ile birleşerek 1 molekül okside glutatyonu (GS-SG) oluşturur. Bu reaksiyon glutatyon peroksidaz enzimi ile katalize edilir. Glutatyon peroksidaz G-SH'ın  $H^+$  atomunu  $H_2O_2$  ve organik serbest hidroperoksitlerin redüksiyonu için kullanır (Reaksiyon 8 ve 9). Katalitik aktivitesini sağlayan 4 selenyum atomu içeren bu enzim, ökaryotik hücrelerde sitoplazmada bulunur ve yüksek substrat afinitesi gösterir.<sup>24</sup>

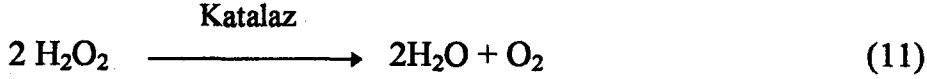


Okside glutatyondan redükte glutatyonun rejenerasyonu bir flavoprotein olan glutatyon redüktaz enzimi ile olur. Bu reaksiyon NADPH gerektirir (Reaksiyon 10).





Son çalışmalar eritrosit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin yıkımında katalaz enziminin daha aktif bir rol oynadığını glutasyon peroksidazın asıl işlevinin organik peroksitlerin yıkımı olduğunu göstermektedir. Katalaz, 2 molekül H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin 1 molekül oksijen ve 2 molekül suya dönüşümünü kataliz eder (Reaksiyon 11).<sup>22, 28</sup>



Tetramerik formu aktif olan bu enzim yapısında 4 molekül sıkı bağlı NADPH taşımaktadır. Katalaz ilk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekülü ile birleştiğinde bileşik I adı verilen enzim-substrat kompleksini oluşturur. İkinci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekülü ile reaksiyon katalazı başlangıç durumuna getirir. NADPH yokluğunda bileşik I katalazın inaktif formu olan bileşik II'ye dönüşmekte ve sürekli H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'ye maruz kaldığında geri dönüşümsüz inaktivasyona yol açabilmektedir.<sup>27, 28</sup>

G-SH methemoglobin redüksiyonu yanı sıra katalaz ile birlikte hücre içinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve organik peroksitlerin birikimini engelleyerek de eritrositleri korur. Çünkü hücrede peroksitlerin artışı hemoglobinin methemoglobine dönüşümüne yol açar, membran lipidlerini ve hücre için yaşamsal olan enzim yapısındaki proteinleri okside eder.<sup>4,22</sup> Hemoglobin presipitatlarının membrana bağlanması, membran lipidlerinin oksidasyonu eritrosit stabilitesini bozar; membran rijiditesini, şekil değişikliklerine direncini artırır ve damar içi hemolize yahut hasarlı hücrenin RES tarafından yıkılmasına yol açar.<sup>9, 29, 30</sup>

Sonuç olarak eritrosit bütünlüğünün ve hemoglobin işlevlerinin sürdürülmesi için redükte glutatyona, sürekli tüketilen redükte glutasyonun rejenerasyonu, NADPH bağımlı MetHb redüktaz sisteminin ve katalazın işlevi için NADPH'a gereksinim vardır.

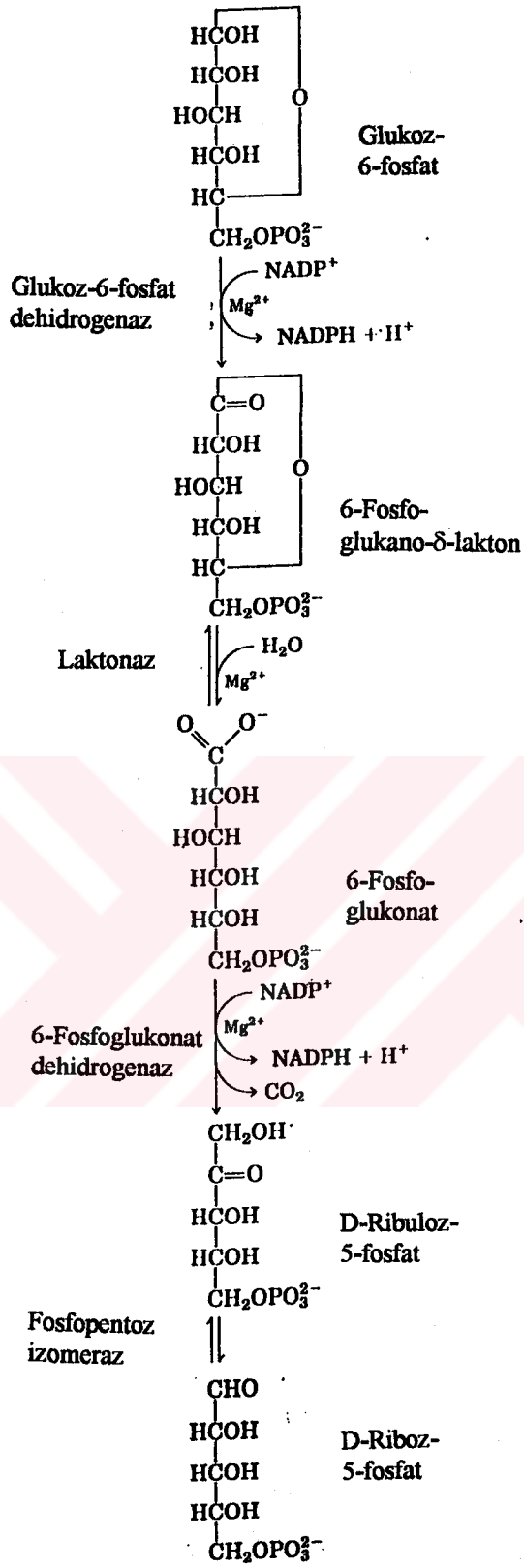
## Pentoz Fosfat Yolu ve NADPH Üretimi

Eritrositlerde aktif olan metabolik yollardan birisi de pentoz fosfat yoludur (Fosfoglukonat yolu, Heksoz monofosfat yolu).<sup>16,22,23</sup> Glukozun birinci karbonundan dekarboksilasyonu ile pentoz fosfatlar ve NADPH üretilir. Memelilerde pentoz fosfat yolu eritrositler dışında yağ asidi ve steroid yapıdaki bileşikler sentezleyen dokularda da yüksek aktivite gösterir; karaciğer, yağ dokusu, adrenal korteks, testis ve süt veren meme bezi indirgeyici sentezlerde NADPH kullanırlar. Nükleotid ve nükleik asit sentezleri için gerekli ribozun öncülleri ise tüm dokularda sağlanabilir. Bu, muhtemelen pentoz fosfat yolunun oksidatif olmayan fazının tersine dönüşü ile başılır.<sup>21, 22, 23</sup>

Pentoz fosfat yolunun enzimleri, glikolizde olduğu gibi hücrenin sitozolik kompartımanında bulunur. Oksidasyon dehidrojenasyon ile sağlanır, hidrojen alıcısı olarak NADP<sup>+</sup> kullanılır. Bu yoldaki reaksiyonlar dizisi oksidatif ve oksidatif olmayan iki faza ayrılabilir.

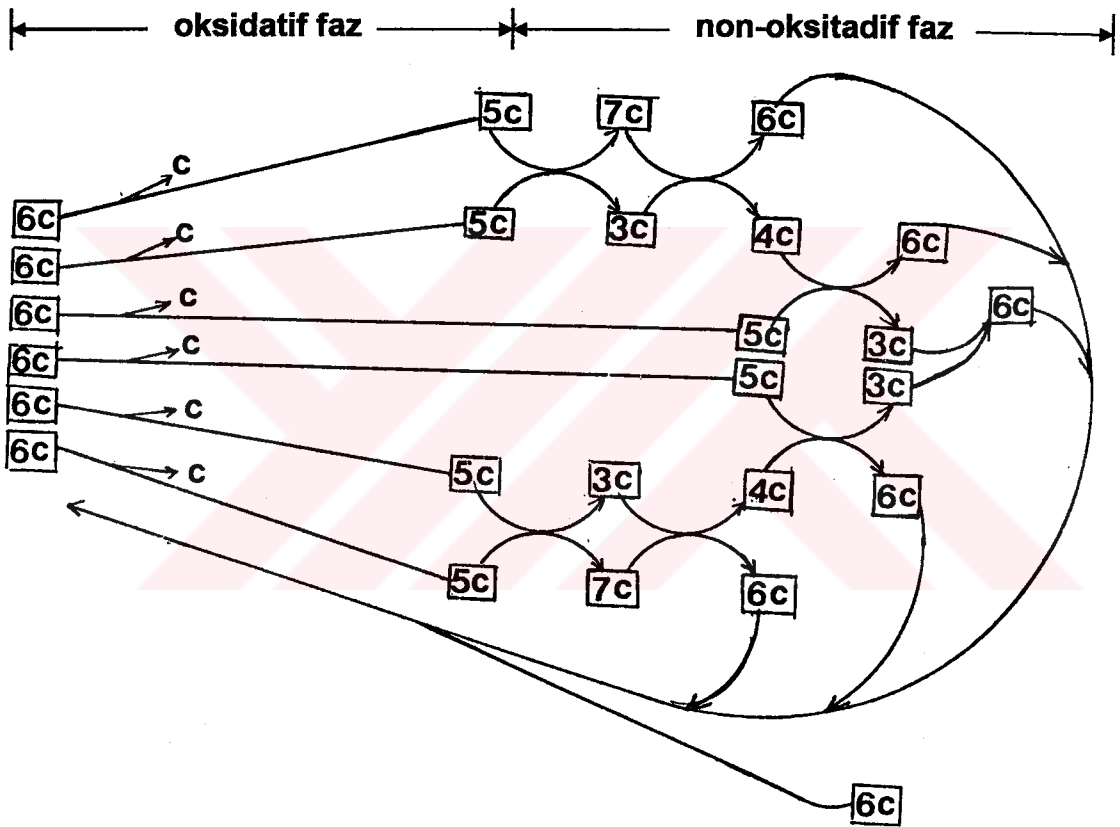
**Oksidatif Faz :** İlk reaksiyon glukoz 6-fosfatın (G6-P) G6PD tarafından enzimatik dehidrojenasyonu ve 6-fosfoglukano -δ- lakton oluşumudur. Bu reaksiyonda elektron alıcısı NADP<sup>+</sup>dir ve denge NADPH oluşumu yönündedir. Sonraki basamakta 6-fosfoglukano -δ- lakton spesifik bir laktonaz ile serbest bir asit olan 6-fosfoglukonata hidroliz olur. 6-Fosfoglukonat, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz ile dehidrojene ve dekarboksile olarak D-ribüloz 5-fosfatı oluştururken bir molekül NADP<sup>+</sup> daha indirgenir. Eğer dokunun nükleik asit biyosentezi için pentoz fosfat gereksinimi varsa D-ribüloz 5-fosfat fosfopentoz izomeraz ile aldoz izomerine; D-riboz 5-fosfata dönüşerek oksidatif faz tamamlanmış olur (Şekil 9).<sup>23</sup> Net sonuç indirgen biyosentez reaksiyonları için NADPH ve nükleotid sentezinde öncül olarak riboz 5-fosfat üretimidir. Glukozun birinci karbonu CO<sub>2</sub> şeklinde açığa çıkmıştır.





Şekil 9. Pentoz fosfat yolunda oksidatif faz reaksiyonları. <sup>23</sup>

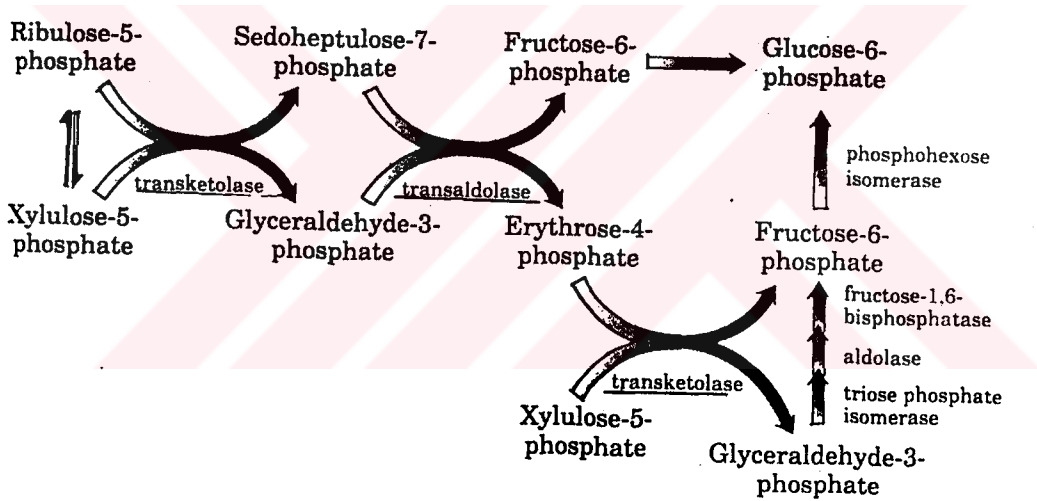
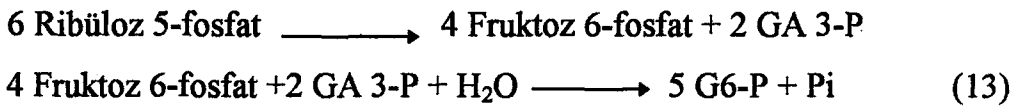
**Non-oksidatif Faz :** Riboz 5-fosfattan çok NADPH gereksinimi olan dokularda ribüloz 5-fosfat bir seri reaksiyonla yeniden G6-P'a dönüşür. Önce ribüloz 5-fosfat, ksililöz 5-fosfata epimerize olur, daha sonra şeker fosfat ara maddelerinin karbon iskeletlerindeki düzenlemeyle 6 tane 5 karbonlu şeker fosfat, 5 tane 6 karbonlu şeker fosfata dönüşür. Döngü ilave bir glukoz 6-fosfat molekülüyle yeniden başlayarak glukozun oksidasyonu ve NADPH üretimi sürdürülebilir.<sup>23</sup> (Şekil 10).



Şekil 10. Pentoz fosfat yolunun oksidatif fazında oluşan pentoz-fosfatlar non-oksidatif fazda yeniden heksoz fosfatlara dönüşerek oksidatif reaksiyonların sürmesini sağlarlar.

Pentoz fosfat yolunun non-oksidatif fazında tiyamin pirofosfat bağımlı bir enzim olan transketolaz ksilüloz 5-fosfatın 1. ve 2. karbonunun ribüloz 5-fosfata transferini gerçekleştirerek 7 karbonlu sedoheptüloz 7-fosfatı oluşturur. Ksilülozun

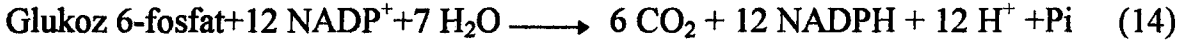
geri kalanı 3 karbonlu gliseraldehit 3-fosfattır (GA 3-P). Daha sonra transaldolaz benzer bir reaksiyonla sedoheptüloz 7-fosfatın 3 karbonlu bir kısmını GA 3-P ile kondanse ederek fruktoz 6-fosfatı meydana getirir. Sedoheptüloz 7-fosfatın geri kalan 4 karbonlu kısmı eritroz 4-fosfattır. Transketolaz ikinci bir reaksiyonda eritroz 4-fosfat ve ksilüloz 5-fosattan, fruktoz 6-fosfat ve GA 3-P sentezini sağlar. Bu reaksiyon dizisinin iki tekrarı ile oluşan iki GA 3-P molekülü de fruktoz 6-fosfata dönüşebilir (Şekil 11). Böylece döngü tamamlanmış 6 tane pentoz fosfat 5 tane heksoz fosfata dönüşmüş olur (Reaksiyon 13).<sup>23,31</sup>



Şekil 11. Pentoz fosfat yolunun non-oksitatif fazı.<sup>23</sup>

<sup>14</sup>C işaretli GA 3-P kullanılarak yapılan çalışmalarda <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> oluşumunun minimal düzeyde gerçekleşmesi GA 3-P oluşumu yoluyla döngüye girişin önemsiz miktarda olduğunu göstermektedir. Oluşan GA-3P'in büyük kısmının laktata dönüştüğü sonucuna varılmaktadır. Gerçekte döngüye giren 6 mol glukozun 1 molü CO<sub>2</sub> şeklinde okside olmakta, 1 molü laktata dönüşmekte ve sadece 4 tanesi yeniden kullanılmaktadır.

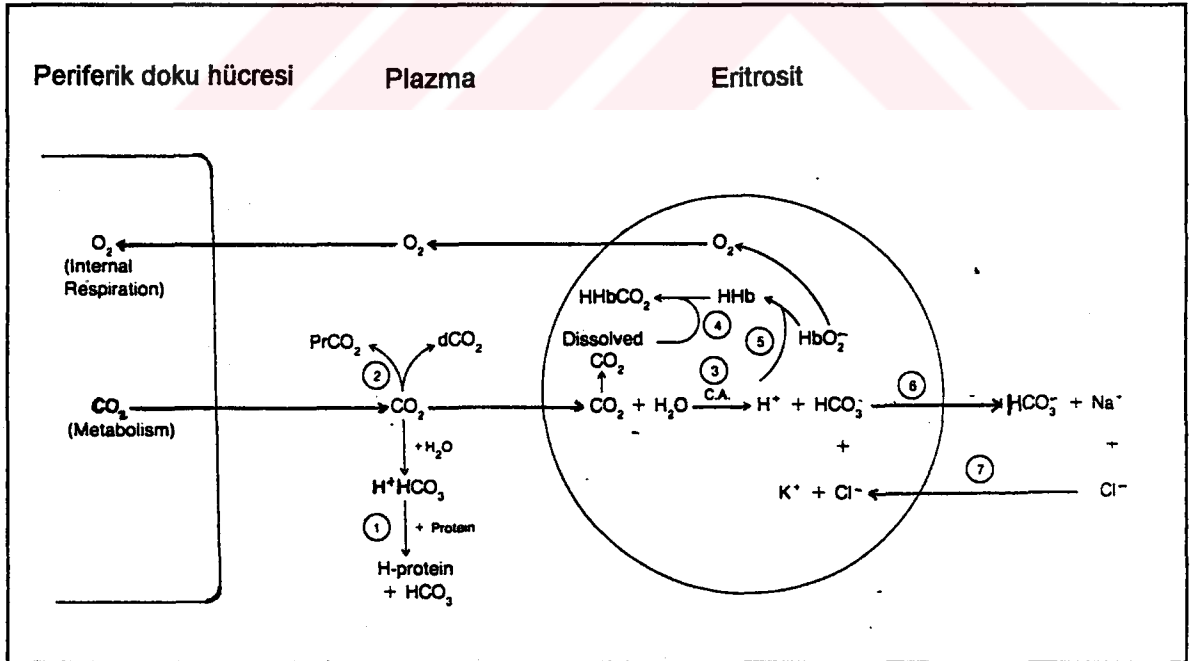
Dokunun NADPH gereksinimi fazla olduğunda 6 karbonlu bir glukoz 6-P molekülünün pentoz fosfat yolunda tamamen yıkılması ile 6 CO<sub>2</sub> yanı sıra 12 NADPH + 12 H<sup>+</sup> oluşacaktır (Reaksiyon 14).<sup>31</sup>



### Karbondioksit Taşınması ve Tamponlama

Doku hücrelerinin solunumu O<sub>2</sub> tüketirken, CO<sub>2</sub> ve organik asit metabolitler açığa çıkarır. Metabolizmanın asit ürünleri tamponlanır veya çeşitli yollarla uzaklaştırılarak vücut ekstraselüler sıvı pH' ı sürdürülür. En önemli ekstrasüler tampon sistemi fiziksel olarak çözülmüş CO<sub>2</sub> ( d CO<sub>2</sub> ) ile etkileşen bikarbonat sistemidir.<sup>32</sup>

Dokularda açığa çıkan CO<sub>2</sub>, eritrositlerde su ve hemoglobinin amino grupları arasındaki reaksiyonlarla etkin bir şekilde akciğerlere taşınır. Bu reaksiyonların dengesi karbonik anhidraz enziminin varlığı ve işleviyle düzenlenir (Şekil 12).



Şekil 12. Eritrositlerin CO<sub>2</sub> taşınması ve tamponlama.<sup>32</sup>

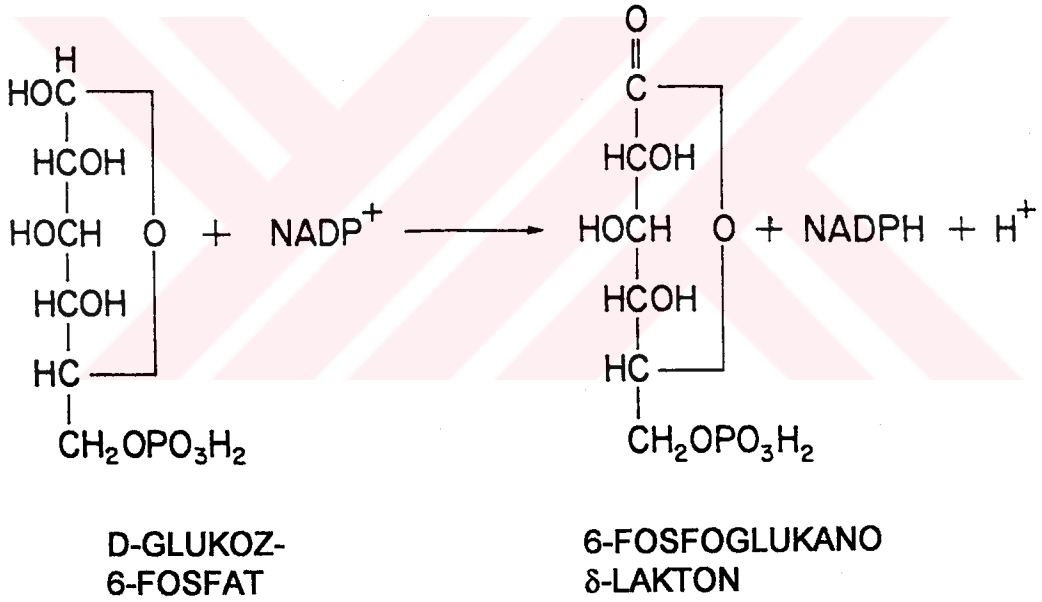
CO<sub>2</sub> eritrositlere difüzyon sonrası su molekülü ile birleşerek karbonik asidi (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) meydana getirir. H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, H<sup>+</sup> ve bikarbonata (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ayrışır. H<sup>+</sup> büyük ölçüde hemoglobinin **histidin** amino asidi ile tamponlanırken HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> plazma klorürü (Cl<sup>-</sup>) ile yer değiştirir. Buna izohidrik klor kayması denilir. Deoksihemoglobinin tamponlama gücü daha fazla olduğundan H<sup>+</sup> alımı CO<sub>2</sub>'in yüksek O<sub>2</sub> ise düşük olduğu ven kanında özellikle kolaylaşır. CO<sub>2</sub>'in hemoglobine bağlanması da deoksihemoglobin molekülünde daha kolaydır.<sup>32</sup>

Sonuçta CO<sub>2</sub> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> verimli bir şekilde akciğerlere taşınmış olur. Burada düşük parsiyel CO<sub>2</sub> basıncı ve yüksek parsiyel O<sub>2</sub> basıncı ile eritrositlerden CO<sub>2</sub> salınır ve hücre içine O<sub>2</sub> girer. Kandan CO<sub>2</sub>'nin uzaklaştırılarak oksijenasyonu venöz kanın arteriel kana dönüşümündeki majör faktördür.<sup>16, 32</sup>

## GLUKOZ 6-FOSFAT DEHİDROGENAZ

### Tanımı ve İşlevi

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (D-glukoz 6-fosfat: NADP<sup>+</sup> oksido- redüktaz, E.C. 1.1.1.49) tüm bitkisel ve hayvansal dokularda bulunan adaptif bir enzimdir. Hücreye glukozun oksidasyonu ile NADPH formunda indirgen güç sağlayan pentoz fosfat yolunun birinci ve hız kısıtlayıcı tepkimesini katalizler. Hücrenin sitozolünde meydana gelen reaksiyonla D-glukoz 6-fosfat, 6-fosfoglukano δ-laktona dönüşürken bir molekül NADP<sup>+</sup> indirgenmektedir (Şekil 13).



Şekil 13. G6PD'nin kataliz ettiği reaksiyon.<sup>22</sup>

### Moleküler Yapısı

G6PD eş subünitelerinden oluşan dimerik yapıda sitozolik bir enzimdir.<sup>3, 5, 22</sup> Katalitik fonksiyonu için dimerik yapının gerekliliği, tetrametik formunun da aktif



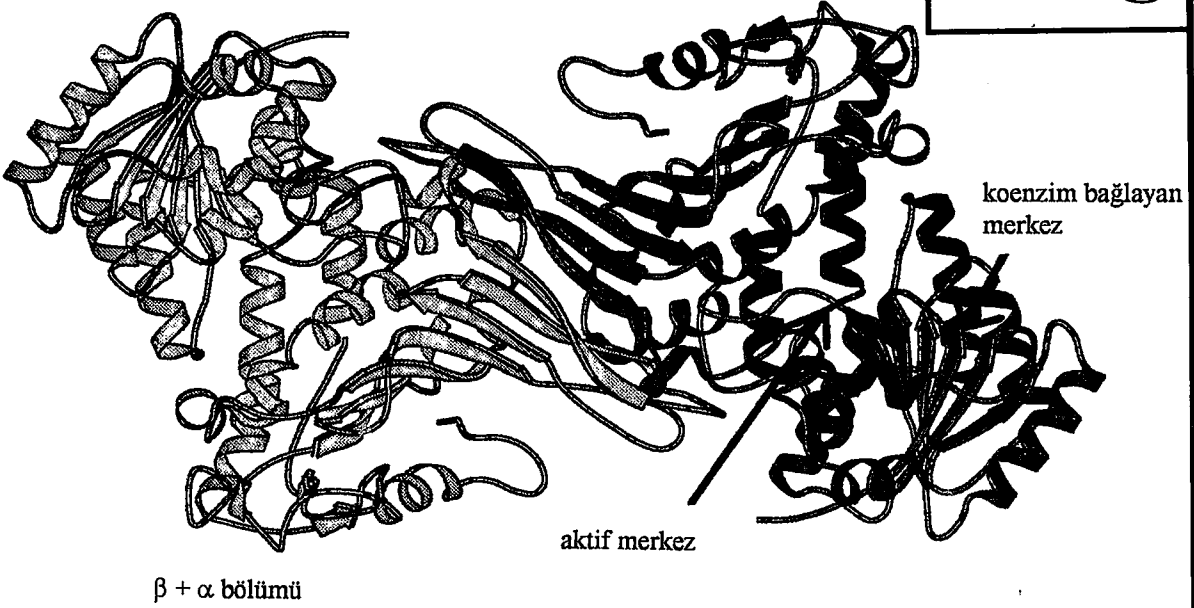
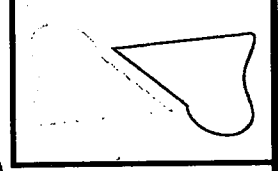
olduğu gösterilmiştir. NADP<sup>+</sup> veya NADPH katalitik olarak aktif G6PD molekulunu stabilize etmektedir. <sup>5,33</sup>

Enzimin birincil yapısını oluşturan amino asit içeriğinin ve dizilişinin turler arası farklılık gosterdiği bilinmektedir. İnsan eritrositlerinden elde edilen G6PD monomerlerin komplementer DNA (cDNA) incelenmesi sonucu molekul ağırlığının 58.000- 60.000 Da olduğu ve 479 ile 531 aminoasit içerdiğine dair farklı yayınlar mevcuttur. <sup>3, 5, 18, 34</sup>

Son çalışmalarda insan G6PD'i ile önemli homoloji (% 33.1) gosteren *Leuconostos mesenteroides* bakteri enziminin kristal yapısından yararlanılarak molekulun 3 boyutlu yapısına açıklık kazandıran bir model oluşturulmuştur. <sup>3, 7</sup> Bu G6PD B<sup>+</sup> modeline göre her monomer 1-198'inci amino asit kalıntılarında meydana gelen koenzim bölümü ve 199-515'inci amino asit kalıntılarını içeren  $\beta + \alpha$  bölümlerinden oluşmaktadır. GASGDLA dizisi (38-44. amino asit kalıntıları) koenzim bağlamaktadır. Glukoz 6-fosfat bağlayan aktif merkez tüm turlerde büyük oranda korunan 9 amino asitlik (198-206'inci amino asit kalıntıları ) RIDHYLGKE dizisini içermektedir.  $\beta + \alpha$  bölümünün  $\beta$  düzlemini oluşturan komşu peptid dizileri (389-425'inci amino asit kalıntıları) molekulun dimerik yüzünü meydana getirir. Dimer yapısındaki iki aktif merkez, dimerik yüzleri oluşturan antiparalel düzlemlerin karşılıklı gelmesiyle, tp şeklindeki boşlukla birbirinden 50 A<sup>o</sup> uzaklıktadır (şekil 14). <sup>3</sup>

Bu model, aktif merkezi oluşturduğu düşünülen 9 amino asitlik dizideki farklı mutasyonların benzer biyokimyasal fenotipler taşımasıyla da desteklenmektedir. <sup>7</sup>

koenzim bölümü



Şekil 14. İnsan G6PD'sinin dimer modeli. Bu şekilde p subünitesi kırmızı, yeşil, sarı q subünitesi mavi, pembe, beyaz renklerle gösterilmiştir.<sup>3</sup>

### G6PD'm Biyokimyasal Özellikleri

Tüm populasyon gruplarında en sık görülen (normal) G6PD enzimi Gd B<sup>+</sup> olarak adlandırılır. Diğer enzim varyantlarının biyokimyasal, klinik ve genetik özellikleri Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) önerdiği standartlara göre Gd B<sup>+</sup> ile karşılaştırılarak değerlendirilmektedir. Yarı ömrü 62 gündür.<sup>35</sup>

**Aktivitesi :** Eritrosit enzim aktivitesi analiz yöntemine göre farklılık gösterdiği için her laboratuvar kendi referans sınırlarını saptamakta, bu değer % 100 olarak kabul edilmektedir. Beutler referans değerleri  $12.1 \pm 2.05$  IÜ/gHb olarak bildirmiştir. Yüreğir ve ark ise Çukurova bölgesinde referans değerleri  $8.6 \pm 3.3$  IÜ/gHb olarak saptamışlardır.<sup>12</sup> Eritrosit GdB<sup>+</sup>'sinin immunolojik olarak değerlendirilmesiyle spesifik aktivitesi ortalama  $183 \pm 18.5$  (146-200) Ü/mg protein olarak saptanmıştır.<sup>2</sup>

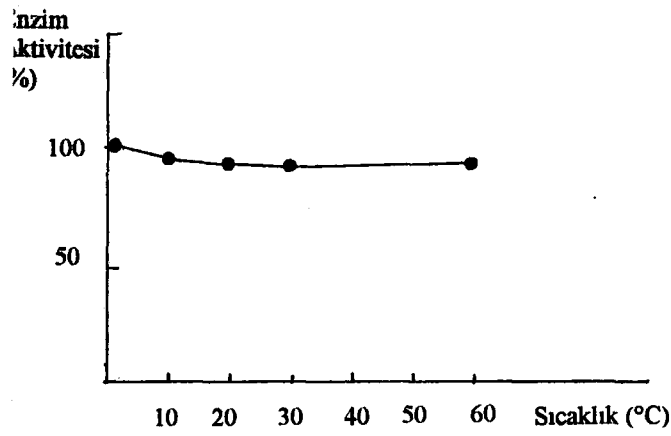
**Elektroforetik Mobilitesi :** G6PD varyantlarının elektroforezi nişasta jel elektroforezi ile Tris-EDTA-borat (TEB) tampon sisteminde pH 8.6'da, fosfat tampon sisteminde pH 7.0'de, Tris HCl tampon sisteminde pH 8.8'de ve poliakrilamid jel elektroforeziyle (PAGE) Tris-HCl tampon sisteminde pH 8.0'de yapılmaktadır (Davies 1964, Kirkman ve Hendrickson 1963, Mathai ve ark. 1966, DSÖ 1967).<sup>11, 36, 37</sup> Bu sistemlerdeki Gd B<sup>+</sup> mobilitesi varyantlarla kıyaslanabilmesi amacıyla % 100 kabul edilmektedir.

**NADP<sup>+</sup> ve G6PD için Michaelis sabitleri :** G6PD glukoz 6-fosfatın β anomerine yüksek özgünlük gösterir. G6-P sudaki çözeltilerinde % 38 oranında α, %62 oranında β anomeri şeklinde bulunmaktadır. Kısmi olarak saflaştırılmış Gd B<sup>+</sup> enzim preparatlarının Michaelis sabiti G6-P için 30 ile 80 μM arasında, NADP<sup>+</sup> için 1.2 ile 8μM arasında bildirilmiştir.<sup>10,11,38,39,40,41</sup> İnsan eritrosit G6PD'nin NADP<sup>+</sup>'ye afinite eğrisinin hiperbolik değil sigmoidal oluşu iki koenzim bağlanma yüzünün pozitif kooperatif etkileşim gösterdiğini düşündürmektedir.

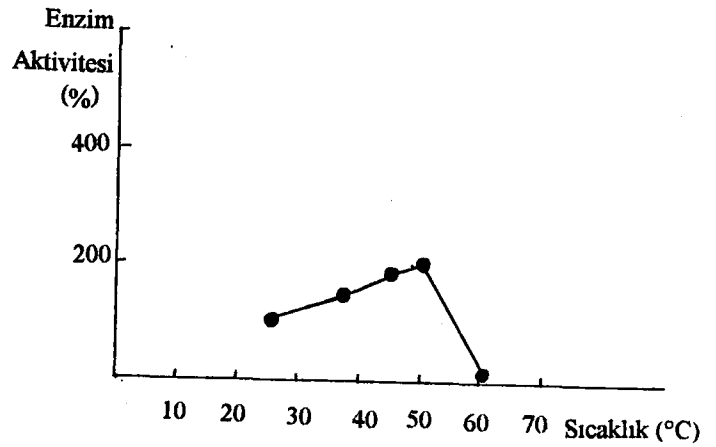
**Substrat Analoglarının Kullanımı :** G6PD varyantlarının analizinde deamino NADP<sup>+</sup> ve enzimin düşük düzeyde reaktif olduğu 2-deoksi G6-P ve galaktoz 6-fosfat kullanımı da değerlendirilmektedir. Gd B<sup>+</sup>'nin bu analogları kullanımının G6-P ve deamino NADP kullanımının NADP<sup>+</sup> kullanımlarına oranı sırasıyla % 1.6-7.9, % 2.2-6 ve % 40-69 arasındadır.<sup>10,11,38,39,40,41</sup> NAD<sup>+</sup> kosubstrat olarak kullanıldığında enzimin aktivitesi % 95 oranında azalmaktadır.<sup>33</sup>

**KCl Gradyanında Elüsyonu :** Gd B<sup>+</sup>'nin DEAE Sefadex A 50 kolonundan elüsyon piki 227-230 mmol/L KCl konsantrasyonunda gerçekleşmektedir.<sup>3, 39</sup>

**Sıcaklık Stabilitesi ve Optimal Sıcaklık :** Gd B<sup>+</sup>'nin 46 °C'da 20 dakika inkübasyonu sonrası başlangıç aktivitesine oranla % 66 - 99 oranında stabil kaldığı gözlenmiştir (Şekil 15). Enzimin maksimum aktivitesi 50 °C'da 10 dakika inkübasyonu ile elde edilmektedir (Şekil 16).<sup>10, 39, 40, 42</sup>



Şekil 15

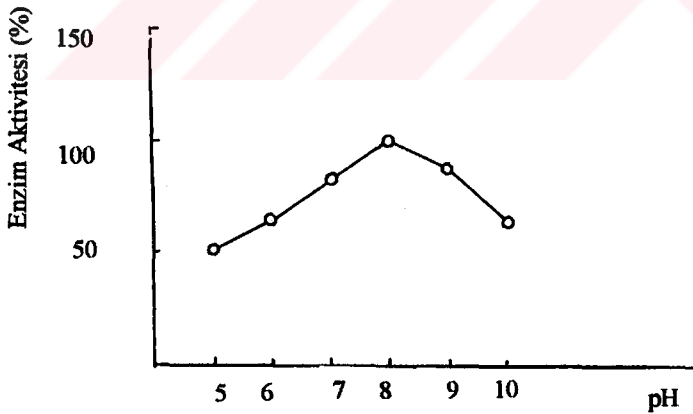


Şekil 16

Şekil 15. Gd B<sup>+</sup>'nin sıcaklık stabilitesi. Yirmi dakika inkübe edildikten sonra enzim aktivitesi saptanmıştır.<sup>42</sup>

Şekil 16. Gd B<sup>+</sup>'nin 25, 37, 45, 50, 60 °C'lerde 10 dakika inkübasyon sonrası aktivitesi. 25 °C'daki aktivitesi % 100 kabul edilmiştir.<sup>42</sup>

**Optimal pH Eğrisi :** Gd B<sup>+</sup> optimal pH eğrisi maksimum aktivitenin pH 8.0'de gerçekleştiği monofazik bir patern göstermektedir (Şekil 17).<sup>11, 42, 43</sup>



Şekil 17. Gd B<sup>+</sup>'nin optimal pH eğrisi. pH 8.0'deki aktivitesi % 100 kabul edilmiştir.<sup>11, 42</sup>

**Ki NADPH :** NADPH G6PD'a bağlanmakta NADP<sup>+</sup> ile yarışarak inhibitör etki göstermektedir. NADPH'n Ki'si 4.9 - 12.9 µM olarak saptanmıştır.<sup>40</sup>

**Aktivatör ve İnhibitör Etkili Maddeler :** Optimal G6PD aktivitesi  $Mg^{2+}$  gerektirir. Aktivasyon, kısmi saflaştırılmış enzimde 50 mM, hemolizatta 100 mM  $Mg^{2+}$  konsantrasyonlarında gerçekleşirken 200 mM  $Mg^{2+}$  konsantrasyonunda her iki grupta da inhibisyon görülmektedir.<sup>5</sup>  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Ba^{2+}$  iyonları da düşük konsantrasyonlarda aktivatör, yüksek konsantrasyonlarda inhibitör etki göstermektedir.  $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  iyonlarının ve p-kloromerküribenzoatın G6PD için inhibitör maddeler olduğu saptanmıştır.<sup>33</sup>

### **Doku Dağılımı**

G6PD enziminin tüm memeli dokuları için yaşamsal gerekliliği bilinmekle birlikte klinik sonuçları nedeniyle eritrosit G6PD aktivitesi önem kazanmıştır. Bunun yanında lökosit ve fibroblast enzim aktiviteleri de araştırılmıştır.

North ve ark. (1975) sağlıklı bireylerde eritrosit, lökosit ve trombosit G6PD aktivitelerini saptamışlardır.<sup>43</sup>

Eritrosit:  $6.1 \pm 0.70$  IÜ/gHb

Lökosit:  $0.68 \pm 0.19$  IÜ/mg protein

Trombosit:  $0.19 \pm 0.04$  IÜ/mg protein.

Mamluk ve ark. (1985) eritrosit, lökosit ve fibroblastlardaki G6PD aktivitelerini araştırmışlardır. Sağlıklı bireylerde G6PD aktiviteleri;

Eritrosit: 7.2 - 6.3 IÜ/gHb

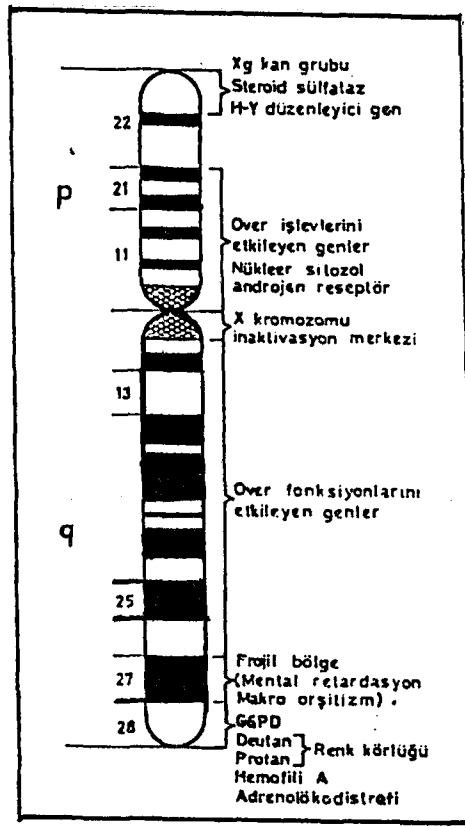
Lökosit: 0.76 IÜ/mg protein

Fibroblast: 0.124 IÜ/mg protein

olarak saptanmıştır.<sup>10</sup>

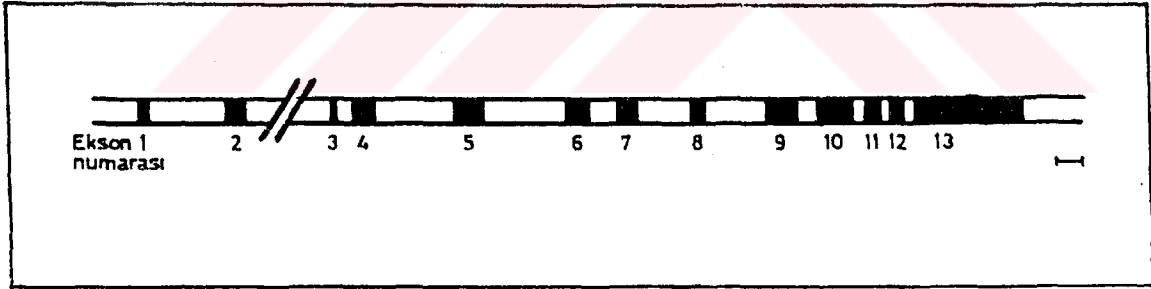
### **Gen Haritası**

İnsan G6PD enziminin X kromozomunun  $q^{28}$  bölgesinde yer alan gen lokusu tarafından şifrelendiği anlaşılmıştır. G6PD genomuna komşu bölgelerde frajil X sendromu, hemofili A, manik depresif hastalık, renk körlüğü ve adrenolökodistrofi ile ilgili genler bulunmaktadır (Şekil 18).<sup>3, 5, 8, 44</sup>



Şekil 18. İnsan X kromozomu üzerinde genlerin yerleşimi. <sup>5</sup>

G6PD cDNA'sının ve geninin klonlanması genomun 3751 nükleotid uzunluğunda 13 ekzon ve 12 introndan oluştuğunu göstermiştir (Şekil 19). Her intron GT nükleotidleri ile başlayıp AG nükleotidleri ile sonlanmaktadır. <sup>5, 6, 22</sup>



Şekil 19. G6PD genomunun yapısı. <sup>5</sup>

10. ekzonun fonksiyonel bir alan olduğu, koenzim ve olasılıkla substrat bağlayan kısımları şifrelediği düşünülmüştür. 10. ekzondaki mutasyonların enzimin stabilitesi için yüksek konsantrasyonlarda NADPH gerektiren varyantlarda görülmesi ile bu görüş desteklenmiştir. <sup>6, 18</sup> Ancak bu sav Luzzatto ve arkadaşlarının 3 boyutlu insan G6PD modeline uyum göstermez. <sup>3</sup>

İnsan G6PD geninin baz dizisi analiz edilmiş ve G+C içeriği % 61 olarak bulunmuştur (Şekil 20). <sup>34</sup>

## İnsan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz geni

### DİZİ BİLGİSİ

- Gen Bankası Girişi : M65234
- Dizi Uzunluğu : 3751 baz G+C içeriği: % 61
- Kod Dizisi : 179..1618
- Ürün: PID Q182890; glukoz-6-fosfat dehidrogenaz

### DİZİ VERİLERİ

>M65234 İnsan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz geni

```
CCCCGAAACGGTCGTACACTTCGGGGCTGCGAGCGCGGAGGGCGACGACGACGAAGCGC
AGACAGCGTCATGGCAGAGCAGGTGGCCCTGAGCCGGACCCACGTGTGCGGGATCCTGCG
GGAAGAGCTTTTCCAGGGCGATGCCTTCCATCAGTCGGATACACACATATTCATCATCAT
GGGTGCATCGGGTGACCTGGCCAAGAAGAAGATCTACCCACCATCTGGTGGCTGTTCCG
GGATGGCCTTCTGCCCGAAAACACCTTCATCATGGGCTATGCCCGTCCCGCCTCACAGT
GGCTGACATCCGCAAACAGAGTGAGCCCTTCTTCAAGGCCACCCAGAGGAGAAGCTCAA
GCTGGAGGACTTCTTTGCCCGCAACTCCTATGTGGCTGGCCAGTACGATGATGCAGCCTC
CTACCAGCGCCTCAACAGCCACATGGATGCCCTCCACCTGGGGTCACAGGCCAACCGCCT
CTTCTACCTGGCCTTGCCCCGACCGTCTACGAGGCCGTCACCAAGAACATTCACGAGTC
CTGCATGAGCCAGATAGGCTGGAACCGCATCATCGTGGAGAAGCCCTTCGGGAGGGACCT
GCAGAGCTCTGACCGGCTGTCCAACCACATCTCCTCCCTGTTCCGTGAGGACCAGATCTA
CCGCATCGACCACTACCTGGGCAAGGAGATGGTGCAGAACCTCATGGTGCTGAGATTTGC
CAACAGGATCTTCGGCCCCATCTGGAACCGGACAACATCGCCTGCGTTATCCTCACCTT
CAAGGAGCCCTTTGGCACTGAGGGTTCGCGGGGGCTATTTTCGATGAATTTGGGATCATCCG
GGACGTGATGCAGAACCACCTACTGCAGATGCTGTGTCTGGTGGCCATGGAGAAGCCCGC
CTCCACCAACTCAGATGACGTCCGTGATGAGAAGGTCAAGGTGTTGAAATGCATCTCAGA
GGTGCAGGCCAACAAATGTGGTCTGGGCCAGTACGTGGGGAACCCCGATGGAGAGGGCGA
GGCCACCAAGGGTACCTGGACGACCCACGGTCCCCCGGGTCCACCACCGCCACTTT
TGCAGCCGTCGTCCTCTATGTGGAGAATGAGAGGTGGGATGGGGTGCCCTTCATCCTGCG
CTGCGGCAAGGCCCTGAACGAGCGCAAGGCCGAGGTGAGGCTGCAGTTCATGATGTGGC
CGGCGACATCTTCCACCAGCAGTGCAAGCGCAACG?.GCTGGTGATCCGCGTGCAGCCCAA
CGAGGCCGTGTACACCAAGATGATGACCAAGAAGCCGGGCATGTTCTTCAACCCCGAGGA
GTCGGAGCTGGACCTGACCTACGGCAACAGATAACAAGAACGTGAAGCTCCCTGACGCCTA
CGAGCGCCTCATCCTGGACGTCTTCTGCGGGAGCCAGATGCACTTC6TGCGCAGCGACGA
GCTCCGTGAGGCCCTGGCGTATTTTACCCCACTGCTGCACCAGATTGAGCTGGAGAAGCC
CAAGCCATCCCCTATATTTATGGCAGCCGAGGCCCCACGGAGGCAGACGAGCTGATGAA
GAGAGTGGGTTTCCAGTATGAGGGCACCTACAAGTGG6TGAACCCCAACAAGCTCTGAGC
```



CCTGGGCACCCACCTCCACCCCCGCCACGGCCACCCTCCTTCCC GCCGCCCGACCCCGAG  
TCGGGAGGACTCCGGGACCATTGACCTCAGCTGCACATTCCTGGCCCCGGGCTCTGGCCA  
CCTGGCCGCCCTCGCTGCTGCTACTACCCGAGCCCAGCTACATTCCTCAGCTGCCAAGC  
ACTCGAGACCATCTTGGCCCCCTCCAGACCCTGCCTGAGCCTAGGAGCTTGAGTCACCTCC  
TCCACTCACTCCAGCCCAACAGAAGGAAGGAGGAGGGCGCCCATTCGTCTGTCCCHGAGC  
TTATTGGCCACTGGGTCTCGCTCCGAGTGGGGCCAGGGTGGGAGGGAGGGTTCAGGGGGAG  
GAHAGGGGGCAGCACCCACGTGAGAGAATCTGCCTGTGGCCTTGCCCCGCCAGCCTCAGTG  
CCACTTGACATTCCTTGTACCAGCAACATCTCGAGCCCCCTGGATGTCCCCTGTCCCAC  
CAACTCTGCACTCCATGGCCACCCCGTGCCACCCGTAGGCAGCCTCTCTGCTATAAGAAA  
AGCAGACGCAGCAGCTGGGACCCCTCCCAACCTCAATGCCCTGCCATTAATCCGCAAAC  
AGCCACAGCGTCATGGCAGAGCAGGTGGCCCTGAGCCGGACCCACGTGTGCGGGATCCTG  
CGGAAGAGCTTTTCCAGGGCGATGCCTTCCATCAGTCGGATACACACATATTCATCATC  
ATGGGTGCATCGCCCCGAAACGGTCGTACACTTCGGGGCTGCGAGCGCGGAGGGCGACG  
ACGACGAAGCGCAGCGACGAGCTCCGTGAGGCCTGGCGTATTTTACCCCACTGCTGCAC  
CAGATTGAGCTGGAGAAGCCCAAGCCATCCCCTATATTTATGGCAGAACGTGAAGCTCC  
CTGACGCCTACGAGCGCCTCATCCTGGACGTCTTCTGCGGGAGCCAGATGCACTTCGTGC  
GCAGGGGTGCCCTTCATCCTGCGCTGCGGCAAGGCCCTGAACGAGCGCAAGGCCGAGGTG  
AGGCTGCAGTTCATGATGTGGCCGGCGACATCTTCCACCAGCAGTGCAAGCGCAACGAG  
CTGGTGATCCGCGTGCAGCCCAACGAGGCCGTGTACACCAAGATGATGACCAAGAAGCCG  
GGCATGTTCTTCAACCCCGAGGAGTCGGAGCTGGACCTGACCTACGGCAACAGATACAAG  
GTCAAGGTGTTGAAATGCATCTCAGAGGTGCAGGCCAACAATGTGGTCTGGGCCAGTAC  
GTGGGGAACCCCGATGGAGAGGGCGAGGCCACCAAAGGGTACCTGGACGACCCACGGTG  
CCCCGCGGGTCCACCACCGCCACTTTTGCAGCCGTCGTCTCTATGTGGAGAATGAGAGG  
TGGGATGGGACGTGATGCAGAACCACCTACTGCAGATGCTGTGTCTGGTGGCCATGGAGA  
AGCCCGCCTCCACCAACTCAGATGACGTCCGTGATGAGAAGATTTGCCAACAGGATCTTC  
GGCCCCATCTGGAACCGGGACAACATC6CCTGCGTTATCCTCACCTTCAA6GAGCCCTTT  
GGCACTGAGGGTCGCGGGGGCTATTTTCGATGAATTTGGGATCATCCGAGGCTGGAACCGC  
ATCATCGTGGAGAAGCCCTTCGGGAG6GACCTGCAGAGCTCTGACCGGCTGTCCAACCAC  
ATCTCCTCCCTGTTCCGTGAGGACCAGATCTACCGCATCGACCACTACCTGGGCAAGGAG  
ATGGTGCAGAACCTCATGGTGCTGAGGCCACCCCRGA6GAGAAGCTCAAGCTGGAGGACT  
TCTTTGCCCGCAACTCCTATGTGGCTGGCCAGTACGATGATGCAGCCTCCTACCAGCGCC  
TCAACAGCCACATGGATGCCCTCCACCTGGGGTCACAGGCCAACCGCCTCTTCTACCTGG  
CCTTGCCCCCGACCGTCTACGAGGCCGTACCAAGAACATTACGAGTCCTGCATGAGCC  
AGATGTGGCTGTTCCGGGATGGCCTTCTGCCCCGAAAACACCTTCATCATGGGCTATGCC  
GTTCCC GCCTACA6TGGCTGACATCCGCAAACAGAGTGAGCCCTTCTTCAAGGGTGACC  
TGGCCAAGAAGAAGATCTACCCACCATCTG

Şekil 20. İnsan G6PD geninin baz dizisi.



## **X'e Bağlı Kalıtımın İlkeleri**

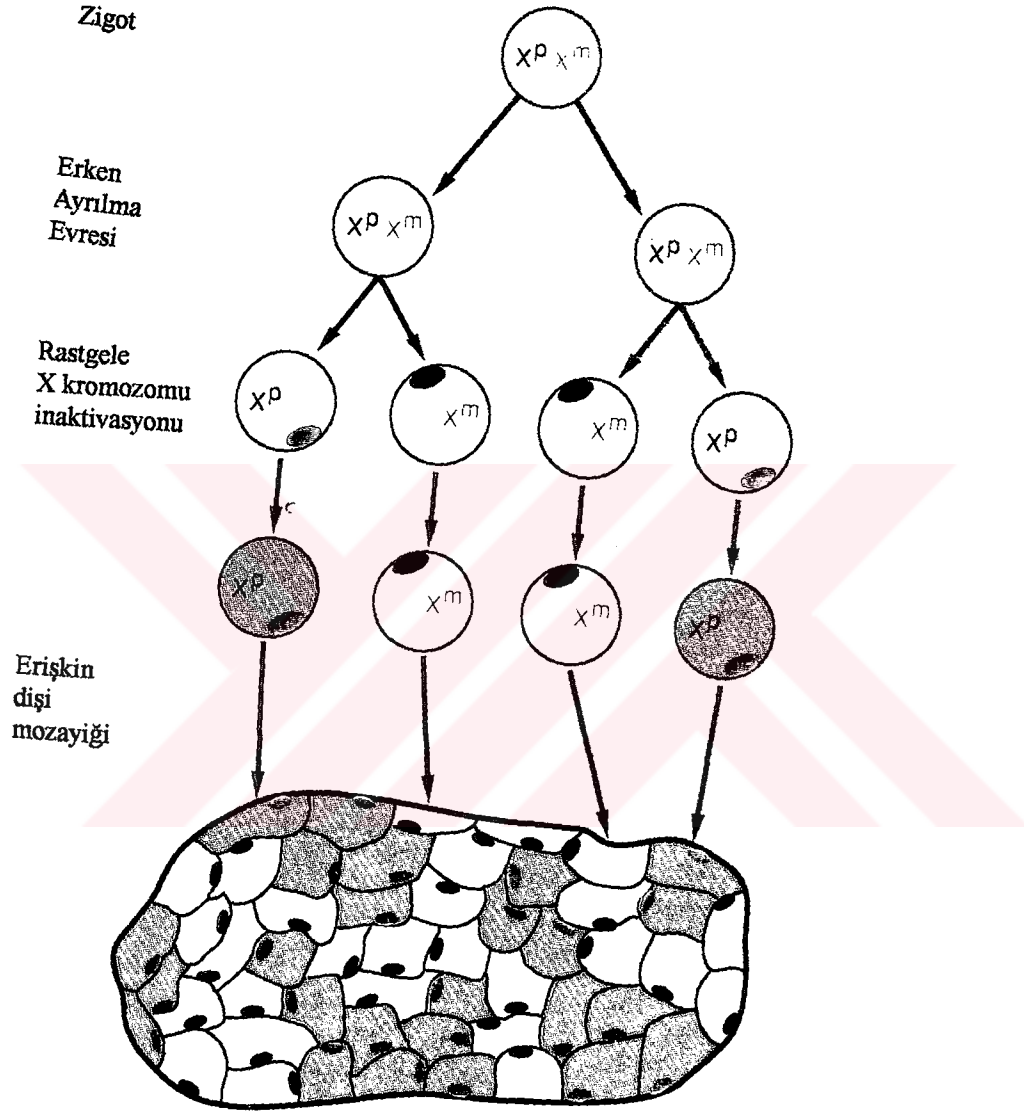
X'e bağlı genlerin ifadesi genetik bilimcileri için uzun yıllar bir soru oluşturmuştur. Dişi bireyler X'e bağlı genleri erkeklerin 2 katı miktarda taşımalarına rağmen her iki cinste oluşan ürün miktarı eştir. Açıklanamayan diğer bir gözlem X kromozomuna bağlı genlerin fenotipik ifadesinin aynı bireyin hücrelerinde farklılık gösterebilmesidir. Bu sorular 1961'de Mary Lyon'un X inaktivasyon (Lyon) hipotezi ile yanıt bulabilmiştir. X inaktivasyon hipotezinin temel ilkeleri kısaca aşağıdaki gibi özetlenebilir;

1. Memeli türlerinde dişilerin her somatik hücresinde iki X kromozumundan sadece 1 tanesi aktiftir.

2. İnaktivasyon embriyonik hayatın erken evresinde gerçekteşir. Fertilizasyondan yaklaşık üç gün sonra morula evresinde başlar, embriyo gelişiminin 1. haftası sonunda tamamlanır.

3. Her hücrede hangi X kromozomunun (anne veya baba kaynaklı) inaktive olacağı rastgeledir ve kalıcıdır. O hücre ve ondan çoğalan kuşaklar aynı inaktif X kromozomunu taşır. Ancak X kromozomlarından birisi yapısal bozukluk gösteriyorsa sıklıkla bu kromozom inaktive olur.

X inaktivasyonu genetik ve klinik olarak önem taşıyan 3 sonuca yol açar. Bunlar doz kompensasyonu, mozaizizm ve dişi bireylerde ifadenin değişkenliğidir (şekil 21).<sup>1, 8, 44, 45</sup>



Şekil 21. Dişi somatik hücrelerinde rasgele X inaktivasyonu Xp: babadan alınan X kromozomu, Xm: anneden alınan X kromozomu. Oval cisimler: X kromozomunun inaktivasyonu ile oluşan Barr cisimcikleri. Erişkin dokusu Xp veya Xm allellerinin fenotipik özelliklerini taşıyan mozaisizm göstermektedir.<sup>8</sup>

## **X'e Bağlı Kalıtımın Özellikleri**

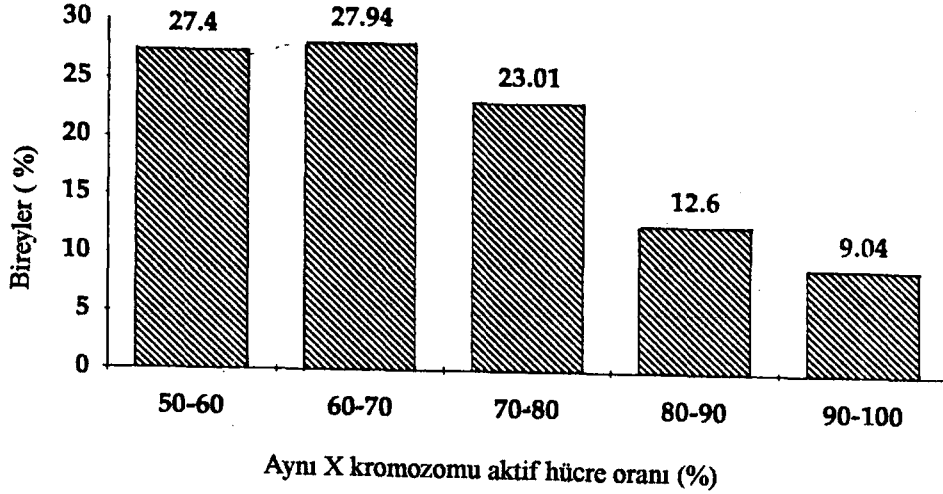
**Doz Kompansasyonu :** İnaktif X kromozomunun yaklaşık tümü kondanse olduğundan genlerin çoğunluğu transkripsiyona uğramaz. Bu nedenle erkek ve dişi bireylerin somatik hücrelerinde X kromozomu üzerindeki genler eş miktarda ifade edilirler.

İnaktive olan kromozomun bazı genleri aktif kalır. Yalancı otozomal kromozom denilen aktif bölgede mayoz bölünme sırasında X ve Y kromozomlarının paylaştığı genler bulunmaktadır. Genomu bu bölgede yer alan steroid sülfataz dişilerde erkeklerdekinin yaklaşık iki katı bulunmaktadır.

**Mozaisizm :** Dişiler farklı X kromozomlarının aktif olduğu iki somatik hücre popülasyonuna sahiptirler (Şekil 21). Buna başka bir ifadeyle X'e bağlı genlerde mozaisizm denilebilir.

**Heterozigotlarda İfadenin Değişkenliği :** Heterozigot dişilerde belirli bir allelin aktif olduğu hücrelerin oranı bireyler arası farklılık gösterir. Rasgele inaktivasyon embriyonik gelişimin erken bir evresinde embriyo sadece 16-64 hücreden oluşurken meydana geldiğinden ve her hücreden çoğalan kuşaklarda aynı X kromozomu inaktive olduğundan dolayı klinik değişkenlik uç boyutlara varabilir. Hatalı genomu taşıyan heterozigot bireyde kusurun tam ifadesi görülebildiği gibi, tümüyle sağlıklı da olabilir.<sup>8</sup>

Neumova ve arkadaşları (1996) sağlıklı 365 kadının lenfositlerinde androjen reseptör geni metilasyon analizi ile yaptıkları çalışmada bireylerin % 27.4'ünde aynı X kromozomu inaktif hücre oranını % 50 olarak saptamışlardır (Şekil 22).<sup>46</sup>



Şekil 22. 365 sağlıklı kadının lenfositlerinde X inaktivasyon fenotipine göre sıklık dağılımı.<sup>46</sup>

X'e bağlı bir gende mutasyon taşıyan bireylerde ise artmış proliferasyon veya yaşam ömrüne yol açan geni taşıyan kromozom daha az oranda inaktive olmaktadır (Migeon 1993).<sup>46</sup>

### **G6PD Eksikliğinin Genetik Aktarımı**

G6PD eksikliği X'e bağlı kalıtımın klasik özelliklerini taşır. Enzim eksikliği hatalı genomu taşıyan hemizigot erkek bireylerde tam olarak ifade edilir. Bireyin tüm eritrositlerinde enzim kusuru söz konusudur ve fenotipik olarak enzim aktiviteleri düşüktür. Heterozigot kadınlarda ise enzim kusuru olan ve olmayan iki eritrosit popülasyonu vardır. İki eritrosit popülasyonunun oranı dış faktörlerle etkilenmediği sürece her birey için sabittir. Değişkenlik göstermekle birlikte normal enzimi taşıyan eritrositlerin oranı daha yüksektir.<sup>8,47</sup> Heterozigot bireylerin fenotipik özellikleri taşıdıkları varyantın özelliklerine ve varyantı taşıyan eritrositlerin oranına göre değişir. Çoğunlukla sağlıklıdırlar veya hafif-orta derecede hastalık belirtileri gösterirler.<sup>48, 49</sup>

Hemizigot baba ile sağlıklı annenin erkek çocukları sağlıklı iken tüm kız çocukları heterozigot olurlar. Heterozigot anne ve sağlıklı babanın kız çocuklarının heterozigot veya sağlıklı, erkek çocuklarının hemizigot veya sağlıklı olma olasılıkları ise eşittir.

### **G6PD Eksikliğinin Genetik Değişkenliği**

G6PD eksikliğinde görülen klinik tabloların, bu bireylerdeki enzim aktivitelerinin, enzimin biyokimyasal özelliklerinin çeşitliliği araştırmacılara G6PD eksikliğinin birden fazla genetik nedene bağlı gerçekleşebileceğini düşündürmüştür. Hastalığın klinik görünümüne ve enzimin biyokimyasal özelliklerine göre günümüze dek 400 farklı enzim G6PD varyantı olarak tanımlanmıştır.<sup>5,6,7,8,14</sup> DNA düzeyindeki analizlerin mümkün olmasıyla bir varyantın çeşitli sayıda genetik değişiklikten kaynaklanabileceği anlaşılmıştır. Bu da G6PD eksikliğinde genetik değişkenliğin tahminlerin üzerinde olduğunu düşündürmektedir.<sup>7</sup>

### **G6PD Varyantlarının Patogenezi**

Spesifik bir enzim eksikliğinin nedeni olarak düşünülebilecek ilk patoloji enzimin sentezlenmemesi olabilir. Bu da gen delesyonuna, ilgili veya komşu genin eksiltme oluşturan mutasyonuna bağlanabilir. Ancak G6PD aktivitesi güvenilir kantitatif yöntemlerle sıfır bulunan kan örneklerinde bile kısmi saflaştırma sonrası enzim aktivitesinin gösterilebilmesi ve bu enzimlerin kinetik özelliklerinde, elektroforetik mobilitesinde ve termostabilitesinde kalitatif değişikliklerin saptanması araştırmacıları farklı bir patogeneze yönlendirmiştir.<sup>2,3,10,11,38</sup> Bunun bir istisnası 1973'de Gray ve arkadaşlarının yaptığı bir aile çalışmasıdır. Bu araştırmacılar 3 erkek kardeşin eritrosit, lökosit ve fibroblastlarında saflaştırma sonrasında da G6PD aktivitesi olmadığını gözlemişlerdir.<sup>10</sup> Ancak bu çalışmanın G6PD varlığının immunolojik yöntemlerle saptanmasını içermediği göz önüne

alınmalıdır. Erkek fare embriyojenik kök hücresindeki G6PD geninin fonksiyonları durdurularak, homolog rekombinasyon ile elde edilen hücre klonlarının etkinliğinin azalması da G6PD aktivitesinin yaşamsal zorunluluğunu desteklemektedir. Günümüzde G6PD eksikliği olan bireyler enzimden yoksun değil yapısal olarak modifiye bir enzim (varyant) taşıyan kişiler olarak düşünülmektedir.<sup>2,3,6,7</sup> Yapısal bozukluk enzimin genetik kodundaki bir hatadan kaynaklanabileceği gibi posttranslasyonel bir bozukluk da enzim eksikliğine yol açabilmektedir.<sup>7, 42</sup>

Yapısal bir bozukluk çeşitli yollarla enzim eksikliğine neden olabilir. 1965'de Itano anormal yapı nedeniyle sentez hızının düşeceğini ileri süren yapı-hız hipotezini ortaya koymuştur. G6PD varyantları için ise en sık neden enzim stabilitesinin düşük olması diğer bir deyişle yıkım hızının artmasıdır.<sup>2, 3, 6, 50</sup>

Marks ve Gross (1959) yaşlı eritrositlerde G6PD düzeyinin daha düşük olduğunu ilk defa göstermiştir. GdA<sup>-</sup>, Mediterranean, Mahidol ve Seattle-like varyantlarında yaşlı eritrositlerde enzim aktivitesindeki düşüşün normal enzime göre daha belirgin olması artmış yıkımı desteklemektedir.<sup>2, 50</sup>

Yapısal değişikliğin aktif enzim molekülü sayısını etkilememesi ama katalitik etkinliğini düşürmesi de söz konusu olabilir (Rosa ve ark., 1970).<sup>2,50</sup> G6PD eksikliğine yol açabileceği düşünülen genetik, yapısal değişiklikler ve biyokimyasal sonuçları Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1. G6PD eksikliğinin olası biyokimyasal nedenleri.<sup>50</sup>

Mutasyon Yeri	Enzimin 1° Yapısı	Eksikliğin Biyokimyasal Temeli	Örnek
Yapısal Gen	Hatalı	↑ Yıkım	Gd A <sup>-</sup>
Yapısal Gen	Hatalı	↓ Katalitik Aktivite	Gd Port Royal
Düzenleyici gen	Normal	↓ Sentez hızı	—
İlgisiz Gen	Normal	↑ Yıkım	KGH'da lökosit G6PD'si

KGH: Kronik granülomatoz hastalık

Katalitik aktiviteyi ve enzim miktarını etkilemeyen varyantlar klinik önem taşımamaktadır. Örneğin G6PD Baltimore-Austin elektroforetik olarak farklı, enzim aktivitesi olarak normale yakındır. G6PD Barbieri, G6PD Seattle varyantlarında ise enzim aktivitesinde belirgin azalma olmasına rağmen önemli klinik bulgular görülmemektedir.<sup>2, 41</sup>

### **G6PD Varyantlarının Tanımlanması**

G6PD varyantları klinik görünümüne ve aktivitelerine göre 5 sınıfa ayrılarak tanımlanmıştır (Yoshida ve ark. 1971, Beutler ve Yoshida 1973).<sup>18,41,51</sup>

**Sınıf 1** : Kronik non-sferositik hemolitik anemi (KNSHA) ile birlikte önemli derecede enzim eksikliği; enzim aktivitesi normalin % 10'undan düşük (Gd Şikago).

**Sınıf 2** : KNSHA ile birlikte olmayan önemli derecede enzim eksikliği; enzim aktivitesi normalin %10'undan düşük (Gd Mediteranean, Gd Mahidol, Gd Union).

**Sınıf 3** : Orta-hafif derecede enzim eksikliği; enzim aktivitesi normalin %10-60'ı (Gd A<sup>-</sup>).

**Sınıf 4** : Enzim eksikliği çok hafif ya da yok; enzim aktivitesi normalin %60-100'ü (Gd A<sup>+</sup>).

**Sınıf 5** : Artmış enzim aktivitesi. Bu sınıfa giren yalnız bir varyant tanımlanmıştır (Gd Hektoen).<sup>18, 41, 51</sup>

Bu varyantların çeşitli kinetik, elektroforetik ve dayanıklılık özellikleri de bildirilmiştir. 1967'de DSÖ karışıklığı önlemek amacıyla G6PD analiz yöntemlerine bir standardizasyon getirmiştir. Buna göre yeni bir varyantın tanımlanması hemizigot erkeklerde, *eritrosit enzim aktivitesi, elektroforetik mobilitesi, G6-P ve NADP<sup>+</sup> için Michaelis sabiti, substrat analoglarının kullanımının rölatif oranı, sıcaklık stabilitesi, optimal pH özelliklerine ve klinik görünümüne göre* yapılmaktadır. Bunların yanı sıra enzimin aktivasyon sıcaklığının, inhibitörlere



yanıtının ve kromatografik ortamdaki göçünün araştırılması ve aile çalışmalarının yapılması önerilmektedir.<sup>51, 52, 53</sup>

G6PD geninin klonlanması ve analizinin mümkün olmasıyla çok sayıda varyantın genetik temeli araştırılmış ve 80 farklı nokta mutasyonu, 3 farklı delesyon mutasyonu saptanmıştır.<sup>3, 7</sup> Gd Nara bu güne dek bulunan 2 den fazla amino asitin delesyona uğradığı tek varyant olması nedeniyle ilginçtir. 318. - 325. amino asitleri delesyona uğrayan bu varyant aktivite göstermekle birlikte stabilitesi azalmıştır. Delesyonların 3 boyutlu insan G6PD modeline göre aktivite için zorunlu bölgelerde bulunmaması bu modeli desteklemektedir.<sup>3</sup>

Bir mutasyon ile tek bir biyokimyasal varyantın ilişkili olacağı düşünülmüştür. Yapılan çalışmalarla aynı mutasyonun farklı biyokimyasal varyantlara yol açabileceği ve aynı varyanta yol açan farklı mutasyonlar bulunabileceği anlaşılmıştır.<sup>6, 7, 14</sup>

Günümüzde varyantlar DNA düzeyindeki kusurlara göre tanımlanmakta aynı mutasyonu taşıyan farklı biyokimyasal ve klinik varyantlar tek bir ad altında tanımlanmaktadır.<sup>7</sup>

Dünya Sağlık Örgütü 1967'de G6PD varyantlarının adlandırılmasına bir standardizasyon getirmiştir. Buna göre enzimin fenotipi ve genotipi Gd ve G simgeleriyle belirtilmektedir.

Tüm populasyon gruplarında en sık görülen (normal) G6PD varyantı Gd B<sup>+</sup>'dir.

DSÖ'ye göre yeni varyantlara coğrafik yörenin adı verilmektedir.<sup>5</sup>

### **Sık Görülen G6PD Varyantları**

**Gd A<sup>+</sup> :** Gd B<sup>+</sup> ile yaklaşık aynı aktiviteyi gösterir. pH 8.0'de elektroforetik olarak Gd B<sup>+</sup>'den daha hızlı hareket eden Gd A<sup>+</sup> varyantının prevalansı zenci erkeklerde %20 oranında bildirilmiştir.<sup>5, 9, 18</sup>



DNA düzeyindeki çalışmalarda bu varyantın nükleotid (nt)376 A→G nokta mutasyonu ile meydana geldiği, bu mutasyonun amino asit dizisinde 126 Asn→Asp değişimine yol açtığı anlaşılmıştır.<sup>3,6,7</sup> Bu mutantın aktivitesi normal düzeylerde olduğu için taşıyan bireyler sağlıklı olmaktadır.

**Gd A<sup>-</sup>** : Aktivitesi normalin %5-15'i olan bu varyant Gd A<sup>+</sup> ile eş elektroforetik mobiliteye sahiptir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yaşayan zenci erkeklerde prevalansı % 11 olarak bildirilmiştir.

DNA analizi ile bu varyantta Gd A<sup>+</sup>'ya yol açan nt 376 A→G mutasyonunun ve ilave bir mutasyonun varlığı gösterilmiştir. 2. mutasyon 3 farklı konumda olabilmektedir; nt 202 G→A, nt 680 G→T, nt 986 T→C. En sık nt 202 G→A mutasyonu görülmekte 68. amino asitin Val→Met değişimiyle sonuçlanmaktadır. nt 376 A→G mutasyonu olmadan enzim aktivitesinin etkilenmediği saptanmıştır.<sup>2, 3, 5, 7</sup> Bu varyantın biyolojik sistemlerde spontan olarak inaktivasyona açık formlara dönüştüğü düşünülmektedir (Babalola ve ark., 1972). In vivo yarı ömrünün 12-13 gün olduğu saptanmıştır.<sup>50</sup>

Hemizigot ve heterozigot olarak Gd A<sup>-</sup> taşıyan bireylerin dolaşımında G6PD'si yeterli yeni sentezlenmiş ve enzim aktivitesi azalmış yaşlı eritrositlerden oluşan hücre karışımı bulunmaktadır. Enzim aktivitesi sitolojik olarak methemoglobin elüsyon testi ile saptandığında görülen G6PD yeterli ve azalmış hücre gruplarının oluşturduğu histokimyasal artefakta, heterozigot kadınlardaki genetik mozaizmden ayırt etmek için pseudomozaizizm denilmektedir.<sup>37, 50</sup>

**Gd Mediterranean (Gd B<sup>-</sup> , Gd Akdeniz)**: Aktivitesi normalin % 0-5'i olan bu varyanta Akdeniz toplumlarında sık rastlanılmaktadır. Elektroforetik mobilitesi Gd B<sup>+</sup> ile aynıdır. G6-P ve NADP<sup>+</sup> için düşük Km değeri olduğu, substrat analoglarını yüksek oranda kullandığı, sıcaklık stabilitesinin düşük, pH optimumunun bifazik olduğu saptanmıştır.<sup>14</sup>

DNA analizinde 2 farklı nokta mutasyonu saptanmıştır. Ekson 6'daki nt 563 C→T missense mutasyonu 188. serin amino asitinin fenil alanine dönüşmesine yol açmaktadır. Ekson 11'de polimorfik olduğu saptanan nt 1311 C→T mutasyonu ise

Mediterranean varyantında % 97, Akdeniz bölgesinde yaşayan sağlıklı bireylerde % 20 oranında görülen sessiz bir mutasyondur. Bu mutasyona Orta Doğu ülkelerinde de sık rastlanılmaktadır.

DNA analizleri Gd Mediterranean'ın heterojen bir grup enzim kusuru olduğunu, benzer biyokimyasal özellik gösteren farklı mutasyonlardan kaynaklanabildiğini göstermektedir (Gd Coimbra, Gd Dallas, Gd Birmingham).<sup>7</sup> Bunun aksine sadece KCl gradiyentinden elüsyon piklerinin farklılığı ile bu varyanttan ayrılan Cagliari ve Sassari varyantlarının da nt 563 C→T mutasyonu taşıdıkları anlaşılmıştır. <sup>5, 6, 7</sup> G6PD Adana olarak tanımlanan varyant da aynı mutasyonu taşımaktadır.<sup>14</sup>

Gd Mediterranean taşıyan eritrositlerde azalmış aktiviteden katalitik olarak kusurlu enzim ve artmış yıkımın sorumlu olduğu düşünülmektedir. <sup>2, 6, 26</sup>

Bu varyantı taşıyan bireyler infeksiyon veya oksidan ajanlara bağlı olarak akut hemolitik krizlere maruz kalmaktadır. Bir kısmında hafif düzeyde kronik hemolitik anemi, yaklaşık %15'inde favizm görülmektedir. Uzamış yeni doğan sarılığı ve Gd Mediterranean arasındaki ilgi de bilinmektedir.

### **Türkiye'de Saptanan Varyantlar**

Türkiye'de en sık görülen G6PD varyantının Mediterranean tipinde olduğu bildirilmiştir (DSÖ, 1981). Diğer G6PD varyantlarının görülme sıklığının düşük olduğu sanılmaktadır.<sup>54</sup>

Türkiye'de ilk kez 1967 yılında Berkal ve ark. Gd Mediterranean varyantını saptamışlardır. Fransa'da (Kahn ve ark., 1975) ve Almanya'da (Gahr M. ve ark., 1976) yaşayan iki Türk ailesinde sırasıyla G6PD Ankara ve G6PD Tarsus varyantları biyokimyasal olarak saptanmıştır. <sup>5, 43</sup>

Aksoy K. ve arkadaşları 1987'de Çukurova Bölgesinde yaptıkları çalışmada Gd Adana, Gd Samandağ, Gd Balcalı biyokimyasal varyantlarını saptamışlardır. <sup>11</sup> Daha sonra Gd Adana'nın Gd Mediterranean ve nt 1311 polimorfik mutasyonu

taşıdığı anlaşılmıştır. Aynı çalışmacılar 1989 yılında birisi ısıya dayanıklı 3 yeni biyokimyasal varyant daha tanımlamışlardır.<sup>38, 42</sup> 1990'da Gd Antakya adı verilen varyant biyokimyasal ve genetik olarak saptanmıştır.<sup>52</sup> Türkiye'de ve Türk ailelerinde saptanan varyantlar ve biyokimyasal özellikleri Tablo 2 ve 3'de görülmektedir.<sup>14</sup>

Tablo 2. Türkiye'de saptanan G6PD varyantları.<sup>14</sup>

Türkiye'de Saptanan Varyantlar		
G6PD Mediterranean	1967	Berkal
G6PD Mediterranean	1973	Altay
G6PD Ankara	1975	Kahn A.
G6PD Tarsus	1976	Gahr M.
G6PD Antalya	1979	Sipahioğlu
G6PD Mersin	1981	Akoğlu T.
G6PD Samandağ	1987	Aksoy K.
G6PD Balcalı	1987	Aksoy K.
G6PD Adana	1987	Aksoy K.
G6PD Antakya	1988	Aksoy K.
Isıya Dayanıklı G6PD	1988	Aksoy K.
G6PD Hacettepe	1989	Kuş S.
G6PD Korkuteli	1989	Alıcıgüzel Y.
G6PD Aksu	1989	Alıcıgüzel Y.
G6PD Serik	1989	Yücel G.
G6PD Çorum	1989	Kuş S.
Gal 6P Kullanımı yüksek	1989	Dikmen N.
G6PD Siirt	1992	Dikmen N.

Tablo 3. Türkiye’de saptanan G6PD varyantlarının biyokimyasal özellikleri.<sup>14</sup>

Varyant	Enzim aktivitesi %	Km (µM)		Substrat Analoglarının Kullanım Oranı ( % )			Optimal pH Eğrisi	Sıcaklık Stabilitesi	
		G6P	NADP	2dG6P	Gal 6P	d NADP			NAD
GD B+	100	50-70	2,9-4,1	4	7-15	55-60	-	N	N
Gd Med.	<10	19-26	1,2-1,6	23-37	20	350	-	Bifazik	Düşük
Gd Adana	0	210	13	38	27	147	-	5,8	0
Gd Samandağ	0	25	18	5	-	-	-	7,9	67
Gd Balcalı	93	38	3	0	-	-	-	5,7	80
G6 PD Antakya	51	667	25	5	2	53	-	4,9	110
G6PD Korkuteli	0	41,2	27	-	-	-	-	9,0	27
G6PD Serik	0	6,8	-	-	-	-	-	4,8	0
Gd Hacettepe	0,5	7,8	0,74	60	47	257	32	Bifazik	Azalmış
Gd Siirt	47	33	5,3	N	N	N	18	8,1	-
Gd Çorum	1	34,7	1,3	14,8	7,5	45,3	25,2	Bifazik	Normal

### G6PD Eksikliğinin Patogenezini Etkileyen Faktörler

**1. Olgun Eritrositler Yeni Enzim Sentezleyemez :** Bilindiği gibi eritrositler biyosentez tepkimeleri için gerekli organeller ve enzim sistemlerinden yoksundur. Çeşitli nedenlerle inaktive olan enzimlerini yenileyemezler. Bu nedenle eritrositlerde enzim miktarını belirleyen başlıca faktör yıkımdır. Diğer dokularda ise enzim miktarındaki azalma yeniden sentezle kompanse edilebilir ve eritrositlerdeki kadar düşük aktivite gözlenmez.<sup>26</sup> G6PD eksikliğinde lens dokusu, böbrekler,

karaciğer, trombositler, süt ve tükürükte de enzim aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. Ancak bu düşüş eritrositlerdekinden daha azdır.<sup>41</sup>

**2. Eritrosit Yaşam Ömrü Göreceli Olarak Uzundur:** Dokuların G6PD aktivitesinin farklılığı hücre yaşam ömrü ile de ilgilidir. Eritrositlerin normal yaşam ömrünün göreceli olarak uzun olması enzim eksikliğinin klinik önemini arttırmaktadır. Örneğin yarı ömrü lökosit yarı ömründen uzun olan Gd A<sup>-</sup> varyantında lökosit G6PD aktivitesi etkilenmezken, eritrositlerde normalin % 5- 15'i oranındadır. Gd Mediterranean varyantında ise G6PD yarı ömrü, lökosit yarı ömründen kısadır. Bu bireylerde G6PD aktivitesi, lökositlerde normalin % 20'si eritrositlerde ise % 0-5'i oranındadır.

Eritrosit ve lökosit G6PD enziminin eş olduğu ve biyokimyasal farklılıkların saflaştırma sırasındaki proteolitik değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir.<sup>53</sup>

**3. Bazal Koşullarda Eritrositlerin Gereksinimlerini Sağlayabilen G6PD Düzeyleri Düşüktür :** Eritrositler yaşlandıkça G6PD düzeyleri de azalır. Sağlıklı bireylerde bu azalma eritrositlerin yaşayabilmesi için sınırlayıcı değildir. Gd B<sup>+</sup> taşıyan en yaşlı eritrositlerin enzim aktivitesi toplam eritrosit popülasyonunun aktivitesinin yarısı kadardır. Bu değer çoğu varyantın toplam eritrosit popülasyonunda görülenden daha yüksektir (Gd A<sup>-</sup> için %15, Gd Mediterranean için % 0-5). Sonuç olarak eritrositlerin bazal koşullarda gereksinimlerini sağlayabilen enzim düzeyi çok düşüktür ve mutantlara göre farklılık gösterebilmektedir.<sup>50</sup>

**4. Analitik Yöntemlerde Koşullar İn Vivo Koşullardan Farklıdır :** Bazal koşullarda hücre içi NADP<sup>+</sup>/NADPH oranı NAD<sup>+</sup>/NADH oranına göre çok düşüktür. Kobay karaciğer hücresinde bu oranlar sırasıyla 0.014 ve 700'dür. Eritrosit içinde 1 µM olan NADP<sup>+</sup> konsantrasyonlarında G6PD enzimi büyük oranda inaktiftir ve ürünü NADPH tarafından inhibe edilmektedir. G6PD aktivitesi analizi ise optimal substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirildiğinden enzimin in vivo davranışı hakkında doğru bir gösterge olmayabilir (Luzzatto, 1967).<sup>31,41, 50</sup>

**5- Sadece Enzim Düzeyi Değil Özgün Enzimatik Özellikler de Etkili Olmaktadır :** Varyantların özellikle NADPH ve NADP<sup>+</sup> bağlama özellikleri normal enzimden farklılık gösterir (Afalayan ve Luzzatto 1971, Luzzatto 1973). Bazal koşullarda eritrosit NADP<sup>+</sup>/NADPH oranlarının düşük olması nedeniyle hücresele G6PD aktivitesini belirleyen faktör enzimin bu metabolitlere afinitesidir. Kinetik özellikleri olumlu (Km NADP<sup>+</sup>'si düşük, Ki NADPH'ı yüksek) varyantın çok az miktarı hücre gereksinimlerini karşılamakta yeterli olacaktır. Mutant enzimlerde ise NADP<sup>+</sup>'ye ilginin azalması yahut NADPH ile inhibasyona duyarlılığın artması oksidan stres olmadan da antioksidan sistemlerin fonksiyonu için yeterli NADPH üretilmemesine ve kronik hemolize yol açmaktadır. Çoğu varyantın Km NADP<sup>+</sup> ve Ki NADPH değerleri arasında resiprokal bir korelasyon vardır ; NADP<sup>+</sup>'ye afinitesi azalmış enzimler NADPH ile daha kolay inhibe edilmektedir. Ancak G6PD eksikliği olgularında NADPH konsantrasyonlarının normal eritrositlerden düşük olması bu bireylerde NADPH inhibisyonunun önemli olmadığını düşündürmektedir.

Km NADP<sup>+</sup>'si düşük olan Gd A<sup>-</sup> varyantı, enzim miktarı sınırlı olmasına rağmen hücresele koşullarda kolaylıkla aktive olabilmektedir. Gd Oklahama ise hücrede sağlanabilenden yüksek konsantrasyonlarda NADP<sup>+</sup> gerektirmekte, bazal koşullarda dahi yeterli NADPH sağlanamamakta ve kronik hemolizle seyretmektedir (Kirkman ve ark., 1960). G6PD Mediterranean'ın NADP<sup>+</sup> ve G6-P için düşük Km değeri olması varyantı taşıyan eritrositlerin çok düşük enzim konsantrasyonlarına rağmen bazal koşullarda yaşamını sürdürebilmesini sağlamaktadır.<sup>41, 50</sup>

**6- Redoks Stres Altında Enzim Miktarı Önem Kazanır :** Redoks stres altında NADP<sup>+</sup> konsantrasyonu artarken NADPH tüketilecek hücresele G6PD aktivitesi maksimum hıza yükselecektir. Bu durumda enzimin kinetik özelliklerinden çok NADPH üretimi için sağlanabilen enzim miktarı önem kazanacaktır. Yapısal bozukluk ne olursa olsun az miktarda G6PD içeren hücreler hemoliz olacaktır (Tablo 4).<sup>50</sup>

Tablo 4. G6PD'nin kinetik özelliklerinin eritrosit yaşamsallığına etkisi.<sup>50</sup>

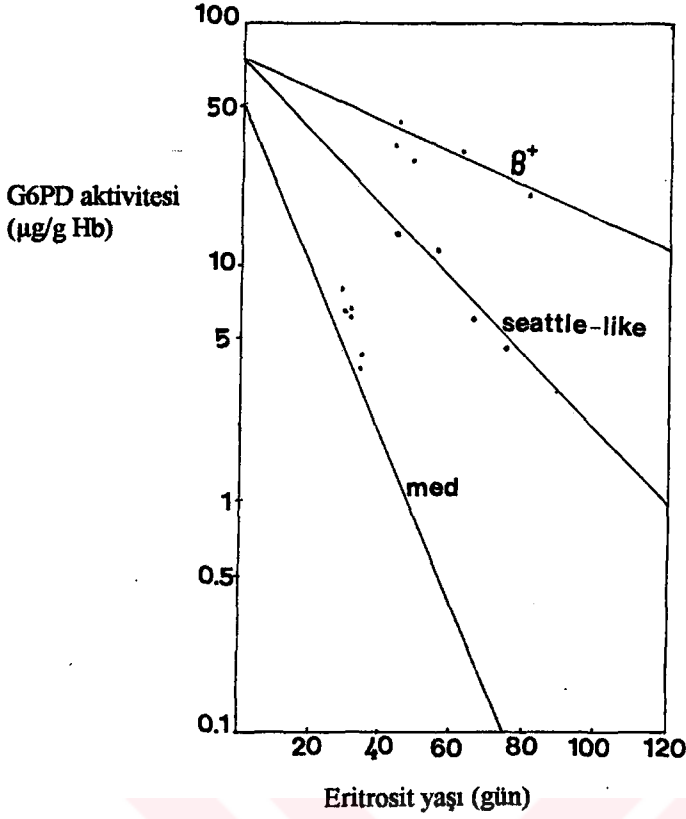
Aktivite	Kinetik Özelliği	Hemoliz	Örnek
Normal	Normal	Yok	G6PD B <sup>+</sup>
Düşük (%15)	Olumsuz	Kronik, ciddi	G6PD Oklahama
Çok düşük (%5)	Normal	Kronik, ciddi	G6PD New York
Düşük	Olumlu	* Sadece redoks stresle indüklenen	G6PD A <sup>-</sup>
Çok düşük	Olumlu	* Sadece redoks stresle indüklenen	G6PD Mediterranean

\* Bu varyantlarda da eritrosit yaşam ömrü kısalmaktadır ancak kronik hemoliz minimal düzeydedir.

**7- G6PD Eksik Hücrelerde Bazal Koşullar da Değişir:** G6PD eksik eritrositlerde mevcut NADPH glutatyon redüktazın kataliz ettiği reaksiyonla tüketilir. Hücre içi NADP<sup>+</sup>/NADPH oranının yükselmesi G6PD aktivitesinin azalmasına uyumlu bir ortam yaratarak az miktarda ve olumsuz kinetik özellik taşıyan varyantlarla bile hücre yaşamının sürdürülmesini sağlar.<sup>41</sup>

**8- Varyantlarda Enzim Stabilitesi Azalmıştır :** Eritrositlerde Gd B<sup>+</sup> varyantının miktarı 62 günlük yarı ömür ile logaritmik olarak azalmaktadır. Varyantlarda çoğu kere enzim stabilitesi azalmış olduğu için aktivitenin düşüşü daha belirgin olmakta ortalama eritrosit ömrünün ksalmasına yol açabilmektedir (Şekil 23).<sup>2</sup>





Şekil 23. G6PD miktarının eritrosit yaşıyla değişimi. y eksenini RIA ile saptanan G6PD proteinini, katalitik aktiviteye oranlanarak elde edilen spesifik aktiviteyi göstermektedir.<sup>2</sup>

**9- Kemik İliğinin Kompansasyonu :** Kronik hemolize bağlı anemi geliştiğinde yahut akut hemolitik krizi takiben, doku hipoksisi kemik iliğinde eritropoezi indüklemekte, retikülositoz meydana gelmekte ve ortalama eritrosit yaşı azalmaktadır. G6PD eritrosit yaşına bağlı bir enzim olduğu için dolaşımdaki eritrositlerin yaşı varyantın yarı ömrünün altına düştüğünde (örneğin akut hemolitik kriz sonrası) eritrosit G6PD aktivitesi normalden yüksek bile bulunabilmektedir.

### G6PD Eksikliği ile İlgili Klinik Tablolar

G6PD eksikliği genetik heterojenite, X'e bağlı kalıtım, dış faktörlerin değişkenliği ve doku dağılım özellikleri nedeniyle değişken klinik görünlere yol açabilmektedir. Bazı bireylerde rastlantısal olarak saptanırken bazı olgular ölümle



sonuçlanmaktadır.<sup>30,54</sup> Dişi heterozigotlar genellikle semptomsuz olarak yaşamlarını sürdürmektedir.<sup>48</sup>

Akut hemolitik krizler G6PD eksikliğinin en tipik klinik görünümünü oluşturur. Etkilenen bireylerde bazal koşullarda azalmış enzim aktivitesi dışında hematolojik bozukluk saptanmamıştır.<sup>55</sup> Favizm bazı özellikleriyle diğer etkenlerle oluşan akut hemolizden farklılık gösterir. G6PD eksikliği kronik hemolitik anemiye ve kronik granüloamatöz hastalığa da yol açabilmektedir. Yeni doğan sarılığının insidansı ve seyri G6PD eksik bebeklerde farklılık gösterdiği bilinmektedir.

**1- Akut Hemolitik Kriz :** G6PD eksikliği olan bireylerde eritrosit antioksidan sistemleri hassas bir denge ile sağlanır. Bu denge hücre oksidan bir stresle karşılaştığında bozulabilir. Oksidan stres viral veya bakteriyel bir enfeksiyon, kendisi veya metaboliti oksidan özellik gösteren bir medikasyon, diabetik ketoasidoz gibi metabolik bir tablo olabilir. Akut hemolitik krizlerin en sık nedeninin enfeksiyonlar olduğu bildirilmiştir.<sup>30</sup> Oksidan stres, bazal koşullarda hücre için yeterli olan NADPH gereksiniminin artmasıyla hemoglobin, hücre membranı bileşenleri ve sitozolik fonksiyonel moleküllerin oksidasyonuna yol açmaktadır. Hemoglobin denatürasyonu ve Heinz cisimciklerinin oluşumu, membran lipidlerinin peroksidasyonu, intravasküler hemoliz ve eritrositlerin RES tarafından dolaşımdan alınmasıyla sonuçlanmaktadır.

Gd A<sup>-</sup> varyantında akut hemolitik krizlerin kendini sınırlayıcı özellikte olduğu görülmüştür. Bu, genç hücrelerin yeterli düzeyde enzim içermesine ve hemolizin yaşlı eritrositlerle sınırlanmasına bağlıdır.<sup>30,41,56</sup> Gd Mediterranean varyantında ise genç hücrelerin de enzim düzeylerinin düşük olması, hemolizin kendini sınırlayıcı özellikte olmamasına yol açmaktadır.<sup>57</sup> Gd A<sup>-</sup> varyantında hemolize yol açmayan ilaçlar da hemolitik kriz nedeni olabilmektedir. Çinlilerde sık görülen Gd Canton varyantı da akut hemolitik krizlerle seyretmektedir.<sup>9</sup>

Akut hemolize yol açan medikasyonlar Tablo 5'de görülmektedir.<sup>1, 9, 41</sup>

Tablo 5. G6PD eksikliğinde hemolize yol açan ilaçlar.<sup>1, 9, 41</sup>

İlaç Gurubu	Hafif Şiddetle Hemolize Yol Açabilenler	Ciddi Seyreden Akut Hemolize Yol Açabilenler
Analjezik ve Antipiretikler	Asetil Salisilik Asit* Antipirin Aminopirin Asetofenatidin* (fenasetin)	Asetanilid
Sıtma İlaçları	Klorokin Primetamin Kinin <sup>+</sup>	Primakin Pamakin Kinosit
Sülfonamidler ve Sülfonlar	Sülfadiyazin Sülfamerazin Sülfametoksipiridazin Sulfisoksazol Sülfaguanidin Kloramfenikol <sup>#</sup>	Sülfacetamid Sülfametoksazol Sülfanilamid Sülfapiridin Tiyazolsülfon
Diğer antibakteriyel ajanlar		Furazolidon Nitrofurantoin Nitrofurazon Nalidiksik asit
Antihelmintik ajanlar		Nidazol Sebopan β-Naftol
Diğer Maddeler	Probenesid K vitamini ve analogları Kinidin <sup>+</sup> Askorbik asit <sup>δ</sup>	Naftalin Fenil hidrazin Tolidin mavisi Metilen mavisi Fenazopiridin İzobutil nitrit Ürat oksidaz

\* Gd A<sup>-</sup> da sadece yüksek dozlarda hafif hemoliz.

# Gd Mediterranean'da hemolitik, Gd A<sup>-</sup> veya Gd Canton'da değil.

+ Gd Mediterranean'da hemolitik Gd A<sup>-</sup> da değil.

δ Sadece masif dozlarda hemolitik.

Akut hemolitik krizlerde tablo, hastanın fark edemediği geçici hafif anemiden, sırt ve karın ağrısı, sarılık, idrar renginin koyulaşması ile kendini gösteren şiddetli hemolize kadar değişebilmektedir. Eritrosit sayısı ve hemoglobin konsantrasyonunun düşüşüyle izlenen anemi ve retikülositozun yanı sıra nadiren hepatosplenomegali görülebilmektedir. Periferik kan yaymasında anizositoz, poikilositoz, sferositler ve koyu boyanmış düzensiz kontrakte eritrositler görülebilir. Akut hemolitik krizin erken döneminde supravital boyama ile Heinz cisimcikleri gözlenebilir. Bunun aksine morfolojik değişiklikler saptanmayabilir.<sup>9,57,58</sup> Plazma bilirubin düzeyi hemolizin derecesine ve karaciğerin indirekt bilirubini kullanmasına bağlı olarak artmış veya normal olabilir. Şiddetli hemoliz serum hemoglobininde artış, haptoglobin düzeyinin düşüşü ve hemoglobinüriye de yol açabilmektedir.<sup>1, 59</sup>

**2- Kronik Hemolitik Anemi :** G6PD eksikliği olan bir grup hastada akut hemolitik krizlerin yanı sıra veya yalnızca kronik hemolizle seyreden anemi görülmektedir.

G6PD eksikliğinde görülen kronik hemolitik anemi eritrosit içinde bazal koşullarda da enzim aktivitesinin yetersiz kalması sonucu meydana gelmektedir. Enzimin NADP<sup>+</sup> ve/veya G6-P'a afinitesinin azalması, NADPH inhibisyonuna duyarlılığın artması, düşük NADP konsantrasyonlarında inaktivasyonu, artmış instabilitesi veya bu faktörlerin kombinasyonu ile sonuçlanan kinetik kusurlar bu yetersizliğe yol açabilir.<sup>50</sup>

Bu gruptaki hastalarda kronik retikülositoz ve/veya kronik anemi görülmektedir. Dikkatli bir anamnezle genellikle yeni doğan döneminde hiperbilirubinemi öyküsü varlığı saptanmaktadır. Splenektomi hastalığın seyrini değiştirmekte etkili değildir.<sup>1</sup>

**3- Favizm :** Favizm G6PD eksikliğinin öldürücü potansiyeli olabilen bir klinik tablosudur ve bu genetik kusurun sık olduğu bölgelerde bir halk sağlığı problemidir. G6PD eksikliği olan bireylerin yaklaşık %20'sinde bakla (vicia faba l.) yenmesinden sonra anemi, hemoglobinüri ve sarılıkla seyreden akut hemolitik krizler gelişmekte ve buna favizm adı verilmektedir.<sup>59, 60</sup> Baklaya duyarlılık daha çok Akdeniz Bölgesi, Ortadoğu ve Güney Asya toplumlarında görülmekte, Gd Med geni ile ilgili olduğu düşünülmektedir.<sup>60, 61</sup> Ancak diğer G6PD mutasyonlarında da (Gd A<sup>-</sup>, Gd Aures) sporadik olgular bildirilmiştir.<sup>28</sup>

Baklanın içerdiği visin ve konvisin adlı iki glikozidik madde favizmde hemolitik krizlerin nedeni olarak gösterilmiştir. Bu bileşikler glukoz ve OH arasındaki  $\beta$  glikozidik bağın ayrışmasıyla divisin ve isouramil adlı metabolitlerine dönüşmekte  $H_2O_2$  oluşumunu arttırmaktadır. Divisin ve isouramilin in vitro koşullarda GS-H ve  $NADP^+$  düzeyini düşürdüğü, hücre membranında çapraz bağlar ve Heinz cisimcikleri oluşumuna yol açtığı  $Ca^{2+}$  ATPaz ve katalazı inhibe ettiği gösterilmiştir.<sup>28,60</sup> İşbir ve Topçu bakla ekstreleriyle yaptığı çalışmada  $Na^+ K^+/Mg^{+2}$  ATPaz enziminin istatistiksel olarak anlamlı olmayan etkilenişini göstermiştir. Bakla bileşeni olan L-Dopa'nın GS-H'ı okside etme özelliği diğer iki alkaloidden az olmakla birlikte sadece bakla yaprağı ve genç bakla çekirdeklerinde bulunması, kuru baklanın L-Dopa içeriğinin düşüklüğü önemlidir.<sup>62</sup>

Favizm çocuklarda daha sık görülmektedir. İtalya'da yapılan bir çalışma favizm olgularının %70' ini pediatrik hastaların oluşturduğunu göstermiştir. Favizm erkek cinsinde daha sık görülmektedir.<sup>59, 61</sup>

Hemolitik krizlerin en sık Mayıs ve Haziran aylarında ve % 94 oranında taze bakla yenmesini takiben geliştiği kuru baklanın sıklıkla Ocak ve Şubat aylarında etken olduğu gösterilmiştir. Bakla yiyen annelerin sütü ile beslenen bebeklerde favizme rastlanılmamıştır. Doğumdan 5 gün önce bakla yiyen bir annenin bebeğinde hemolitik anemi saptanmış anne ve bebeğin G6PD eksikliği için heterozigot olduğu anlaşılmıştır.<sup>61</sup>

İlaçla indüklenen hemolitik krizlere oranla (4-5 gün sonra), favizmde klinik bulgular ortaya daha erken (24-48 saat sonra) çıkmaktadır. Bu grupta serum  $\alpha_2$  globulin düzeyi düşük, bilirubin düzeyleri yüksek bulunmuştur. %79.5 oranında anhaptoglobiniye rastlanılmıştır.<sup>59, 60</sup>

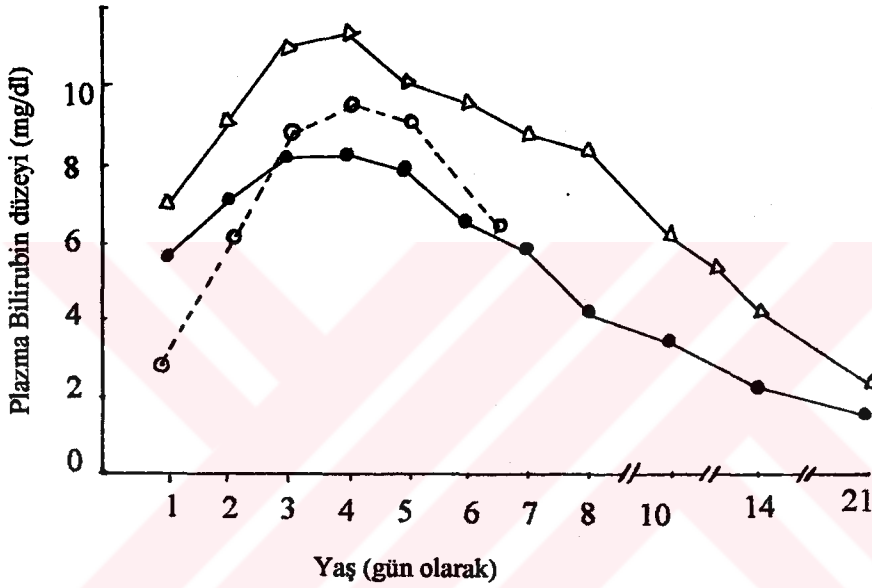
Aynı mutanıt taşıyan bireylerin tümünde favizm görülmemesi, olguların bazı ailelerde sıklığı bir otozomal genin favizmde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Visin ve konvisini toksik metabolitlerine dönüştüren  $\beta$ -glukozidaz düzeylerinin olası etkisi araştırılmış; sağlıklı, favizm göstermeyen ve gösteren G6PD eksik bireylerin ince bağırsak  $\beta$  glukozidaz aktiviteleri arasında anlamlı fark bulunamamıştır.<sup>60</sup> Bakla duyarlılığı olan erkek hemizigot bireylerde genel popülasyona oranla eritrosit asit fosfataz geninin p<sup>a</sup> ve p<sup>c</sup> allellerini taşıma oranının yüksek olduğu gösterilmiştir (Biotini ve ark., 1971). Bakla duyarlılığı olan bireylerde 0 kan grubu insidansının % 45 olduğu saptanmıştır.<sup>59, 60</sup>

G6PD eksikliği için heterozigot bireylerde bakla mevsiminde oksidan ajanlara duyarlı eritrositlerin oranındaki azalma favizm göstermeyen bireylerin çoğunda (6/8) baklaya duyarlılığın olduğunu ancak hemolizin subklinik düzeyde seyrettiğini düşündürmektedir.<sup>47</sup>

**4- Yenidoğan Sarılığı :** Yenidoğan sarılığı pediatriye sık karşılaşılan bir problemdir. Sıklığının G6PD eksikliği olan bebeklerde yüksek olduğu bilinmektedir.<sup>63</sup> Singapur, Hindistan, Yunanistan ve Nijerya'da yapılan çalışmalarda G6PD eksikliğine bağlı olarak görülen yenidoğan sarılığı sıklığı etnik gruplara göre farklılık gösterdiği saptanmıştır.<sup>64, 65, 66, 67</sup>

G6PD Mediterranean ile yenidoğan sarılığı arasındaki ilişki gösterilmiştir. G6PD Mahidol ve G6PD Canton'un tehlikeli düzeyde hiperbilirubinemi nedeni olduğu bildirilmiştir. Bienzele ve arkadaşları (1967) G6PD A<sup>-</sup> varyantını taşıyan bebeklerde etnik kökene göre yenidoğan sarılığı insidansının değiştiğini göstermiştir. Bu değişimin, fizyolojik yenidoğan sarılığında serum bilirubin düzeylerinin etnik gruplar arasındaki farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.<sup>67</sup>

Çeşitli çalışmalarda G6PD eksikliği olan ve olmayan bebeklerde hiperbilirubinemi sıklığı sırasıyla % 22 ve % 9.5, kernikterus sıklığı % 8 ve % 0.3 olarak bildirilmiştir.<sup>65,68</sup> Klinik olarak sarılık G6PD eksikliği olmayan bebeklere göre daha erken ortaya çıkabilmekte (1. gün), daha uzun sürmekte (yaklaşık 3 hafta) ve daha ciddi seyretmektedir.<sup>66, 68</sup> Serum bilirubin düzeyleri sağlıklı, tam ve kısmi G6PD eksikliği olan bebekler arasında farklılık göstermektedir (Şekil 24).<sup>68</sup>



Şekil 24. G6PD aktiviteleri normal, kısmi ve tam yetmezlikli yenidoğanların plazma bilirubin düzeyleri.<sup>68</sup>

Yenidoğan sarılığında hiperbilirubinemiden sorumlu mekanizma açıklık kazanmamıştır. G6PD eksikliği olan bebeklerin tümünde yenidoğan sarılığı gelişmemesi bu komplikasyona yol açan ilave faktörlerin varlığını düşündürmektedir.

Valaes ve ark. (1969), Tan (1981) bu bebeklerde Hb değerlerinin düşük, retikülosit oranları ve serum indirekt bilirubin düzeylerinin yüksek olması nedeniyle hiperbilirubinemi nedeni olarak hemolizi ileri sürmüştür.<sup>62, 66</sup>

G6PD eksikliği olan bireylerde eritrosit yaşam ömrünün kısa olması oksidan stres olmadığı koşullarda da görülen yenidoğan sarılığının artmış hemolizden kaynaklandığını desteklemektedir. Ancak olguların çoğunda artmış hemolizi gösteren bulgular saptanmamış veya hiperbilirubineminin derecesi ile ilgili bulunmamıştır.<sup>65,69,70</sup> Brown ve ark. (1968) direkt bilirubin fraksiyonundaki artış nedeniyle yetersiz hepatik klirensin etkili olabileceğini ileri sürmüştür.<sup>65</sup> Malaka ve ark. (1973) G6PD eksikliği ve yenidoğan sarılığı olan bebeklerde karaciğerin salisilamid glukuronidasyonunda önemli azalma olduğunu göstermiştir.<sup>69</sup> Aynı çalışmacılar bu bebeklerde idrarla D-glukarik asit atılımının azaldığını ve glukuronik asit metabolizmasında rol alan karaciğer mikrozomal enzimlerin aktivitesindeki düşüklüğe bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.<sup>70</sup>

Yenidoğan sarılığı olan G6PD eksik bebeklerin yaklaşık yarısında oksidan bir ajan veya infeksiyon gibi oksidan bir stres saptanamamıştır.<sup>30,66</sup> Bu bebeklerde hiperbilirubinemi nedeni olabilecek diğer bir etken de tespit edilememiştir.

Farklı etnik gruplarda fizyolojik yenidoğan sarılığında serum bilirubin düzeylerinin farklılık göstermesi de etkili olabilmektedir.<sup>65</sup>

$\alpha$ -Talaseminin G6PD eksikliği olan bebeklerde hiperbilirubinemiye eğilimi arttıran bir etken olabileceği düşünülmüştür. Ancak  $\alpha$ -talasemi ile birlikte G6PD eksikliği olan bebeklerde serum bilirubin düzeyleri ve hiperbilirubinemi sıklığının sadece G6PD eksikliği olan bebeklerden farksız olduğu saptanmıştır.<sup>71</sup>

G6PD yanı sıra glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon peroksidaz (GP) enzimleri de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve organik peroksitlerin zehirsizleştirilmesinde rol aldığından bu enzimlerin olası eksikliklerinin varlığı araştırılmıştır. GR, G6PD eksikliğinde artış göstermektedir. G6PD eksikliği olan normo ve hiperbilirubinemili bebeklerde GR aktiviteleri anlamlı fark göstermezken G6PD eksikliği olmayan bebeklerde hiperbilirubinemili grupta GR aktiviteleri düşük bulunmuştur. GR aktivitesi genç eritrositlerde daha yüksek olduğu için düşük GR aktivitesinin yenidoğan sarılığında sonuç değil neden olması olasıdır. Yenidoğanlarda katalaz düzeyinin erişkinlerden



düşük oluşu da diğer antioksidan sistemlerin yetersizliğini belirgin hale getirmektedir.<sup>63</sup>

### **G6PD Eksikliğinin Coğrafi Dağılımı ve Prevalansı**

Eritrosit G6PD eksikliğinin yeryüzünde yaklaşık 400 milyon insanı etkilediği düşünülmektedir. Dağılımın coğrafi ve etnik farklılıklar göstermesi ilave genetik veya çevresel faktörlerin varlığını düşündürmektedir.<sup>13,30,38,59</sup>

Coğrafik veriler, saha çalışmaları ve in vitro kültür çalışmaları G6PD eksikliğinin sıtma paraziti Plasmodium falciparuma karşı rölatif koruma sağladığını ve sıtmanın endemik olduğu bölgelerde prevalansının yüksek olduğunu göstermektedir.<sup>72, 73</sup>

G6PD eksikliğine Afrika, Güney Avrupa, Ortadoğu, tropikal ve subtropikal Asya toplumlarında sık rastlanılmaktadır.<sup>38</sup> Akdeniz toplumlarında: İtalya, Yunanistan, Suriye, Mısır, Suudi Arabistan ve Türkiye'de G6PD eksikliği prevalansının yüksek olduğu bilinmektedir.<sup>5, 13, 38, 48, 66</sup>

G6PD eksikliği prevalansı Amerikalı zenci erkeklerde % 11-15, kadınlarda % 2 tam ve % 5 kısmi yetmezlik olmak üzere toplam % 7 oranlarında saptanmıştır.<sup>74, 75</sup>

Singapur'da yenidoğan dönemindeki bebeklerde yapılan bir çalışmada G6PD eksikliği prevalansının etnik gruplara göre değiştiği gösterilmiş, Çinlilerde % 1.36, Malezyyalılarda % 1.34 ve Hintlilerde % 0.48 oranında bildirilmiştir.<sup>65</sup>

Fujii (1978) Japonya'da G6PD eksik varyantların sıklığını % 0.1 olarak saptamıştır. Nakatsuji ve Miwa (1979) 3000 kişilik bir grupta yaptıkları çalışmada benzer bir sonuç elde etmişlerdir (% 0.5).<sup>40</sup>

Valeas ve arkadaşları (1979) erkek yenidoğan bebeklerle yapılan bir çalışmada Yunanistan'da G6PD eksikliği prevalansının coğrafi bölgelere göre önemli farklılıklar gösterdiğini saptamıştır. Enzim eksikliğine Alexandra bölgesinde % 2.92, Lesbos bölgesinde % 4.93 ve Rodos'ta % 12.5 oranında rastlanılmıştır.



Smith Yunanistan'da 400 yenidoğan bebekte G6PD eksikliği prevalansını % 4.3 olarak saptamışlardır. Erkek bebeklerin % 2.9'unda enzim düzeyi düşük, % 0.5'inde hafif düşük iken, kız bebeklerin % 5.2'sinde hafif düşük olarak bulunmuştur.<sup>48, 66</sup>

Bir Akdeniz ülkesi olan ve farklı etnik grupların yaşadığı yurtdışında da G6PD eksikliği prevalansı araştırılmış ve coğrafi ve etnik gruplar arasında farklılık gösterdiği saptanmıştır. Türkiye'de bu konuda ilk çalışmalar Say ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. 1963 yılında Ankara'da 1000 erkek yenidoğan bebekte yapılan çalışmada G6PD eksikliği prevalansı % 0.5 olarak bulunmuştur. Aksoy M. ve ark. (1980) Türkiye genelinde G6PD eksikliğin prevalansını % 0.6 olarak bildirmiştir.<sup>76</sup>

Say ve arkadaşları etnik ve coğrafi gruplar üzerinde yaptıkları çalışmada İstanbul'da yaşayan Rum (n:107), Ermeni (n:101), Kürt (n:93) etnik gruplarında G6PD eksikliğine rastlamamışlardır. G6PD eksikliği insidansı Diyarbakır'da yaşayan Kürtçe konuşan Türk'lerde (n:203) % 1.92, Kıbrıs'lı Türk'lerde (n:200) % 3.5, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde (n:152) % 0, Adana ve Tarsus bölgesinde yaşayan Eti Türklerinde (n:158) % 8.2 ve İzmir'de (n:212) % 0.94 olarak belirtilmiştir.<sup>13</sup>

Aksoy M. ve arkadaşları çoğunluğu Gümölcine, Selanik ve İskeçe'den göç eden Batı Türk'lerinde G6PD eksikliğine % 5 oranında rastlandığını bildirmişlerdir.<sup>76</sup>

Yüreğir ve arkadaşları (1989) Çukurova Bölgesinde yaptıkları çalışmada G6PD eksikliği prevalansını bölge genelinde erkek popülasyonda % 8.4 bulmuşlardır. Bu olguların % 3.8'inin tam yetmezlikli, % 4.6'sının hafif yetmezlikli olduğu saptanmıştır. Çukurova Bölgesinde küçük yerleşim birimleri arasında da G6PD eksikliği prevalansı farklılık göstermekte ve % 1.2 ile % 21.2 arasında değişmektedir.<sup>11, 12, 38</sup>

Tarsus ve Hatay yöresinde G6PD eksikliği prevalansı % 10-17 olarak saptanmıştır. Özgür ve arkadaşları Ege Bölgesinde eksikliğin % 2.3 oranında görüldüğünü bildirmiştir.<sup>5</sup> Gaziantep Bölgesinde G6PD eksikliği ile ilgili çalışmalar

bu güne dek 18 kişilik bir grubun araştırılmasıyla sınırlı kalmıştır Bu grupta enzim eksikliği saptanmamıştır (Vuruşkan E).

Türkiye’de G6PD eksikliğinin bölgesel çalışmalarda saptanan sıklıkları Tablo 6’da görülmektedir. <sup>14</sup>

Tablo 6. Türkiye’de bölgesel çalışmalarda saptanan G6PD eksikliği sıklıkları. <sup>14</sup>

Yıl	Araştırmacı	Bölge veya etnik grup	G6PD eksikliği oranı
1965	Say ve ark.	Batı Anadolu	% 1,5
		Eti Türklerinde	% 8,2
		Ankara	% 1’den az
		Türkiye genelinde	% 0,5
1966	Özgür ve ark.	Ege	% 2,3
1968	Aksoy M ve ark.	Türkiye genelinde	% 0,6
1972	Aksu	Erzurum	% 1’den az
1975	Özsoylu ve Şahinoğlu	Tarsus	% 10
1977	Özsoylu ve ark.	Çukurova	% 21,2
1978	Akoğlu ve ark.	Eti Türklerinde	% 16,5
1979	Sipahioğlu	Ege Bölgesi	% 2,9
1980	Aksoy M ve ark.	Manavgat-Serik-Boztepe	% 5-20
1981	Akoğlu ve ark.	Çukurova	% 5,8
1982	Kılınç	Çukurova	% 20,2
1984	Yüreğir ve ark.	Çukurova	% 8,2
1985	Aksoy M ve ark.	Batı Trakya Türkleri	% 5
1990	Aksoy M ve ark.	Antalya	% 9,2
1992	Aksoy ve ark.	Adana Yeşilköy	% 7,8
1994	Aksoy ve ark.	İçel Kazanlı	% 3,8
1997	Şekeroğlu ve ark.	Van Yöresi	% 0

## Sıtma Endemisinin G6PD Eksikliği Prevelansına Etkisi

Genetik geçiş gösteren G6PD eksikliği prevalansının Plasmodium falciparuma bağlı sıtmanın endemik olduğu bölgelerde yüksek olması dikkat çekmektedir.<sup>3, 72</sup> G6PD eksikliğinin Plasmodium falciparum varlığında seçici bir avantaj sağlayabileceği düşüncesi ilk kez Allison (1960) ve Motultsky (1960) tarafından ileri sürülmüş, bazı saha çalışmalarıyla da desteklenmiştir (Luzzatto ve ark. 1969, Siniscalco ve ark. 1966, Luzzatto 1979, Guggenmoos-Holzmann ve ark. 1981). Martin ve ark. (1979), Bernstein ve ark. (1980) tarafından ise kabul görmemiştir.<sup>72, 77</sup>

G6PD eksikliği olan bireylerin eritrositlerinde artan GS-SG konsantrasyonunun protein sentezini inhibe ettiği ve parazit proliferasyonunu yavaşlatarak sıtma varlığında seçici bir avantaj sağladığı ileri srlmştir (Kosower ve Kosower 1970). Friedman (1979) serbest radikal üreten kaynaklara maruz kalmanın parazit çoğalmasını inhibe ettiğini göstermiştir. Hücresel GS-H ve membran tiyol grupları diamid ile okside edildiğinde hemoglobin ve hücre membranı serbest radikal hasarına uğramadan da G6PD eksikliği olan hücrelerde parazit çoğalmasının yavaşladığı saptanmıştır. Sıtmaya karşı direncin kısmi artışı endemik bölgelerde G6PD polimorfizmini açıklamaktadır.<sup>72</sup>

G6PD eksikliğinin sıtmaya karşı koruyuculuğu fenomeninin sadece heterozigot dişi bireylerde görüldüğü ileri srlmştir.<sup>5</sup> Usanga ve Luzzatto (1985) parazitin önceki üreme döngüsünün gerçekleştiği konak hücre tipine uyum sağladığını ve G6PD eksik hücre kültürlerinde üretilen parazitlerin G6PD genlerinin aktif hale geçtiğini göstermişlerdir. Bu teoriye göre heterozigot bireyin infekte eritrositinde çoğalan parazitin sonraki şizogonik döngüyü sürdürme şansı % 50 oranında azalmaktadır. Normal veya varyant bir G6PD geni için hemizigot veya homozigot olan bireyde ise sıtmaya karşı koruyuculuk fenomeni gerçekleşmemektedir.<sup>73</sup> Ruwende ve arkadaşları (1995) ise 2000 Afrikalı ocuk

üzerinde yaptıkları çalışmada Gd A<sup>-</sup> geninin ciddi sıtma infestasyonuna karşı koruyuculuğunun % 46-58 oranında olduğunu, dişi heterozigot ve erkek hemizigot bireylerde değişmediğini bildirmişlerdir.

### **G6PD Eksikliği Tanı Yöntemleri**

G6PD eksikliğinin tanısı, G6PD aktivitesinin nitel veya nicel analizi, immunokimyasal olarak enzim varlığının gösterilmesi veya NADPH'ın indirgen özelliğine dayalı yöntemlerle konulabilir.

Hemizigot erkeklerde tarama testleri veya nicel enzim analizleri yeterli olmaktadır. Akut hemolitik kriz sonrasında ise, yaşlı eritrositlerin dolaşımdan uzaklaşması nedeniyle, G6PD aktivitesinin heksokinaz veya AST gibi eritrosit yaşına bağımlı bir enzim aktivitesi ile oranlanması veya daha yoğun, yaşlı eritrositlerin analizi önerilmektedir.<sup>41, 78</sup>

Heterozigotlarda da G6PD eksikliğinin tanısı bazı zorluklar göstermektedir. Geleneksel tarama testleri yeterli olmazken nicel analizlerin sonucu varyantın aktivitesine, normal ve G6PD eksik eritrositlerin oranına bağlı olarak değişir. Bu koşullarda, az sayıda G6PD eksik eritrositlerin gösterilmesini sağlayan özel teknikler kullanılmaktadır.<sup>25, 41</sup>

G6PD eksikliğinin tanısında kullanılan yöntemler ana başlıklar halinde aşağıdaki gibi özetlenebilir.

#### **A) Tarama testleri**

- Heinz cisimcikleri oluşturma testi
- G-SH dayanıklılık testi
- Boya kullanılan tarama testleri
  - Brillant krezil mavisi
  - Dikloroindofenol
  - MMT [3(4,5 dimetilthiazolil) 2,5 difenil tetrazolyum bromid]
- Metilen mavisini indirgeme testi

- Methemoglobin redüksiyon testi
- Askorbat-siyanit testi
- Floresans spot testi

**B) Normal ve G6PD eksik eritrositlerin oranını belirleyen testler**

- Methemoglobin Elüsyon Testi
- Tetrazolyum sitokimyasal yöntemi

**C) Nicel enzim analizleri**

- Spektrofotometrik olarak NADPH oluşum hızının saptanması
- Glock ve Mc Lean analizi
- Florometrik olarak NADPH oluşum hızının saptanması
- Kıyaslamalı kantitatif enzim elektroforezi

**D) G6PD'nin kalitatif karakterizasyonu**

Enzimin kısmi saflaştırılması sonrası biyokimyasal özelliklerinin saptanmasını (Km, substrat analoglarını kullanım oranı, elektroforetik mobilite, optimal pH, optimal sıcaklık, sıcaklık stabilitesi ve kromatografik göç gibi) içermektedir.

**E) G6PD varyantlarının genetik düzeyde tanımlanması**

- DNA dizi analizi
- c DNA analizi
- Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve tek sarmal konformasyon polimorfizm analizi (SSCP)
- Restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi (RFLP)
- Haplotip analizi
- Klonlama Yöntemi

Günümüzde tarama testlerinin çoğu özgünlük, ve/veya duyarlılıklarının düşük, uygulamanın zor, zaman alıcı olması nedeniyle kullanılmamaktadır. DSÖ (1979) tarama testi olarak floresans spot testini önermiştir.<sup>79</sup> Günümüzde saha

araştırmalarında floresans spot testi, klinik laboratuvarlarda NADPH oluşum hızını ölçen nicel enzim analizleri tercih edilmektedir. G6PD'nin kalitatif karakterizasyonu ve genetik analizler araştırma laboratuvarlarının konusudur.

**1- Heinz Cisimciklerinin Gösterilmesi :** Metil moru veya kristal moru ile supravital boyama sonrası Heinz cisimcikleri koyu mor renkte 1-4 µm çapında ve genellikle hücre membranına birleşik olarak görülürler. Heinz cisimcikleri G6PD eksikliği yanı sıra sağlıklı kişilerde antioksidan sistemleri açan miktarda oksidasyona maruz kalındığında, dayanıksız hemoglobin veya talasemi varlığında da görülebilir (Dacie 1975).<sup>9</sup>

**2- Heinz Cisimcikleri Oluşturma Testi :** Eritrositler asetilfenilhidrazinle inkübe edildiğinde normal eritrositlerde 1-2 tane hücre membranına birleşik 1-2 µm çapında Heinz cisimciği görülür. G6PD eksik duyarlı eritrositlerde ise çok sayıda, küçük ve hücre içine serpiştirilmiş şekildedirler.<sup>33, 58</sup>

**3- Beutler'in Glutatyon Stabilite Testi :** G6PD eksikliği olan bireylerin kanı asetilfenilhidrazinle inkübe edildiğinde eritrosit G-SH düzeyleri hızla düşer. Eritrosit G-SH düzeylerinin kolorimetrik ölçümüyle birlikte bu test G6PD eksikliğinin tanısında yararlı olabilmektedir.<sup>58,71,78</sup>

**4- Motulsky'in Boya Redüksiyon Testi :** G6P, NADP<sup>+</sup>, brillant krezil mavisi ve tampon karışımının hemolizatla inkübasyonu sonrası örnekte G6PD varlığında açığa çıkan NADPH'ın boyayı indirgeyerek renksizleştirmesi esasına dayanır. Bu redüksiyonun gerçekteşmesi için gerekli süre enzim aktivitesiyle ters orantılıdır. Beklemiş örneklerde uygulanabilen bu test özgündür ve az miktarda örnek gerektirir ancak heterozigotlarda ve akut hemolitik kriz sonrası kompensasyon döneminde yanlış negatif sonuçlar verebilmektedir (Fairbanks, 1969).<sup>9, 33, 66</sup>

**5- Diklorindofenol (DCIP) Dekolorizasyon Testi :** NADPH'ın DCIP'yi renksizleştirmesi esasına dayalı bir tarama testidir. Fenazin metosülfat NADPH ve DCIP arasında elektron transferini gerçekteştirmesi amacıyla test ortamına eklenir.<sup>33,</sup>

**6- Beutler'in Spot Testi :** Bu test fenazin methosülfat varlığında NADPH'ın MMT boyasını indirgeyerek mor renk oluşturması esasına dayanır. Hemoglobin MMT ile non spesifik reaksiyon oluşturduğu için ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Bu yöntem heterozigotların tanısı için yeterli olmamaktadır.<sup>58,75</sup>

**7- Metilen Mavisini İndirgeme Testi :** Glukoz varlığında normal hücreler metilen mavisini renksiz lökometilen mavisine indirgerler. Hücre içinde yaklaşık 4 saatte boya yeniden okside olarak mavileşir. G6PD eksik hücreler metilen mavisini indirgeyemezler, okside boya hücre içine giremez. Heparinli mikrohematokrit tüplerine alınan kan satrifüj sonrası metilen mavisini ile inkübe edilir ve yayma hazırlanır. Sağlıklı bireylerin eritrositlerinin yaklaşık %10'u mavi boyanırken G6PD eksikliğinde bu oran % 0.0 - 0.2 arasındadır.<sup>58</sup>

**8- Methemoglobin Redüksiyon Testi :** Hemoglobin sodyum nitrit ile metHb'e okside olur. Metilen mavisini veya Nil sülfat boyası varlığında, metHb methemoglobin redüktaz sistemince hemoglobine indirgenirken NADPH kullanılır. G6PD eksik hücrelerde yeterli NADPH olmadığı için kahverengi renkli metHb indirgenmez. Örnek tüpü kontrol tüpü ile görsel olarak karşılaştırılarak değerlendirilir (Brewer, 1962).<sup>25,58</sup> Bu testin nicel formunun duyarlılığı spektrofotometrik yöntem ile karşılaştırılabilir düzeydedir. Heterozigot bireyler % 70-80 oranında tanınabilmektedir.<sup>33</sup>

**9- Jacob ve Jandl'ın Askorbat-Siyanit Testi :** Sodyum siyanit ve sodyum askorbatla inkübe edilen kanda askorbik asit ve hemoglobinin eşli oksidasyonu ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşur. Test koşulları içinde katalaz, siyanit ile inhibe olduğu için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hemoglobin ile reaksiyona girerek kahverengi renkli metHb oluşur. (Jacob, 1966). Tarama testleri içinde en duyarlı olan bu test özgün değildir. İntakt hücreler kullanılarak heterozigotlarda ve akut hemolitik kriz sonrası dönemlerde de tanı olanağını sağlarken pirüvat kinaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz eksikliği, paroksizmal nokturnal hemoglobinüri ve dayanıksız hemoglobinler ile yanlış pozitif sonuçlar vermektedir (Fairbanks, 1969).<sup>9, 25, 49</sup>



**10- Floresans Spot Testi :** Filtre kağıdı üzerinde G6-P,NADP<sup>+</sup>, saponin, GS-SG ve tampon karışımına eklenen tam kan, uzun dalga ultraviole ışığında gözlenir. G6PD varlığında oluşan NADPH floresans verecektir. Hafif yetmezlikli olgularda oluşan az miktardaki NADPH glutatyon redüktaz tarafından okside edilerek testin heterozigotlarda güvenilirliğini arttırmak amaçlanmıştır (Beutler 1979, Beutler 1984).<sup>18,52,58,79</sup> Yine de heterozigotların tanısında (G6PD aktivitesi %20'nin üzerinde olduğunda) ve akut hemolitik krizler sonrası, tanıda yeterli olmadığı ve anemilerde yanlış negatif sonuç verdiği düşünülmektedir.<sup>25,80</sup>

**11- Methemoglobin Elüsyon Testi :** Siyanmethemoglobinin (HbFe<sup>+3</sup>CN) seçici elüsyonu ve oksihemoglobin taşıyan eritrositlerin boyanması esasına dayalı sitokimyasal bir testtir. Teorik olarak heterozigot G6PD eksikliğinin kesin tanısı G6PD analizleri ile konulamadığından bu yöntem önem taşımaktadır.<sup>25,49</sup> MetHb redüksiyon testindeki gibi önce oksijen saturasyonu arttırılan daha sonra sodyum nitrit ve Nil mavisi sülfat ile inkübe edilen tam kana, KCN eklenerek metHb, HbFe<sup>+3</sup>CN'e dönüştürülür. HbFe<sup>+3</sup>CN'in seçici elüsyonundan sonra HbO<sub>2</sub> içeren hücreler hemotoksilen eozin ile boyanarak mikroskopta incelenir. Dişi heterozigotlarda hayalet (boyanmamış) hücrelerin oranı genellikle % 40-60 arasındadır. Bazı olgularda % 2 - 3 kadar düşük bulunabilmektedir.<sup>25</sup>

**12- G6PD Tetrazolyum Sitokimyasal Yöntemi:** İntakt hücrelerdeki hemoglobin, sodyum nitrit ile metHb'e dönüştürülür. Pentoz fosfat yolunun ve NADPH-bağımlı met Hb redüktazın aktivasyonu sonrası ortama MMT eklenir. G6PD eksik hücrelerde methemoglobin MMT'yi mor renge dönüştüremez. Renkli granülasyonu içermeyen hücrelerin oranı tespit edilir (Fairbanks).<sup>33,41</sup>

**13- G6PD Aktivitesinin Nicel Spektrofotometrik Analizi :** G6PD glukoz 6-fosfatın 6-fosfoglukanolaktone dönüşümünü kataliz ederken 1 molekül NADP<sup>+</sup> indirgenir.





Reaksiyon ortamında NADPH konsantrasyonu artış hızı G6PD aktivitesi ile koreledir. NADP<sup>+</sup> ultraviyole ışığa geçirgen iken NADPH ultraviyole ışığı şiddetle absorbe eder. 340 nm'deki absorbans artış hızı ile enzim aktivitesi saptanır.

Bu yöntemle G6PD ve 6-fosfoglukanat dehidrogenaz (6-PGD) reaksiyonlarında oluşan NADPH ölçülmektedir. Çünkü tüketilen bir G6-P molekülüne karşılık 2 molekül NADPH açığa çıkmaktadır.<sup>18,25</sup>

**14- Glock ve Mc Lean Analizi :** Sadece 6-PGD reaksiyonu ile oluşan NADPH'nin saptanması ve toplam aktiviteden çıkarılmasını öngören bir yöntemdir.<sup>18,74</sup> 6-fosfoglukonat ve 6-fosfoglukonat+G6-P içeren iki ilave küvet kullanımı ile bu analiz gerçekleştirilmektedir. Ancak hemolitik anemi nedeni olarak eritrosit 6-PGD eksikliği olgusu bildirilmemiş olması ve normal 6-PGD aktivitesinin G6PD eksikliğini maskeleyememesi rutin amaçlarla Glock ve Mc Lean analizi uygulanması gereğini ortadan kaldırmaktadır.<sup>18</sup>

Dror ve ark. ortama 6-PGD ilavesinin okside olan her G-6-P molekülü için 2 molekül NADPH oluşumunu sabit hale getirdiğini ve analizin kararlılığını arttırdığını ileri sürmüşlerdir. Nicholson ve ark. (1974) bunu doğrulamış ve santrifugal bir analizöre otomatize bir yöntem olarak adapte etmişlerdir.<sup>55</sup>

**15- G6PD Aktivitesinin Nicel Florometrik Analizi :** Florometrik analiz de NADPH oluşum hızına dayalı bir yöntemdir. Ancak kantitasyon NADPH'nin floresansının ölçümü ile yapılmaktadır. Spektrofotometrik yöntemle göre duyarlılığı yüksektir, daha az örnek gerektirir, bu nedenle hemoglobinin interferansı minimumdur. Tan ve ark. otomatize florometrik bir yöntem tanımlamışlardır. Lowe (1972), Glock ve Mc Lean analizi yaklaşımını florometrik olarak uygulamışlardır.<sup>33</sup>

**16- Kıyaslamalı Nicel Enzim Elektrofrezisi :** Hemolizatın pH: 9.1'de selüloz asetat elektrofrezini takiben G6PD ve 6-PGD reaksiyonlarının ayrı ayrı gerçekleştirilmesi, oluşan NADPH'nin MTT'yi indirgemesi ve enzim aktivitelerinin dansitometre ile kantitatif analizi esasına dayalı bir yöntemdir. Smith ve ark. (1975)

G6PD aktivitesini 6-PGD aktivitesine oranlayarak ifade etmiş ve heterozigotlarda da güvenilir tanısal değeri olduğunu saptamışlardır.<sup>48</sup>

**17- G6PD'm Solid Faz Radyo İmmun Analizi (RIA) :** BrCN ile aktive agaroza adsorbe ettirilen tavşan kaynaklı saflaştırılmış insan G6PD B<sup>+</sup> IgG antikoları ile radyoionize G6PD (<sup>125</sup>I-G6PD) arasındaki reaksiyonun hemolizattaki enzimle inhibisyonu esasına dayalı bir yöntemdir. Morelli ve arkadaşları (1978) bu yöntemi kinetiği olumsuz varyantlarda enzim varlığını immunolojik olarak göstermek amacıyla uygulamışlardır.<sup>2</sup>

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Örneklerin Sağlanması

Çalışmamıza Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi'ne ve Şehitkamil ve Şahinbey Sağlık Grup Başkanlıklarına bağlı altı sağlık ocağına kontrol ya da hastalık nedeniyle başvuran ve Gaziantep il merkezinde ikamet eden 1-80 yaşları arasında (ort: 39.5) 306 birey (166 K, 140 E) dahil edildi. Süt çocuklarında eritrosit G6PD aktivitesinin çeşitli faktörlerle değişkenlik gösterebileceği düşünülerek bu yaş grubu çalışmaya dahil edilmedi.<sup>33</sup>

Bireyler akut hemolizi düşündürebilecek şikayet ve bulguları yönünden sorgulanarak retikülositozun yanıltıcı etkisinden kaçınılmaya çalışıldı.

### Kimyasal Maddeler

- \* Etilen Diamin Tetraasetik Asit Disodyum Tuzu Dihidrat,  
( $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ , Titriplex III) (Merck 8421)
- \* 2- Merkapto Etanol, ( $C_2H_6OS$ ) (Fluka RO1812)
- \* Sodyum Klorür, (NaCl) (Merck 6406)
- \* Heparin (Roche)
- \*  $\beta$ -Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Sodyum Tuzu,  
( $C_{21}H_{27}N_7O_{17}P_3 Na$ ) (Sigma N 3886)
- \* D-Glukoz 6-Fosfat Dipotasyum Tuzu Hidrat,  
( $C_6H_{11}O_9PK_2$ , ortalama 2-4  $H_2O/M$ ) (Sigma G7375)
- \* Magnezyum Klorür Hekzahidrat, ( $MgCl_2 - 6H_2O$ ) (Merck 5833)
- \* Tris (hidroksimetil)- Aminometan, ( $C_4H_{11}NO_3$ ) (Merck 8382)
- \* Hidroklorik Asit % 37'lik, (HCl) (Merck 314)

## **Gereçler**

Tam Kan Sayım Cihazı	Medonic CA 610
Soğutmalı Santrifüj	Jouan MR 1822
Spektrofotometre	Sclavo
Manyetik Karıştırıcı	Janke and Kunkel RH
Vorteks Karıştırıcı	Janke and Kunkel VF2
Terazi	Sartorius Basic
pH Metre	Hanna
Derin Dondurucu	Arçelik 2020 D
Otomatik Pipet	Socorex, 100-1000 µl
	Socorex, 20-1000 µl
Dispensör	Socorex, 1-10 ml

## **Ayıracılar**

### **1- İzotonik Sodyum Klorür Çözeltisi (NaCl 0,156 M)**

9 g NaCl saf suda çözünerek 1 litreye tamamlanır, +4 °C'da saklanır.

### **2- Stok EDTA Çözeltisi (EDTA 0.27 M, pH 7.0)**

10 g disodyum EDTA.2H<sub>2</sub>O (M.A: 372.24) üzerine yaklaşık 80 ml distile su eklenerek çözülür. 0.1 M sodyum hidroksit çözeltisi ile pH 7.0'ye ayarlanır. Hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti amber şişede, +4 °C'da, bir yıl stabildir.

### **3- Stabilizasyon Çözeltisi (EDTA 2.7 mM, 2-Merkapto etanol 0.7 mM, pH 7.0)**

0.25 ml 2-Merkapto etanol üzerine 5 ml stok EDTA çözeltisi eklenir. pH 7.0'ye ayarlanarak distile su ile 500 ml'ye seyreltilir. Bu çözelti amber şişede, 4°C'da bir yıl stabildir.

**4- TRIS-HCl Tamponu (Tris (hidroksimetil)-aminometan, TRIS 1 M, pH 8.0)**

12.12 g TRIS (MA :121.14) üzerine 25 ml distile su ve 65 ml 1N HCl eklenerek çözününceye kadar karıştırılır. pH 8.0'e ayarlandıktan sonra hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti +4 °C'da bir yıl stabildir.

**5- Magnezyum Klorür Çözeltisi (MgCl<sub>2</sub> 0.1 M)**

2 g MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (MA : 203.31) bir miktar distile su ile çözülerek son hacim 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti +4 °C'da bir yıl stabildir.

**6- NADP Çözeltisi (NADP 2 mM)**

0.1539 g β-NADP.Na (MA:765.4) bir miktar distile su ile çözülerek son hacim 100 ml'ye tamamlanır. +4 °C'da bir hafta stabildir.

**7- Reaksiyon Karışımı**

TRIS-HCl Tamponu (1 M, pH 8.0)	100 ml
NADP Çözeltisi (2 mM)	100 ml
MgCl <sub>2</sub> Çözeltisi (0.1 M)	100 ml
Distile Su	570 ml
<hr/>	
TOPLAM	870 ml

Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra dispensör ile deney tüplerine 870'er µl hacminde dağıtılır. Analiz tarihine kadar -20°C'da saklanır. Bu karışımın -20°C'da stabilitesi bir yıldır.

**8- Substrat Çözeltisi (Glukoz-6-Fosfat 6 mM)**

0.202 g D-G6-PK<sub>2</sub> (MA:336.3) bir miktar distile su ile çözülerek son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Porsiyonlar halinde -20 °C'da saklanır. Stabilitesi -20 °C'da bir yıldır.

## Yöntem Belirlenmesinde Hazırlık Çalışmaları, Yorum ve Modifikasyonlar

### Antikoagülant Seçimi ve Tam Kanda G6PD Stabilitesi

Asit-Sitrat-Dekstroz (ASD) çözeltisi ile eritrosit G6PD'sinin +4 °C'da üç hafta boyunca aktivite kaybı olmaksızın saklanabileceği bazı kaynaklarda bildirilmiştir.<sup>25,57</sup> Ortamda glukoz varlığının stabilizeyi azalttığını ileri süren yeni yayınlar da vardır.<sup>12</sup> Bu nedenle antikoagülant seçimi ve stabilize konusunda bir ön çalışma yapıldı. Normal değerlerde G6PD aktivitesi olan 10 venöz kan örneğinde antikoagülant olarak heparin ve ASD çözeltileri denendi. Heparin 20 IU/ml kan ve ASD çözeltisi 2 ml/1 ml kan oranlarında kullanıldı. Saklama sıcaklığı eritrosit metabolizmasını yavaşlatmak amacıyla +4 °C olarak seçildi. 0 °C altındaki sıcaklıklar hemolize yol açacağından denenmedi. +4 °C'da saklanan tam kan örneklerinin ve eritrosit süspansiyonlarınının 1., 2., 3. ve 7. günlerde G6PD aktiviteleri ölçüldü. İlk gün aktivitesi % 100 kabul edilerek değerlendirildi. Üç gün +4 °C'da saklanan heparinli tam kan ve heparinli tam kandan hazırlanan eritrosit paketinde enzim aktivitesindeki düşüşün önemsiz düzeyde olduğu kabul edildi (Tablo 7).

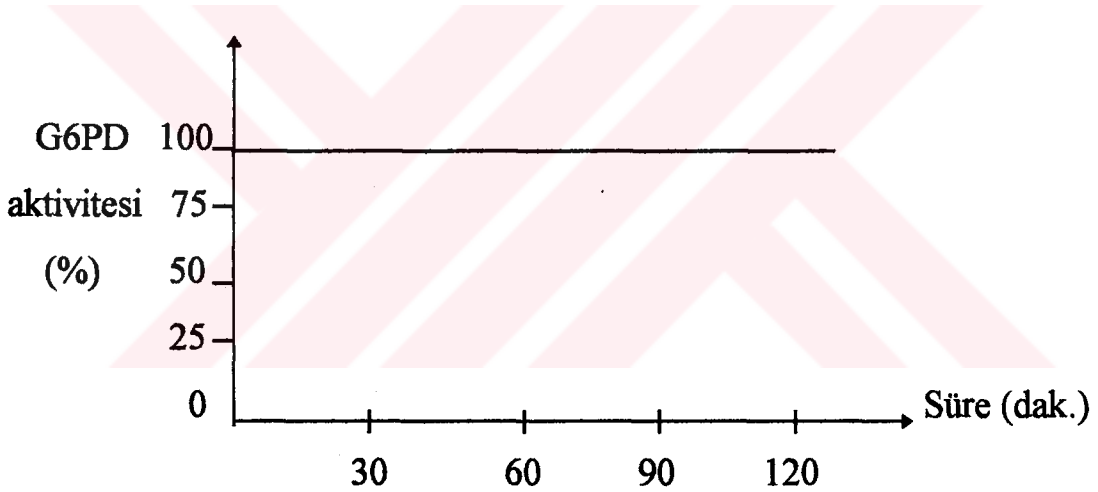
Tablo 7. Eritrosit G6PD'sinin +4 °C'da stabilitesi.

G6PD Aktivitesi (%)			
+4 °C de Bekleme Süresi (gün)	Heparinli Tam Kan	ASD'li Tam Kan	Eritrosit Paketi
1	100	100	100
2	100	75	100
3	100	60	100
7	90	56	90

Bu çalışma sonrası antikoagülant olarak heparin seçildi ve örnekler üç gün içinde analiz edildi.

### Hemolizatta G6PD Stabilitesi

Hemolizatta G6PD aktivitesinin +4 °C'da bir ile sekiz saat arasında stabil olduğuna dair farklı yayınlar vardır.<sup>18,25</sup> Bu nedenle, G6PD aktivitesi normal olan 10 venöz kan örneğinde yapılan çalışmada +4 °C'da bekletilen hemolizatların 1., 30., 60. ve 120. dakikalarda aktivitelerini analiz ederek 120 dakika boyunca enzim aktivitesinde değişiklik olmadığını saptadık (Şekil 25).



Şekil 25. Hemolizatta G6PD stabilitesi. Birinci dakika aktivitesi % 100 kabul edilmiştir.

### Eritrosit Paketinin Hazırlanması

Mikrokristal yapısında sellülozdan filtrasyon yöntemi ile lökositlerin % 99'u ve trombositlerin % 90'ı uzaklaştırılırken eritrositlerin % 97'si korunur ve retikülositlerin seçici bir şekilde kaybı önlenir. Ancak bu yöntem zaman alıcıdır ve uygulanması zordur. Çalışmamızda plazmanın ayrıştırılmasından sonra eritrosit paketleri 2 kez soğuk izotonik NaCl çözeltisi ile yıkandı.<sup>18,25</sup> Lökosit ve

trombositlerin ne oranda uzaklaştığını görmek amacıyla eritrosit süspansiyonunda bu hücrelerin sayımı yapıldı. Yüksek oranda lökosit (ort ± SD:  $1.30 \pm 1.33 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) ve trombosit (ort ± SD:  $15.9 \pm 1.11 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) içeren örnekler çalışmamıza dahil edilmedi.

### Hemoliz Edici Çözeltinin Seçimi

Çeşitli yöntemlerde hemoliz digitonin, Triton X-100, saponin veya EDTA-2-merkapt etanol çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir.<sup>5,18,25,33,57</sup> EDTA, enzimi iki değerlikli metal iyonlarının etkisinden korur. 2- merkapt etanol, enzimin -SH gruplarını koruyarak monomerlerine ayrışmasını ve inaktivasyonunu önler.<sup>5</sup> Çalışmamızda stabilize edici etkisi nedeniyle EDTA-2-merkapt etanol çözeltisi kullanıldı. Bu konuyu teyit etmek amacıyla deneysel çalışma yapılmadı.

### Kör Hazırlanması

Nicel G6PD analiz yöntemlerinin tümü reaksiyon ortamının bileşenlerini içeren bir kör kullanımını öngörür. Kör, enzim (hemolizat) veya substrattan birisini içermez.<sup>5,18,25,57</sup> Reaksiyon koşullarına eş ortama maruz bırakılan körün 340 nm'deki optik dansite (OD) değişimi örnek tüpündeki OD değişiminden çıkarılarak hesaplamalar yapılır. Çalışmamızda 10 örnek için örnek ve substrat körleri denendi. Her iki grupta da kör tüplerinde OD değişimine rastlanmadı. Bu gözleme dayanarak hem zaman hem de maliyet açısından avantaj sağlayan su körünü kullandık (Tablo 8).

Bazı varyantlarda farklı sonuçlar bulunabileceğini düşünerek enzim aktivitesi normal olmayan örneklerde örnek körü kullanılarak sonuçları teyit ettik. Bu örneklerde de kör tüplerinde OD değişimine rastlanmadı.



Tablo 8. Nicel spektrofotometrik G6PD analizinde alternatif kör tüplerinin bileşimi.

	Örnek ( $\mu$ l)	Örnek Körü ( $\mu$ l)	Substrat Körü ( $\mu$ l)	Su Körü (ml)
Reaksiyon Karışımı	870	870	870	-
Hemolizat	30	30	-	-
Substrat Çözeltisi	100	-	100	-
Distile Su	-	100	30	1

### Reaksiyonun Başlatılması

Nicel G6PD analizinde reaksiyon ortama enzim içeren hemolizatın veya substratın ilavesiyle başlatılabilir.<sup>18,25,57,58</sup> Bilindiği gibi NADP enzimin dimer ve tetramer yapısı için monomerler bağlamakta, enzimin monomerlerine ayrılmasını önleyerek disosiyede edici ajanlara karşı korumakta ve aktif yapıyı stabilize etmektedir. pH 7.0'nin üzerinde enzim dimer ve tetramer yapıyı koruma eğilimi göstermektedir. 100 mM konsantrasyonunda  $Mg^{2+}$  iyonları maksimum G6PD aktivitesi sağlamaktadır.<sup>5,33</sup> Çalışmamızda preinkübasyon süresinde enzim ve kofaktörün ideal konformasyonel değişimini ve aktivasyonunu sağlamak amacıyla reaksiyon substrat ilavesiyle başlatıldı.

### Reaksiyon Sıcaklığı

Nicel G6PD analizi farklı yöntemlerde 25 °C, 30 °C ve 37 °C'larda yapılabilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü, standardizasyon sağlanması amacıyla 25 °C'ı önermektedir. Reaksiyonun sıcaklık bağımlı olması termal kontrolü zorunlu hale getirmektedir. Tüm laboratuvarlarda oda sıcaklığının 25 °C olduğunu

varsaymak hataya yol açabileceğinden kabul edilen yaygın görüş G6PD aktivitesi sonuçlarının reaksiyon sıcaklığı belirtilerek verilmesidir. <sup>5,18,25,33,49,57</sup>

Ortam sıcaklığının artışı eksergonik olmayan kimyasal reaksiyonların hızını arttırır. Ancak sıcaklık artışı NADPH'nin molar absorbtivitesini olumsuz etkileyerek düşürmekte ve absorpsiyon piklerinin genişlemesine yol açmaktadır.<sup>18</sup> Çalışmalarımızda hem reaksiyonun yeterince hızlı, hem de NADPH'nin molar absorbtivitesinin yüksek olduğu 30 °C reaksiyon sıcaklığı olarak seçildi. <sup>25</sup>

### Reaksiyon Süresi

Nicel G6PD analizinde reaksiyonun başlangıcından itibaren 3 ile 30 dakika arasında değişen sürelerde OD değişimi izlenir. <sup>25,33,74</sup> Bu yöntemlerden bazıları enzim aktivitesinin doğrusal olduğu zaman aralığındaki bazıları da ortalama OD değişimini değerlendirmektedir. Çalışmamızda 10 örneğin OD değişimi ( $\Delta OD$ ) 30 saniye aralıklarla 10 dakika süresince izlendi. Aktivitenin kısmen düşük olduğu ilk 90 saniyeden sonra 10 dakika boyunca doğrusal olduğu gözlemlendi. Bu gözlem sonucunda reaksiyon süresini toplam 240 saniye olarak kısaltıp ilk 90 saniye sonrasında 30 saniye ara ile toplam altı okuma gerçekleştirdik. Böylece enzim aktivitesinin doğrusallığı 150 saniye gözlemlenmiş oldu. Bu çalışma grubunda ve tarama amacıyla G6PD aktiviteleri tespit edilen örneklerde OD artışının sabit olduğu saptandı.

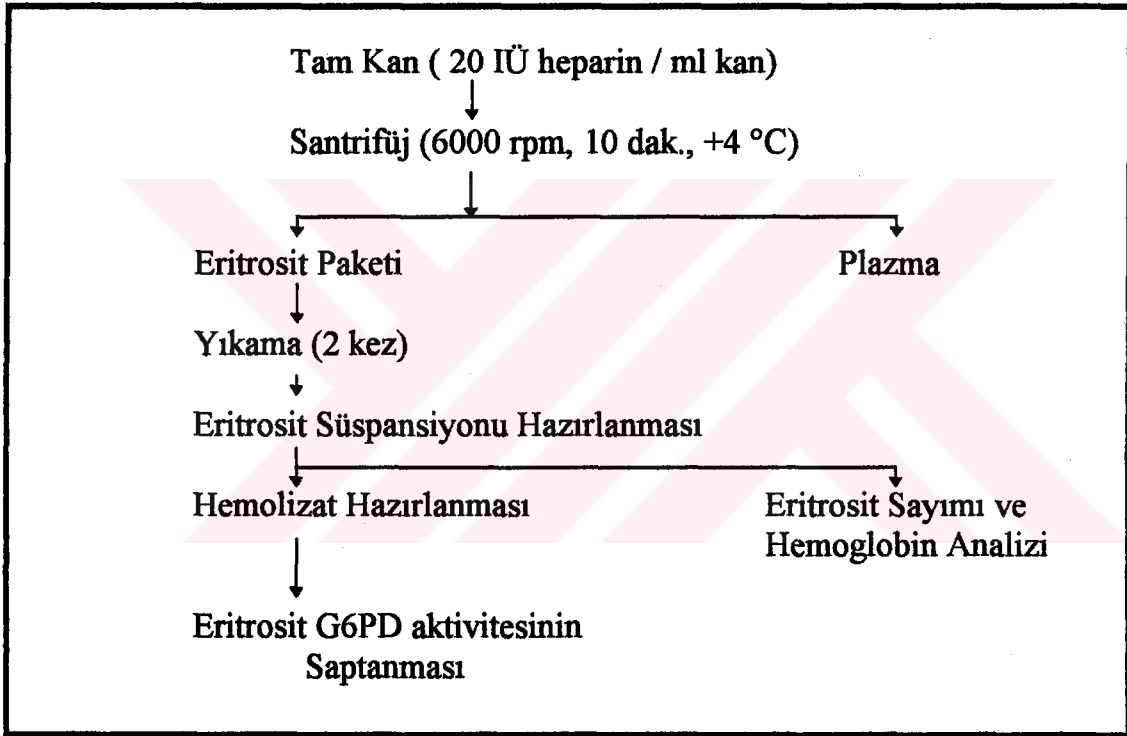
### Glock ve Mc Lean Analizi Gerekli mi ?

Nicel G6PD analizi hem G6PD hem de 6-fosfoglukanolakton dehidrogenazın (6-PGD) kataliz ettiği reaksiyonlar sonucu oluşan NADPH'ı yansıtır. Yani tüketilen bir mol G6-P sonucu iki mol NADPH oluşur. <sup>18,55,58,74</sup> Glock ve Mc Lean analizinde 6-fosfoglukonat ve 6-fosfoglukonat + G6P içeren iki ilave tüp ile hem gerçek G6PD aktivitesi hem de 6-PGD aktivitesi ölçülür. Ancak tanısal amaçla bu ilave ölçüm ve

hesaplamaları yapma gereği yoktur. Çünkü günümüze dek hemolitik anemi nedeni olarak bildirilmiş hiç eritrosit 6-PGD eksikliği yoktur. Normal 6-PGD aktivitesi olması da analitik olarak G6PD eksikliğini maskeleyememektedir.<sup>18</sup>

### Örneklerin Saklanması ve Çalışma Tablosu

60 IÜ heparin içeren tüplere üçer ml venöz kan örneği alındı. Örnekler çalışma tarihine dek +4 °C'da saklandı ve üç gün içerisinde çalışıldı (Şekil 26).



Şekil 26. Çalışma tablosu.

### Eritrosit Süspansiyonunun Hazırlanışı

Üçer ml heparinli venöz kan örneği içeren tüpler +4 °C'da 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek plazma ve lökosit tabakası dikkatle aspire edildi. Eritrosit paketleri 2 kez 10 ml soğuk izotonik NaCl çözeltisi ile yıkandı. Yıkamalar sonrası +4 °C'da, 6000 rpm'de, 10 dakika santrifüj edildi. Son yıkamadan sonra dipte

kalan eritrosit paketinden 300 µl alınarak 250 µl izotonik NaCl çözeltisi ile süspansiyon edildi. Bu şekilde hazırlanan eritrosit süspansiyonunun eritrosit sayısı  $5-6 \times 10^6/\mu\text{l}$  ve hemoglobin konsantrasyonu 13-16 g/dl olmaktadır.

### **Eritrosit Süspansiyonunun Hemoglobin ve Eritrosit İçeriğinin Saptanması**

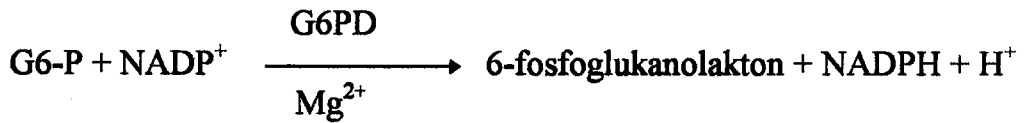
Daha önce hazırlanan eritrosit süspansiyonu uygun şekilde karıştırıldıktan sonra tam kan sayımı cihazında hemoglobin, eritrosit, lökosit, trombosit içeriği ve eritrosit indisleri saptandı.

### **Hemolizat Hazırlanışı**

Uygun şekilde karıştırılan eritrosit süspansiyonundan 100 µl alınarak üzerine 900 µl stabilizasyon çözeltisi eklendi. Voteks karıştırıcı ile hemolizin tam olması sağlandı. Parçalanmamış eritrositlerin varlığı mikroskopla araştırıldı. Bu aşamadan sonra G6PD aktivitesi 60 dakika içinde saptandı.

### **Hemolizatta G6PD Aktivitesinin Nicel Analizi**

**İlke :** G6PD, glukoz 6-fosfatın 6-fosfoglukanolaktone dönüşümünü kataliz ederken bir molekül  $\text{NADP}^+$  indirgenir. Reaksiyonun gerçekleşmesi için kofaktör olarak magnezyum iyonlarına gereksinim duyar.



Reaksiyon ortamında NADPH konsantrasyonunun artış hızı G6PD aktivitesi ile koreledir.  $\text{NADP}^+$  ultraviyole ışığa geçirgen iken NADPH ultraviyole ışığı şiddetle absorbe eder. 340 nm deki absorbans artış hızı ile enzim aktivitesi saptanır.

**İşlem :** Kullanılan çözeltilerin stabilitesinin kısa süreli olması nedeniyle ve kolaylık sağlanması amacıyla reaksiyon karışımı hazırlandı. Deney tüplerine dağıtılarak çalışma gününe kadar  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'da saklandı.

**I. Deney Tüplerinin Hazırlanışı :**

TRIS HCl tamponu (1 M, pH: 8.0)	100 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> çözeltisi (0.1 M)	100 $\mu\text{l}$
$\beta$ -NADP-Na çözeltisi (2 mM)	100 $\mu\text{l}$
Distile su	570 $\mu\text{l}$

veya,

Reaksiyon karışımı (eritilip karıştırılmış )	870 $\mu\text{l}$
--	-------------------

**II.** Analiz için gerekli sayıda deney tüpü oda ısısında eritildi. 30  $\mu\text{l}$  hemolizat eklenerek 10 dakikada oda ısısında inkübe edildi ( $25 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

**III.** Distile su ile kör ayarı yapıldı.

**IV.** Reaksiyon, ortama substrat eklenerek başlatıldı. 6 mM glukoz 6- fosfat çözeltisinden 100  $\mu\text{l}$  ilave edildi.

**V-**  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 90 saniye inkübe edildi. (Bu aşama spektrofotometrenin küvetinde gerçekleştirildi).

**VI-** Sonraki 150 saniye süresince 340 nm'deki absorbands artışı 30 saniye aralıklarla kaydedildi. Işık yolu bir cm olan spektrofotometre kullanıldı. Hesaplamalar optik dansite artışının doğrusal olduğu zaman göz önüne alınarak yapıldı.

**Eritrosit G6PD Aktivitesinin Hesaplanması**

NADPH'in maksimum absorbands gösterdiği dalga boyu 340 nm'dir ve bu dalga boyundaki molar absorpsivitesi ( $MA_{\text{NADPH}}$ )  $6220\text{ L x mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$ 'dir.<sup>18</sup>

Çalışmamızda her örneğin enzim aktivitesini (EA) mÜ/10<sup>9</sup> RBC ve Ü/g Hb cinsinden hesaplayarak karşılaştırdık.

$$EA \text{ (mÜ/10}^9 \text{ RBC)} = \frac{\Delta A_{340} / \text{dakika}}{MA_{NADPH}} \times 1000^a \times \frac{1000^b}{30} \times \frac{1}{10^9 \text{ RBC/ml hemolizat}} \times 1000^c$$

$$EA \text{ (Ü/g Hb)} = \frac{\Delta A_{340} / \text{dakika}}{MA_{NADPH}} \times 1000 \times \frac{1000}{30} \times \frac{1}{\text{g Hb/ml hemolizat}}$$

a : 1 mol / 1 NADPH'in absorpsivitesini 1 µmol/ml'ye dönüştürme faktörü

b : 30 µl hemolizattaki aktiviteyi 1 ml'dekine dönüştürme faktörü

c : Üniteyi mili üniteye dönüştürme faktörü

Bir ml Hemolizatın Eritrosit İçeriğinin Hesaplanması

Eritrosit süspansiyonundaki eritrosit sayısı (10<sup>6</sup>/µl) x 10<sup>-1\*</sup> işlemi ile 10<sup>9</sup>/ml cinsinden bulunur.

\* Eritrosit süspansiyonundan hemolizat hazırlanması aşamasındaki seyrelme faktörü

Bir ml Hemolizatın Hb İçeriğinin Hesaplanması :

Eritrosit süspansiyonunun Hb konsantrasyonu (g/dL) x 10<sup>-3\*</sup> işlemi ile g/ml cinsinden bulunur.

\* Eritrosit süspansiyonundan hemolizat hazırlanması aşamasındaki seyrelme faktörü (10<sup>-1</sup>) x dl'yi ml'ye dönüştürme faktörü (10<sup>-2</sup>).

Sonuç olarak ;

$$EA \text{ (mÜ/10}^9 \text{ RBC)} = \frac{\Delta A_{340} / \text{dakika}}{10^9 \text{ RBC / ml hemolizat}} \times 5359$$

$$EA \text{ (Ü/g Hb)} = \frac{\Delta A_{340} / \text{dakika}}{\text{g Hb/ml hemolizat}} \times 5359 \quad \text{olarak hesaplanır.}$$

## **Verilerin Analizinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler**

G6PD aktivitelerinin dağılımında tanımlayıcı (definitive) istatistikler, normal dağılıma uygunluğunun araştırılmasında Ki-kare testi, gruplar arası önemlilik testlerinde iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi ve Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi, ilintilerin saptanmasında korelasyon, kısmi korelasyon ve regresyon analizleri kullanılmıştır.<sup>18,21</sup> İstatistikler Microsoft Excel ve Statgraphics programlarında gerçekleştirilmiştir.



## BULGULAR

### 1- Gaziantep İl Merkezi Örneklem Grubunda Eritrosit G6PD Aktivitesi Dağılımı

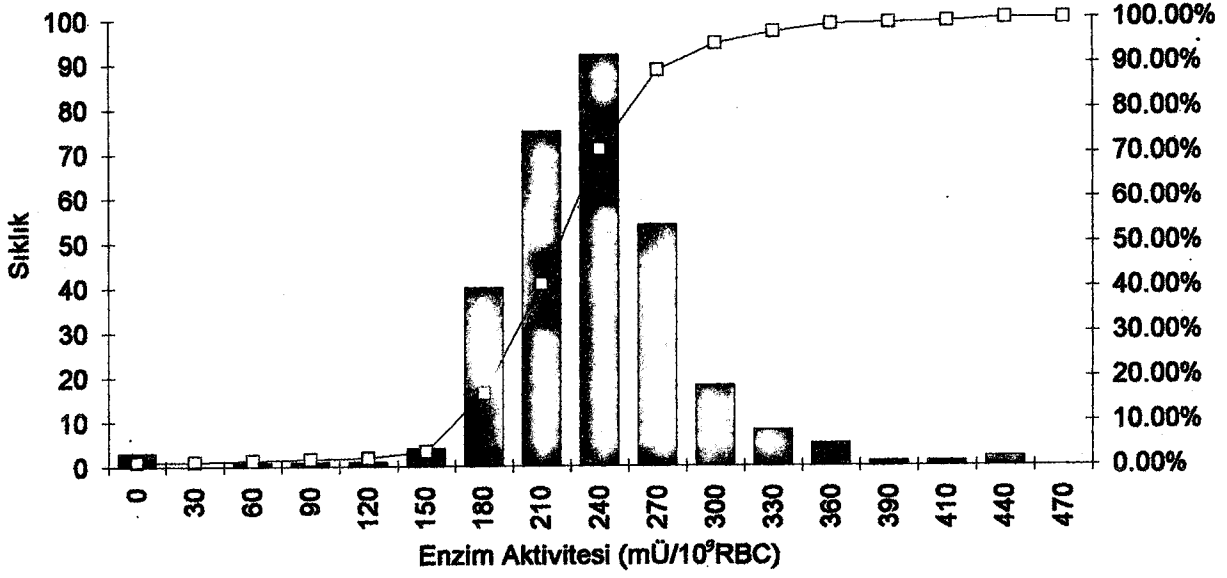
Gaziantep il merkezinde G6PD eksikliği sıklığının saptanması amacıyla sağlık ocaklarına ve Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi'ne başvuran 1-80 yaşları arasında 306 bireyin (166 K, 140 E) eritrosit G6PD aktiviteleri saptanmıştır. Örneklem grubunun, hemogloblin konsantrasyonu ve eritrosit sayısına oranlanarak ifade edilen G6PD aktivitelerinin dağılımı Şekil 27- a ve b'de görülmektedir.

Bu dağılımlara ait istatistiksel veriler Tablo 9'da özetlenmiştir.

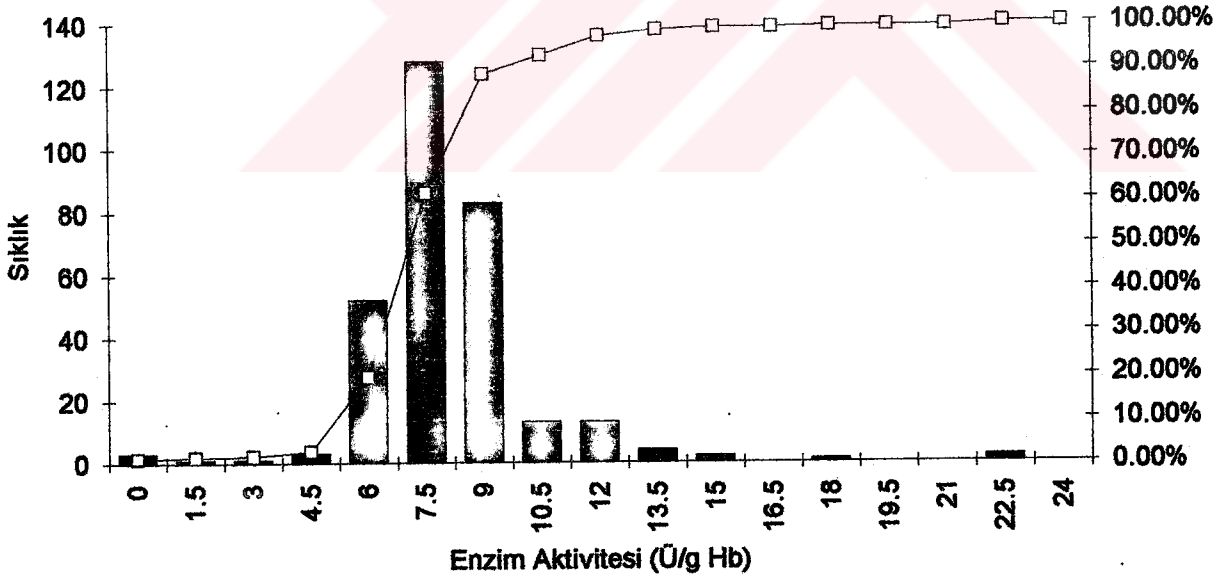
Tablo 9. Gaziantep il merkezi örneklem grubunda eritrosit sayısı ve hemogloblin konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktivitelerinin dağılımına ait istatistiksel veriler.

	G6PD Aktivitesi (mÜ / 10 <sup>9</sup> RBC)	G6PD Aktivitesi (Ü / g Hb)
Ortalama ( $\bar{X}$ )	249	8.8
Standart sapma (SD)	53	2.3
Standart hata (SE)	3.0	0.1
Ortanca (Ort)	249	8.6
Tepe değeri (TD)	257	8.3
Sivrilik (kurtosis)	5.7	12.0
Asimetri (skewness)	-0.3	1.6
Olgu sayısı	306	306





Şekil 27-a. Örneklem grubunda eritrosit sayısına oranlanan G6PD aktivitesinin dağılımı ve kümülatif sıklığı.



Şekil 27-b. Örneklem grubunda hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktivitesinin dağılımı ve kümülatif sıklığı.

Tablo 9’da görüldüğü gibi Gaziantep il merkezi örneklem grubunda eritrosit sayısına oranlanan G6PD aktivitesi dağılımının ortalama, ortanca ve tepe değerleri sırasıyla 249, 249 ve 257’dir. Çok hafif asimetri göstermekte (asimetri: -0.3) ve yüksek sivrilik değeri (sivrilik: 5.7) taşımaktadır.

Hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktivitesi dağılımı daha yüksek sivrilik değeri (sivrilik: 12.0) ve asimetri (asimetri: 1.6) göstermektedir. Bu dağılımda ortalama, ortanca ve tepe değerleri sırasıyla 8.8, 8.6, 8.3’tür ve sola çarpık asimetriyi desteklemektedir:  $\bar{X} > \text{ort} > \text{TD}$  (Tablo 9).

Örneklem grubunda her iki dağılımın normal (Gaussian) dağılıma uygunluğu araştırılmıştır (Tablo 10-a ve b).

Tablo 10-a. Örneklem grubunda eritrosit sayısına oranlanan G6PD aktivitesi dağılımının normal dağılım ile karşılaştırılması.

Örneklem Grubunda G6PD Aktivitesi			Normal Dağılım	
	Sınırlar (mÜ/10 <sup>9</sup> RBC)	Denek Sayısı (n)	Oran (%)	Oran (%)
$\bar{X} \pm 1 \text{ SD}$	196 - 302	203	82.67	> 86.26
$\bar{X} \pm 2 \text{ SD}$	143 - 355	290	94.77	> 95.44
$\bar{X} \pm 3 \text{ SD}$	90 - 408	299	97.72	> 99.74
$\chi^2$	39.51*			

\* p < 0.001

Tablo 10-b. Örneklem grubunda hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktivitesi dağılımının normal dağılım ile karşılaştırılması.

Örneklem Grubunda G6PD Aktivitesi			Normal Dağılım	
	Sınırlar (Ü/g Hb)	Denek Sayısı (n)	Oran (%)	Oran (%)
$\bar{X} \pm 1 \text{ SD}$	11.1 - 6.5	264	85.62	> 86.26
$\bar{X} \pm 2 \text{ SD}$	13.4 - 4.2	292	95.42	> 95.44
$\bar{X} \pm 3 \text{ SD}$	15.7 - 1.9	300	98.03	> 99.74
$\chi^2$	98.09 *			

\* p < 0.001

Tablo 10-a ve b'de görüldüğü gibi örneklem grubunda eritrosit sayısı ve hemoglobin konsantrasyonlarına oranlanan G6PD aktivitesi dağılımları normal dağılıma uygunluk göstermemektedir. (Serbestlik derecesi (sd) :7,  $\chi^2 > 24.32$ ,  $p < 0.001$ ).

## **2- Gaziantep İl Merkezi Toplumunu için Eritrosit G6PD Aktivitesi**

### **Referans Sınırlarının Belirlenmesi**

a) Örneklem Grubunun Seçimi: Örneklem grubunun seçiminde G6PD aktivitesini etkileyebileceği düşünülen klinik durum ve fizyolojik değişkenlerden kaçınılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla yeni doğan ve süt çocukları, gebeler, akut hemolitik krizi düşündürebilecek şikayetleri olan bireyler çalışma kapsamına alınmamıştır.

İndirekt örnekleme ile seçilen 1-80 yaşları arasında 306 birey (166 K, 140 E) örneklem grubunu oluşturmuştur.

b) Yüksek Sapma Gösteren (uç) Değerlerin Atılması: Bu amaçla kullanılan istatistiksel yöntemler dağılımın Gaussian tipinde olduğunu veya tek bir uç değer olduğunu öngörmektedir.<sup>18</sup> Bu koşullar yapılan çalışmaya uygun olmadığı için sadece enzim aktivitesi sıfır olan üç ve megaloblastik anemisi olduğu saptanan iki bireye ait veriler referans sınırlarının belirlenmesinde örneklem grubu dışında bırakılmıştır.

c) Altgrupların Analizi: G6PD aktivitesi dağılımlarının ünimodal olduğu gözlenmekle birlikte gizli bir non-homojenitenin varlığı enzim aktivitesinin cinsiyetler arası önemlilik ve yaşla korelasyon analizleri ile araştırılmıştır.

Cinsiyete göre ayrılan altgruplarda G6PD aktivitelerine ait istatistiksel veriler Tablo 11'de görülmektedir.

Tablo 11. Kadın ve erkek altgruplarında G6PD aktivitelerinin istatistiksel verileri ( $\bar{X} \pm SD$ , 2.5 ve 97.5'inci persantiller, f ve t değerleri).

		KADIN	ERKEK
	$\bar{X} \pm SD$	250 ± 46	248 ± 60
G6PD Aktivitesi (mÜ/10 <sup>9</sup> RBC)	% 97.5	338	365
	% 2.5	182	177
	f	1.72*	
	t	0.41**	
	$\bar{X} \pm SD$	9.0 ± 2.1	8.6 ± 2.4*
G6PD Aktivitesi (Ü/g Hb)	% 97.5	13.2	13.7
	% 2.5	6.7	5.9
	f	1.33***	
	t	1.92**	

\*p < 0.001

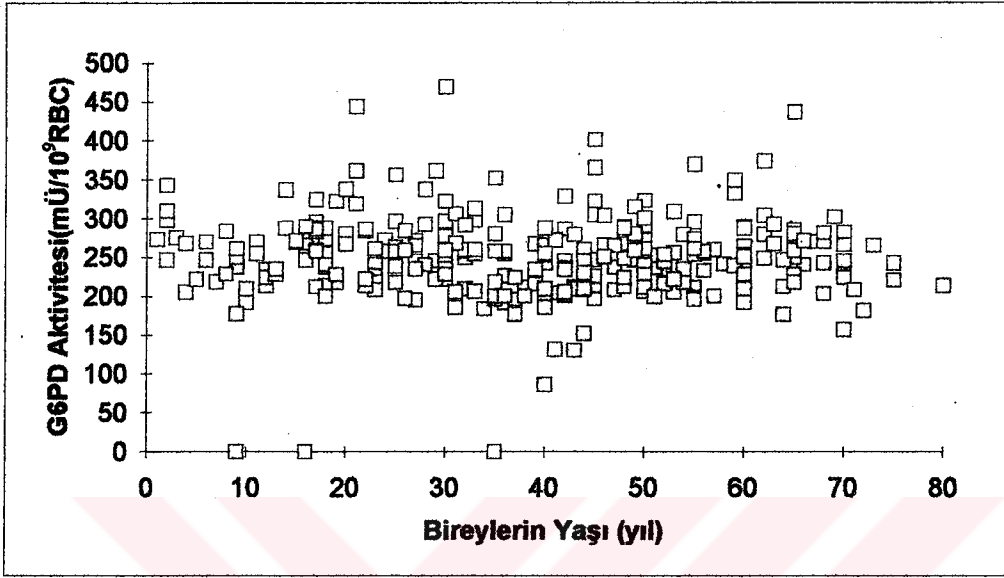
\*\*p > 0.05

\*\*\*p < 0.05

Tablo 11'de görüldüğü gibi eritrosit sayısı ve hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktivitesi kadın ( $\bar{X} \pm SD$ ; 250± 46 mÜ/10<sup>9</sup> RBC ve 9.0 ± 2.1 Ü/gHb) ve erkek ( $\bar{X} \pm SD$ ; 248± 60 mÜ/10<sup>9</sup> RBC ve 8.6± 2.4 Ü/gHb) altgruplarında homojen varyans göstermektedir ( f: 1.72, p < 0.001 ve f: 1.33, p < 0.05). Gruplara iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi uygulanmış, kadın ve erkek grupları arasında eritrosit sayısı ve hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktivitelerinin fark göstermediği sonucuna varılmıştır (t: 0.41, p > 0.05 ve t: 1.92, p > 0.05).

G6PD aktivitesinde yaşa bağlı bir değişim varlığı korelasyon analizi ile araştırılmış, anlamlı bir ilinti saptanmamıştır (r: 0.0023, p>0.5). Örneklem grubunu

oluşturan bireylerde enzim aktivitesinin yaşa göre dağılımı Şekil 28'de görülmektedir.



Şekil 28. Örneklem grubunda eritrosit G6PD aktivitesinin bireylerin yaşına göre dağılımı.

Bu veriler ışığında örneklem grubunda G6PD aktivitesinin homojen dağılım gösterdiği sonucuna varılmış, her iki cinsiyet ve bir yaş üzeri bireyler için tek referans aralık belirlenmesinin yeterli olacağı düşünülmüştür.

d) Referans Sınırlarının Belirlenmesi: Uluslararası Klinik Kimya Federasyonu (IFCC) referans sınırların belirlenmesinde 'interpersantil aralık' yöntemini önermektedir. İntersantil aralık Gaussian dağılımlarında parametrik olarak saptanabilmektedir.<sup>18,21</sup> Çalışmamızın özellikleri nedeniyle non-parametrik yöntemle, % 95'lik aralığı saptadık. Bu amaçla referans grup G6PD aktivitesi dağılım eğrilerinin her iki kuyruğunda, 2.5 ve 97.5 persantillerin dışında kalan değerler atılmıştır. Sonuçlar Tablo 12'de görülmektedir.

Tablo 12. Gaziantep il merkezi toplumunda bir yaş üzeri bireyler için saptanan referans G6PD aktivitesi sınırları.

G6PD Aktivitesi	Alt Sınır	Üst Sınır
mÜ/10 <sup>9</sup> RBC	178	354
Ü/g Hb	6.4	13.2

Gaziantep il merkezi toplumunda bir yaş üzeri bireyler için referans G6PD aktivitesi sınırları Tablo 12’de görüldüğü gibi 178 -354 mÜ/ 10<sup>9</sup> RBC veya 6.4-13.2 Ü/gHb olarak saptanmıştır.

### 3. Gaziantep İl Merkezi Toplumunu Örneklem Grubunda G6PD Eksikliği Oranı ve Beklenen Sıklığı

306 bireyden oluşan örneklem grubunda G6PD aktivitesi 178 mÜ/10<sup>9</sup> RBC’nin altında olan yedi birey saptanmıştır. Bu olgulara ait diğer veriler Tablo 13’de görülmektedir.

Tablo 13. G6PD aktivitesi, referans sınırın altında bulunan yedi olguya ait veriler.

Olgu	Cinsiyet	Yaş	G6PD Aktivitesi (mÜ/10 <sup>9</sup> RBC)	G-6 PD Aktivitesi Ü/g Hb	Şikayeti
1	E	9	0	0	yok
2	E	16	0	0	yok
3	E	35	0	0	yok
4	K	40	86	2.9	yok
5	E	43	92	3.7	yok
6	K	41	131	5	çay rengi idrar
7	K	44	152	4.6	çay rengi idrar

G6PD aktivitesi araştırılan 140 erkek bireyden dördünde enzim aktivitesi referans sınırın altında bulunmuştur. Bu olgulardan üçünde enzim aktivitesinin sıfır olduğu gözlenmiştir. Gaziantep il merkezi örneklem grubunda, erkeklerde G6PD eksikliği oranı %2.9 olarak saptanmıştır. Örneklem grubundaki 166 kadın bireyden üçünde G6PD aktivitesi referans sınırın altında bulunmuş ve kadınlarda G6PD eksikliği oranı %1.8 olarak saptanmıştır. 306 kişilik Gaziantep il merkezi örneklem grubunda eritrosit G6PD eksikliği oranı % 2.3 olarak saptanmıştır (Tablo 14).

Tablo 14. Gaziantep il merkezi örneklem grubunda eritrosit G6PD eksikliği oranı.

	Olgu sayısı	Eritrosit G6PD eksikliği oranı
K	166	% 1.8
E	140	% 2.9
T	306	% 2.3

Bu veriler Gaziantep il merkezi toplumunda eritrosit G6PD eksikliği sıklığının %  $2.3 \pm 1.0$  oranında olduğunu göstermektedir.

#### 4. G6PD Aktivitesini Belirleyen Faktörlerin Araştırılması

Eritrosit G6PD aktivitesi, tam kan hemoglobin konsantrasyonu, eritrosit sayısı veya hematokrit yüzdesine oranlanarak ifade edilebilmektedir. Günümüzde çoğu araştırma ve klinik biyokimya laboratuvarları enzim aktivitesini hemoglobin konsantrasyonuna oranlayarak ifade etmektedir. Çalışmamızda, bu yaklaşımın doğruluğunu sorgulamak, eritrosit G6PD aktivitesini belirleyici ana faktörü saptamak amacı ile diğer bir bileşene (Hb konsantrasyonu veya RBC sayısı) oranlanmamış (direkt) enzim aktivitesinin bu parametreler ile olan korelasyonu araştırılmıştır.

Parametreleri metodolojik açıdan incelenen 242 olguda, direkt enzim aktivitesi ile eritrosit süspansiyonunun eritrosit ve hemoglobin içerikleri arasındaki ilinti Tablo 15'te görülmektedir.

Tablo 15. G6PD aktivitesi ile eritrosit sayısı ve hemoglobin konsantrasyonu arasındaki korelasyon katsayıları.

Cinsiyet	Olgu sayısı	G6PD aktivitesi (mÜ) ile korelasyon katsayıları ( r )	
		RBC ( $10^6/\mu\text{l}$ )	Hb (g/dl)
K	123	0.48*	0.14
E	119	0.57*	-0.19
T	242	0.53*	-0.01

\*  $p < 0.001$

Tablo 15'te görüldüğü gibi eritrosit sayısı ile direkt enzim aktivitesi arasında pozitif yönde, anlamlı bir korelasyon ( $r: 0.53, p < 0.001$ ) bulunmaktadır. Hemoglobin konsantrasyonu ile direkt enzim aktivitesi arasında ise anlamlı bir ilinti saptanmamıştır ( $r: -0.01, p > 0.05$ ).

## 5. G6PD Aktivitesinin Etkileyen Faktörlerin Araştırılması

Eritrosit G6PD aktivitesi analizinde yanıtıcı olabilecek, istenmeyen etkilerin varlığı ve nedenlerini araştırmak amacı ile eritrosit süspansiyonunda diğer kan hücreleri (lökosit ve trombosit) analiz edilmiş, eritrosit morfolojisi araştırılmıştır. Direkt enzim aktivitesi ile eritrosit indisleri (ortalama eritrosit hacmi: MCV, ortalama eritrosit hemoglobini: MCH) ve eritrosit süspansiyonunun lökosit (WBC) ve trombosit içeriği arasındaki ilinti Tablo 16'da görülmektedir.



Tablo 16. G6PD aktivitesi ile eritrosit indisleri, eritrosit süspansiyonunun lökosit ve trombosit içeriği arasındaki korelasyon katsayıları.

Cinsiyet	Olgu sayısı	G6PDAktivitesi (mÜ) ile Korelasyon Katsayıları (r)			
		MCV (fl)	MCH(g/dl)	WBC( $10^3/\mu\text{l}$ )	Trombosit( $10^3/\mu\text{l}$ )
K	123	-0.41*	-0.29*	0.28*	0.30*
E	119	-0.47**	-0.29*	0.11	0.28*
T	242	-0.44**	-0.29**	0.17**	0.29**

\* p < 0.01

\*\* p < 0.001

Tablo 16’da görüldüğü gibi direkt enzim aktivitesi MCV ve MCH ile negatif yönde, anlamlı korelasyon göstermektedir (r:-0.44 ve r: -0.29, p < 0.001). Direkt enzim aktivitesi ile lökosit ve trombosit sayıları arasında ise anlamlı, pozitif yönde zayıf bir korelasyon varlığı saptanmıştır (r: 0.17 ve r: 0.29, p< 0.001).

Çalışmamızda MCV ve MCH değerleri arasında da anlamlı bir korelasyon saptanmış olması (r : 0.61, p< 0.05) direkt enzim aktivitesi ile eritrosit indisleri arasındaki ilintilerin dolaylı olabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle direkt enzim aktivitesi ile MCV arasındaki korelasyona MCH’nin, direkt enzim aktivitesi ile MCH arasındaki korelasyona MCV’nin etkisini ortadan kaldırmak amaçlanarak kısmi korelasyon analizi uygulanmıştır. Sonuçlar Tablo17’de görülmektedir.

Tablo 17. Direkt enzim aktvitesi ile eritrosit indisleri ve eritrosit süspansiyonlarının trombosit içeriği arasındaki kısmi korelasyon katsayıları.

Olgu sayısı	G6PDAktivitesi (mÜ) ile Kısmi Korelasyon Katsayıları ( r )		
	MCV (fl)	MCH (g/dl)	Trombosit ( $10^3/\mu\text{l}$ )
242	-0.35*	-0.02	0.01

\* p < 0.01

Tablo 17’de görüldüğü gibi direkt enzim aktivitesi ile MCV arasındaki gerçek ilişki negatif yönde ve anlamlıdır. ( $r : -0.35, p < 0.01$ ). Direkt enzim aktivitesi ile MCH değerleri ise anlamlı bir korelasyon göstermemektedir ( $r: -0.02, p > 0.5$ ).

Eritrosit süspansiyonunun RBC ve trombosit içerikleri arasında da anlamlı bir korelasyon saptanmıştır ( $r: 0.48, p < 0.05$ ). Direkt enzim aktivitesi ile trombosit sayısı arasındaki gerçek ilişkinin saptanması amacıyla uygulanan kısmi korelasyon analizinde anlamlı bir ilişkinin olmadığı görülmüştür ( $r: 0.01, p > 0.5$ ) (Tablo 17).

İstenmeyen bu etkilerin hemoglobin konsantrasyonu ve RBC sayılarına oranlanan enzim aktivitelerine ne ölçüde yansıdığı araştırılmıştır. Hemoglobin konsantrasyonu ve eritrosit sayısına oranlanarak ifade edilen enzim aktiviteleri ile eritrosit indisleri ve eritrosit süspansiyonunun lökosit ve trombosit içerikleri arasındaki ilişki Tablo 18’de görülmektedir.

Tablo 18. Hemoglobin konsantrasyonu ve eritrosit sayısına oranlanarak ifade edilen G6PD aktiviteleri ile eritrosit indisleri, eritrosit süspansiyonun lökosit ve trombosit içeriği arasındaki korelasyon katsayıları.

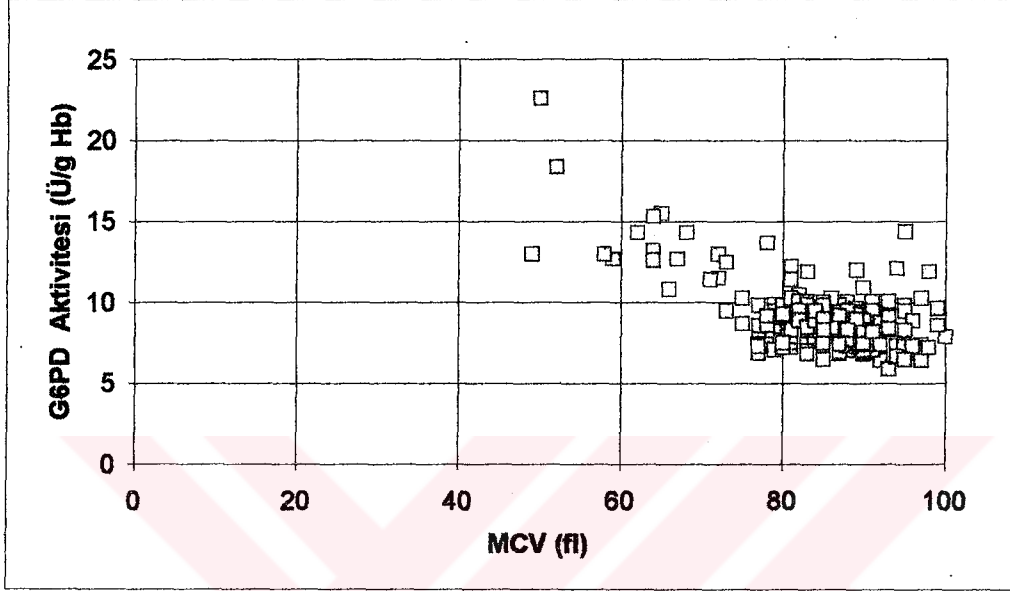
Olgu Sayısı		G6PDAktivitesi ile Korelasyon Katsayıları (r)			
		MCV(fl)	MCH(g/dl)	WBC( $10^3/\mu\text{l}$ )	Trombosit( $10^3/\mu\text{l}$ )
242	mÜ/ $10^9$ RBC	-0.03	-0.11	0.15*	0.04
242	Ü/g Hb	-0.61**	-0.44**	0.25**	0.33**

\* $p < 0.01$

\*\*  $p < 0.001$

Tablo 18’de görüldüğü gibi hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan enzim aktivitesi MCV ve MCH değerleri ile negatif yönde anlamlı bir korelasyon göstermektedir ( $r: -0.61$  ve  $r: -0.44, p < 0.001$ ). Bu korelasyon direkt enzim aktivitesinde saptanan korelasyondan daha belirgin hale gelmiştir. Eritrosit sayısına oranlanan enzim aktivitesi ise eritrosit indisleri ile anlamlı bir korelasyon

göstermemektedir ( $p>0.05$ ). Hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktivitesinin MCV'ye göre dağılımı Şekil 29'da görülmektedir.

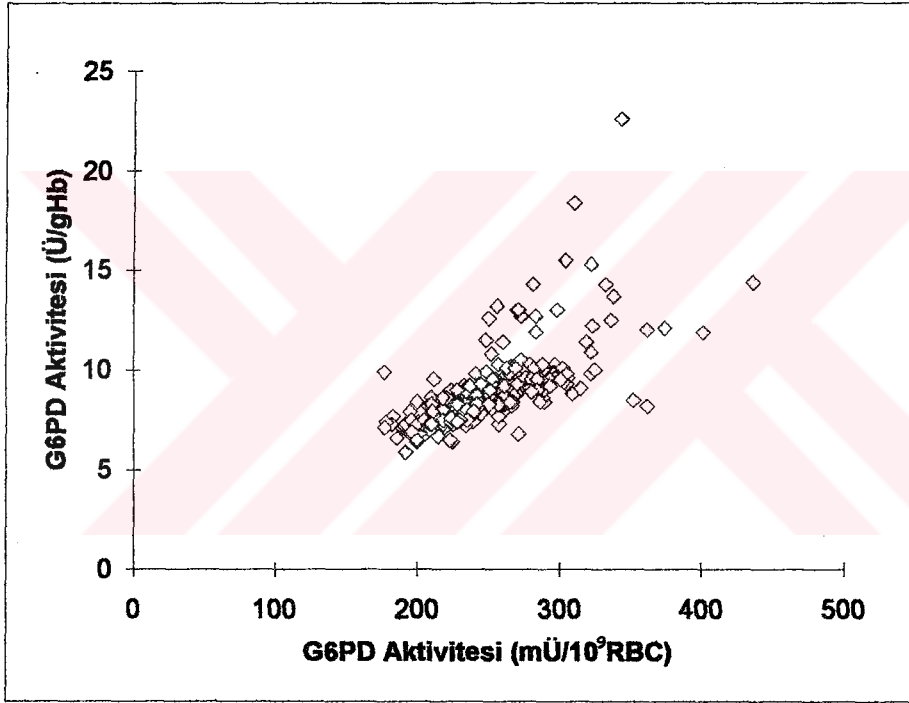


Şekil 29. Hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktivitesinin MCV'ye göre dağılımı.

Eritrosit süspansiyonunun lökosit ve trombosit içeriğinin enzim aktivitesine etkisi, aktivitenin hemoglobin konsantrasyonu veya eritrosit sayısına oranlanması ile farklılık göstermektedir (Tablo 18). Hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktivitesi lökosit ve trombosit sayıları ile anlamlı, pozitif yönde korelasyon göstermektedir ( $r: 0.25$  ve  $r: 0.33$ ,  $p < 0.001$ ). Eritrosit sayısına oranlanan enzim aktivitesinin ise trombosit sayısı ile etkileşimi ortadan kalkmakta ( $r:0.04$ ,  $p >0.05$ ), lökosit sayısı ile korelasyonu ise azalmaktadır ( $r: 0.15$ ,  $p < 0.01$ ).

## 6. G6PD Aktivitesi Hemoglobin Konsantrasyonuna ve Eritrosit Sayısına Oranlandığında Elde Edilen Değerlerin Karşılaştırılması

Parametreleri metodolojik açıdan incelenen 242 olgunun eritrosit sayısı ve hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktiviteleri arasındaki ilişki Şekil 30'da görülmektedir.



Şekil 30. Eritrosit sayısı ve hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktiviteleri arasındaki ilişki.

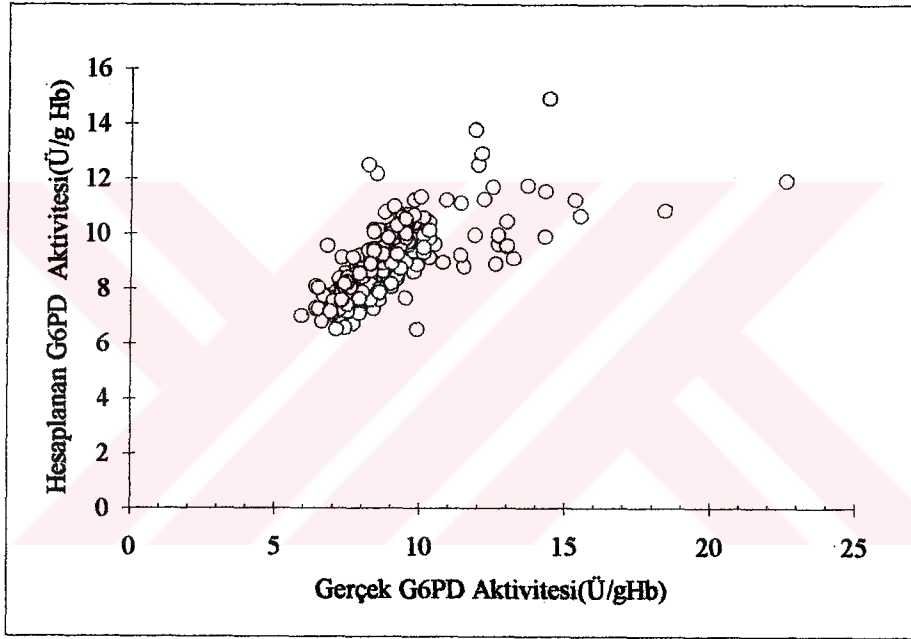
Bu ilişki doğrusallaştırıldığında ( $p < 0.001$ ) elde edilen veriler aşağıda belirtilmiştir.

Eğim :  $0.032 \pm 0.002$ ,  $p < 0.001$ .

Doğrunun x eksenini kestiği nokta:  $0.77 \pm 0.59$ ,  $p > 0.05$ .

G6PD Aktivitesi (Ü/g Hb) =  $[0.032 \times \text{G6PD Aktivitesi (mÜ/10}^9 \text{ RBC)}] + 0.77$ .

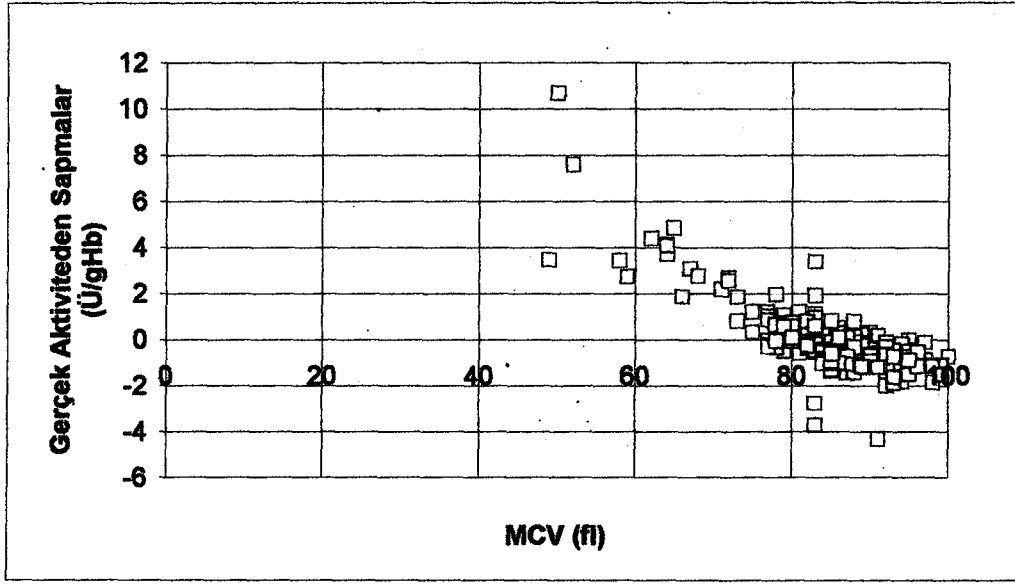
Yukarıda belirtilen matematiksel ilişki ile eritrosit sayısına oranlanan enzim aktiviteleri ( $m\dot{U}/10^9RBC$ ), hemoglobine oranlanan enzim aktivitelerine dönüştürülmüştür. Bu şekilde hesaplanan enzim aktivitesi ( $8.8 \pm 1.8 \dot{U}/gHb$ ), analiz ile saptanan gerçek enzim aktivitesi ( $8.8 \pm 2.3 \dot{U}/gHb$ ) ile anlamlı, pozitif yönde korelasyon göstermektedir ( $r: 0.67, p<0.01$ ). Örneklem grubunda hesaplanarak bulunan ve gerçek enzim aktiviteleri arasındaki ilişki Şekil 31’de görülmektedir.



Şekil 31. Regresyon eşitliği ile hesaplanarak bulunan ve gerçek enzim aktiviteleri arasındaki ilişki.

Hesaplanarak bulunan ve gerçek enzim aktiviteleri arasındaki fark, önemlilik testi ile analiz edilmiş ve iki grup birbirinden farksız bulunmuştur ( $t: -3.49 \cdot 10^{-14}, p>0.1$ ).

Hesaplanarak bulunan ve gerçek enzim aktiviteleri arasındaki farkların MCV ile ilintisi araştırılmış; negatif yönde, anlamlı bir korelasyon saptanmıştır ( $r: -0.79, p<0.01$ ). Farkların MCV'ye göre dağılımı Şekil 32’de görülmektedir.



Şekil 32. Regresyon eşitliği ile saptanan ve gerçek enzim aktiviteleri arasındaki farkların MCV'ye göre dağılımı.

## TARTIŞMA

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz doku ve kan hücrelerinde yaygın olarak bulunan ve koruyucu rol üstlenen bir enzimdir. Eritrositlerde eksikliği hemolitik anemi ile sonuçlanırken komplikasyonlarından koruyucu bir yaklaşımla kaçınılması mümkün olabilmektedir. Dünyada yaklaşık 400 milyon bireyi etkilediği düşünülen G6PD eksikliği genetik polimorfizm göstermekte, bu yönüyle hemoglobino-patilerden sonra ikinci sırayı almaktadır.

Enzim aktivitesi için saptanan referans değerlerin yöntemsel (sıcaklık, konsantrasyon v.b.) ve bölgesel farklılıklar göstermesi toplumsal referans değerlerin oluşturulmasını gerekli kılmaktadır.<sup>12,13,49</sup>

G6PD eksikliğinin sıklığı da etnik gruplar ve coğrafi yöreler arasında farklılık gösterir.<sup>13,38,72</sup> Gaziantep, iklim özellikleri, coğrafi konumu ve etnik yapısı ile Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu kentleri arasında bir geçiş toplumdur. Özellikle 1980 yılları sonrasında doğudan batıya göçlerin etkisi altında kalmıştır. Batısında yer alan Adana, Antakya gibi komşu kentlerde G6PD eksikliği görülme oranının yüksek oluşu Gaziantep yöresinde bu enzime olan ilgiyi artırmaktadır.

Bu nedenlerle, çalışmamızda yöresel G6PD aktivitesi referans değerlerinin ve enzim eksikliği sıklığının saptanması amaçlanmıştır.

G6PD aktivitesinin alışlagelmiş şekilde hemoglobine oranlanarak ifadesi, farklı çevresel, fizyolojik ve genetik etkenlerle düzenlenen hemoglobin konsantrasyonundaki değişimlerin, enzim aktivitesine yansımaya yol açabilir. Demir eksikliği, talasemi sendromları ve hemoglobino-patiler gibi anemi ile seyreden hastalıkların yurdumuzda sık görülmesi, bizce eritrosit G6PD aktivitesinin hemoglobin konsantrasyonuna oranlanmasının en önemli sakıncasını oluşturmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda alternatif olarak G6PD aktivitesi eritrosit sayısına oranlanarak, sonuçlar karşılaştırılmıştır.

G6PD eritrositlerin yanı sıra lökosit ve trombosit gibi diğer kan hücrelerinde de bulunmaktadır. Eritrosit G6PD aktivitesi analiz ortamında bu hücrelerin varlığının yanıltıcı olabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla eritrosit süspansiyonunda lökosit ve trombosit sayıları saptanarak enzim aktivitesine etkileri araştırılmıştır.

### **Gaziantep İl Merkezi Örneklem Grubunda G6PD Aktiviteleri Dağılım Eğrilerinin İrdelenmesi**

Çalışmamız örneklem grubunda hemoglobin konsantrasyonu ve eritrosit sayısına oranlanarak tanımlanan G6PD aktiviteleri dağılımları ünimodal özellik göstermektedir. ( Şekil 27-a ve b ).Ancak Gaussian dağılımına göre piklerin daha sivri olduğu ve histogramların her iki ucunda kuyruklanmaların varlığı dikkat çekmektedir.

Eritrosit sayısına oranlanan G6PD aktivitesi dağılım eğrisi Tablo 9'da görüldüğü gibi birbirine yakın ortalama, ortanca ve tepe değeri (sırasıyla 249, 249, 257) ve çok hafif asimetri göstermesi (asimetri; -0.3) ile Gaussian dağılımına benzemekte, farklı olarak yüksek sivrilik değeri (sivrilik; 5.7) taşımaktadır. Bu veriler G6PD aktivitesinin dar sınırlar içinde yoğunlaştığını düşündürmektedir.

Hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktiviteleri dağılımı daha yüksek sivrilik değeri (sivrilik:12.0) ve asimetri (asimetri: 1.6) göstermektedir. Şekil 27-b incelendiğinde sola çarpık bu asimetrinin Gaussian tipteki dağılımından uzak birkaç olgudan kaynaklanabileceği görülmektedir. Bu dağılımda da ortalama, ortanca ve tepe değerleri (sırasıyla 8.8, 8.6, 8.3) birbirine yakındır ve sola çarpık asimetriyi desteklemektedir :  $\bar{X} > Ort > TD$  (Tablo 9). Tablo 10-a ve b'de görüldüğü gibi örneklem grubunda eritrosit sayısı ve hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktivitesi dağılımları normal dağılıma uygunluk göstermemektedir. (sd: 7,  $\chi^2 > 24.32$ ,  $p < 0.001$ ). Çoğu analitin normal dağılıma uygun olmadığı bilindiğinden bu sonuç şaşırtıcı değildir.<sup>21</sup> Her iki dağılımda da sivrilik değerinin yüksek oluşu genetik eksikliği dışında eritrosit G6PD aktivitesinin bireyler arasında önemli



farklılık göstermediğini, çevresel, fizyolojik ve patolojik koşullara bağlı olarak kolaylıkla değişmediğini düşündürmektedir.

Yüreğir ve ark. 1994'te Çukurova bölgesinde yaptıkları çalışmada hemoglobine oranlanan G6PD aktivite dağılımının, Gaussian dağılımına uygun olduğunu saptamışlardır.<sup>12</sup>

### **Örneklem Grubunda Altgrupların Analizi**

G6PD aktivitesi dağılımlarının ünimodal olduğu gözlenmekle birlikte gizli bir non-homojenitenin varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla kadın ve erkek altgruplarında enzim aktivitesinin farklılığı ve yaş ile enzim aktivitesinin korelasyonu incelenmiştir.

Yeni doğan ve süt çocuklarında hematolojik parametrelerin dinamik bir değişim gösterdiği bilinmektedir. Fetal yaşamdan dış dünyaya uyumu sağlayan bu süreç, aktif eritropoez odaklarının değişimi yanı sıra dolaşımında nispeten genç hücrelerin bulunması ile de karakterizedir.<sup>9,81</sup>

Fetüs, yeni doğan ve süt çocuğu kanlarında eritrosit enzim aktiviteleri araştırılmış ve erişkinlerden farklı bulunmuştur. Vetrella ve Barthelman (1971) fetus ve yenidoğanda eritrosit sayısına oranlanan G6PD aktivitelerinin birbirinden farksız, erişkinlerdekinden yüksek olduğunu saptamışlardır. Bu farklılığın genç eritrosit oranı ile ilgisinin araştırılmasını önermişlerdir.<sup>82</sup> Konrad ve ark. (1972) eritrositlerin ayırıcı sedimantasyonu sonrası yaptıkları çalışmada yenidoğan ve kordon kanındaki yüksek G6PD aktivitesinin, sadece ortalama eritrosit yaşının küçük veya eritrosit hacminin büyük olması ile açıklanamayacağını bildirmişlerdir.<sup>83</sup> Travis ve ark. (1980) PK aktivitesine oranlanan G6PD aktivitesinin doğumda erişkinlerden yüksek olduğunu, 11. aya kadar erişkin düzeylerine düştüğünü saptamışlardır. 11-12. aylarda görülen artışın ise olasılıkla bu yaş grubunda sık rastlanılan demir preparatlarının kullanımı ve buna bağlı gelişen retikülositozdan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir.<sup>33,81</sup>

Bu çalışmaların ışığında eritrosit G6PD aktiviteleri ve yaş arasındaki korelasyon araştırılırken 0-1 yaş grubu örneklem grubuna dahil edilmemiştir. Bir yaş üzeri çocuklar ve erişkinlerde ise enzim aktivitesinin yaşa bağlı değişimi beklenen bir sonuç değildir.<sup>33</sup> Çalışmamızda Şekil 28'de görüldüğü gibi bir yaş üzeri bireylerde yaş ve enzim aktiviteleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır ( $r: 0.023, p>0.5$ ). Benzer bulgular Yüreğir ve ark. (1994) tarafından da saptanmıştır.<sup>12</sup>

Steele ve Migeon (1973) kültüre edilen fetal akciğer fibroblastlarında X kromozomu inaktivasyonuna rağmen dişi fetuslarda G6PD aktivitesinin % 45 oranında yüksek olduğunu, doğumdan bir kaç hafta sonra erkek bebeklerde aktivitenin hızlı yükselişi ile farkın kaybolduğunu saptamışlardır.<sup>84</sup> Erişkinlerde ise eritrosit G6PD aktivitesinin cinsiyete bağlı değişim göstermediği bilinmektedir.<sup>12,33</sup> Çalışmamızda G6PD aktiviteleri için ortalama  $\pm$  SD değerleri kadın ( $250 \pm 46$  mÜ/ $10^9$  RBC ve  $9.0 \pm 2.1$  Ü/g Hb) ve erkek ( $253 \pm 60$  mÜ /  $10^9$  RBC ve  $8.8 \pm 2.4$  Ü/g Hb) altgruplarında farklılık göstermemektedir ( $p>0.05$ ). Bu veriler örneklem grubunda G6PD aktivitesinin homojen dağıldığını, her iki cinsiyet ve bir yaş üzeri bireyleri için tek referans aralık belirlenmesinin yeterli olduğunu göstermektedir.

### **Eritrosit G6PD Aktivitesi İçin Saptanan Referans Sınırlarının Değerlendirilmesi.**

Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesi (NCCLS) bir yöntem için referans sınırların belirlenmesinde en az 120 referans bireyin analiz edilmesini önermektedir. % 99'luk güvenlik için ise 198 birey gerekmektedir.<sup>21</sup> Örneklem grubumuzun (n: 306; 166 K, 140 E) büyüklüğü referans sınırların saptanması için yeterlidir.

Hematolojide Standardizasyon Uluslararası Komitesi (ICSH) eritrosit G6PD aktivitesi için referans değerleri ortalama 8.34, SD 1.59 Ü/g Hb, 30 °C olarak

bildirmiştir.<sup>25</sup> Çalışmamızda kullandığımız yöntem, ICSH yöntemi ile hemolizat içeriği ve su körü kullanılması dışında diğer reaksiyon bileşenlerinin konsantrasyonları, pH, sıcaklık, inkübasyon ortamı ve süresi gibi koşullar açısından eşittir. Bu nedenle yöresel G6PD aktivitesinin bu referans değerlerle kıyaslanması doğru olacaktır. Ortalama 8.8, SD 2.3 Ü/g Hb, 30 °C olarak saptadığımız değerler ICSH referans değerleri ile benzeşmektedir. Gelişmekte olan diğer ülkeler gibi yurdumuzda da demir eksikliği anemisi sık görülmektedir. Yöresel G6PD aktivitesinin ICSH değerlerinden hafifçe yüksek olmasının örneklem grubundaki anemik olgularda hemoglobine oranlanan aktivitenin yalancı artışından kaynaklanabileceğini düşünüyoruz.

G6PD için referans değerleri (ortalama  $\pm$  2 SD), Beutler  $12.1 \pm 4.1$  Ü/g Hb 37 °C, Fairbanks ve arkadaşları  $13.0 \pm 5.0$  Ü/g Hb 37 °C olarak bildirmiştir.<sup>12,18</sup> Yüreğir ve arkadaşları G6PD aktivitesini Çukurova bölgesinde ortalama : 8.6, SD: 3.3 Ü/g Hb, 37 °C olarak saptamış, bulguların 37°C için referans değerlerden düşüklüğünü bölgede enzim eksikliği prevalansının yüksek olması ve G6PD polimorfizmi ile açıklamışlardır.<sup>12</sup>

Referans sınırlarının saptanmasında kabul edilen yaygın görüş ortalamadan 2 SD uzaklıktaki değerlerin alt ve üst sınırlar olarak belirtilmesidir. IFCC ise % 95'lik güvenlik aralığı sınırlarının referans aralığı belirlemesini önermektedir.<sup>18,21</sup> Birinci görüşün G6PD eksikliği oranının yüksek olduğu bölgelerde doğru bir yaklaşım olacağını, ikinci görüşün ise dağılım eğrisinin asimetrisini ihmal etmediği için enzim eksikliği prevalansının düşük beklendiği yörelerde tercih edilmesi gerektiğini düşünüyoruz. Biz çalışmamızda uç değerlerin atılmasını takiben % 95 güvenlik aralığı yöntemini kullandık. Bu yaklaşımla eritrosit G6PD aktiviteleri referans sınırları 6.4-13.2 Ü/g Hb, 30 °C olmaktadır. Bu değerler ICSH'nin referans değerlerinden ( $\bar{X} \pm 2$  SD ; 5.2 - 11.5 Ü/g Hb, 30°C) yüksektir.<sup>25</sup> ICSH hemoglobin konsantrasyonunun hemolizattan analiz edilmesini önermektedir (Hb  $\cong$  2g / dl). Düşük konsantrasyondaki hemoglobin ölçümü seyrelme faktörü ile düzeltildiğinde gerçek konsantrasyondan (+) yöne hafif bir sapma göstermesi beklenir.

Çalışmamızda ise hemoglobin konsantrasyonu eritrosit süspansiyonunda ( $Hb \cong 14$  g/dl) gerçekleştirilmiştir. Anemik olgularımızın varlığı yanı sıra hemoglobin analizi ve istatistiksel yaklaşım farklılıkları referans sınırlarımızın yüksekliğini açıklamaktadır.

Bauer, DSÖ yöntemi ile eritrosit G6PD aktivitesini 5.9 - 12.0 Ü/g Hb veya 200 - 400 Ü/10<sup>12</sup> RBC, 30 °C olarak bildirmiştir. Bu çalışmada, preinkübasyon sıcaklığı (30 °C), süresi (5 dakika) ve reaksiyon bileşenlerinin konsantrasyonları da farklıdır. Hemoglobine oranlanan aktivitenin yöresel değerlerimizden ( 6.4 - 13.2 Ü/g Hb veya 178 - 354 mÜ/10<sup>9</sup> RBC, 30 °C) düşük oluşu yurdumuzda anemilerin sıklığı, eritrosit sayısına oranlanan aktivitenin yüksekliği ise farklı preinkübasyon sıcaklığı ve diğer yöntemsel farklardan kaynaklanabilir. Bauer referans değerleri hangi yaklaşımla saptadığını da bildirmemiştir.<sup>57</sup>

Klinik düzeyde hemolizin normal eritrosit oranının % 50'nin altına düştüğü olgularda görüldüğü ileri sürülmektedir.<sup>18</sup> Bu da aktivitesi sifıra yakın varyantlarda 4.4 Ü/g Hb değerlerine karşılık gelir. Ancak bilindiği gibi heterozigot bireylerde bu oran genellikle % 50'nin üzerindedir.<sup>8,47</sup> Heterozigot bireylerde subklinik hemolitik krizlerin ve hafif düzeyde kronik bir aneminin sakıncalarını ihmal etmemek açısından ortalama G6PD aktivitesinin yaklaşık % 75 ine karşılık gelen 6.4 Ü / g Hb alt sınırlarımızın klinikte de hekim ve hastalar açısından doğru bir yaklaşım getireceğini düşünmekteyiz.

### **Gaziantep İl Merkezi Örnekleme Grubunda G6PD Eksikliği Oranı ile İlgili Yorumlar**

Gaziantep İl Merkezinde ikamet eden 1-80 yaşları arasında ( $\bar{X}$ : 39.5) 306 bireyden oluşan örneklem grubunda yedi bireyde eritrosit G6PD aktivitesi saptadığımız referans değerinin altında (178 mÜ/10<sup>9</sup> RBC veya 6.4 Ü/g Hb) bulunmuş ve G6PD eksikliği oranı % 2.3 olarak saptanmıştır. Nüfusu 604.000 olan Gaziantep il merkezi toplumunda % 95 lik güvenlik sınırları içinde G6PD

eksikliği prevalansının saptanması yaklaşık 1100 bireyin araştırılmasını gerektirmektedir. Çalışmamız örneklem grubu yeterli büyüklükte olmamasına rağmen Gaziantep il merkezi toplumunda G6PD eksikliği sıklığının yaklaşık %  $2.3 \pm 1$  oranında olduğunu düşündürmekte ve bu bölgede yapılacak diğer araştırmalar için başlangıç niteliği taşımaktadır.

Türkiye genelinde beklenen G6PD eksikliği prevalansı % 0.5 düzeyindedir. Ancak G6PD eksikliği prevalansının bölgelere göre değişiklik gösterebildiği bilinmektedir. Gaziantep'e komşu iller olan Adana sıtmanın endemik olarak (1979) görülmesi, Antakya ise farklı etnik yapısı ile dikkat çekmektedir. Her iki kentte de G6PD eksikliği oranı yüksek olarak bulunmuştur (sırasıyla % 8.2, % 11.4). Gaziantep coğrafi konumu ve etnik yapısı ile Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu kentleri arasında bir geçiş toplumdur. Bu nedenle Gaziantep İl Merkezinde saptadığımız Türkiye genelinden yüksek % 2.3 oranı beklentilerimizle uyumludur.

Bu oran, yöremizde klinik laboratuvarlarda G6PD analizinin rutin bir test olarak uygulanmasının ve hekimlerin tanı ve tedavi yaklaşımlarında G6PD eksikliğini göz önünde bulundurmalarının gerekliliğini göstermektedir.

DSÖ (1981) Türkiye'de en sık görülen G6PD varyantının Gd Mediterranean olduğunu bildirmiştir.<sup>54</sup> Enzim aktivitesi 0 olarak saptanan üç hemizigot olgunun yanı sıra, enzim aktiviteleri  $86-152 \text{ mÜ}/10^9 \text{ RBC}$  veya  $2.9 - 4.6 \text{ Ü/g Hb}$  arasında olan üç bireyin heterozigot oldukları varsayılarak, Gd Mediterranean varyantını taşıdıkları düşünülebilir. Ancak enzim aktivitesi  $92 \text{ mÜ}/10^9 \text{ RBC}$  veya  $3.7 \text{ Ü/g Hb}$  olarak saptanan erkek olgunun varlığı yurdumuzda diğer varyantların da bulunabileceğini göstermektedir.

Eritrosit G6PD aktiviteleri düşük bulunan olguların başvuru şikayetleri incelenmiştir. Aktiviteleri 0 bulunan olguların sırasıyla kemik yaşı tespiti, kontrol ve böbrek taşı takibi, diğer olguların ellerde uyuşma ve ağrı tedavisi, kardiyomiyopati takibi, üst solunum yolu infeksiyonu, böğür ağrısı ve kanlı idrar şikayetinin incelenmesi amacı ile sağlık kurumlarına başvurdukları görülmüştür. Bu olgulardan

ikisi dikkatli bir anamnezle G6PD eksikliği ile ilgili olabilecek ara sıra çay rengi idrar çıkarma şikayetleri olduğunu belirtmişlerdir. Enzim aktivitesi 0 bulunan olgularda bile G6PD eksikliği ile ilgili olabilecek önemli şikayetlerin olmayışı dikkati çekmekte ve G6PD eksikliğinin bazı bölgelerde fizyolojik bir varyasyon kadar sık görülebilmesini açıklamaktadır.

### **G6PD Aktivitesi Hangi Parametreye Oranlanarak Tanımlanmalıdır ?**

G6PD aktivitesi hemolizatta ölçülen hemoglobin konsantrasyonuna veya tam kanda saptanan eritrosit sayısına oranlanarak tanımlanmaktadır.<sup>18,25</sup> Bu şekliyle her iki yaklaşım da analitik hataya açıktır. Hemolizatta hemoglobin ölçümü düşük absorbans değerlerinin yol açabileceği sapmalar, tam kanda eritrosit sayımı da yıkama sırasında meydana gelebilecek kayıplar nedeniyle yanıltıcı olabilir. Biz çalışmamızda uyguladığımız gibi, hemoglobin konsantrasyonu ve eritrosit sayısı ölçümlerinin eritrosit süspansiyonunda yapılmasının analitik hatayı en aza düşürecek yaklaşım olduğunu düşünüyoruz.<sup>57</sup>

Bu analitik yaklaşım yanı sıra G6PD aktivitesini hangi parametreye oranlanması gerektiği de saptanmalıdır. İdeal koşullarda bu parametre G6PD aktivitesini belirleyici, diğer faktörlerden ise bağımsız olmalıdır.

Çalışmamızda direkt enzim aktivitesi ile hemoglobin konsantrasyonu ve eritrosit sayısı arasındaki ilişki araştırılmıştır. Tablo 15'te görüldüğü gibi eritrosit sayısı ile direkt enzim aktivitesi arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon ( $r: 0.53, p < 0.001$ ) bulunmuştur. Hemoglobin konsantrasyonu ile direkt enzim aktivitesi arasında ise anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ( $r: -0.01, p > 0.05$ ). Bu veriler G6PD aktivitesi için eritrosit sayısının belirleyici bir faktör hemoglobin konsantrasyonunun ise bağımsız bir eritrosit bileşeni olduğunu düşündürmektedir. Gerçekten de hemoglobin konsantrasyonu farklı genetik, fizyolojik etkenlere bağlı olarak düzenlenmekte, çevresel etkilerle değişkenlik gösterebilmektedir.<sup>9,18</sup>



G6PD aktivitesine lökosit ve trombosit kirliliklerinin etkisi araştırılmış ve direkt enzim aktivitesi ile pozitif yönde, zayıf bir korelasyon varlığı saptanmıştır (sırasıyla  $r: 0.17$  ve  $r: 0.29$ ,  $p < 0.001$ ). Eritrosit süspansiyonunun RBC ve trombosit içerikleri arasında anlamlı bir korelasyon varlığı ( $r: 0.48$ ,  $p < 0.05$ ) bu ilintinin dolaylı olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle uygulanan kısmi korelasyon analizinde, direkt enzim aktivitesi ile trombosit sayısı arasında ilinti olmadığı saptanmıştır ( $r: 0.01$ ,  $p > 0.5$ ).

G6PD aktivitesi ile eritrosit indisleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Direkt enzim aktivitesi MCV ( $r: - 0.44$ ,  $p < 0.001$ ) ve MCH ( $r: - 0.29$ ,  $p < 0.001$ ) ile negatif yönde anlamlı korelasyon göstermektedir. MCV ve MCH'nin azalan değerlerine karşılık artan G6PD aktivitesi bize göre eritrosit morfolojisi veya düşük MCV'ye yol açan patolojilerden kaynaklanmamaktadır. Yöntemimizde eritrosit süspansiyonunun hematokrit oranı yaklaşık olarak sabit tutulmuştur ( $\bar{X} \pm SD: 44-50$ ). Sabit hematokrit oranlarında azalan MCV değerleri aynı zamanda eritrosit sayısının artışı anlamını taşımakta ve G6PD aktivitesini belirleyici faktörün eritrosit sayısı olduğunu desteklemektedir. MCH ile enzim aktivitesi arasındaki negatif ilişki ise demir eksikliği anemisi ve talasemi sendromları gibi patolojik durumlarda düşük MCV ve düşük MCH'nin birlikteliğinden kaynaklanmaktadır.<sup>9,18,41</sup> Çalışmamızda da MCV ve MCH değerleri ilintili bulunmuştur ( $r: 0.61$ ;  $p < 0.05$ ). MCV ve MCH arasındaki korelasyonun, MCH ve direkt enzim aktivitesi arasındaki korelasyona etkisini ortadan kaldırmak için kısmi korelasyon analizi uygulandığında MCH ve direkt enzim aktivitesi arasında ilinti olmadığı saptanmıştır ( $r: -0.02$ ;  $p > 0.5$ ).

Aksu 1972'de yaptığı çalışmada MCH ile G6PD arasındaki ilgiden bahsetmiştir. Kordon kanı, yenidoğan ve erişkin eritrositlerinde hemoglobine oranlanan enzim aktivitelerini (sırasıyla  $3.93 \pm 1.53$ ,  $4.31 \pm 0.93$ ,  $4.76 \pm 1.16$ ) saptamıştır. Aksu erişkinlerde hemoglobine oranlanan G6PD aktivitesinin rölatif yüksekliğini düşük MCH değerleri ile açıklamış, gerçekte kordon ve yenidoğan kanında daha yüksek olduğunu belirtmiştir.<sup>85</sup>

Enzim aktivitesi eritrosit sayısı ve hemoglobin konsantrasyonlarına oranlanarak ifade edildiğinde eritrosit indisleri ile ilişkinin ne yönde değiştiği araştırılmıştır. Tablo 18’de görüldüğü gibi hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan enzim aktivitesi MCV ve MCH değerleri ile negatif yönde anlamlı bir korelasyon göstermektedir (r: -0.61 ve r: -0.44, p < 0.001). Bu korelasyon direkt enzim aktivitesinde saptanan korelasyondan daha belirgin hale gelmiştir.

Bize göre ters yöndeki bu ilintinin kuvvetlenişi demir eksikliği anemisi ve talasemi sendromları gibi patolojik ve 1 - 12 yaş arası çocuklarda görüldüğü gibi fizyolojik nedenlerle, düşük MCV ve MCH değerleri ile düşük hemoglobin konsantrasyonlarının birlikte bulunmasından kaynaklanmaktadır. Bu veriler G6PD aktivitesinin hemoglobin konsantrasyonuna oranlanmasının her iki grupta enzim aktivitesinin yalancı artışına yol açabileceğini düşündürmektedir. Eritrosit sayısına oranlanan enzim aktivitesi ise eritrosit indisleri ile anlamlı bir korelasyon göstermemektedir. Bu özelliği ile eritrosit morfolojisini etkileyebilecek patolojik ve fizyolojik durumlarda da güvenilir sonuçlar elde edileceği düşünülebilir.

Eritrosit süspansiyonunda lökosit ve trombosit kirliliğinin enzim aktivitesine etkisi, aktivitenin hemoglobin konsantrasyonu veya eritrosit sayısına oranlanması ile farklılık göstermektedir. (Tablo 18). Hemoglobin konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktivitesi lökosit ve trombosit sayıları ile anlamlı, pozitif yönde korelasyon göstermektedir (r:0.25 ve r: 0.33, p < 0.001). Eritrosit sayısına oranlanan enzim aktivitesinin ise trombosit sayısı ile etkileşiminin kalktığı ( r: 0.04, p > 0.5), lökosit sayısı ile korelasyonunun zayıfladığı (r: 0.15, p < 0.01) görülmektedir. Trombosit sayısı ile korelasyonun bu değişimi trombositlerin enzim içeriklerinden çok, ortamda trombosit yoğunluğunun eritrosit yoğunluğu ile birlikte olmasından kaynaklanan bir etkileşimi düşündürmektedir. Kısmi korelasyon analizi ile trombosit sayısı ve direkt enzim aktivitesi arasındaki ilintinin ortadan kalkması bu düşüncüyü desteklemektedir (r:0.0076, p>0.5). Bilindiği gibi G6PD spesifik aktivitesi eritrositlerde (180 Ü/mg protein), lökosit (0.86 Ü/mg protein) ve trombositlerden (0.19 Ü/mg protein) daha yüksektir.<sup>10,43</sup> Çalışmamız, eritrosit sayısı ve hemoglobin



konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktivitesinin her iki koşulda da eritrosit süspansiyonun lökosit içeriğinden etkilendiğini, bu etkileşimin lökositlerin enzim içeriğinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Bu da lökosit kirliliğinin yüksek düzeyde olmasının analitik hata nedeni olabileceğini göstermektedir.

Regresyon eşitliği ile hesaplanarak bulunan ve gerçek enzim aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $p>0.1$ ). Ancak MCV'si düşük olgularda bu farkın önemli boyutlarda olduğu görülmektedir. Bu nedenle regresyon eşitliğinin pratik kullanımının her zaman doğru sonuç vermeyebileceği dikkate alınmalıdır. Hesaplanarak bulunan ve gerçek enzim aktiviteleri arasındaki fark MCV ile negatif yönde anlamlı korelasyon göstermektedir ( $r:-0.79$ ,  $p<0.01$ ). Bu ilinti de sabit hematokrit oranlarında düşük MCV değerlerinin analitik ortamda eritrosit sayısı artışı, fizyopatolojik olarak da düşük hemoglobin konsantrasyonları ile birlikte görülmesinden kaynaklanmaktadır.

Bu veriler sağlıklı bireylerde eritrosit G6PD aktivitesini belirleyici ana faktörün eritrosit sayısı olduğunu, eritrosit sayısına oranlanan G6PD aktivitesinin lökosit içeriği dışında, eritrosit süspansiyonundaki hücre kirliliğinden ve eritrosit morfolojisinden etkilenmediğini göstermektedir.

G6PD aktivitesi hemoglobin konsantrasyonuna oranlandığında ise eritrosit süspansiyonunun lökosit ve trombosit içeriği ile ilintili olarak değişebilmekte, eritrosit morfolojisini ve büyük olasılıkla tam kan hemoglobin düzeyini etkileyen fizyolojik ve patolojik durumlarda yanıltıcı sonuçlar verebileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda, demir eksikliği anemisi, talasemi sendromları ve hemoglobinopatiler gibi hemoglobin konsantrasyonu ve eritrosit morfolojisini etkileyen hastalıkların sık görüldüğü yurdumuzda G6PD aktivitesinin RBC sayısına oranlanmasının önem kazandığı, analitik ortamda lökosit kirliliğinin yanıltıcı olabileceği sonucuna varılmıştır.<sup>86</sup>

## SONUÇLAR

1- +4 °C'da bekletilen eritrosit paketi ve heparinli tam kanda, eritrosit G6PD aktivitesinin, üç gün boyunca değişmediği, antikoagülant olarak ASD çözeltisi kullanılmasının enzim stabilitesini olumsuz etkilediği saptanmıştır.

2- EDTA -2- merkapto etanol çözeltisi ile elde edilen hemolizatlarda +4 °C'da, 120 dakika boyunca enzim aktivitesinin değişmediği gözlenmiştir.

3-Nicel spektrofotometrik G6PD analizinde su körü kullanılması, örnek körü veya substrat körü kullanımı ile eş sonuçlar vermektedir.

4- Gaziantep il merkezi örneklem grubunda eritrosit sayısı veya Hb konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktivite dağılımları, normal dağılıma uygun değildir, yüksek sivrilik değeri göstermektedir.

5- Eritrosit G6PD aktivitesi cinsiyetler arası farklılık ( $p>0.05$ ) ve yaşa bağlı bir değişim göstermediğinden ( $p>0.5$ ) bir yaş üzeri bireyler için tek referans aralık saptanması yeterli bulunmuştur.

6- Gaziantep il merkezinde eritrosit G6PD aktivitesi referans değerleri 6.4-13.2 Ü/g Hb veya 178-354 mÜ/10<sup>9</sup> RBC, 30°C olarak belirlenmiştir.

7- Gaziantep il merkezinde G6PD eksikliği sıklığı yaklaşık % 2.3 ± 1 oranındadır.

8- G6PD aktivitesi ile hemoglobin konsantrasyonu ilintisiz bulunmuş ( $p>0.05$ ), eritrosit sayısının enzim aktivitesinin belirlenmesinde etkili olduğu ( $r: 0.53, p<0.001$ ) sonucuna varılmıştır.

9- Enzim aktivitesi, analiz ortamının lökosit ( $r:0.53, p<0.001$ ) ve trombosit içeriği ile korele bulunmuş ancak trombosit sayısı ile ilintinin dolaylı olduğu anlaşılmıştır.

10- Enzim aktivitesinin MCV ( $r: -0.44, p<0.001$ ) ve MCH ile negatif yönde korele olduğu, fakat MCH ile korelasyonun dolaylı olduğu saptanmıştır.

**11-** Hb konsantrasyonuna oranlanan G6PD aktivitesi MCV (r: -0.61), MCH (r: -0.44), lökosit sayısı (r: 0.25) ve trombosit sayısı (r: -0.44) ile etkileşim göstermektedir (p<0.001).

**12-** Eritrosit sayısına oranlanan G6PD aktivitesi sadece lökosit sayısından etkilenmektedir (r: 0.15, p<0.01).

**13-** Eritrosit sayısına ve Hb konsantrasyonuna oranlanan enzim aktiviteleri regresyon eşitliği ile birbirine dönüştürülebilmektedir (p<0.001).

$$EA (\text{Ü/g Hb}): [0.032 \times EA(\text{mÜ}/10^9 \text{RBC})] + 0.77$$

**14-** Regresyon eşitliği ile hesaplanan ve gerçek enzim aktiviteleri istatistiksel olarak farksız bulunmuştur ( p>0.1). Ancak bu aktiviteler arasındaki fark MCV ile negatif yönde korelasyon göstermektedir (r: -0,79, p<0.01).



## ÖZET

G6PD eksikliği, oksidan strese bağlı gelişen akut hemolitik krizlerle karakterize bir eritrosit enzim kusurudur. Genetik polimorfizm göstermekte, sıklığı coğrafi bölgeler ve etnik gruplar arasında değişebilmektedir.

Çalışmamızda, Gaziantep il merkezinde yaşayan 1-80 yaşları arasında 306 bireyin (166 K, 140 E) eritrosit G6PD aktiviteleri nicel spektrofotometrik yöntemle saptanmıştır. G6PD aktivitesinin analizinde ve tanımlanmasında doğru yaklaşımın belirlenmesi amacıyla bazı yöntemsel modifikasyonlar denenmiş, enzim aktivitesine analitik ortam bileşenlerinin etkisi (RBC, hemoglobin, lökosit, trombosit) ve eritrosit morfolojisinin (MCV, MCH) olası etkileri araştırılmıştır.

G6PD aktivitesinin cinsiyetler arası farklılık ( $p>0.05$ ) ve yaşa bağlı bir değişim ( $p>0.5$ ) göstermediği anlaşılmış, bir yaş üzeri bireyler için tek referans aralık belirlenmesi yeterli bulunmuştur. Yüksek sapma gösteren değerlerin atılmasından sonra % 95 intersantil aralık ile referans sınırlar 6.4 - 13.2 Ü/g Hb veya 178-354 mÜ/10<sup>9</sup> RBC, 30 °C olarak saptanmıştır. Enzim aktivitesi alt sınırdan düşük bulunan 7 olgu Gaziantep il merkezinde G6PD eksikliğinin % 2.3 ± 1 oranında görüldüğünü düşündürmektedir.

Parametreleri analitik açıdan incelenen 242 olguda, enzim aktivitesinin hemoglobin konsantrasyonu ile ilintisinin olmadığı ( $p>0.05$ ), belirleyici faktörün RBC sayısı olduğu ( $r: 0.53$ ,  $p<0.001$ ) anlaşılmıştır. Hemoglobin konsantrasyonuna oranlanarak tanımlanan enzim aktivitesi analitik ortamda lökosit, trombosit varlığı ve eritrosit indisleri ( $p<0.001$ ) ile ilintili bulunmuştur. RBC sayısına oranlanan enzim aktivitesi ise sadece lökosit kirliliğinden ( $p<0.01$ ) etkilenmektedir.

G6PD eksikliği prevalansının yüksek olduğu Akdeniz bölgesine komşuluğu nedeniyle, Gaziantep'te saptadığımız Türkiye genelinden yüksek % 2.3 ± 1 oranı beklentilerimizle uyumludur. Çalışmamız G6PD aktivitesinin RBC sayısına oranlanmasının eritrosit morfolojisini etkileyen koşullarda da güveniler sonuçlar verdiğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: G6PD sıklığı, eritrosit sayısı, hemoglobin konsantrasyonu, MCV.

## SUMMARY

G6PD deficiency is an erythrocyte enzyme defect characterized with acute hemolytic episodes on an exposure to oxidative stress. G6PD manifests genetic polymorphism and deficiency prevalence varies among geographic regions and ethnic groups.

In this study 306 subjects (166 F, 140 M) between 1-80 years old were analyzed for erythrocyte G6PD activity with quantitative spectrophotometric method. To attain the true approach for analyzing and expressing G6PD activity, some methodological modifications were tested and the probable effect of analytical medium components (RBC, hemoglobin, leucocyte, platelet) and erythrocyte morphology (MCV, MCH) were investigated.

As neither a difference between sex groups ( $p>0.05$ ) nor a relation with age ( $p>0.5$ ) was observed, unique reference interval was established for subjects over one year old. After excluding highly deviating outliers, 95 % interpercentil interval was accepted as reference limits: 6.4-13.2 U/g Hb or 178-354 mU/ $10^9$  RBC, 30 °C. Seven subjects whose enzyme activity is below the lower reference limit indicate that G6PD deficiency frequency is  $2.3 \pm 1$  % in Gaziantep.

Investigation of 242 samples indicated that G6PD activity is not related to hemoglobin concentration ( $p>0.05$ ), where RBC count is the determining factor ( $r: 0.53$ ,  $p<0.001$ ). Enzyme activity as a ratio of hemoglobin concentration was correlated to leucocyte and platelet content of analytical medium and to erythrocyte indices ( $p<0.001$ ). But enzyme activity as a ratio of RBC count was only affected with leucocyte contamination ( $p<0.01$ ).

Because of neighbouring with Mediterranean region, G6PD deficiency frequency in Gaziantep, higher than the mean for Turkey, is in accordance with our expectancy. Our results also indicate that G6PD activity expressed as a ratio of RBC count is reliable even in conditions that affect erythrocyte morphology.

**Key words:** G6PD frequency, RBC count, hemoglobin concentration, MCV.

## KAYNAKLAR

1. Cooper R A, Bunn H F: Hemolytic Anemias. In: Harrison's Principles of Internal Medicine (10<sup>th</sup> ed). Petersdorf RG, Adams RD, Braunwald E et al (ed). Vol: 329, Japan.Mc Graw - Hill Book Co. 1883. p: 1872 - 1875.
2. Morelli A, Benatti U, Gaetani GF, De Flora A: Biochemical mechanisms of glucose -6- phosphate dehydrogenase deficiency. Proc Natl Acad Sci 75 (4): 1979-1983, 1978.
3. Naylor CE, Rowland P, Basak AK et al. : Glucose 6 - phosphate dehydrogenase mutations causing enzyme deficiency in a model of the tertiary structure of the human enzyme. Blood 87 (7): 2974-2982, 1996.
4. Gözükara EM: Biyokimya . Ankara: Ofset Repromat Ltd Şti, 1990. s. 923-932.
5. Ünlükurt İ, Aksoy K: Glukoz -6- fosfat dehidrogenaz enzimi ile eser elementler arasındaki ilişki. T.C. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Master Tezi: 1-67, 1992.
6. Beutler E, Kuhl W, Gelbart T, Forman L: DNA sequence abnormalities of human glucose -6- phosphate dehydrogenase variants. The Journal of Biological Chemistry 266 (7) : 4145-4150, 1991.
7. Cappellini MD, Montemuros FM, De Bellis G et al. : Multiple G6PD mutations are associated with a clinical and biochemical phenotype similar to that of G6PD Mediterranean. Blood 87 (9) : 3953-3958, 1996.
8. Thompson MW: Genetics in Medicine (5<sup>th</sup> ed.) USA: WB Saunders Co, 1996. p. 72-74.
9. Nelson DA, Davey FR: Erythrocytic Disorders. In: Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods (18<sup>th</sup> ed). Henry JB (ed). Vol: 26, Philadelphia. WB Saunders Co. 1991. p: 660-662.

10. Mamlök RJ, Mills GC, Goldblum RM et al. : Glucose -6- phosphate dehydrogenase Beaumont: A new variant with severe enzyme deficiency and chronic nonspherocytic hemolytic anemia. *Enzyme* 34: 15-21, 1985.
11. Aksoy K, Yüreğir GT, Dikmen N, Ünlükurt İ: Three new G6PD variants, G6PD Adana, G6PD Samandağ and G6PD Balcalı in Çukurova, Turkey. *Hum Genet* 624: 1-3, 1987.
12. Yüreğir GT, Aksoy K, Arpacı A et al.: Studies on red cell glucose -6- phosphate dehydrogenase: evaluation of reference values. *Ann Clin Biochem* 31: 50-55, 1994.
13. Say B, Ozand P, Berkel İ, Çevik N: Erythrocyte glucose -6- phosphate dehydrogenase deficiency in Turkey. *Acta Paediatrica Scandinavica* 54: 319-324, 1965.
14. Aksoy K: Glukoz -6- fosfat dehidrogenaz enziminin yapısı. Tübitak Biyokimya yaz okulu ders notları, 1997.
15. Vogels IMC, Van Noorden CJF, Wolf BHM et al. Cytochemical determination of heterozygous glucose -6- phosphate dehydrogenase deficiency in erythrocytes. *Br J Haematol* 83 (2): 402-405, 1986.
16. Pasternak CA: İnsan Biyokimyasına Giriş (2. baskı), Çevirenler: Ciliv G, Emerk K, Karan A. Çağ Matbaacılık, Ankara 1980. s. 196-205.
17. Alberts B, Bray D, Lewis J et al.: *Biology of the Cell* (3<sup>rd</sup> ed.). New York: Grand Publishing, 1994. p. 489-494.
18. Fairbanks VF, Klee GG: Biochemical aspects of hematology. In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry* (2<sup>nd</sup> ed). Burtis CA, Ashwood ER (ed). Chapter: 37, Philadelphia. WB Saunders Co. 1994. p: 1977-1986.
19. Guyton AC: *Textbook of Medical Physiology* (9<sup>th</sup> ed.). USA: WB Saunders Co, 1996. p.426-431.
20. Jindal HK, Ai Z, Gascard P et al.: Specific loss of protein kinase activities in senescent erythrocytes. *Blood* 88 (4): 1479-1487, 1996.



21. Dods RF: Diabetes mellitus. In: Clinical Chemistry theory, analysis and correlation (3<sup>th</sup> ed). Kaplan AL, Pesce AJ (ed). Chapter: 32, USA. Mosby-Year Book 1996. p. 613-621.

22. Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW: Harper'ın Biyokimyası, Çevirenler: Menteş G, Ersöz B. Barış Kitabevi, İstanbul 1993. s. 237-242.

23. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM: Principles of Biochemistry (2<sup>nd</sup> ed). New York: Worth Publishers, 1993. p. 436-437.

24. Cayuela MM: Oxygen free radicals and human disease. Biochimie 77: 147-161, 1995.

25. Luzzatto L: Investigation of the hereditary haemolytic anaemias: membrane and enzyme abnormalities. In: Practical Haematology (7<sup>th</sup> ed). Dacia JV, Lewis SM (ed). Vol: 14, Singapore. Longman Singapore Pu. 1993. p: 204-214.

26. De Flora A, Morelli A, Benatti U: Entrapment of normal and mutant glucose -6- phosphate dehydrogenase (G6PD) within G6PD deficient erythrocytes. Biblthca haemat 51: 50-56, 1985.

27. Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M, et al: Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. Blood 87 (4): 1595-1599, 1996.

28. Gaetani GF, Rolfo M, Arena S et al.: Active involvement of catalase during hemolytic crises of favism. Blood 88 (3): 1084-1088, 1996.

29. Alhanaty E, Synder M, Sheetz MP: Glucose -6- phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes have an impaired shape recovery mechanism. Blood 63 (5): 1198-1202, 1984.

30. Glader BE: Erythrocyte disorder in infancy. In: Schaffer's Diseases of the Newborn (5<sup>th</sup> ed). Avery ME, Taeusch WB (ed). Philadelphia. WB Saunders Co. 1984. p: 598-600.

31. Stryer L: Biochemistry (3<sup>th</sup> ed). New York.WH Freeman Co, 1988. p. 427-437.



32. Tietz NW, Siggaard-Andersen O, Pruden EL: Acid-base balance and acid-base disorders. In: Tietz Textbook of Clinical Chemistry (2<sup>nd</sup> ed). Burtis CA, Ashwood ER (ed). Chapter 31, Philadelphia. WB Saunders Co. 1994. p: 1422-1424.

33. Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW: Clinical Chemistry Principles and Technics (2<sup>nd</sup> ed). New York. Harper and Row Publishers, 1974. p. 842-854.

34. Human glucose -6- phosphate dehydrogenase gene. gdb home internet adresi: <http://gdbwww.gdb.org>

35. Smits HL, Oski FA, Brody JI: The hemolytic crisis of sickle cell disease: The role of glucose -6- phosphate dehydrogenase deficiency. J Pediatr 44 (4) : 544-551, 1969.

36. Kirkman HN, Hendrickson EM: Sex - linked electrophoretic difference in glucose -6- phosphate dehydrogenase. Am J Hum Genet 15: 241- 258 , 1963.

37. Morisaki T, Fujii H, Takegawa S et al.: G6PD Sendagi: A new glucose -6- phosphate dehydrogenase variant associated with congenital hemolytic anemia. Hum Genet 65 (2): 214-215, 1983.

38. Yüreğir GT, Aksoy K, Dikmen N, Ünlükurt İ: Heterogeneity of glucose -6 - phosphate dehydrogenase in Çukurova , Turkey. Biochimica 13: 933- 935, 1989.

39. Colonna - Romano S , Iolascon A , Lippo S: Genetic heterogeneity at the glucose -6- phosphate dehydrogenase locus in southern Italy: a study on the population of Naples. Hum Genet 69: 228 - 232, 1985.

40. Nakatsuji T, Miwa S: Incidence and characteristics of glucose -6- phosphate dehydrogenase variants in Japan. Hum Genet 51: 297-305, 1979.

41. Beutler E: Glucose -6- phosphate dehydrogenase deficiency. In: The Metabolic Basis of Inherited Disease (4<sup>th</sup> ed). Stanbury JB, Nyngaarden JB, Frederickson DS (ed). Chapter: 60, USA. Mc Graw-Hill Book Co. 1978. p. 1430-1451.

42. Aksoy K, Yüreğir GT, Dikmen N, Ünlükurt İ: Isıya dayanıklı yeni bir glukoz -6- fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği. Ç Ü Tıp Fak Der 2: 202-206, 1989.

43. North ML, Kahn A, Messer J et al.: İctere n o-natal et d ficit en G6PD Ankara, une nouvelle variante enzymatique d couvrir dans une famille turque. Societe Française D'Hematologie 24 (26): 454-459, 1975.
44. Başaran N: Tıbbi Genetik (4. baskı). İstanbul: Bilim Teknik Yayınevi. 1986. s: 99, 239-240, 374.
45. şaylı BS: Medikal Genetik İlkeleri (1. baskı). Ankara: Türkiye Klinikleri Yayınevi. 1992. s: 59-61, 104-105.
46. Naumova AK, Plenge RM, Bird LM et al.: Heritability of X chromosome-inactivation phenotype in a large family. Am J Hum Genet 58: 1111-1119, 1996.
47. Panizon F, Zacchello F, Sartori E, Addis S: The ratio between normal and sensitive erythrocytes in heterozygous glucose -6- phosphate dehydrogenase deficient women. Acta Haemat 43: 291-295, 1970.
48. Smith MB, Whiteside MG: The detection of glucose-6- phosphate dehydrogenase deficiency in mediterraneans by comparative quantitative enzyme electrophoresis. The Medical Journal of Australia 1: 558-559, 1975.
49. Solem E: Glucose -6- phosphate dehydrogenase deficiency: an easy and sensitive quantitative assay for the detection of female heterozygotes in red blood cells. Clinica Chimica Acta 142: 153-160, 1984.
50. Luzzatto L: Genetic heterogeneity and pathophysiology of G6PD deficiency. British Journal of Haematology 28: 151-154, 1974.
51. Yoshida A, Beutler E, Motulsky AG: Human glucose -6- phosphate dehydrogenase variants. Bulletin of WHO 45: 243-253, 1971.
52. Aksoy K, Y reğir GT, Dikmen N,  nl kurt İ: Türkiye'de saptanan yeni bir G6PD B<sup>+</sup> Varyantı G6PD-Antakya.    Tıp Fak Der 2: 186-191, 1990.
53. Beutler E, Mathai CK, Smith EJ: Biochemical variants of glucose -6- phosphate dehydrogenase giving rise to congenital nonspherocytic hemolytic disease. Blood 31(2): 131-150, 1963.

54. Akoğlu T, Özdoğu H, Erdoğan R, Özer FL: Erythrocyte membrane ATP ase activity of G6PD- deficient individuals and the effect of primaquine metabolite (s) on membrane ATP ase enzymes. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 87: 219-224, 1984.

55. Nicholson JF, Bodourian SH, Pesce MA: Measurement of glucose -6-phosphate dehydrogenase and 6- phosphogluconate dehydrogenase activities in erythrocytes by use of a centrifugal analyzer. *Clinical Chemistry* 20 (10): 1349-1352, 1974.

56. Naylor J, Rosenthal I, Grossman A et al.: Activity of glucose -6-phosphate dehydrogenase in erythrocytes of patients with various abnormal hemoglobins. *Pediatrics* 8: 285-292, 1960.

57. Bauer JD: *Clinical Laboratory Methods* (9<sup>th</sup> ed.) USA: CV Mosby Co, 1982. p. 96-100, 220-221.

58. Bauer JD : Red blood cell pathology. In: Gradwohl's *Clinical Laboratory Methods and Diagnosis* (7<sup>th</sup> ed). Frankel S, Reitman S, Sonnenwirth Ac (ed). Chapter: 30, USA. CV Mosby Co. 1970. p: 450-455, 578-579.

59. Hedayat SH, Farhud DD, Montazami K, Ghadirian P: The pattern of bean consumption, laboratory findings in patients with favism, G6PD deficient, and a control group. *Journal of Tropical Pediatrics* 27: 110-113, 1981.

60. Mareni C, Repetto L, Forteleoni G et al.: Favism: looking for an autosomal gene associated with glucose -6- phosphate dehydrogenase deficiency. *Journal of Medical Genetics* (21): 278-280, 1984.

61. Meloni T, Forteleoni G, Dore A, Cuttillo S: Favism and hemolytic anemia in glucose -6- phosphate dehydrogenase deficient subjects in north Sardinia. *Acta Haemat* 70: 83-90, 1983.

62. Lattanzio V, Bianco VV, Lafiandra D: High-performance reversed-phase liquid chromatography (HPLC) of favism-inducing factors in *Vicia faba* L. *Experientia* 38: 789-790, 1982.

63. Bienzle U, Effiong VE, Aimaku VE, Luzzatto L: Erythrocyte enzymes in neonatal jaundice. *Acta haemat* 55: 10-20, 1976.

64. Gupta S, Ghai OP, Chandra RK: Glucose -6- phosphate dehydrogenase deficiency in the newborn and its relation to serum bilirubin. *Indian Journal of Pediatrics* 37 (268): 169-176, 1970.

65. Brown WR, Boon WH: Hyperbilirubinemia and kernicterus in glucose -6- phosphate dehydrogenase deficient infants in Singapore. *Pediatrics* 41 (6): 1055-1062, 1968.

66. Valaes T, Karaklis A, Stravarakakis D et al.: Incidence and mechanism of neonatal jaundice related to glucose -6- phosphate dehydrogenase deficiency *Pediatr Res* 3: 448-458, 1969.

67. Bienzle U, Effiong C, Luzatto L: Erythrocyte glucose -6- phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD Type A<sup>-</sup>) and neonatal jaundice. *Acta Paediatr Scand* 65: 701-703, 1976.

68. Tan KL: Glucose -6- phosphate dehydrogenase status and neonatal jaundice. *Arch Dis Child* 56: 874-877, 1981.

69. Malaka- Zafiriou K, Tsiures J, Danielides B, Cassimos C: Salicylamide glucuronide formation in newborns with severe jaundice of unknown etiology and due to glucose -6- phosphate dehydrogenase deficiency in Greece. *Helv paediat Acta* 28: 323-329, 1973.

70. Malaka-Zafiriou K, Tsiures J, Cassimos C: D-glucaric acid excretion in newborns with severe jaundice of unknown etiology and due to glucose -6- phosphate deficiency in Greece. *Helv paediat Acta* 30: 201-207, 1975.

71. Meloni T, Corti R, Costa S et al.:  $\alpha$ -Thalassaemia and hyperbilirubinaemia in G-6-PD- deficient newborns. *Arch Dis Child* 55 (6): 482-484, 1980.

72. Miller J, Golenser J, Spira DT: *Plasmodium falciparum*: Thiol status and growth in normal and glucose -6- phosphate dehydrogenase deficient human erythrocytes. *Experimental Parasitology* 57: 239-247, 1984.

73. Usanga EA, Luzzatto L: Adaptation of Plasmodium falciparum to glucose 6- phosphate dehydrogenase - deficient host red cells by production of parasite-encoded enzyme. *Nature* 313 (6005): 793-795, 1985.

74. Zinkham WH, Baltimore REL: Metabolic abnormalities of erythrocytes from patients with congenital nonspherocytic anemia. *J Pediat* 55: 319-336, 1959.

75. Fairbanks VF, Beutler E: A simple method for detection of erythrocyte glucose -6- phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD spot test). *Blood* 20 (5): 591-600, 1962.

76. Aksoy M, Kutlar A, Kutlar F et al.: Survey on haemoglobin variants,  $\beta$  thalassaemia, glucose-6- phosphate dehydrogenase deficiency, and haptoglobin types in Turks from Western Thrace. *Journal of Medical Genetics* 22: 288-290, 1985.

77. Clark IA, Cowden WB, Hunt NH et al.: Activity of divicine in Plasmodium vinckei - infected mice has implications for treatment of favism and epidemiology of G-6-PD deficiency. *British Journal of Haematology* 57: 479-487, 1984.

78. Zinkham WH: An in-vitro abnormality of glutathione metabolism in erythrocytes from normal newborns: mechanism and significance. *Pediatrics* 23: 18-32, 1959.

79. Beutler E, Blume KG, Kaplan JC et al.: International Committee for Standardization in Haematology: Recommended screening test for glucose -6- phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency. *British Journal of Haematology* 43:469-477, 1979.

80. Yeung CY, Lai BC, Sin WK, Leung NK: Fluorescent spot test for screening erythrocyte glucose -6- phosphate dehydrogenase deficiency in newborn babies. *J Pediatr* 76 (6): 931-934, 1970.

81. Travis SF, Kumar SP, Paez PC, Papadoulos MD: Red cell metabolic alterations in postnatal life in term infants: glycolytic enzymes and glucose - 6 - phosphate dehydrogenase. *Pediatr Res* 14: 1349-1352, 1980.

82. Vetrella M, Barthelman W: Enzyme activities in the erythrocytes of human fetuses. *Z Kinderheilk* 110: 99-103, 1971.

83. Konrad PN, Valentine WN, Paglia DE: Enzymatic activities and glutathione content of erythrocytes in the newborn: comparison with red cells of older normal subjects and those with comparable reticulocytosis. *Acta Haemat* 48: 193-201, 1972.

84. Steele MW, Migeon BR: Sex differences in activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase from cultured human fetal lung cells despite X- inactivation. *Biochemical Genetics* 9 (2): 163-167, 1973.

85. Aksu TA: Muhtelif yaş gruplarındaki sağlam şahıslarda eritrosit glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi kinetiği üzerine bir çalışma. *Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Dergisi* 5 (17): 1-8, 1972.

86. Aksoy M: Türkiye'de talaseminin tarihçesine kısa bir bakış. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 34: 1-8, 1991.