

44194

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**EGE BÖLGESİNDEKİ
GLUKOZ-6- FOSFAT DEHİDROGENAZ (G6PD)
EKSİKLİĞİNE YOL AÇAN AKDENİZ
MUTASYONUNUN
DNA TEKNOLOJİSİ İLE ARAŞTIRILMASI**

SELİM UZUNOĞLU
Doktora Tezi
(Ph. D.)

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
Prof. Dr. ORHAN TERZİOĞLU

İZMİR

1995

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Doktora tezi olarak sunduğum “Ege Bölgesindeki Glukoz-6- Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) Eksikliğine Yol Açan Akdeniz Mutasyonunun DNA Teknolojisiyle Araştırılması” adlı çalışmanın, tarafımdan, bilimsel ahlâk ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurulmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin Bibliyografyada gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanılmış olduğunu belirtir ve bunu onurumla doğrularım.

31 Mayıs 1995

Selim UZUNOğLU



**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRLÜĞÜ'NE**

“Ege Bölgesindeki Glukoz-6- Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) Eksikliğine Yol Açan Akdeniz Mutasyonunun DNA Teknolojisiyle Araştırılması” isimli tez tarafımdan okunarak gerekli yönlendirmeler yapılmıştır.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Orhan TERZİOĞLU

Terzioğlu

TUTANAK

TIBBİ BİYOLOJİ konusunda doktora öğrencisi **Selim UZUNOĞLU** tezini savunması için Lisans Üstü Öğretim Yönetmeliği'nin 21. maddesi uyarınca Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 31.05.1995 tarih ve 12/7 sayılı kararı ile oluşturulan jürimiz 29.06.1995 tarihinde, saat: 10.00'da toplanarak aşağıda belirtilen şekilde işbölümü yaptıktan sonra adayın tez savunmasını dinlemiştir. Yönetmelik gereğince adaya tezi ile ilgili sorular yöneltilmiş ve tartışmalardan sonra adayın "**EGE BÖLGESİNDEKİ GLUKOZ -6- FOSFAT DEHİDROGENAZ (G6PD) EKSİKLİĞİNE YOL AÇAN AKDENİZ MUTASYONUNUN DNA TEKNOLOJİSİ İLE ARAŞTIRILMASI**" konulu Doktora Tezinin BAŞARILI olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.



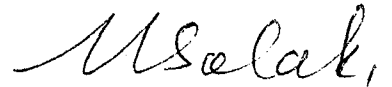
Prof. Dr. Orhan TERZİOĞLU

BAŞKAN



Prof. Dr. Meral SAKIZLI

ÜYE



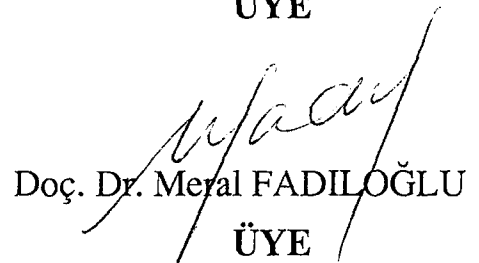
Doç Dr. Mustafa SOLAK

ÜYE



Prof. Dr. Baha TANELİ

ÜYE



Doç. Dr. Meral FADİLOĞLU

ÜYE

TEŞEKKÜR

Akademik yaşantımda bana düşünce ve eylem noktasında, bilimde evrenselliği yakalama noktalarını öğreten, ayrıca düşünceleriyle ve tecrübeleriyle bu tez çalışmasına katkıda bulunan danışman hocam Prof. Dr. Orhan TERZİOĞLU'na öncelikle en içten teşekkür ederim.

Ayrıca belirtilmesinin gerekli olduğuna inandığım bir husus da, bilimsel araştırmaların ortaklaşmayı ve karşılıklı paylaşımı zorunlu kıldığı ve bir kimsenin hiç bir destek ve yardım görmeksizin bir çalışmayı günümüz koşullarında kendi başına bitirebilmesinin imkansız hale gelmesidir. Bu bağlamda bu çalışmaya destek veren veya katkıda bulunan kişilerin isimlerini aşağıda belirtmenin, bilim adamının ahlâkî boyutu açısından, uygun bir davranış olduğuna ve gerekliliğine inanmaktayım.

-Doktora eğitimime katkıda bulunan ve Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı imkanlarını kullanmama izin veren Anabilim dalı Başkanı Prof. Dr. Meral SAKIZLI ve anabilim dalının diğer akademik ve idari personeli,

-Görevli bulunduğum C.B.Ü Tıp Fak. ve Bilgi İşlem Dairesi'den gerekli izini veren Celal Bayar Üniversitesi Rektörü Prof. Dr. Tuna Taner ve diğer yetkililer,

- Bu çalışmanın yürütülebilmesi için gerekli parasal desteğin bir kısmını 0923.94.01.05 nolu tez projesi kapsamında veren Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, ve Araştırma Fon saymanlığı ile çalışmanın zamanında bitirilmesini sağlayacak şekilde parasal destek sağlayan ACAN İnşaat ve Ticaret Ltd. Şirketi sahibi Cezmi ACAN, Prof. Dr. Orhan TERZİOĞLU ve Selim UZUNOĞLU,

- Olguların saptanması kapsamında hastane ve özel arşivlerini kullanma izini veren ve gerekli yardımı gösteren

Prof. Dr. Baha TANELİ (Çalışma sırasında Ege Üniv. Tıp Fakültesinde; şu anda C.B.Ü.Tıp Fak.Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları)

Doç Dr. Füsun ATLIHAN ve Dr. Demet CAN (İzmir Behçet Uz Çocuk H. Büyük Çocuk Kliniği Şefi ve Acil servis Doktoru)

Doç. Dr. Işın YAPRAK (Tepecik SSK Hastanesi Çocuk Kliniği)

Doç. Dr. Gülersu İRKEN (Dokuz Eylül Tıp Fak. Çocuk Hematolojisi Bölümü)

Prof. Dr. Galip KÖSE (Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Özel Klinik -Alsancak-İzmir)

-Bilimin insanlığın ortak mirası olduğunu ve karşılıklı ortaklaşarak, paylaşarak geliştiğini tutumlarıyla gösteren ve yurtdışından yazışmalar yoluyla çalışmanın değişik kademelerinde katkıda bulunan ve daha önemlisi, örnek değişimi yoluyla çalışmada kullanılan yöntemlerin ve testlerin eksternal standardizasyonuna, kontrolüne imkan sağlayan konunun uluslararası otoritelerinden

-L. LUZZATTO ve T. VULLİAMY (Hematoloji bölümü, Hammersmith Hospital Londra)

-Çalışmanın planlama aşamalarında katkılarını esirgemeyen E. BEUTLER (A.B.D) ve M.D. CAPPELLİNİ (İtalya)

Yukarıda ismi belirtilenler başda olmak üzere bu çalışmaya katkıda bulunan ve destek veren herkese teşekkür ederim.

Ayrıca tezin dizgi ve sayfa düzenini başarıyla gerçekleştiren NİL A.Ş. Teknik Servis elemanlarından Teyfik BUYÜKDAŞ ve Yavuz YILMAZ'a teşekkür ederim.

Selim UZUNOĞLU

İÇİNDEKİLER

Tablo Listesi.....	1
Şekil Listesi.....	2
Kısaltmalar ve Tanımlamalar.....	3
Özet (Türkçe).....	5
Özet (İngilizce)	7
Giriş ve Amaç	9
1. GENEL BİLGİLER.....	11
1.1 Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz'ın Hücrese İşlevleri ve Aktivitesinin Düzenlenmesi.....	11
1.2 G6PD Enzimi Eksikliğinin Tanımı ve Sınıflandırılması	14
1.3 G6PD Enzimi Eksikliğinin Yol Açtığı Sağlık Sorunları.....	15
1.3.1.1 Belirli İlaçların ve Kimyasalların Vücuda Alımıyla Uyarılan Hemolitik Anemi	16
1.3.1.2 Favism	17
1.3.1.3 Enfeksiyonla Uyarılan Hemoliz	18
1.3.2 Ciddi Yenidoğan Sarılığı ve Kernikterus	19
1.3.3 Kalıtsal Non Sferositik Hemolitik Anemi	20
1.4 G6PD Enzimi Eksikliğinin Biyokimyasal Temeli	22
1.5 G6PD Enzimi Enzimine ait Genetik Bilgi, İşleyişi ve Değişiklikleri.....	25
1.5.1 G6PD Geni	25
1.5.2 X'e Bağlı Kalıtım ve X İnaktivasyonu	25
1.6 G6PD Mutasyonları	27

1.7 G6PD Eksikliğinin Genel Olarak Yeryüzündeki Dağılışı	31
1.8 Afrika Kökenli Mutasyonlar	33
1.9 Akdeniz Bölgesi Mutasyonları.....	34
1.10 Uzakdoğu Mutasyonları	35
1.11 G6PD Eksikliği ve Sıtma İlişkisi	36
1.12 G6PD Eksikliğinin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	37
1.13 G6PD Varyantlarının Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler	39
1.14 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	42
1.15 PCR Temelli Yöntemle G6PD Mutasyonlarının Taranması.....	42
1.16 G6PD Eksikliğinin Yol Açtığı Sağlık Sorunlarının Tedavisi ve Önlenimi	43
1.17 Dünya Sağlık Örgütü G6PD Eksikliği Çalışma Grubunun Önerileri	44
1.18 G6PD Eksikliği Üzerine Türkiye’de Yapılan Çalışmaların Genel Olarak Değerlendirilmesi.....	45
1.19 G6PD Eksikliği Ege Bölgesinde Çalışılmaya Değer mi?	46
2. MATERYEL ve METOD.....	47
2.1 Ege Bölgesinde Ciddi Düzeyde G6PD Eksikliğine Sahip Ailelerin Saptanması ve Olası Akut Hemolitik Kriz Önlenim Listesinin Hazırlanması.....	47
2.1.1 Sağlık Kurumları ve Doktorlardan Bilgi Sağlanımı, Mektup Yazımı, Örnek kanların alımı ve Anket Uygulanması	47
2.1.2 Çalışmaya Alınan Ailelerde Ciddi Düzeyde G6PD Eksikliğinin Floresans Spot Testi ile Saptanması	50
2.2 Ciddi Düzeyde G6PD Eksikliği Saptanan Olgularda Akdeniz Mutasyonunun DNA Teknolojisi ile Araştırılması	52
2.2.1 Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	52
2.2.2 Akdeniz Mutasyonunun Yer Aldığı Exon 6-7’nin PCR ile Çoğaltımı.....	57
2.2.3 MboII ile Kesim ve Akdeniz Mutasyonunun Saptanması.....	61

3. BULGULAR	63
3.1 Ege Bölgesinde Ciddi Düzeyde G6PD Eksikliği Saptanan Olgular	63
3.1.1 Ailelere Uygulanan Anketin Bulguları	63
3.1.2 Floresans Spot Testi Sonuçları.....	64
3.2 Ciddi Düzeyde G6PD Eksikliği Saptanmış Olgularda Akdeniz Mutasyonunun Taranmasına Ait Bulgular	68
3.2.1 PCR Ürününün Kontrolü	68
3.2.2 MboII ile Kesim ve Akdeniz Mutasyonu Taranması.....	68
4. TARTIŞMA	73
4.1 Konu Seçiminde ve Sınırlarının Belirlenmesinde İzlenen Stratejiler ve Gerekçeleri	73
4.1.1 Ege Bölgesinde Ciddi Düzeyde G6PD Eksikliği Olgularının Saptanması.....	75
4.1.2 Floresans Spot Testinin Tercih Nedenleri ve Sonuçların Tartışılması	77
4.2 Ciddi Düzeyde G6PD Eksikliği Saptanan Olgularda Akdeniz Mutasyonunun Araştırılmasına Ait Bulguların Tartışılması.....	80
4.2.1 G6PD Genine Ait Exon 6-7 Bölgesinin Çoğaltımında Kullanılacak Primerin Seçimi	81
4.2.2 Yayınlanmış Çalışmalar Işığında Bulguların Yeri.....	82
5. SONUÇ	85
6. EKLER	87
6.1. Bu çalışmanın Uluslararası Standartlara ve Bilimin Evrensel Kriterlerine Uygun Olarak Yürütülmesini Sağlamak İçin Yurt Dışındaki Konunun Otorite Kişileriyle Yapılan Yazışmalar Sonucunda Alınan Cevaplardan Bazı Örnekler. (Ek. 1-8).....	88
6.2. Çalışma Sonunda Ailelere Gönderilen Teşekkür ve Bilgilendirme Mektup Örneği. (Ek. 9-10).....	102
7. KAYNAKLAR	104

TABLO LİSTESİ

Tablo-1.1 : İnsandaki G6PD enziminin genotipik ve fenotipik varyasyonlarının genel sınıflandırması.....	15
Tablo-1.2 : Klinik açıdan hafif ve ağır seyredabilen hemolitik anemiye yol açan ilaçların, kimyasalların ve yiyeceklerin listesi	21
Tablo-1.3 : DNA düzeyinde tanımlanan G6PD varyantları	31
Tablo-1.4 : G6PD Akdeniz mutasyonunun (med) bulunduğu gen bölgesinin (exon-6-7) PCR yoluyla çoğaltımında kullanılan primerler	41
Tablo-2.1 : Floresans spot testi çözeltisinde kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları	50
Tablo-3.1 : Ciddi düzeyde G6PD eksikliği saptanan yakın akraba olmayan ailelerin adreslerinin sağlandığı kaynağa göre dağılımı	63
Tablo-3.2 : Olgulara gönderilen güncel akut hemolitik kriz önlenim tablosu.....	65
Tablo-3.3 : Ciddi düzeyde G6PD eksikliği saptanan ve yakın akraba olmayan 37 olgunun yaş dağılımı	67
Tablo-3.4 : Ciddi düzeyde G6PD eksikliği saptanan ve yakın akraba olmayan 37 olgunun yerleşim birimlerine göre il ve ilçe bazında dağılımı	67
Tablo-3.5 : Floresans spot testine göre ciddi düzeyde G6PD eksikliği saptanan ve yakın akraba olmayan 37 olguda Akdeniz mutasyonu (Med) Taraması Sonuçları	70
Tablo-3.6 : Çalışılan ailelerde saptanan Akdeniz (Med) ve Akdeniz olmayan (Nonmed) mutasyonların yerleşim birimlerine dağılımı	71

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil-1.1 : Pentoz fosfat yolunda glukoz-6-fosfat dehidrogenaz tarafından katalizlenen reaksiyon.....	12
Şekil-1.2 : Metabolizmada glukoz'un temel kullanım yolları.....	13
Şekil-1.3 : G6PD Enzimi eksikliğine bağlı ölümcül olabilen akut hemolitik aneminin oluş mekanizması.....	23
Şekil-1.4 : G6PD geninin sitogenetik ve moleküler haritası	26
Şekil-1.5 : Dünya ölçeğinde G6PD eksikliğinin görülme sıklığı haritası	32
Şekil-1.6 : G6PD geninde saptanan bazı mutasyonların cDNA üzerindeki yerleşimi.....	35
Şekil-2.1 : G6PD eksikliği olgusuna sahip ailelere gönderilen mektup örneği.....	48
Şekil-2.2 : Ailelere uygulanan anket örneği	49
Şekil-3.1 : Ciddi düzeyde G6PD eksikliği olan ve olmayan kan hemolizati örneklerinde floresans spot test sonucu	66
Şekil-3.2 : Exon 6-7'nin PCR'da çoğaltımına ait elektroforez görüntüsü	69
Şekil-3.3 : MboII ile kesim sonrası, Akdeniz mutasyonu içeren ve içermeyen kontrol DNA örnekleri, marker DNA ve çalışılan olguların DNA örneklerinin elektroforez sonuçlarına ait örnek fotoğraf.....	69
Şekil-3.4 : Ciddi düzeydeki G6PD eksikliği olgularında saptanan Akdeniz (Med) ve Akdeniz olmayan (Nonmed) mutasyonların coğrafik dağılımı	72

KISALTMALAR ve TANIMLAMALAR

- 6PGD : **6-Phosphate-Gluconate-Dehydrogenase**;
6-fosfoglukonat-Dehidrogenaz.
- G6PD : **Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase**;
Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz. (D-glucose-6-phosphate; NADP+
oxidoreductase, E.C. 1.1.1.49).
- G6P : **Glucose-6-Phosphate**; Glukoz-6-fosfat.
- GSH : **Reduced Glutathione**; İndirgenmiş Glutatiyon.
- GSSG : **Oxidized Glutathione**; Oksitlenmiş Glutatiyon.
- NADP : **Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate**;
Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfatın Oksitlenmiş Formu.
- NADPH : **Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate**;
Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfatın İndirgenmiş Formu.
- PCR : **Polymerase Chain Reaction**; Polimeraz Zincir Reaksiyonu.
- WHO : **World Health Organisation**; Dünya Sağlık Örgütü.
- WHO-G6PD : **World Health Organisation-Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase**;
Dünya Sağlık Örgütü-Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Eksikliği Çalışma Grubu.
- cDNA : **Complementary Deoxyribonucleic Acid**;
Komplementer Deoksiribonükleik Asid: Bir genin nükleotid dizisinin messenger RNA (mRNA) üzerinden başlanarak primer yapısını tanımlayan DNA.
- DGGE ve TGGE : **Denaturing and Temperature Gradient Gel Electrophoresis**;
Denatüre edici gradient jel elektroforezi ve sıcaklık gradienti jel elektroforezi.

- Heinz Cisimciği : Alyuvar membranının i yüzeyine tutunmuş çoğunlukla globinden oluşan denatüre protein molekülleri.
- PCR-SSCP : **P**olymerase **C**hain **R**eaction-**S**ingle **S**trand **C**onformation **P**oly-morphism; Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve tek iplik konformasyon polimorfizmi isimli bu yöntem genin belirli bölgelerindeki nokta mutasyonlarını saptamada kullanılır.
- RFLP : **R**estriction **F**ragment **L**enght **P**olymorphism; Farklı DNA örneklerini farklı restriction endonkleazlarla (kesici enzim) keserek elde edilen farklı büyüklüklerdeki DNA parçalarının analizi.



ÖZET

EGE BÖLGESİNDEKİ GLUKOZ-6- FOSFAT DEHİDROGENAZ (G6PD) EKSİKLİĞİNE YOL AÇAN AKDENİZ MUTASYONUNUN DNA TEKNOLOJİSİ İLE ARAŞTIRILMASI

ANAHTAR KELİMELER

Ege bölgesi, Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz(G6PD), Ciddi Düzeyde G6PD Eksikliği, Akut Hemolitik Anemi, Floresans Spot Test, G6PD Akdeniz Mutasyonu, PCR Temelli Mutasyon Tarama, Hemolitik Kriz Önlenimi

Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz(G6PD; D-glucose-6-phosphate; NADP+ oxi-doredüctase, E.C. 1.1.1.49) aktivitesinde saptanan değişik düzeylerdeki azalmalar, G6PD eksikliği olarak tanımlanır. G6PD eksikliği, klinik açıdan önemli ve en yaygın kalıtsal metabolik hastalıklardan biridir. G6PD eksikliğinden dünya nüfusunun %7'lik bir kesimi etkilenmektedir. G6PD aktivitesindeki ciddi düzeyde azalmanın yol açtığı sağlık sorunları, belirli ilaçlarla, yiyecek ve enfeksiyonlarla uyarılan ve ölümcül olabilen akut hemolitik anemi, yenidoğan ciddi sarılığı ile kalıtsal nonsferositik hemolitik anemi'dir. G6PD aktivitesindeki azalma, enzimatik reaksiyon sırasında oluşan NADPH miktarını ölçmeye dayalı test sistemleriyle kalitatif veya kantitatif olarak saptanabilmektedir. Ciddi düzeydeki G6PD eksikliğini kalitatif olarak ortaya çıkarıcı testlerden önerileni ve standardize edilene, floresans spot testidir. Tanımlanan 442 biyokimyasal varyantın,1994 yılı itibarıyla, G6PD geninde(Xq28) oluşan 60 mutasyondan kaynaklandığı belirlendi.

G6PD eksikliği, biyokimyasal ve moleküler düzeyde güncel testlerle tanımlanır ve buna bağlı olarak kişilere akut hemolitik kriz önlenim tablosu verilirse, yol açtığı sağlık sorunları kesin önlenebilmektedir.

Ege bölgesinde ciddi düzeydeki G6PD eksikliğine yol açan Akdeniz mutasyonunun DNA teknolojisi ile araştırılması, çalışmanın amacı olarak belirlendi. Çalışma grubu, Ege bölgesindeki yerleşim birimlerinden gelen 45 aileyi kapsayan 130 bireyden oluşturuldu. İnternal ve eksternal olarak standardize edilen floresans spot testi ile 130 bireyden 42'sinde ciddi düzeyde G6PD eksikliği saptandı.

Alınan kanlardan fenol-kloroform ekstraksiyonu ve etanol ile çöktürme yöntemiyle DNA'lar izole edildi. Akdeniz mutasyonunun saptanmasında, PCR+ MboII enzimiyle kesim+ mini horizontal agaroz jel elektroforez teknikleri kullanıldı. G6PD geninde Akdeniz mutasyonunun bulunduğu exon 6-7 bölgesini çoğaltmada Luzzatto L, (1994) grubunun kullandığı 91 ve 92 nolu primerler, tercih edildi. Standart olarak Akdeniz mutasyonu saptanan ve saptanmayan eksternal kontrol DNA'lar kullanıldı. Elde edilen sonuçlar, örnek değişimi yapılmak suretiyle Uluslararası G6PD Eksikliği Referans merkezince de (Hematoloji bölümü, Hammersmith Hospital,Londra) doğrulandı.

Mutasyon sıklığının saptanmasında yakın akraba olmayan 37 olgu esas alındı. 37 olgunun 29 tanesinin(%78.3) Akdeniz mutasyonu ve geri kalan 8 tanesinin de(%21.6) nonmed olduğu saptandı. Çalışılan bölgede hakim olan varyantın ve mutasyon tipinin Akdeniz(563T) olduğu deneysel olarak doğrulandı. Uluslararası geçerli standartlara uyularak, Ege bölgesinde ciddi düzeydeki G6PD eksikliğinin moleküler temeli ilk defa tanımlanarak, yerel ve evrensel ölçekte G6PD eksikliğinin moleküler temelini aydınlatma çalışmalarına katkıda bulunuldu. Klinisyenlere danışılarak hazırlanan güncel akut hemolitik kriz önlenim tablosu, ciddi düzeyde G6PD eksikliği olan kişilere gönderilerek elde edilen bulgular, uygulamaya konuldu.

ABSTRACT

SCREENING OF G6PD MEDITERRANEAN MUTATION CAUSING TO SEVERE GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE DEFICIENCY IN THE AEGEAN REGION BY USING DNA TECHNOLOGY

KEY WORDS

Aegean region, Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase(G6PD), Severe G6PD deficiency, Acute hemolytic anemia, Fluorescent spot test, G6PD Mediterranean mutation, PCR based mutation screening, Protection from hemolytic crisis.

G6PD deficiency is described as a differential decrease of measured normal activity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase(G6PD; E.C.1.1.1.49). G6PD deficiency is one of the most common of all clinically significant inherited metabolic disorders. About 7% of the world population is affected from G6PD deficiency. Health problems caused by severe G6PD deficiency include acute hemolytic anemia induced by specific drugs, chemicals, food and infections, neonatal jaundice and hereditary nonspherocytic hemolytic anemia. Decrease on the level of G6PD activity is measured quantitatively or nonquantitatively by determining the amount of NADPH regenerated during the enzymatic reaction. Fluorescent spot test is one of the suggested and standardized non-quantitative tests in the diagnosis of severe G6PD deficiency.

So far, 442 biochemical G6PD variants originated from 60 mutations in the G6PD gene(Xq28) have been currently identified according to information obtained in 1994.

Health problems related to G6PD deficiency can be definitely prevented provided that it is determined by biochemical and molecular updated diagnostic tests, and acute hemolytic crisis prevention list is given those who are severely G6PD deficient.

The objective of this study is to screen G6PD Mediterranean mutation in the severe G6PD deficient cases from Aegean region.

The study group consisted of 45 family covering 130 people. 42 out of 130 were determined as a severe G6PD deficient by using internally and externally standardized fluorescent spot test. DNA from blood samples were isolated according to phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. PCR+MboII digestion+mini horizontal agarose gel electrophoresis techniques were used in screening mediterranean mutation. 91 and 92 numbered primers designed by Luzzatto,L.(1994) were preferred in the amplification of exon 6-7 fragment including mediterranean (med) mutation. External control DNA samples with med and nonmed mutations were employed as a standard. All obtained results were also confirmed by International G6PD Deficiency Reference Center (Haematology Dept. Hammersmith Hospital-London).

37 unrelated cases were evaluated in the determination of mutation frequency. 29 out of 37 (%78.3) were found as G6PD Med and the remaining 8 (%21.6) were nonmed mutation. It is experimentally approved that G6PD Mediterranean variant and mutation is predominant in the Aegean region. The molecular basis of severe G6PD deficiency in the Aegean region was identified at the first time by following international updated standards. Based upon the obtained data, a contribution to the local and worldwide studies of defining the molecular basis of severe G6PD deficiency was carried out.

At the end of the present study an updated acute hemolytic crisis prevention list was sent to severe G6PD deficient people in order to inform and protect them from health problems related to severe G6PD deficiency. By this way, results were placed into practice at the local health services.

GİRİŞ VE AMAÇ

Sağlıklı bir yaşam, milyarlarca hücrenin karşılıklı etkileşimi ve bağımlılığıyla oluşan doku-organ ve sistem üçlüsünün dinamik dengeyi ortaya çıkaracak şekilde organizasyonunu ve bunun sürekliliğini gerektirir. İnsan organizmasında bu organizasyonun devamı, döllenmiş yumurta hücresindeki anne ve babadan kalıtılan genetik bilginin, gelişim ve yaşam süresince her hücrede koşullara uygun olarak dinamik şekilde düzenlenebilmesine ve kontrolüne bağlıdır. Ayrıca genetik bilgisi kısmen yapısal ve fonksiyonel düzenlemeye uğramış farklılaşmış hücrelerde, genetik bilginin uygun zamanda, uygun koşullarda, uygun miktarda ve gereken sürede deşifre edilip karşılığı olan proteinlerin doğru sentez edilmesi de gerekli olan bir diğer koşuldur.

Bu noktadan, biyolojik sistemin yapısal ve fonksiyonel özelliklerini temelde belirleyen genetik bilginin hücreler tarafından sağlıklı kullanımı, iki koşula bağlı olmaktadır. Birincisi döllenmiş yumurta hücresindeki genetik bilgi ve sitoplazmadaki moleküller eksiksiz, hatasız kalıtılmış ve düzenlenmiş olmalıdır. İkincisi embriyonel dönemden itibaren yaşam boyunca bu bilgilerin sağlıklı kullanımı gerçekleşebilmeli ve genetik bilginin hatalı düzenlenmesine, kontrolüne veya okunmasına imkan vermeyecek bir çevrede yaşanmalıdır. Ancak bu iki şart gerçek yaşam koşullarında değişik düzeylerde sağlanabilmektedir. Sonuçta bazı kişiler, genetik bilgilerinin bazılarını anne ve babalarından hatalı veya eksik alabilmektedir. Anne ve babadan kalıtılan metabolizmayla ilişkili genetik bilgideki hata veya eksikliğin neden olduğu sağlık sorunları, kalıtsal metabolik hastalıklar olarak tanımlanır. Dünya genelinde sık rastlanılan kalıtsal metabolik hastalıklardan biri olan Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz (G6PD) eksikliği, glukoz metabolizmasında yer alan Pentoz-fosfat (veya heksoz-monofosfat) yolundaki ilk enzim Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz'daki aktivite kaybının yol açtığı sağlık sorunlarıyla ilişkilidir.

Çalışma konusunun seçiminde ve tanımlanmasında G6PD eksikliğinin yol açtığı sağlık sorunlarının kesin önlenabilir olması, Ege bölgesinde G6PD eksikliğine yol açan varyantların moleküler temelinin bilinmemesi, hastalığın moleküler düzeyde doğru tanımlanmasında güncel bilgi ve teknolojinin kullanılabilir olması dikkate alın-

dı. Ege bölgesinde yaşıyan insanlarda ciddi düzeyde G6PD eksikliğine yol açan G6PD Akdeniz mutasyonunun güncel DNA teknolojisi kullanılarak araştırılması çalışmanın amacı olarak belirlendi. Ciddi düzeyde G6PD eksikliğine sahip olguların doğru saptanması için gerekli testin standardizasyonu ve kalibrasyonu da bu amaç doğrultusunda hedeflendi.

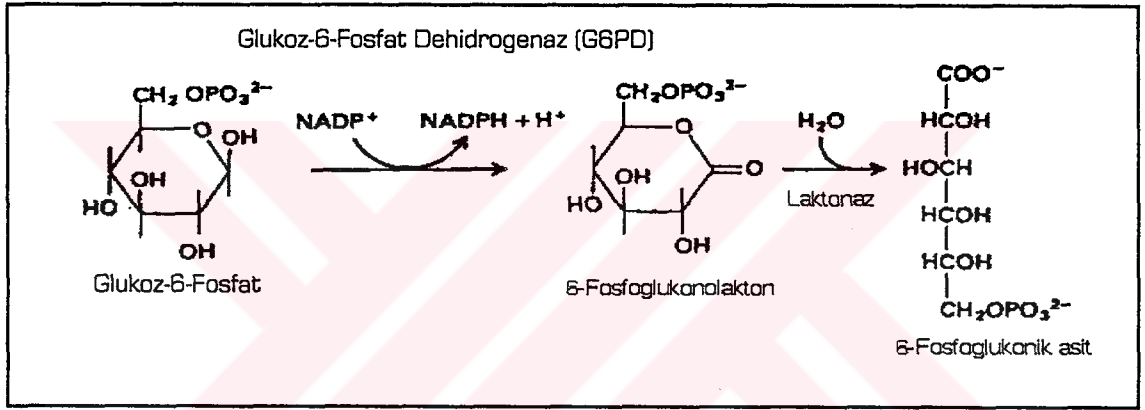


1. GENEL BİLGİLER

1.1 Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz'ın Hücresel İşlevleri ve Aktivitesinin Düzenlenmesi

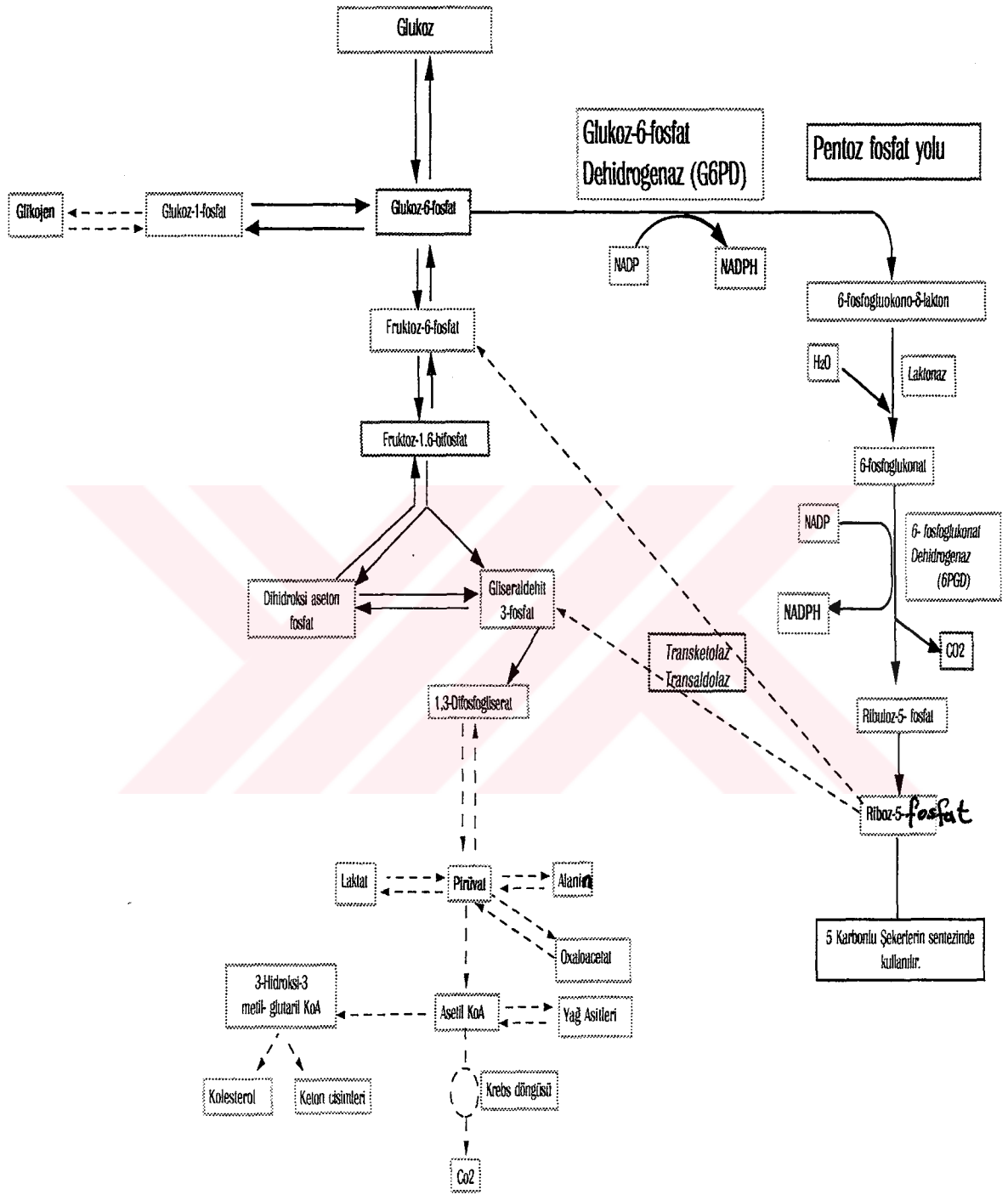
Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD; D-glucose-6-phosphate; NADP+ oxidoreductase, E.C. 1.1.1.49), 1931 yılında Otto Warburg tarafından tanımlanmıştır (1). Katalitik formdaki G6PD enzimi dimer yapıda olup, herbiri 515 aminoasitten oluşan yaklaşık 59,256 dalton moleküler ağırlığa sahip monomerlerden oluşur (2). Beş karbonlu şekerlerin ve NADPH molekülünün sentez edildiği Pentoz fosfat yolunun ilk enzimidir. Beş karbonlu şekerler, ATP, KoA, NAD, FAD, RNA ve DNA gibi biyomoleküllerin yapıtaşı olarak kullanılır. Bu yolda üretilen NADPH molekülleri ise metabolizmadaki indirgeyici reaksiyonlarda hidrojen sağlayıcı kaynaktır (3). Olgun alyuvarlarda antioksidan tamir sistemlerinin çalışması için gerekli olan NADPH'i üreten alternatifsiz tek yol olmasından dolayı, pentoz fosfat yolunun sağlıklı işleyişi, alyuvarların yaşamı açısından kritik öneme sahiptir (4). Örneğin antioksidan tamir sisteminde bulunan oksitlenmiş glutatyonu (GSSG) indirgenmiş forma (GSH) dönüştüren glutatyon redüktaz, gerekli hidrojeni NADPH molekülünden alarak glutatiyona transfer eder (5). Sitoplazmada gerçekleşen pentoz fosfat yolunun ilk basamağında glukoz-6-fosfat (G6P), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz tarafından 6-fosfoglukono- δ -laktona, dönüştürülür. Reaksiyon sırasında glukoz-6-fosfatın 1. karbon atomundaki hidrojen NADP'ye transfer edilerek NADPH oluşur. Reaksiyonun ürünü 6-fosfoglukono- δ -lakton, laktonaz tarafından 6-fosfoglukonata dönüştürülür. Sonra bu altı karbonlu şeker, oksidasyonla 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) tarafından dekarboksile edilirken bir tane daha NADPH üretilir. Dolayısıyla bu metabolik yolda bir mol glukoz-6-fosfatdan üretilen iki mol NADPH'in bir tanesi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz diğeri de 6-fosfoglukonat dehidrogenaz tarafından üretilir. Ribuloz -5-fosfat (ketoz) fosfopentoz isomeraz tarafından riboz-5-fosfata (aldoz) çevrilir. Şekerlerin moleküler seviyede yeniden düzenlenmelerinde rol oynayan transketolaz ve transaldolaz enzimleri, pentoz fosfat yolunu ve glikolizisi birbirine bağlar (6).

Aktif enzimin hem yapısal bileşeni hem de reaksiyon substratı olan NADP, enzim aktivitesinin düzenlenmesinde rol alır. G6PD enziminin aktivitesi birinci derecede, hücre içi NADPH/NADP oranı ve glukoz-6-fosfat düzeyi tarafından kontrol edilir (4,5). Açarsak NADPH molekülü enzim aktivitesini engelleyen önemli bir metabolik inhibitör, NADP molekülü de enzim aktivitesini uyarıcı işleve sahiptir. Enzimin aktivite düzeyi, sağlıklı koşullarda hücre içi NADPH/NADP oranı yüksek tutulacak şekilde düzenlenir. Bu oran sürekli yüksek tutulduğundan hücre içi G6PD aktivitesi, normal koşullarda enzimin teorik maksimum aktivite kapasitesinin % 0.1-1'i kadar düşük olabilmektedir (7).



Şekil-1.1: Pentoz fosfat yolunda glukoz-6-fosfat dehidrogenaz tarafından katalizlenen reaksiyon (8).

Glukoz-6-fosfat ve NADP için farklı affinitelere sahip olan normal formdaki G6PD enziminin her iki substrat için ölçülen K_m değerleri de buna paralel olarak farklıdır. Glukoz-6-fosfat için K_m 60-90 $\mu\text{M/L}$ ve NADP için 1-4 $\mu\text{M/L}$ arasında değişir (2,6). NADPH'in sürekli ve hızla tüketildiği koşullar oluştuğunda sağlam enzim, katalitik aktivitesini artırarak NADPH/NADP oranının yüksek düzeyde tutulmasını sağlar. Ancak substratlara olan affiniteleri değişen G6PD varyantlarında bu kontrol bozulur ve enzim yüksek NADP veya düşük NADPH konsantrasyonlarında katalitik aktivitesini yeterli hız ve düzeyde ortaya koyamaz. Ayrıca enzimin NADPH tarafından inhibe edilmeye olan duyarlılığı, bazı mutant enzimlerde oldukça yüksek olabilir. Az miktardaki NADPH tarafından aktivitesi engellenen enzim, aktif hale geçemez. Dolayısıyla NADPH/NADP oranı hücrede gerekli olan düzeyde devam ettirilemez (3).



Şekil-1.2: Metabolizmada glukozun temel kullanım yolları. Bu şekil farklı kaynaklardaki şekil ve metinlerden yararlanılarak tarafımızdan oluşturuldu (8,9,10).

1.2 G6PD Enzimi Eksikliğinin Tanımı ve Sınıflandırılması

G6PD enzim eksikliği, G6PD'ye ait genetik bilgidenden sentezlenen G6PD proteininin katalitik fonksiyonunu azaltan, yapısal ve işlevsel bozuklukların tümünü ifade eder (11,48). G6PD enzimidindeki aktivite kaybı, sağlık sorunlarına yol açabilecek veya açmayacak düzeylerde olabilir (11).

G6PD enzimidindeki aktivite kaybının birinci dereceden önemli klinik belirtileri, moleküllerini genetik bilgidenden yeniden sentez etme imkanı olmayan olgun alyuvarlarda ortaya çıkar. Çünkü yaşamları boyunca ortalama 170000 defa vücudu dolaşan alyuvarlar, yaklaşık 280 km yolculukları esnasında iç ve dış çevrenin yaşamı kısıtlayıcı koşullarına (yüksek türbülans, dar kapillerden geçme, böbreğin peritübüler kapillerindeki yüksek osmotik değerler, alyuvar içindeki yüksek oksijen yükü, iç ve dış kaynaklı oksitleyici ajanların üretimi vb.) normal koşullarda 120 ± 6 gün dayanabilmektedirler. Ayrıca alyuvarlardaki enzimler, alyuvar ömrüne bağımlı enzimler olduğundan, alyuvarlar yaşlandıkça enzimlerin katalitik fonksiyonları da azalmaktadır. Alyuvarların normal yaşam sürelerinde membran yapılarının esnekliği ve sitoplazmadaki antioksidan enzimlerin sağlıklı işleyişi, bu koşulların zararlı etkilerini önlemektedir (12).

Yukarıda tanımlanan koşullarda oksijen bağlama ve taşıma işlevini yerine getiren alyuvarlarda G6PD enzimidindeki aktivite kaybı, hücre içi antioksidan tamir sisteminin sağlıklı işleyişinde değişik düzeylerde aksamalara neden olur. Dolayısıyla Tablo-1.2'de verilen ilaçların ve yiyeceklerin vücuda alımı sonrasında açığa çıkan, oksitleyici moleküllerin hemoglobin ve membran proteinleri üzerinde yapacağı zararlı değişikliklere engel olunamaz. Sonuçta G6PD eksikliği olan kişilerde alyuvarlar hemolize son derece duyarlı hale gelir ve değişik düzeylerde hemolitik anemi oluşabilir (11).

G6PD enzimidindeki aktivite kaybının yol açtığı diğer bir klinik belirtisi, G6PD eksikliği olan bebeklerin bazılarında hemen doğum sonrası ortaya çıkan G6PD eksikliğisiyle ilişkili yenidoğan sarılığıdır. G6PD eksikliğisiyle yenidoğan sarılığı arasındaki ilişkinin varlığı, kesinleşmiş olmakla beraber, sarılığa yol açan moleküler olaylar tam olarak bilinmemektedir (13).

Farklı çeşit ve sayıda olan G6PD varyantları, Dünya Sağlık Örgütü - Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Eksikliği Çalışma (WHO-G6PD) grubu tarafından

enzimin aktivite düzeyi, biyokimyasal özellikleri ve yol açtığı klinik tablolar dikkate alınarak 4 sınıf halinde gruplanmıştır (13,14,30).

Sınıf 1: Kalıtsal nonsferositik hemolitik anemiye yol açan G6PD varyantlarını içerir. Enzimin aktivite düzeyi değişken olup genelde normalin %2-35'i arasında seyrederek.

Sınıf 2: Ciddi düzeyde enzim eksikliğine yol açan (aktivite düzeyi normal değerlerin %10'undan daha aşağıda olan) varyantların toplandığı bu sınıfta ölümcül olabilen akut hemolitik kriz ve ciddi yenidoğan sarılığı ve kernikterus, olası klinik tablolardır (13).

Sınıf 3: Orta ve hafif düzeyde enzim eksikliğine yol açan (normal aktivite düzeyinin %10-%65'i arasında aktiviteye sahip olan) G6PD varyantlarını içine alır. Bu sınıftaki G6PD varyantları nadiren sağlık sorunlarına yol açarlar.

Sınıf 4: G6PD eksikliği göstermeyen ve enzim aktivite düzeyi normalin %65 ve yukarısında olan G6PD varyantlarını içine alır.

SINIF	KLİNİK TABLO	ÖRNEK	AKTİVİTE % NORMAL	ELEKTROFORETİK MOBİLİTE	KmG6P μ M/L	Populasyondaki Dağılımı
I	KNSHA	BARSELONA	2	HIZLI	40	SEYREK
I	KNSHA	Santiago de Cuba	2	YAVAŞ	45	SEYREK
II	AHA, YDS	Akdeniz	3	NORMAL	25	POLİMORFİK
III	AHA, YDS	G6PDA	12	HIZLI	70	POLİMORFİK
III	ÇOK NADİR	Seattle	25	YAVAŞ	20	POLİMORFİK
IV	YOK	G6PDA	85	HIZLI	70	POLİMORFİK
IV	YOK	G6PDB	100	NORMAL	70	YAYGIN

KNSHA: Kalıtsal non sferositik hemolitik anemi.

AHA : İlaçlara, bakla yemeye ve enfeksiyonlara bağlı olarak oluşan Akut Hemolitik Anemi.

YDS : Yenidoğanlarda görülen ciddi sarılık ve kernikterus.

Tablo-1.1: İnsandaki G6PD enziminin genotipik ve fenotipik varyasyonlarının genel sınıflandırması (14).

1.3 G6PD Enzimi Eksikliğinin Yol Açtığı Sağlık Sorunları

G6PD enziminde değişik düzeylerdeki aktivite kaybının yol açtığı ölümcül olabilen sağlık sorunları, belirli koşulların varlığında (Tablo-1.2'deki belirli ilaçların ve besinlerin alımı ve enfeksiyonlar) değişik düzeylerde ortaya çıkmaktadır. G6PD eksikliğinin yol açtığı önemli sağlık sorunları:

-Belirli ilaçların ve bakla gibi besinlerin vücuda alımı sonrasında açığa çıkan

ekstra oksitleyici ajanlar tarafından uyarılan hızla ve âniden gelişen ölümcül olabilen akut hemolitik kriz.

- G6PD eksikliğine sahip yenidoğan bebeklerin bazılarında doğum sonrası ortaya çıkan ciddi yeni doğan sarılığı ve buna bağlı kernikterus.

- G6PD eksikliğine bağlı kalıtsal nonsferositik hemolitik anemi.

Alyuvarlar ekstra oksitleyici koşullara maruz kalmadıkları sürece, G6PD eksikliği kişide yukarıdaki sağlık sorunlarına yol açmamaktadır. Ancak, Akdeniz varyantına ve G6PDA- varyantına sahip hemizigot erkeklerde, normal koşullarda, kısalan alyuvar ömrüne (ortalama 120 günden 100 güne) bağlı hafif şiddette seyreden kronik hemoliz görülebilir (6).

G6PD eksikliğine sahip kişilerde bu sağlık sorunlarının sıklığı ve şiddeti; G6PD genindeki mutasyonun olduğu gen bölgesine ve tipine, enzimatik aktivite kaybının derecesine, hemolitik anemiye uyarıcı etkenlere, alınan miktarına ve genetik yatkınlığa bağlı olarak farklı düzeylerde olabilmektedir (2).

1.3.1.1 Belirli İlaçların ve Kimyasalların Vücuda Alımıyla Uyarılan Hemolitik Anemi

İkinci dünya savaşı sırasında, sıtma ilacı primakini (8-aminoquinoline) kullanan zenci Amerikan askerlerinin bazılarında ilaç alımıyla uyarılan akut hemolitik anemi gözlemlendi. Akut hemolitik anemiye yol açan faktörlerin tanımlanmasına yönelik 1950'li yıllarda sürdürülen çalışmalar, bunun G6PD eksikliğinin bir sonucu olduğunu ortaya çıkardı (15). Daha sonra primakinin, ciddi düzeyde G6PD eksikliği olan kişilerde alyuvarların yaşam süresini kısaltan birçok ilaçtan ve etkenden sadece biri olduğu anlaşıldı.

Tablo-1.2'deki ilaçlar veya kimyasallar alındığında, ciddi düzeyde G6PD eksikliği olan kişilerde 18-72 saat içinde âni ve hızla gelişebilen akut hemolitik anemi ortaya çıkabilmektedir. Bu klinik tablo'nun karakteristik özellikleri, alyuvar sayısında dolayısıyla hemoglobin miktarında âni azalma(hemoglobinemi), idrarda hemoglobin görülmesi (hemoglobinüri), krizin başlangıç döneminde saptanabilen Heinz cisimciği oluşumu ve sonunda gelişen sarılıktır. Hemolitik kriz şiddetli olduğunda, metabolize edilemeyen hemoglobinin idrar yoluyla atılması sonucu idrar, çay rengine dönüşür.

Kişide, sırt ve karın ağrıları başlar. Ağır seyreden akut hemolitik krizlerde hemoglobin düzeyi 12-24 saatler arasında ölümcül düzeye ulaşacak kadar düşebilmektedir (12,16).

Oksitleyici koşulların oluşumuna yolaçan ajanın vücuda alımı durdurulduktan sonra da hemolitik kriz, belirli bir süre devam eder. Çoğu durumda hemolitik krize yakalanan kişiye ilk 12-24 saat içinde, G6PD eksikliği olmayan sağlam kan verilerek, hemolitik krize bağlı ölümler önlenmektedir (16).

Akut hemolitik aneminin, henüz anlaşılamayan yönü; aynı etken maddenin, G6PD eksikliği olan bir kişide hemolitik krize yol açarken, diğerinde hiçbir etki yapmaması veya kişide, bir defasında hemolitik krize yol açarken, diğer zamanlarda aynı etken maddenin herhangi bir klinik tabloya yol açmamasıdır.

Farklı kişilerde ilaç metabolizmasındaki genetik farklılıklar(sitokrom P-448-450 enzim sistemi ve asetilasyon polimorfizmi gibi), bir ilacın hemolitik ajan olup olmayacağını belirlemede rol oynar. Örneğin, bir ilacın aktif hemolitik metabolitini etkin şekilde yıkıma uğratan ilaç metabolizmasına sahip G6PD eksikliği olan kişide, akut hemolitik kriz oluşmayabilir. Öte yandan, aynı ilacın hemolitik metabolitini etkin şekilde yıkıma uğratanamayan metabolizmaya sahip kişide, aynı ilaç hemolitik krize yol açabilir (17).

Buna ilaveten ilaçlarla uyarılan hemoliz derecesi, G6PD eksikliğinin farklı varyantlarında farklı olabilmekte ve bazı ilaçlar belirli varyantlarda ciddi sağlık sorununa yol açacak düzeyde hemolitik krize neden olurken bazılarında hemoliz derecesi, ciddi sağlık sorunlarına yol açmayacak düzeyde oluşabilmektedir. Örneğin G6PD Akdeniz varyantı gibi ciddi düzeyde enzim eksikliği olan kişilerin alyuvarları, birçok hemolitik ilaca duyarlı iken, G6PDA- varyantı gibi orta düzeyde G6PD eksikliğine sahip kişilerin alyuvarları bu hemolitik ajanlara karşı duyarsız olabilmektedir (11).

1.3.1.2 Favism

Ciddi düzeyde G6PD eksikliği olan kişilerin bazılarında yaş veya kuru bakla (Vicia faba) yemeleri sonrasında genelde 18-72 saat içinde, şiddetli renk solukluğu, halsizlik, kusma ve koyu çay rengi idrarla belirtilerini ortaya çıkaran akut hemolitik anemi tablosu, favism olarak tanımlanır. Ciddi düzeydeki G6PD eksikliğinin fenotipini

tanımlayan göstergelerden biridir. Akdeniz bölgesindeki besin kaynaklarından biri olan bakla, daha çok bu bölgede tüketildiğinden, favism olguları, Akdeniz ülkelerinde daha sık görülmektedir. Bakla yenmesine bağlı olarak âniden gelişen şiddetli hemolitik kriz dışında, akut hemolitik anemiye yol açan olaylar, ilaçla uyarılan akut hemolitik anemi ile oldukça benzerdir (18,19).

Favism geçirmiş kişiler, kesin olarak G6PD eksikliğine sahiptirler. Ancak G6PD eksikliği olan herkes, bakla yediğinde, akut hemolitik krize yakalanmamaktadır. Ciddi düzeyde G6PD eksikliği olan kişilerin yaklaşık %20-30'u bakla yediklerinde akut hemolitik krize maruz kalmaktadır. Bakladaki aktif maddelerden, divicine-vicine ve isouramil'in metabolizmasıyla ilişkili bireysel genetik farklılıkların bunda rol oynadığı tahmin edilmektedir (12).

Favism tarihçesi antik döneme kadar uzanır. M.Ö 6. asırda yaşamış Pisagor'un o dönemde bakla yenmesini ve bakla tarlalarından geçmeyi yasaklamasının, bakla yemeye bağımlı akut hemolitik aneminin ölümcül olabilen etkilerinden dolayı olabileceği tahmin edilmektedir (20).

Yapılan literatür çalışmalarında ülkemizde bilimsel açıdan klinik düzeyde favism olgusunu ilk defa 1940'lı yıllarda H. Tekiner'in rapor ettiği belirtilmektedir (21).

G6PD eksikliği, X'e bağlı kalıtım özelliklerine sahip olduğundan, favism olgularının %87'si hemizigot erkek, %13 homozigot dişi kişilerdir (21).

Favism olgusunda aileyi telaşa düşüren şey; kişinin aniden bitkinleşmesi, sararması ve kan renginde idrar yapmasıdır. Bakla yeme sonrasında akut hemolitik krize yakalanmış kişilere, çoğu durumda sağlam kan verilerek, ölümleri engellenebilmektedir (21).

1.3.1.3 Enfeksiyonla Uyarılan Hemoliz

G6PD eksikliğine bağlı hemolizi, belirli enfeksiyonlar da uyarabilmektedir. G6PD eksikliği olan kişilerde enfeksiyonların hemolizi nasıl başlattığına dair mekanizma bilinmemektedir (2). Ancak ileri sürülen bir hipoteze göre, fagositosis sırasında akyuvarlar, aktif oksijen radikallerini dışarı bırakarak çevrelerindeki alyuvarları zarara uğrattırır. G6PD eksikliği olan kişilerde, bu oksijen radikallerinin oluşturduğu zarar, hızla yeterli sürede tamir edilemezse alyuvarlar, hemolize uğrayabilirler. Azot oksit de, oksitleyici ajan

olarak bu mekanizmada rol alabilir. Böyle olası bir mekanizmanın viral hepatit gibi enfeksiyonlarla başlatılan hemolizde geçerli olabilmesi ise mümkün değildir (2).

1.3.2 Ciddi Yenidoğan Sarılığı ve Kernikterus

G6PD eksikliğine sahip yenidoğan bebeklerin bazılarında gözlenen fizyolojik sarılıktan farklı olan yaşamı tehlikeye sokacak düzeydeki ciddi yenidoğan sarılığı ve buna bağlı oluşabilen kernikterus, G6PD eksikliğiyle bağlantılı bir başka önemli sağlık sorunudur (22,23).

Doğumun ilk günlerinde karaciğer fonksiyonlarının tam çalışabilir düzeyde olmaması ve ciddi düzeyde enzim eksikliği, yenidoğanda bilirübinin yeterli hızda metabolize edilememesine yol açabilir. Ciddi düzeyde G6PD eksikliği olan bebeklerde görülen sarılık tablosunun anemiden daha ziyade karaciğer fonksiyonlarının etkinlik düzeyleri ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Ayrıca ciddi düzeydeki G6PD eksikliği olgularında alyuvarların yaşam süresinin kısaltılmasının da sarılığın gelişimine katkıda bulunabilmesi olasıdır. Çünkü hemoliz sonucunda açığa çıkan hem grubu ürünlerin karaciğerde bilirübine dönüştürülmesi, yenidoğan bebeklerde kritik şartlarda düzenlenir. Hemolizi artıran veya bilirübin konjugasyonunu azaltan herhangi bir faktör (örneğin glukuronil transferaz enzim eksikliği), bu düzenlemeyi bozarak, sarılığa yol açabilmesi imkan dahilindedir. Ancak G6PD eksikliği olan yenidoğan bebeklerde genelde anemi saptanamadığından, bu bebeklerde hızlı alyuvar yıkımına (hemoliz) bağlı olarak gelişen sarılık nadiren ortaya çıkmaktadır.

G6PD eksikliği olan bebeklerin yaklaşık % 20-30'unda ciddi düzeyde yenidoğan sarılığı gelişmektedir. Sarılığın gelişme riski, farklı populasyonlar arasında, hatta aynı populasyonda farklı çevrelerde ve doğumdan sonraki ortaya çıkış zamanlarında değişkenlik gösterir. Örneğin G6PD eksikliğine bağımlı yenidoğan sarılığı özellikle, Asya ve Akdeniz kökenli bebeklerde daha çok görülür.

G6PD eksikliğine bağımlı yenidoğan sarılığının enzim eksikliği taşıyan herkesde ortaya çıkmamasında ve coğrafik ve etnik farklılıkların oluşmasında;

-G6PD eksikliğine yol açan mutasyonun yeri, tipi ve buna bağlı ortaya çıkan enzim aktivitesindeki azalma derecesi,

-Bebegin prematüre olarak (tam gelişmeden) doğumu,

-Bebegin genetik yapısı ve soyağacı (örneğin asya kökenli kişilerde karaciğer enzimlerinin olgunlaşma hızlarının Avrupa kökenlilere nazaran daha yavaş olduğu rapor edilmektedir),

-Yenidoğan bebeğe naftalinli elbise giydirimi, annenin hemolitik krizi uyarıcı besin ve ilaçları alması, bunların süt yoluyla bebeğe aktarımı, gibi faktörlerin rol oynadığı rapor edilmektedir. Dolayısıyla G6PD eksikliğine sahip bazı bebeklerde enzim eksikliğiyle ilişkili yenidoğan sarılığının oluşumunu etkileyen faktörler ve mekanizmalar tam olarak bilinmemekte ve bu konuda daha fazla araştırma yapılmasına gerek duyulmaktadır (13).

G6PD eksikliğine bağımlı ciddi yenidoğan sarılığı ve ikteri, erken tedavi ile önlenemezse, bebekte, zeka geriliğine ve spastik serebral felce, kernikterusa bağlı ölüme yol açabilir (13). Bu ciddi sağlık sorunları erken dönemde fototerapi uygulanarak önlenmektedir.

Ancak aileler ve yeni doğan bebekler, güncel bilgiler ışığında standardize edilmiş G6PD eksikliğini ortaya çıkarıcı tarama testinden geçirilerek erken tanı konduğunda; hastalık biyokimyasal ve moleküler düzeyde tanımlandığında ve buna dayalı olarak kişilerin bilgilendirilmesi ve yasak yiyecek-ilaç listesi verilmesi (Tablo-3.2) gibi önlemler alındığında, yukarıda anlatılan G6PD eksikliğiyle ilişkili sağlık sorunlarının ortaya çıkması, kesin olarak önlenmektedir.

1.3.3 Kalıtsal Non Sferositik Hemolitik Anemi

1958 yılında G6PD eksikliğinin kronik hemolize de yol açtığı bulundu ve bu klinik tablo, Newton ve Frajola tarafından kalıtsal nonsferositik hemolitik anemi olarak tanımlandı.

Sınıf 1 içinde gruplandırılan G6PD varyantlarının neden olduğu kronik hemoliz, çok değişik şiddetlerde ortaya çıkabilmektedir. Kronik hemoliz, genelde hafif veya orta şiddette ortaya çıkmaktadır. Ancak nadir rastlanılan bazı G6PD varyantlarında (G6PD Campinas gibi) sürekli transfüzyon gerektirecek kadar şiddetli olabilen hemolitik kriz görüldüğüne dair yayınlar vardır (2).

Kalıtsal nonsferositik hemolitik anemiye neden olan sınıf-1'e dahil G6PD varyantlarına yol açan mutasyonlar, nadir rastlanılan mutasyonlardır. Sınıf-1 içindeki varyantlarda, enzimin fonksiyonel bütünlüğü o kadar tahrip edilmiştir ki, alyuvarlar, dolaşım sırasında karşılaştıkları stress koşullarına dayanabilme güçlerini kaybederek, hemolize uğrarlar (2). Bu hastalar, in vitro koşullarda ölçülen G6PD aktivite düzeyine bakılarak, genellikle saptanamamaktadır. Çünkü, sınıf-1 varyantı içeren kişilerin

İLAÇ GRUBU	HAFIF ŞİDDETE HEMOLİZE YOL AÇABİLENLER [Tedavideki Dozlarının Üstünde Kullanıldığında] (Tedavideki dozları, hekim tavsiyesiyle ve kontrolünde kullanılabilir)	AĞIR SEYREDEDEN AKUT HEMOLİTİK ANEMİYE YOL AÇABİLENLER (Bu gruptaki ilaçlar ve yiyecekler kesinlikle kullanılmamalıdır.) •Etken madde
ANALJEZİK VE ANTİPİRETIKLER	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Acetyl salicylic acid</u> • <u>Antipirin</u> • <u>Aminopyrine</u> • <u>Acetophenetidin</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Acetanilid</u>
SITMA İLAÇLARI	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Chloroquine</u> • <u>Pyrimethamine</u> • <u>Quinine</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Primaquine</u> • <u>Pamaquine</u> • <u>Quinocide</u>
SULFONAMİDLER ve SÜLFONLAR	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Sülfadiazine</u> • <u>Sulfamerazine</u> • <u>Sulfa methoxypridazine</u> • <u>Sulfisoxazole</u> • <u>Sulfaquanidine</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Sülfacetamide</u> • <u>Sülfamethoxazole</u> • <u>Sulfanilamide</u> • <u>Sulfapyridine</u> • <u>Thiazolesulfone</u>
DİĞER ANTİBAKTERİYEL AJANLAR	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Chloramphenicol</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Furazolidone</u> • <u>Nitrofurantoin</u> • <u>Nitrofurazone</u> • <u>Nalidixic Acid</u>
ANTİHELMİNTİK AJANLAR		<ul style="list-style-type: none"> • <u>Niridazole (Ambilhar)</u> • <u>Stibophan</u> • <u>B-Naphthol</u>
DİĞER MADDELER	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Probenecid</u> • <u>Vitamin K ve Analogları</u> • <u>Quinidine</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Naphthalene</u> • <u>Phenylhydrazine</u> • <u>Toluidin mavisi</u> • <u>Metilen mavisi</u> • <u>Phenazopyridine</u> • <u>Trinitrotoluene</u> • <u>Isobutyl nitrite</u> • <u>Urate oxidase</u>
YİYECEKLER		<ul style="list-style-type: none"> • Yaş ve kuru iç bakla (özellikle bakla taze ve çiğ yenildiğinde) akut hemolitik krize (çay rengi idrar, halsizlik-sarıma) yol açar.
HASTALIKLAR		<ul style="list-style-type: none"> • Viral hepatit, • Üst solunum yolu enfeksiyonları, pnömoni, • Diyabetik asidozis gibi durumlar

Tablo-1.2: Klinik açıdan hafif ve ağır seyredabilen hemolitik anemiye yol açan ilaçların, kimyasalların ve yiyeceklerin listesi (2,10,13). İlaçların Türkiye'deki ticari isimleri eklenerek güncelleştirilmiş akut hemolitik kriz önlenim tablosu tarafımızdan hazırlanmış ve tezin bulgular kısmında(tablo-3.2) verilmiştir.

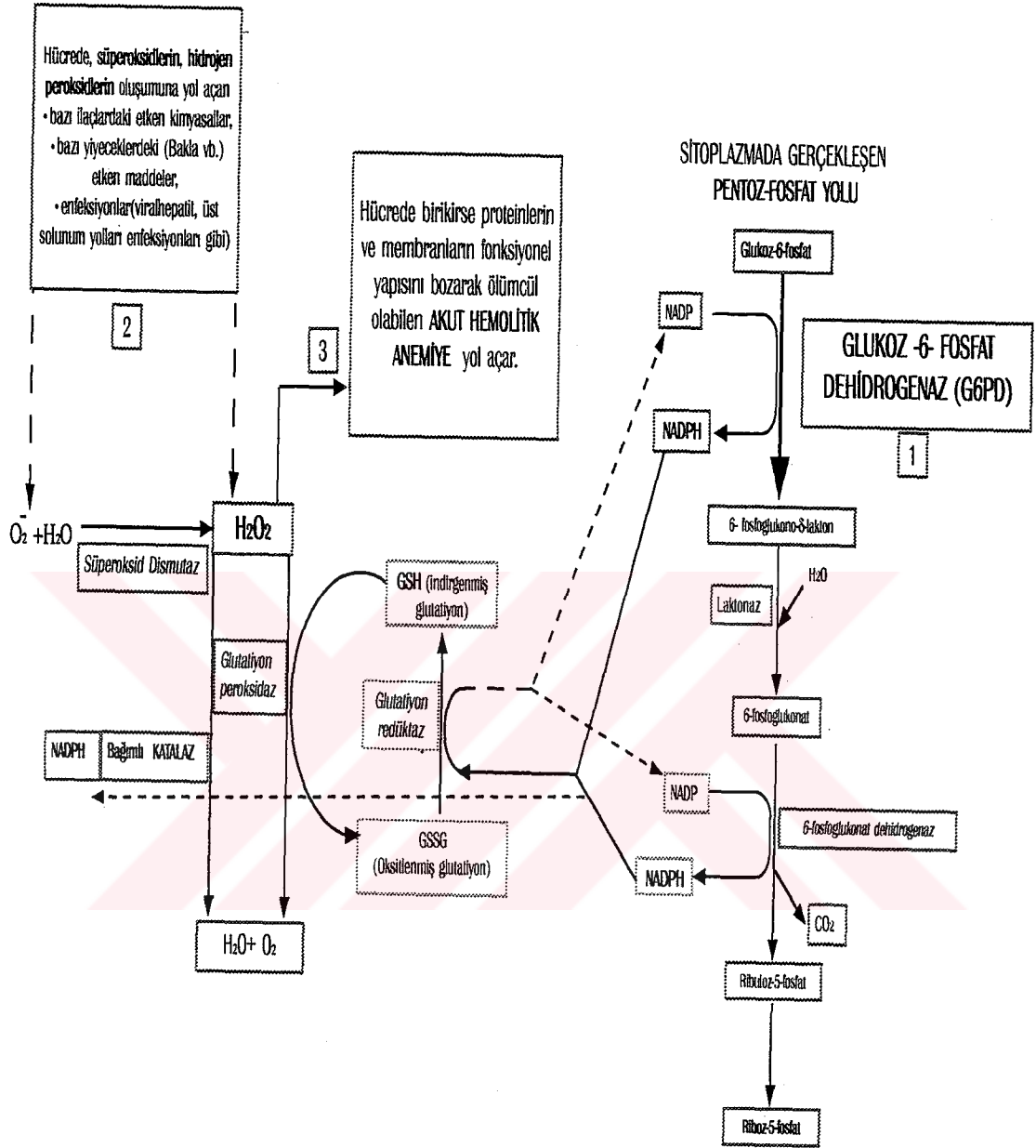
alyuvarlarındaki residual enzimin aktivite düzeyi, normal aktivite düzeyinin %35'i kadar yüksek olabilmektedir. Mutant enzimin NADPH tarafından inhibe edilmeye aşırı duyarlılık kazanması ve in vivo koşullarda, enzimin azalan stabilitesi veya artan kararsızlığı, G6PD enziminde yapısal ve fonksiyonel bozukluğa neden olabilir (28).

Sınıf-1 içindeki G6PD varyantlarının en tutarlı ortak özelliklerinden biri, bu varyantların oluşumuna yol açan mutasyonların G6PD genindeki yerleşimleridir. Kalıtsal nonsferositik hemolitik anemiye yol açan G6PD mutasyonlarının büyük bir kısmı, enzimin NADP'yi veya G6P'yi bağladığı bölgede kümelenmiştir (17).

1.4 G6PD Enzimi Eksikliğinin Biyokimyasal Temeli

Tablo-1.2'deki ilaçlar, kimyasallar, yiyecekler ve enfeksiyonlar, insan vücudunda doğrudan veya dolaylı olarak oksitleyici özellikteki metabolitlerin üretilmesine neden olurlar. Alyuvarlarda hemoglobinin beta zinciri, membrandaki proteinler ve proteinlerin taşıdıkları SH grupları, oksitleyici ajanlar(süperoksitler, hidrojen peroksitler, reaktif serbest radikaller diğer deyişle çiftleşmemiş elektrona sahip moleküller) tarafından oksitlenmeye oldukça duyarlıdırlar (12,13). Hidrojen peroksitin zararsız hale dönüştürülmesinde, dolayısıyla oksidasyona bağlı tahribatın önlenmesinde alyuvarlarda alternatif iki yol vardır. Bunlardan biri, indirgenmiş glutatyonu (GSH) hidrojen kaynağı olarak kullanan glutatyon peroksidaz'ın hidrojen peroksidi suya ve oksijene dönüştürmesidir. Bu aşamada oksitlenmiş forma dönüşen glutatyon (GSSG), glutatyon redüktaz tarafından NADPH varlığında tekrar indirgenmiş glutatyonla dönüştürülür. İndirgenmiş glutatyon, ayrıca hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünü azaltmada ve sistein aminoasidlerindeki sülfidril(SH) gruplarının indirgenmiş formunun devam ettirilmesinde rol alır. İndirgenmiş glutatyonun hücrede yüksek düzeyde devam ettirilmesini sağlayan bu çevrimin sürekliliği sağlandığı sürece hücrede oluşan oksitleyici ajanlar tahribata yol açmadan zararsız hale dönüştürülür (13,83).

Diğer yol ise, aynı reaksiyonu katalizleyen farklı bir enzim olan katalazdır. Katalazın aktif formu tetramerik yapıda olup, enzimin yapısında 4 tane NADPH molekülü bulunur. Katalazın inaktif formu, kendisine NADPH bağlandığında aktif hale geçerek hidrojen peroksidi suya ve oksijene dönüştürür. Buna karşın tek başına katalazın düşük düzeylerde oluşan hidrojen peroksiti uzaklaştırmada çok etkin olmadığı rapor edilmektedir (2).



Şekil-1.3: G6PD enzimi eksikliğine bağlı ölümcül olabilen akut hemolitik aneminin oluş mekanizması:

Pentoz fosfat yolundaki G6PD enzimidaki aktivite kaybı (1), hücre içi indirgenmiş glutatyon'un yeniden üretilmesini sağlayan glutatyon redüktaz'ın çalışabilmesi için gerekli NADPH'in yeterli miktarda sentez edilememesine yol açar. Dışarıdan hidrojen peroksit oluşumunu arttıran etken maddeler alındığında veya vücutta oluştuğunda(2), hidrojen peroksit glutatyon peroksidaz tarafından yeterli hızda ve gereken sürede zararsız hale dönüştürülemez. Katalitik aktivitesi için NADPH'e gereksinim duyan katalaz enzimi de, bu olaylardan kısmen etkilenir. Sonuçta hücre içinde azalan NADPH stoğundan dolayı alyuvarlar oksitlenmeye daha duyarlı hale gelir. Ekstra oksitleyici ajanların varlığında alyuvarlar hemolize uğrayarak ölümcül olabilen **akut hemolitik anemi** tablosu ortaya çıkar (3).

Farklı kaynaklardaki metin ve şekiller dikkate alınarak bu tablo ilk defa hazırlandı (4,6,10,13).

G6PD aktivitesine bağlı olarak oluşan NADPH molekülünün yeterli miktarda retilbilmesi, hidrojen peroksidin zararsız hale getirilmesinde rol alan her iki enzimatik sistemin çalışması için gereklidir. Diğer deyişle hücre içinde yüksek düzeyde tutulan NADPH, oksitleyici koşulların zararlı etkilerinden alyuvarları korumaktadır (83).

Alyuvarlardaki G6PD stoğu, normal koşullarda oksitleyici ajanların yapabileceği yüksek düzeydeki tahribatı önleyebilecek kapasiteye sahiptir. Oksitleyici ajanlara yüksek dozda maruz kalınmadığı takdirde G6PD aktivitesindeki ciddi azalmalar(% 90-99 düzeyinde) normal koşullarda klinik açıdan önemli sağlık sorunlarına yol açmaz. nemli sağlık sorunları, ciddi düzeyde G6PD eksikliğine sahip alyuvarlar ekstradan oksitleyici ajanların etkisinde kalırlarsa ortaya çıkar. Çünkü hidrojen peroksiti zararsız hale dönüştürme reaksiyonlarında hızla tüketilen NADPH molekülü, aktivitesi normal değerin % 1-10'u arasında olan alyuvarlarda aynı hızla yeniden üretilmemektedir. Dolayısıyla hidrojen peroksidi uzaklaştıran sistemin yetersizliği ortaya çıkmaktadır. Bunun yanında azalan NADPH, alyuvarları oksitlenmeye daha duyarlı hale getirmektedir. Ancak bunun moleküler mekanizması ise tam olarak bilinmemektedir (4,83). Sonuçta hücrede biriken hidrojen peroksit, hemoglobin ile reaksiyona girerek hem grubunun ve demir iyonlarının serbest kalmasına neden olur. Denatüre olan hemoglobin, Heinz cisimcikleri olarak tanımlanan partiküller şeklinde ker. Bu olaylar sırasında hücre içi iskelet proteinleri değişikliğe uğrar. Hücrede oksitleyici ajanların varlığında gelişen bu olaylar yağları peroksidasyona uğratarak membran thiollerinin ve proteinlerinin oksitlenmesine de yol açar. Sonuçta alyuvarların membranları hızla parçalanarak akut hemolitik anemi tablosu ortaya çıkar (12,83).

Bu her iki yol, hidrojen peroksidin hücreden uzaklaştırılmasında bir diğerinin işlevini destekleyici role sahiptir. Hangisinin daha aktif ve etkin olduğu ise, kişiden kişiye, aynı kişinin farklı gelişim dönemlerine, peroksit oluşumuna yol açan ajanların tipine bağlı olarak değişmektedir. Bu da ciddi düzeyde G6PD eksikliği olan herkesin her zaman aynı koşullarda akut hemolitik krize maruz kalmadığını veya kalsa bile aynı şiddetlerde olmadığını, aynı etken maddenin bir defasında akut hemolitik krize yol açarken diğer zamanlar yol amamasını ve hemolitik krizin şiddetindeki bireysel farklılıkları kısmen açıklayabilmektedir (2,4,12,13,83).

1.5 G6PD Enzimine ait Genetik Bilgi, İşleyişi ve Değişiklikleri

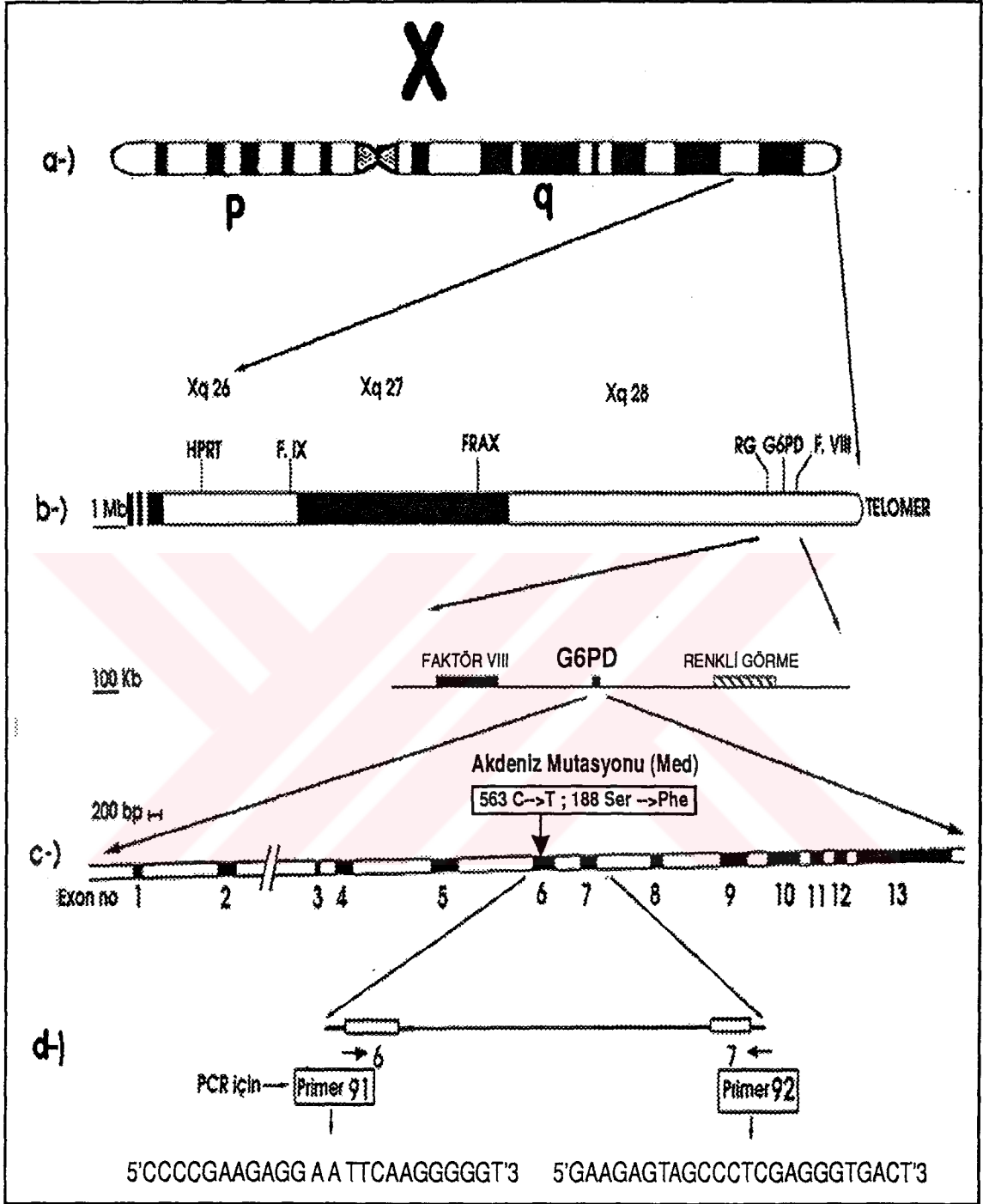
1.5.1 G6PD Geni

G6PD geni insanda X kromozomunun uzun kolunun 28. band bölgesinde (Xq28) bulunur. G6PD geninden başka hemofili (faktör 8 ve 9), renk körlüğü, fragile X(FRAX) hastalıklarıyla bağlantılı genler de bu kromozomal bölgede yerleşmiştir (14). 1986 yılında birbirinden bağımsız iki araştırma grubu tarafından klonlanıp, dizi analizi yapılan G6PD geninin cDNA üzerinden primer yapısı(nükleotid ve amino asid dizisi) tanımlanmıştır (24,25). Genin tam sekans analizi, 1991 yılında Chen E. Y ve arkadaşları tarafından yapıp tamamlanmıştır. G6PD geninin nükleotid sayısı, 20114 baz çifti olup, 13 exon ve 12 intron içerir. Amino asidlere karşılık gelen nükleotid dizilerinin toplam uzunluğu 1545 baz çifti olup, 515 aminoasidik bir polipeptid zincirini tanımlar. Exon 2-3 arasında 9857 baz çiftinden oluşan uzun intron bölgesinin varlığı, genin 5' ucunda -1200baz çiftinden başlayıp birinci intronun içine kadar uzanan bölgenin GC dizisi bakımından zengin adacıklar içermesi, primer yapıdaki karakteristik özelliklerdir. Aktif X kromozomu üzerindeki G6PD geninin transkripsiyonunu düzenlemede bu GC dizilerinin farklı şekilde demetilasyonunun rol alabileceği belirtilmektedir. Yapılan deneysel çalışmalar 5' ucundaki 436 baz çiftlik kısmın, genin tam olarak transkripsiyonu için gerekli olduğunu göstermiştir. Klonlanan insan G6PD enziminin in vitro koşullarda ökaryotik Cos hücreleri ve E. coli ekspresyon sistemlerinde başarılı şekilde sentezi gerçekleştirilmiştir (2,14,26).

G6PD enziminde NADP bağlayan bölgenin yeri moleküler ve yapısal düzeyde henüz tanımlanamamıştır. Ancak yapılan deneysel çalışmalar ve G6PD mutantlarının analizinden 386 ve 387 nolu amino asidlerin(Arginin ve Lysine) NADP bağlayan bölgede yer alabileceği tahmin edilmektedir (27). 205. amino asid lysine bağlanmada glukoz-6-fosfata (G6P) kıyasla daha yüksek affiniteye sahip olan pyridoxal fosfat, G6P varlığında bu bölgeye bağlanarak enzim aktivitesinde % 80 oranında kayba neden olmuştur. Bu deneysel veriden yola çıkılarak glukoz-6- fosfatı bağlayan bölgenin merkezinde 205. amino asidin(Lysine) bulunduğu belirtilmektedir (14).

1.5.2 X'e Bağlı Kalıtım ve X İnaktivasyonu:

X kromozomu üzerinde bulunan G6PD geninin nesilden nesile aktarımı X'e bağlı kalıtımın özelliklerini gösterir. Erkekler(XY) X kromozomundaki genetik bilgilerin birer kopyasına sahip iken, dişiler (XX) ikişer kopyaya sahiptir. Ancak embriyonel gelişimin erken dönemlerinde gerçekleşen X kromozomu inaktivasyonu işlemiyle dişilerdeki iki X kromozomundan biri inaktif hale getirilebilir. İnaktif hale getirilen X



Şekil-1.4: G6PD geninin sitogenetik ve moleküler haritası (14).

- X kromozomunun şematik gösterimi.
- X kromozomunun uzun kolunun uç kısmının büyütülmüş şekli üzerinde G6PD, renkli görme, Fragile X ve hemofili(faktör VIII ve IX), Hipoksantin Quanin Fosforibozil Transferaz(HPRT) genlerinin göreceli yerleşimleri ve büyüklükleri.
- G6PD geninin exon ve intron yapısı. Akdeniz tipi mutasyonun olduğu gen bölgesi.
- Akdeniz mutasyonunu saptama için exon 6-7 gen bölgelerini PCR yoluyla çoğaltmada kullanılan primerler.

kromozomu babadan veya anneden kalıtılan olabileceği gibi, genetik bilgi açısından sağlam veya hatalı kopyayı taşıyan kromozomda olabilir. Ayrıca yaşamın bazı dönemlerinde babadan veya anneden kalıtılan X kromozomu değişik düzeylerde X inaktivasyonu işleminden kaçabilmektedir (28). Sonuçta heterozigot taşıyıcı bireylerde sağlıklı G6PD gen kopyasını taşıyan hücrelerin sayısı, %50'den fazla veya az olabilmektedir. Bu noktadan bazı heterozigot kişiler normal düzeyde G6PD aktivitesine sahip iken bazıları, homozigot hastaymış gibi oldukça düşük G6PD aktivitesi gösterebilmektedirler. Bu durum, kalitatif tarama testleriyle heterozigot kişilerin saptanmasını güçleştirdiği kadar, eksikliğin yol açtığı sağlık sorunlarının ortaya çıkıp çıkmayacağını da belirlemede etkili olmaktadır. Ciddi düzeydeki G6PD eksikliğinin yol açtığı sağlık sorunları X'e bağlı kalıttan dolayı daha çok hemizigot erkeklerde ve homozigot dişilerde ortaya çıkar (28).

1.6 G6PD Mutasyonları

G6PD geninin normal genotipi ve fenotipi, G6PD-B olarak gösterilirken tanımlanan varyantlar enzimin izole edildiği coğrafik bölge, yerleşim birimi veya etnik kökene göre isimlendirilmektedir. Örneğin G6PDA, G6PDA- Afrika, G6PD Akdeniz (Mediterranean) Akdeniz, G6PD Barselona, G6PD Cagliari, G6PD Tokyo, G6PD Tarsus varyantları örneklerin bulunduğu coğrafik veya yerleşim biriminin ismini almışlardır (29,49). Öte yandan G6PD Chinese gibi etnik kökenin ismi verilen varyantlar da vardır. 1994 yılı itibarıyla biyokimyasal düzeyde tanımlanmış 442 varyantın sadece 299 tanesi WHO-G6PD grubunun önerdiği yöntemlere ve kriterlere uyularak tanımlanmıştır (2).

Genin primer yapısının bilinmesi, mutasyon saptama yöntemlerindeki gelişmeler, PCR teknolojisinin, varlığı saptanan mutasyonların analizinde etkin şekilde kullanılabilmesi G6PD geninin farklı bölgelerini çoğaltmada kullanılan özgün primerlerin tasarlanıp geliştirilmesi gibi bu alanda yapılan ilerlemeler, uygun şekilde bir araya getirilerek G6PD varyantları moleküler düzeyde tanımlanmaya başlandı. Biyokimyasal düzeyde saptanan farklılıkların gen düzeyinde geçerli olup olmadığı veya gen düzeyindeki farklılıkların biyokimyasal düzeydeki farklılıkları yansıtmadığı ve mutasyonlarla G6PD eksikliğinin yol açtığı sağlık sorunları arasındaki bağlantılar açısından önemli bulgular elde edildi. 1988 başlarından itibaren biyokimyasal varyantların oluşumuna yolaçan DNA düzeyindeki değişiklikler incelenmeye başlandı. 442 biyokimyasal varyantın temelde 60 moleküler varyanttan köken aldığı saptandı (2). 1994 yılı itibarıyla moleküler düzeyde tanımlanan 60 mutasyonun yeri, özellikleri ve ilişkili olduğu G6PD varyantları Tablo-1.3'de

özetlenmiştir.

G6PD geninde oluşan mutasyonların tanımladığı varyantlar, değişik düzeylerde sağlık sorunlarına yol açar. Tanımlanan mutasyonların çoğu, missense nokta mutasyonları ve delesyonlardır. Kesim bölgesinde bir mutasyon saptanırken promotor bölgede hiç bir mutasyon tanımlanmamıştır. G6PD eksikliğinin görüldüğü coğrafik bölgeler ve etnik gruplar ile G6PD mutasyonlarının dağılımı, tesadüfi olmayıp belirli kümelenmeler göstermektedir.

Varyant	Nükleotid Değişimi	Dünya Sağlık Örgütü Sınıflandırması	Amino Asid Değişimi
Gaohe Gaozhou	95 A->G	2	32 His->Arg
"Sunderland"	105->107 delesyon	1	35 ile ->delesyon
"Aures"	143 T ->C	2	48 ile ->Thr
Metaponto	172 G ->A	3	58 Asp ->Asn
A ⁻ Distrito Federal "Matera"			
Castilla	202 G ->A	3	68 Val -> Met
Alabama	376 A ->G		126 Asn-> Asp
Betica Tepic Ferrara			
Ube Konan	241 C -> T	3	81 Arg ->Cys
"Lagosanto"	242 G ->A	3	81Arg -> His
"Vancouver"	317 C ->G 544 C ->T 592 C->T	1	106 Ser-> Cys 182 Arg -> >Trp 198 Arg -> >Cys
Sao Borga	337 G ->A	4	113 Asp -> Asn
A	376 A ->G	4	126 Asn ->Asp
"Chinese-4"	392 G ->T	?	131 Gly ->Val
"llesha"	466 G ->A	3	156 Glu -> Lys
Mahidol	487 G ->A	3	163 Gly -> Ser
Plymouth	488 G ->A	1	163 Gly -> Asp
"Chinese-3"	493 A->G	2	165 Asn ->Asp
"Shinshu"	527 A->G	1	176 Asp->Gly

Varyant	Nükleotid Değişimi	Dünya Sağlık Örgütü Sınıflandırması	Amino Asid Değişimi
Santamaria	542 A->T 376 A->G	2	181 Asp->Val 126 Asn->Asp
Mediterranean Dallas Birmingham "Sassari" "Cagliari" Panama	563 C->T	2	188 Ser->Phe
"Coimbra"	592 C->T	2	198 Arg->Cys
"Santiago"	593 G->C	1	198 Arg->Pro
Sibari	634 A->G	3	212 Met->Val
Minnesota Marion Gastonia	637 G->T	1	213 Val->Leu
"Harilaou "Mexico City"	648 T->G 680 G->A	1 3	216 Phe->Leu 227 Arg->Gln
A ⁻	680 G->T 376 A->G	3	227 Arg->Leu 126 Asn->Asp
"Stonybrook"	724->729 GGC delesyonu	1	242->243 Gly ve Thr
Wayne	769 G->C	1	257 Arg-> Gly
"Cleveland "Chinese-1"	820 G->A 835 A->T	1 2	274 Glu->Lys 279 Thr->Ser
Seattle Lodi "Modena"	844 G->C	2	282 Asp->His
"Montalbano"	854 G->A	3	285 Arg->His
Viangchan Jammu	871 G->A	2	291 Val ->Met
"West Virginia"	910 G->T	1	303 Val->Phe
Kalyam Kerala	949 G->A	3	317 Glu->Lys

Varyant	Nükleotid Değişimi	Dünya Sağlık Örgütü Sınıflandırması	Amino Asit Değişimi
A ⁻ Betica Selma	968 T→C 376 A→G	3	323 Leu→Pro 126 Asn→Asp
"Nara" Chatham "Fushan" "Chinese-5" "Ierepetra" Loma Linda "Olomouc" Tomah	953-976 delesyonu 1003 G→A 1004 C→A 1024 C→T 1057 C→T 1089 C→A 1141 T→C 1153 T→C	1 3 2 ? 2 1 1 1	319-326 delesyonu 335 Ala→Thr 335 Ala→Asp 342 Leu→Phe 353 Pro→Ser 363 Asn→Lys 381 Phe→Leu 385 Cys→Arg
Iowa Walter Reed Iowa City Springfield	1156 A→G	1	386 Lys→Glu
Guadalajara "Mt. Sinai"	1159 C→T 1159 C→T 376 A→G	1 1	387 Arg→Gys 387 Arg→Cys 126 Asn→Asp
Beverly Hills Genova Worcester	1160 G→A	1	387 Arg→His
"Praba"	1166 A→G	1	389 Glu→Gly
Nashville Anaheim "Calgary" "Portici"	1178 G→A	1	393 Arg →His
Alhambra	1180 G→C	1	394 Val→Leu
"Puerto Limon"	1192 G→A	1	398 Glu→Lys
Riverside	1228 G→T	1	410 Gly→Cys
"Japan" "Shinagawa"	1229 G→A	1	410 Gly→Asp
Tokyo "Georgia"	1246 G→A 1284 C→A	1 1	416 Glu →Lys 428 Tyr→End

Varyant	Nükleotid Değişimi	Dünya Sağlık Örgütü Sınıflandırması	Amino Asid Değişimi
"Varnsdorf"	3'intron 10. kesim bölge delesyonu	1	N/A
Pawnee	1316 G->C	2	439 Arg->Pro
Telti Kobe	1318 C->T	1	440 Leu->Phe
"Santiago de Cuba"	1339 G->A	1	447 Gly->Arg
"Cassano"	1347 G->C	2	449 Gln->His
Union Maewo	1360 C->T	2	454 Arg->Cys
Andalus	1361 G->A	1	454 Arg->His
Cosenza	1376 G->C	2	459 Arg->Pro
Taiwan--Hakka Gifu-like	1376 G->T	2	459 Arg->Leu
Kaiping Anant Dhon Petrich Sapporo	1388 G->A	2	463 Arg->His
"Campinas"	1463 G->T	1	488 Gly->Val

Sınıf 1. Nonsferositik Hemolitik Anemiye yol açan enzim eksikliği
Sınıf 2. Klinik tabloya yol açabilen ciddi enzim eksikliği
Sınıf 3. Orta düzeyde enzim eksikliği
Sınıf 4. Aktivite kaybı göstermeyen mutant enzim tipi

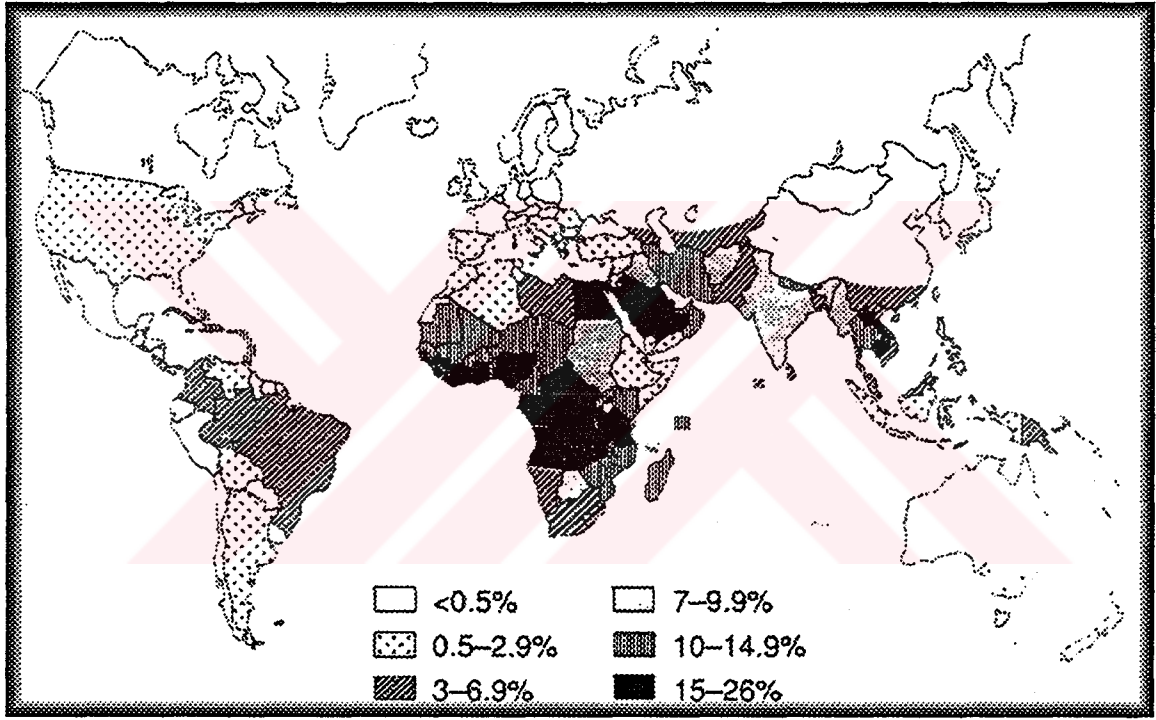
Tablo-1.3: DNA düzeyinde tanımlanan G6PD varyantları (2).

1.7 G6PD Eksikliğinin Genel Olarak Yeryüzündeki Dağılışı

X'e bağlı kalıtım gösteren G6PD eksikliğinin frekansı, genellikle hemizigot erkeklerin belirli bir populasyondaki oranının çıkarılmasıyla tahmini olarak saptanır. Bu oranın gen frekansına eşit olacağı kabullenilir (13). Ancak hastalığın görülme sıklığı yerleşim birimleri arasında önemli ölçüde değişebilmektedir. Bu noktadan G6PD eksikliği frekansının, geniş kapsamlı aile gruplarına ve yerleşim birimlerine bağlı olarak

saptanıp ifade edilmesi, verilerin bilimsel geçerlilik ve güvenilirliğini artırıcı etkiye sahiptir.

Dünya nüfusunun yaklaşık %7'si G6PD eksikliğine sahiptir. G6PD eksikliği olan kişilerin yarısı da, G6PD eksikliğinin yol açtığı ölümcül olabilen sağlık sorunlarına yakalanma riski taşımaktadır. Rakamlarla ifade edildiğinde her yıl doğan yaklaşık 130 milyon bebeğin en az 4.5 milyonu G6PD eksikliğine sahip olarak doğmakta ve buna bağlı sağlık sorunlarına maruz kalma riski taşımaktadır (13).



Şekil-1.5: Dünya ölçeğinde G6PD eksikliğinin görülme sıklığı haritası (13).

Küreselleşen dünyada göç hareketleri ve metropollerde coğrafik ve etnik yapıya bağlı yerleşimler dikkate alındığında, G6PD eksikliğinin belirli yerleşim birimlerinde ve populasyonlarda daha fazla görülme olasılığı artmaktadır. Bunu doğrulayan delil ise, enzim eksikliğinin görülme sıklığının, bazı Ege adalarında ve Kıbrıs da %15-26 arasında Sardinya'da %30, bazı bölgelerde %0.5-2.9 arasında değişebilmesidir (17). Literatür taramalarında ülkemizde Eti Türkleri, Trakya ile Adana, Antalya bölgesini kapsayan sınırlı çalışmalar dışında geniş kapsamlı çalışmalara rastlanılamamıştır

(31,32,33,34). Ege bölgesine ait güvenilir istatistiki veriler de bulunamadı.

Epidemiyolojik veriler, G6PD eksikliğinin sıtmanın geçmişde ve günümüzde yaygın olduğu bölgelerde daha sık görüldüğünü göstermektedir. Ayrıca talassemi ve orak hücre anemisinin bulunduğu bölgelerde, G6PD eksikliğine daha sık rastlanması bu üç hastalığın birlikte seyrettiğini gösterir. Bundan dolayı populasyon çalışmalarında bu üç kalıtsal hastalık birlikte taranarak, aralarındaki ilişki saptanmaya çalışılmaktadır (35,47).

Belirli etnik gruplarda G6PD eksikliğinin frekansı oldukça yüksek bulunmuştur. Örneğin Siyahi Amerikalılar ve Afrikalılar arasında bu frekans %10-20'ye Suudilerde %13'e kadar yükselebilmektedir (17,47).

Benzer şekilde G6PD mutasyonlarının dağılımında da belirli coğrafik ve etnik kümelenmeler görülmektedir. Örneğin G6PDA- Afrika ve Güney Avrupada; G6PD Akdeniz, Güney Avrupa, Ortadoğu ve Hindistanda; G6PD Canton, Asyada daha sıklıkta bulunan mutasyonlardır (29).

1.8 Afrika Kökenli Mutasyonlar:

Batı Afrikada ve siyahi Amerikalılarda yaygın olan iki tip varyantdan G6PDA sınıf-4 grubuna dahil iken G6PDA⁻ şeklinde isimlendirilen diğer varyant sınıf-3 grubunda bulunur. Siyahi Amerikalıların yaklaşık %20'si X kromozomlarında G6PDA varyantını oluşturan mutasyonu(376G) taşırlar. G6PDA mutant enzimi normal aktiviteye sahip ama elektroforetik açıdan normale göre daha hızlı göç eder. G6PDA⁻ ise, aynı elektroforetik mobiliteye sahiptir ancak enzim *in vivo* koşullarda stabil olmadığından aljuvarlarda ortalama enzim aktivitesi yaklaşık normalin %10-30'u civarındadır (2,29).

G6PDA-, G6PDA varyantında ikinci bir mutasyon (202A, 968C ve 680T) olursa ortaya çıkar ve ikinci mutasyonun yerine bağlı olarak üç alt tipi vardır (36). Bu ikinci mutasyon enzim aktivitesinde belirgin bir azalmaya yol açar. Bundan ayrı olarak 376G mutasyonu yanında ikinci olarak 542T (Santamaria) veya 1159T (Mt. Sinai) mutasyonu olursa, hemolitik anemiye yol açacak düzeyde enzim eksikliği ortaya çıkmaktadır (2).

Bilinen Afrika kökenli mutasyonların hepsi, G6PDA varyantından kaynaklanır. Bu da bir zamanlar Afrika G6PD gen havuzunda en yaygın predominant tipin G6PDA olduğunu akla getirmektedir (29).

1.9 Akdeniz Bölgesi Mutasyonları:

Güney Avrupa, Akdeniz ülkelerinde ve Ortadoğuda yaygın olarak görülen sınıf 2 grubu G6PD eksikliği, genelde G6PD-Akdeniz(Mediterranean) varyantından kaynaklanır. Bu varyantın oluşumuna yol açan mutasyonun moleküler temeli, ilk defa T. Vulliamy ve arkadaşları tarafından 1988 yılında Güney İtalyanın Cosenza vilayetinde yaşayan G6PD eksikliği olan kişilerin DNA örneklerinde tanımlandı (37). Bu mutasyonun yeri ve yaptığı değişiklik, aşağıda gösterilmiştir.

Akdeniz (med) mutasyonu (exon VI.) ---> 563. Nükleotid ---> C -----> T	
Kodondaki değişiklik	TCC ----> TTC
Amino asid değişimi	188. a.asid ----> Serin (Ser) --> Fenilalanine (Phe)

Biyokimyasal düzeyde Akdeniz tipinden farklı varyant olarak tanımlanmış G6PD Cagliari, G6PD Dallas, G6PD Birmingham ve G6PD Sassari, varyantlarının hepsi ortak olarak Akdeniz mutasyonu içerir, dolayısıyla moleküler temeli aynıdır. (2,38). Akdeniz mutasyonu Ortadoğuda ve Hindistan da yaşayan ve G6PD eksikliğine sahip kişilerde de saptanmıştır (39).

Ayrıca, Akdeniz mutasyonu taşıyan kişilerin %20'sinde 1311. nükleotidde ikinci bir mutasyon daha saptanmıştır.

İkinci Mutasyonun Yeri:

exon-11'de 1311.nükleotid: C -----> T (sessiz mutasyon)

Güney Avrupa ve Ortadoğu kökenli Akdeniz mutasyonu taşıyan 53 kişi bu mutasyon için tarandığında 52 tanesinin bu ikinci mutasyonu taşıdığı belirlenmiştir. Ortadoğu ve Akdeniz kökenli 42 örneği içeren bir başka çalışmada hepsinde bu ikinci sessiz mutasyon tüm örneklerde saptanmıştır. Ancak Hindistan da Akdeniz mutasyonu taşıyan 3 kişinin DNA örneklerinin analizinde bu ikinci mutasyona(1311.nükleotid) rastlanılmamıştır (39,46).

Akdeniz mutasyonu taşıyan G6PD eksikliğine sahip kişiler, iki haplotipe sahiptirler. Bunlardan birinci haplotip, Akdeniz-1 (Med1) olarak tanımlanır ve sadece tek bir mutasyon içerir (563T). Akdeniz-2 (Med2) olarak tanımlanan ikinci haplotip ise, iki

mutasyon içerir (563T ve 1311T). Şimdiye kadar sınırlı sayıdaki örnekle temsil edilen populasyonlarda Med2 haplotipi hakim iken (%90), Med1 sadece Hindistan da ve İtalya'nın Alp dağları eteklerinde yaşayan insanlar da saptanmıştır (40).

1.10 Uzakdoğu Mutasyonları

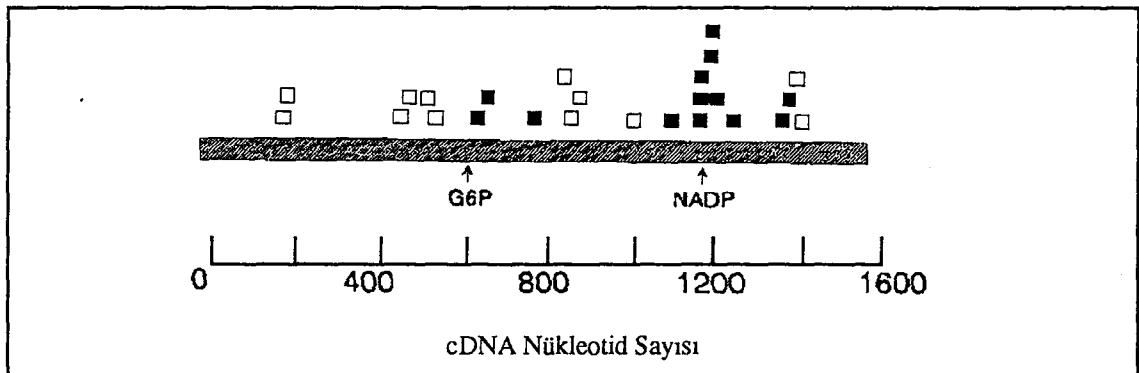
Uzakdoğu mutasyonlarından en fazla bilineni G6PDCanton olup, 1376.nükleotidde bir mutasyon içerir (29,41).

G6PD Canton (exon 12.) -----> 1376. nükleotid -----> G-----> T
Aminoasit değişimi 459. a.asid -----> Arginin -----> Leucine

Daha önce farklı biyokimyasal varyantlar olarak tanımlanan Taiwan-Hakka, Agrigento ve Gifu tiplerinin hepsinin G6PD Canton ile aynı mutasyonu taşıdıkları bulunmuştur. Aynı şekilde daha önceleri farklı biyokimyasal varyantlar olarak tanımlanan sınıf-2 grubu enzim eksikliğine yol açan Kaiping, Anant, Dhon, Petrich-like ve Sapporo-like varyantların hepsi ortak tek bir mutasyon taşırlar (2).

G6PD Kaiping (exon 12.) -----> 1388. nükleotid -----> G-----> A
Aminoasit değişimi 463. a.asid -----> Arginine -----> Histidine

Bu örnekler biyokimyasal düzeyde farklı olduğu düşünülen çok sayıdaki varyantın, DNA düzeyinde aynı mutasyondan köken aldığına güzel bir örnektir.



Şekil-1.6: G6PD geninde saptanan bazı mutasyonların cDNA üzerindeki yerleşimi (29).

□ Polimorfik Varyant ■ Hemolitik Varyant

G6PD geninin cDNA'sı üzerinde saptanan mutasyonların dağılımı tesadüfi olmayıp belirli kümelenmeler göstermektedir (2,29). Kalıtsal nonsferositik hemolitik anemiye yol açan sınıf-1 varyantlarına ait mutasyonların çoğu enzimin G6P veya NADP bağlayan bölgesinde bulunmuştur. Sınıf-1'e ait 23 nokta mutasyonunun 5 tanesi 198-257; 15 tanesi de 363-447 amino asitleri arasındadır. Diğer deyişle 23 nokta mutasyonunun % 87'si bu iki bölgede kümelenmiştir. Ancak bu verilerden yola çıkarak kesin genellemeler yapmak çok zordur. Çünkü tek bir kodondaki farklı mutasyonlar, farklı klinik tablolara yol açabilmektedir. Örneğin 198 Arginin-proline dönüşürse G6PD Santiago isimli sınıf-1 varyantı ortaya çıkmakta; 198 Arginin-sisteine dönüşürse, G6PD Coimbra isimli sınıf-2 varyantı ortaya çıkmaktadır. Aynı şekilde 454 Arginin- sisteine dönüşürse, sınıf-2'ye ait G6PD Union varyantı; 454 Arginin- histidine dönüşürse, sınıf-1'e ait G6PDAndalus varyantı ortaya çıkmaktadır (2).

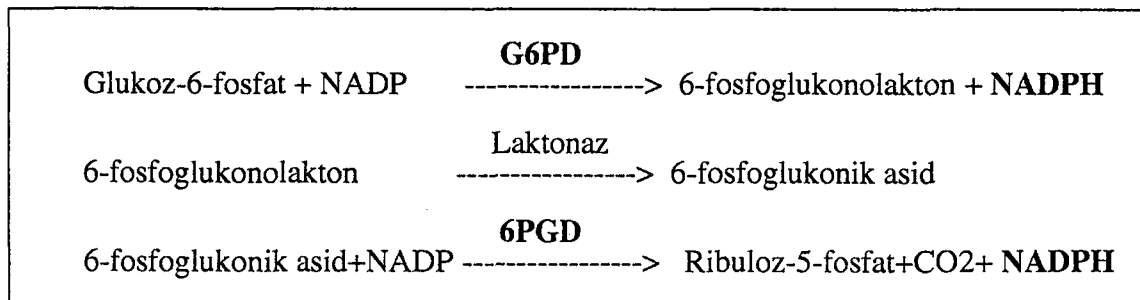
1.11 G6PD Eksikliği ve Sıtma İlişkisi:

G6PD eksikliğinin sıtmanın geçmişde endemik olduğu bölgelerde daha sık gözlenmesi, pek çok araştırmacıya G6PD eksikliğinin sıtma etkeni *P. falciparum* tarafından enfekte edilmeye karşı bir avantaj oluşturabileceğini düşündürmüştür (42). Sıtmanın epidemiyolojisi ile G6PD eksikliğine yol açan varyantların coğrafik dağılışı arasındaki bağlantıya dikkat çekilerek sıtma hipotezi ortaya atılmıştır. Bu hipoteze göre sıtmanın geçmişde endemik olduğu bölgelerde, G6PD eksikliğini taşıyıcılar, pozitif olarak seçilmişler ve popülasyonda frekanslarını artırmışlardır. Örneğin ovalarda ve sulak yerlerde yaşayanlarda G6PD eksikliği görülme sıklığının deniz seviyesinden 1000 metre ve daha yükseklerde yaşayan popülasyonlara kıyasla 4-5 misli daha fazla olduğu saptanmıştır. Bulgaristan'da WHO projesi olarak gerçekleştirilmiş bir çalışmada, geçmişte sıtmanın endemik olduğu ovalık arazilerde heterozigot bireyler üzerinde sıtmanın seçici faktör olduğu doğrulanmıştır (43). Ancak bu pozitif ilişkinin moleküler mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. G6PD eksikliği taşıyıcısı bireylerin sıtmaya karşı dirençli olmaları, X kromozomu inaktivasyonuna bağlı olarak bu kişilerin alyuvarlarında ortaya çıkaran G6PD mozaizmi ile izah edilmektedir. Hücrelerin yaklaşık bir kısmının normal, diğer kısmının G6PD eksikliği taşımaları, sıtma parazitini şaşırtmakta ve çoğalmasını engellemektedir. Örneğin G6PD eksikliği olan alyuvarlarda sıtma parazitlerinin daha yavaş çoğaldığı deneysel olarak gösterilmiştir (44). G6PD eksikliği olan enfekte olmuş

alyuvarlar, sıtma parazitinin nükleik asid sentezi için ihtiyaç duyacağı riboz türevlerini sentezleyemez. Çünkü hücre içi indirgenmiş glutatyonun düşük seviyesi, 5-fosforibozil-1- pyrofosfatı(PRPP) inhibe eder. Sonuçta parazitin veya konakçı hücrenin oksidatif yolla tahribatından daha ziyade parazitin büyümesinin ve replikasyonunun engellenmesi, sıtma ve G6PD eksikliği arasındaki dengeli polimorfizm için bir başka mekanizma olabilir (45). Ancak yukarıdaki olası mekanizmalardan hangisinin moleküler düzeyde geçerli olduğu henüz kesinlik kazanmamıştır.

1.12 G6PD Eksikliğinin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

G6PD eksikliği bütün hücre ve dokular için sözkonusudur (2). Ancak G6PD eksikliğinin klinik belirtileri öncelikle kan dokusunda ortaya çıktığı için, G6PD enzim aktivitesi, genellikle kan hemolizatında veya alyuvarlarda ölçülür. G6PD aktivitesi, glukoz-6-fosfat ve NADP varlığında, standart koşullarda enzimin aktivitesi sırasında oluşumuna yol açtığı NADPH miktarının ölçümüne dayanır. Enzimin aktivitesi sırasında NADP'nin indirgenmesiyle oluşan NADPH'in 340 nm dalga boyundaki molar absorpsiyon katsayısı bilindiğinden, optik dansitedeki değişiklikler, NADPH konsantrasyonundaki değişiklikler ile ilişkilendirilir. Reaksiyon stokiyometrik olduğundan birim zamandaki optik dansite değişiminden yola çıkılarak enzim aktivitesi hesaplanır. Belirli sıcaklık, osmolarite ve pH koşullarında bir dakika içinde bir mikromol NADP'yi NADPH'e indirgeyen enzim miktarı bir ünite (U) G6PD enzim aktivitesi olarak tanımlanır (50). Alyuvarlarda veya kan hemolizatında yapılan aktivite ölçümleri, genellikle gram hemoglobin başına düşen aktivite miktarı olarak ifade edilir. Aktivite ölçümünde dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta da, pentoz fosfat yolunda NADPH oluşumuna yol açan iki enzimin olmasıdır (52).



Bundan dolayı G6PD aktivitesinin göstergesi olarak ölçülen NADPH, gerçekte

G6PD ve 6PGD enzimlerinin aktivitelerinin toplamını yansıtır. İkinci enzimin oluşumuna yol açtığı NADPH miktarını, G6PD aktivitesinden ayrı olarak ölçen ve hesaplayan test sistemleri geliştirilmiştir. Ancak ikinci enzimle bağlantılı NADPH miktarının ciddi düzeydeki G6PD eksikliği tanısını koymada yanlış negatif sonuç verecek şekilde engelleyici bir katkısı yoktur. Çünkü G6PD eksikliği olan kan örneklerinde G6PD aktivitesi sonunda oluşan ürünü, 6PGD enzimi substrat olarak kullandığı için genelde reaksiyon hızını sınırlayıcı faktör olmamaktadır. Ancak oluşan toplam NADPH biraz fazla olduğundan G6PD enziminin normal değeri gerçek değerinden biraz yüksek olarak hesaplanabilir. Bundan dolayı Uluslararası Hematoloji Standardizasyon Komitesi G6PD aktivitesinin 6PGD aktivitesi dikkate alınarak düzeltilmiş normal değerini 8.34 ± 1.59 U gr/Hb olarak yayımlanmıştır. 6PGD aktivitesi için düzeltilmemiş normal G6PD aktivitesi ise 12.1 ± 2.09 U gr/Hb olarak belirtilmektedir (51). Ancak her toplum kendine ait normal değerlerini, bu ölçüm değerini dikkate alarak saptaması gerekir.

1961 yılından itibaren G6PD eksikliğini kalitatif olarak saptamada kullanılan bazı testler yayınlandı (50,53,54):

- Parlak krezil mavisini renksizleştirme (Brillant Cresyl Blue Decolorization) Testi (1961, Motulsky ve Campbell-Kraut)
- Methemoglobin indirgenme testi (1962, Brewer ve arkadaşları)
- Floresans spot testi (1962, Fairbanks ve Beutler, modifikasyon. 1966, 1976, 1979, 1985)
- Metilen mavisini indirgemeye dayalı test (1965, Oski ve Growney)
- Mikro-methemoglobin indirgenme testi (1968, D.R. Miller)

Floresans spot test dışındaki diğer testlerin hepsi, reaksiyon ürünü NADPH'den elektronları alarak indirgenen ve renk değişimine uğrayan farklı kimyasalları içermektedir. Floresans spot testi ise oluşan NADPH'in ultraviyole ışık altında verdiği floresansın doğrudan gözlemine dayanır.

Bu testler bazı laboratuvarlarda ve çalışmalarda hala kullanılmaktadır. G6PD eksikliği tanısı koymak için geliştirilen bu testler tarihsel süreç içinde birçok kez gözden geçirilmiştir. Bazılarının geçerliliği, zaman içinde oldukça azalırken bazıları daha da iyileştirilerek güncelliklerini korumuşlardır. Örneğin G6PD eksikliğinin gerçek nedeninin bilinmediği dönemde, primakine duyarlı bireyleri saptamada kullanılan Heinz cisimciği testi ve glutatyon stabilite testi, G6PD eksikliği tanısının konmasında bugün ge-

çerliliğini kaybetmişlerdir (2). Buna rağmen bazı kitaplarda G6PD eksikliği tanısında kullanılan testler olarak hala yerlerini korumaktadırlar. Öte yandan spot testi, yanlış negatif ve pozitif sonuç vermesini azaltacak şekilde birkaç defa modifiye edilerek kullanılabilirliği artırılmıştır (54, 92, 88, 55, 89). Bunun yanında Uluslararası Hematoloji Standardizasyon Komitesince standardize edilen ve WHO-G6PD grubunca önerilen geçerli test, floresans spot testi olmuştur. 1979 yılında standardize edilen floresans spot testi, ciddi düzeydeki G6PD eksikliğini, hemizigot erkekler ve homozigot dişilerde saptamada güvenilirliği ve geçerliliği yüksek olan bir test olarak tanımlanmıştır (55). Ancak sağlam ve G6PD eksikliği olan iki alyuvar popülasyonuna sahip heterozigot bireylerin kalitatif aktivite ölçümüne dayalı testler ile doğru şekilde saptanabilmesi zordur. Genomik DNA'daki olası mutasyonların analizine dayalı testler ile heterozigot bireyler daha doğru şekilde tanımlanabilmektedir (2).

Hemoliz geçiren kişilerde hemolize yol açan olayların G6PD eksikliğine bağlı olup olmadığını aktivite ölçümüne dayalı testler ile saptarken ayrıca dikkatli olunmalıdır. Özellikle sınıf 3 grubuna ait (G6PDA- varyantı gibi) G6PD eksikliğinde yaşlı alyuvarlar öncelikle hemolize uğradığı için aktivite düzeyi normale yakın olan genç alyuvar sayısı popülasyonda artmaktadır. Bu gruptaki kişilerde hemoliz anında G6PD aktivite ölçümü yapılırsa, normale yakın değerler elde edilmekte ve yanlışlıkla bu kişilere G6PD sağlam tanısı konabilmektedir. Aktivite ölçümlerinde yanlış negatif sonuç elde etmeyi azaltma açısından, ölçümler hemolitik krizden en az 3-4 hafta sonra yapılmalıdır. Bununla beraber hemoliz geçiren kişilerde G6PD eksikliği tanısı konması gerekiyorsa, tüm aile bireylerinin de G6PD aktivite düzeyleri ölçülerek yanlış negatif sonuç verme olasılığı azaltılmalıdır. Kişinin yaşadığı coğrafik bölgedeki G6PD varyantları moleküler düzeyde tanımlanmışsa, izlenmesi gereken daha kesin ve güvenilir alternatif yol ise, çekirdekli kan hücrelerinden izole edilen DNA örneğinde, kişinin yerleşim alanı ve soy ağacı dikkate alınarak tanımlanan mutasyonlar içinden olası birkaçının taranarak, kesin tanının konmasıdır (2).

1.13 G6PD Varyantlarının Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler

1950'li yıllarda G6PD eksikliğinin gerçek nedeninin ortaya çıkarılmasından sonra yapılan ilk çalışmalarda farklı olgulardan izole edilen enzimlerin farklı biyokimyasal özelliklere sahip olması dikkati çekti. Farklı özelliklere sahip varyantların kar-

şılaştırılabilmesi için enzim izolasyonunda ve tanımlanmasında kullanılan yöntemlerin standardizasyonunun gerekliliği ortaya çıktı. 1967 yılında WHO-G6PD grubu oluşturuldu. Aynı yıl bu komite ilk protokolleri ve standartları yayınladı (50). O dönemdeki teknolojiye uygun olarak varyantların tanımlanmasında aşağıdaki strateji önerildi.

- Dietilaminoetil selüloz kolon kromatografisi ve amonyum sülfat ayrıştırımı kullanılarak enzimin kısmen saflaştırılmış halde izolasyonu.

- İzole edilen G6PD enziminin aktivite ölçümü. G6P ve NADP'ye ait Km değerlerinin ölçülmesini kapsayan kinetik özelliklerinin saptanması.

- Değişik pH ve sıcaklıklarda enzimin stabil kalma özelliklerinin saptanması.

G6PD eksikliği çalışmalarında bu yöntemler kullanılarak 1994 yılı itibarıyla 442 varyant tanımlandı (2). Bununla beraber WHO-G6PD grubunun belirlediği standartlara uygun tanımlanan varyantların sayısı 299 idi (2). G6PD Cornell ve Şikago olarak tanımlanan iki varyantın gerçekte aynı varyant olduğunun ortaya çıkarılmasıyla tanımlanan 442 varyantın gerçekten birbirlerinden ne düzeyde farklı olduğu sorusu gündeme geldi. Bu arada G6PD eksikliği araştırma alanında bu sorunun cevabını vermede sağlam bir kriter olabilecek aşağıda özetlenen önemli gelişmeler oldu.

- 1986'lı yıllarda G6PD enzimini kodlayan G6PD geni klonlandı. cDNA üzerinden nükleotid ve amino asid dizisi deşifre edilerek genin primer yapısı çözüldü (24,25).

- G6PD geninin belirli bölgelerinde özgün nükleotid dizilerine bağlanabilen ve geni bu noktalardan parçalara ayırabilen doğal kesici enzimlerin (restriction endonükleaz) varlığı saptandı. Bu enzimler kullanılarak G6PD geninde RFLP desenleri ortaya çıkarılmaya başlandı (36,40,60,82).

- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tanımlandı ve geliştirildi. Mutasyonların saptanmasında PCR temelli strateji ve yöntemler kullanılmaya başlandı (59).

- Gendeki nokta mutasyonlarını saptamada PCR-SSCP ve DGGE-TGGE yöntemleri geliştirilerek başarılı şekilde G6PD genindeki mutasyonların varlığını saptamada kullanıldı (56,57,58).

- G6PD geninin farklı exon bölgelerini PCR yoluyla çoğaltmada kullanılan özgül primerler tasarlanıp geliştirildi (61,62). PCR'da daha başarılı sonuç elde edilebilmesi, PCR ürünlerinin kesici enzimlerle daha etkin şekilde kesilmesini sağlamak için kullanılan özgün primer dizisi zaman zaman değiştirilmektedir. Dolayısıyla primer di-

zisindeki bu iyileştirilmelere bağlı olarak belirli bir gen bölgesinin çoğaltılması için geliştirilmiş farklı isimlerle anılabilen birden fazla primerin varlığı sözkonusu olabilmektedir. Böyle bir durum G6PD Akdeniz mutasyonunun bulunduğu exon 6-7 gen bölgesinin PCR yoluyla çoğaltımını içeren yayınlarda gözlemlendi (63,39,64,67,66,65) (Tablo-1.4).

- G6PD genindeki mutasyonların bulunduğu özgül nükleotid dizilerini tanıyan ve kesen kesici enzimlerin bulunması, mutasyonun olduğu bölgede yeni kesim bölgelerinin

Kaynak	Oligo B primer	Oligo J primer	PCR Ürün Büyüklüğü
(63)	ACTCCCGAAGAGGGGT	CCAGCCTCCCAGGAGAGA	542bp
(39)	ACTCCCGAAGAGGGGTTCAAGG	CCAGCCTCCCAGGAGAGAGGAAG	547bp
(64)	ACTCCCGAAGAGGGGTTCAAGG	CCAGCCTCCCAGGAGAGAGGAAG	547bp
(67)	CCCCGAAGAGG AATTCAAGGGGGT	GAAGAGTAGCCCTCGAGGGTGACT	583bp
(66)	ACTCCCGAAGAGGGGTTCAAGG	CCAGCCTCCCAGGAGAGAGGAAG	547bp
(65)	ACTCCCGAAGAGGGGTTCAAGG	CCAGCCTCCCAGGAGAGAGGAAG	547bp

Tablo-1.4: G6PD Akdeniz (med) mutasyonunun bulunduğu gen bölgesinin (exon 6-7) PCR yoluyla çoğaltımında kullanılan primerler.

ortaya çıkması veya kaybolması, hatalı eşleşmiş oligonükleotidler sentezleyerek mutasyon bölgesinde yeni kesim noktalarının oluşturulabilmesi, PCR ürünlerinin mutasyon analizinde etkin şekilde kullanılmasına yol açtı.

- Mutasyon olduğu saptanan gen bölgelerinin nükleotid dizi analizini kısa sürede mümkün kılan teknolojiler geliştirildi.

G6PD eksikliğine yol açan varyantların DNA düzeyinde tanımlanmasında bu bilgi ve teknolojinin kullanılabilmesi için gerekli stratejiler geliştirildi. Özellikle bilinen G6PD mutasyonlarının saptanmasında PCR temelli yöntemlerin etkin şekilde kullanılabilmesi, enzimin biyokimyasal varyantlarını oluşturan DNA düzeyindeki değişikliklerin hızla tanımlanmasına yol açtı.

G6PD varyantlarını DNA teknolojisini kullanarak moleküler düzeyde tanımlanmanın biyokimyasal teknolojilere üstünlüğü, DNA örneklerinin kandaki enzimden daha stabil olması ve varyantların daha doğru ve güvenilir şekilde saptanabilmesidir. Ayrıca G6PD eksikliği saptanan olguların enzim eksikliği düzeyine, doğdukları coğrafik bölgeye ve soy ağacına ait verilerin ışığında eksikliğe yol açan en olası mutasyonların oldukça iyi tahmin edilebilmesidir (2,29).

1.14 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Genomik DNA'daki hedef genin belirli bölgelerinin özgün primerlerle tanınması ve hedef DNA'nın istenilen kısmının Taq polimeraz tarafından nükleotidlerin varlığında uygun koşullarda kopyalanmasının başlatılması ve ardışık çevrimler halinde çoğaltılması işlemi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) olarak isimlendirilmektedir. Bu yöntem ilk defa 1985 yılında Saiki ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (59).

PCR çevriminde üç ana basamak vardır.

- 1) Çift iplikli DNA'nın yüksek sıcaklıkta (93-95°C) denaturasyonu.
- 2) Hedef genin istenilen belirli bölgelerine özgün olarak tutunacak şekilde geliştirilen primerlerin genomik DNA'daki tamamlayıcı dizilere tutunması. (37-67°C)
- 3) Taq polimerazın hedef DNA bölgesine tutunmuş primerlerin 3'-OH ucundan başlayarak aradaki kalıp DNA'nın kopyesini çıkarması. (72°C)

Programlanabilir thermal cyclers isimli cihazlara yerleştirilen PCR reaksiyon tüpleri (genomik DNA'yı, nükleotidleri, primerleri ve Taq polimerazı içeren çözelti) ısıtılıp-soğutulularak yukarıdaki üç kademeli işlemler istenilen sayıda tekrar ettirilir. Bu çoğaltım işleminin ardışık çevrimleri, sürekli hedef dizinin kopya sayısında logaritmik artış yoluyla sayıca katlanmaya yol açar. PCR tekniğinin değişik amaçlara uygun olarak geliştirilmiş çok farklı uygulama protokolleri günümüzde kullanımdadır. Örneğin, Nested, Multiplex ve Asimetrik PCR bunlardan birkaçıdır.

Bilinen mutasyonların taranmasında, gen parçalarının klonlanmasında ve nükleotid dizi (sekans) analizinde PCR ürünleri, yaygın olarak kullanılmaktadır (59).

1.15 PCR Temelli Yöntemle G6PD Mutasyonlarının Taranması

PCR temelli mutasyon tarama çalışmalarında önce olguların klinik ve laboratuvar bulguları, doğdukları coğrafik bölge, etnik köken ve olguların yaşadıkları bölgede mutasyonların görülme sıklığı birlikte değerlendirilerek doğru strateji belirlenir. Bu şekilde taranacak olası mutasyonların sayısı azaltılır. Çünkü son derece fazla sayıda ve çeşitte olan G6PD eksikliği varyantlarında tanımlanan 60 mutasyonun hepsinin taranması, maliyet ve uygulanabilirlik açısından, etkin bilimsel strateji değildir. PCR yoluyla çoğaltılan G6PD geninin hedef bölgesine ait PCR ürününün varlığının kontrolü yapıldıktan sonra mutasyonla oluşan veya kaybolan kesim bölgelerinin varlığı veya yokluğu uygun

kesici enzimlerle PCR ürünleri kesilerek kontrol edilir. Kesim ürünleri, agaroz elektroforezde incelenir. Örneğin Akdeniz mutasyonunu (563C-->T) saptamada izlenen strateji, önce ciddi düzeyde enzim eksikliği olan olguların doğru şekilde saptanması ve bu olgulardan DNA'nın başarılı şekilde izolasyonudur. Sonra G6PD genine ait exon 6-7 bölgesini çoğaltmada kullanılan primerler belirlenir. Özgül primerler kullanılarak genomik DNA üzerinden Akdeniz mutasyonunun yer aldığı exon 6-7 bölgesi PCR teknolojisiyle çoğaltılır. Akdeniz mutasyonu, bulunduğu bölgede MboII restriction endonüklaz için yeni bir tanıma ve kesim bölgesi oluşturur. Çoğaltılan PCR ürünü, MboII enzimi (tanıma dizisi 5'... GAAGA, 8,7...3') ile kesilir. Kesim ürünleri elektroforezde yürütülerek oluşan band desenlerinden aranılan mutasyonun varlığı veya yokluğu saptanır (39,65,68,91). Akdeniz mutasyonu içermeyen (nonmed) PCR ürünü, elektroforezde 379, 120, 60 ve 17 baz çifti büyüklüğünde 4 tane DNA bantı verir. Akdeniz mutasyonu içeren PCR ürünü MboII ile kesim sonrası elektroforezde 379'un yerine 276 ve 103, 120, 60 ve 17 baz çifti büyüklüğünde 5 bant verir. MboII ile kesim sonrası elektroforezde yürütülen PCR ürünüde gözlenen 276 ve 103 baz çifti büyüklüğündeki iki DNA bantı Akdeniz mutasyonunun kanıtı olarak değerlendirilir.

1.16 G6PD Eksikliğinin Yol Açtığı Sağlık Sorunlarının Tedavisi ve Önlenimi

G6PD eksikliğine bağlı hemolitik kriz geçirmekte olan kişilere yapılacak ilk tedavi, hemolize yol açan etken maddenin alınımının durdurulması veya vücuttan hızla uzaklaştırılmasının sağlanmasıdır. Hemolitik kriz şiddetli ise, kişilere uygun miktarda G6PD-B normal kan verilmelidir. Bakla yemeye bağlı olarak oluşan hemolitik krizin, şiddeti, desferrioxamine alınarak kısmen azaltılabilir (2).

Kronik hemolize yol açan G6PD eksikliğinde, antioksidan vitamin E alınımının hemolizden koruduğuna dair bazı çalışmalar olmakla beraber, bağımsız çalışmalarla bu, doğrulanmamıştır (2).

Yenidoğan bebeklerde G6PD eksikliğine bağlı yenidoğan sarılığı ve buna bağlı kernikterus, erken dönemde fototerapi ile önlenilmektedir. Bilirubin 20 mg/dL düzeyini aştığı olgularda kan değişimi gerekli olmaktadır. Bu durumda, bebeğe G6PD eksikliği olan kan verilmemesine dikkat edilmelidir (2).

Ancak, ciddi düzeydeki G6PD eksikliği ile ilgili ölümcül düzeye varabilen sağlık sorunlarının ortaya çıkması doğru stratejiler izlendiğinde, kesin olarak önlenmektedir. Bu koruyucu temelli önlenimin gerçekleşebilmesi için;

- Öncelikle risk altındaki yerleşim birimleri aile düzeyinde güncel ve standardize edilmiş floresans spot testi ile taranmalıdır. G6PD eksikliğin % 1 veya daha fazla sıklıkta görüldüğü, favism olgularının sık rastlanıldığı ve sıtmanın geçmişte endemik olduğu coğrafik bölgelere öncelik verilmelidir.

- Ciddi düzeyde G6PD eksikliği saptanmış olgulardan kan örnekleri alınarak hastalığa yol açan G6PD varyantları, biyokimyasal ve moleküler düzeyde tanımlanmalıdır.

- G6PD eksikliğine yol açan varyant tanımlandıktan sonra yaşamlarının ileriki dönemlerinde, kişilerin olası akut hemolitik krize yakalanmamaları için, güncel hemolitik kriz önlenim tablosu hazırlanıp verilmelidir.

- G6PD eksikliği saptanan kişiler, aileleri ve doktorları ile buldukları yerlerdeki sağlık personeli hastalık hakkında sözlü olarak veya broşürle bilgilendirilmelidir (13,35).

Yukarıda belirtilen strateji uygulandığında, çalışılan coğrafik bölgede G6PD eksikliğine bağlı ölümcül olabilen sağlık sorunlarının ortaya çıkışında belirgin bir azalma sağlanacaktır. Bu strateji Kuzey Sardinya'da ve Suudi Arabistanda kısmen uygulanarak önemli başarılar elde edilmiştir (69,70).

1.17 Dünya Sağlık Örgütü G6PD Eksikliği Çalışma Grubunun Önerileri

WHO-G6PD grubu 1985 yılında gelişmeleri değerlendirmek üzere toplandı. Toplantı sonunda G6PD eksikliği çalışmalarını yönlendirici bir dizi tavsiye kararı alındı. Bunlardan önemli olanları aşağıda özetlenmiştir (13).

- Bir popülasyonda G6PD eksikliği %1 veya daha fazla ise yenidoğan bebeklerde floresans spot testi ile tarama yapılmalıdır. G6PD eksikliği bulunan kişiler ve sağlık personeli hastalık hakkında bilgilendirilmeli ve G6PD eksikliğine bağlı oluşan sağlık sorunlarını önleyici güncelleştirilmiş yasak ilaç ve yiyecek listesi verilmelidir.

- Tanımlanmış varyantlarla ilgili klinik, hematolojik ve moleküler genetik veriler daha sistematik şekilde toplanmalıdır. Yeni varyantlar tanımlanırken bu veriler dikkate

alınmalıdır.

- Hemolitik krize veya sarılığa yakalanmış ve kan verilmesi gereken kişilere, verilecek kan önce test edilmeli ve G6PD B normal bulunursa, kullanılmalıdır.

- G6PD eksikliğinin yaygın olduğu bölgelerde kullanılan ve piyasaya sürülen yeni ilaçlar, hemolitik kriz oluşturma riski açısından test edilmelidir.

- Belirli G6PD varyantlarında, belirli ilaçların kullanımı sonucunda ortaya çıkan klinik bulgular, tanımlanmalı ve karakterize edilmelidir.

- G6PD enziminin fonksiyonel üç boyutlu yapısının bilinmesine yönelik kristalizasyon çalışmalarına hız verilmelidir (13).

1.18 G6PD Eksikliği Üzerine Türkiye’de Yapılan Çalışmaların Genel Olarak Değerlendirilmesi

Türkiye’nin farklı coğrafik bölgelerinde G6PD eksikliği konusunda yapılan çalışmaların sınırlı sayıda olduğu saptandı. Yurtiçi ve yurtdışı literatür araştırmalarında saptanan 25 yayından 21 tanesine ulaşılabildi. Yayınlardan 10 tanesi Çukurova bölgesine 3 tanesi Antalya, 3 tanesi İzmir, 2 tanesi Trakya bölgesini ve bir tanesi Türkiye genelini kapsamaktadır. İki çalışma da enzimin biyokimyasal özellikleri ve ilaçlarla etkileşimi üzerinedir (71,72). İzmirde yapılan üç çalışma Behçet Uz Çocuk hastanesinde yürütülen Uzmanlık tezi olup, biri favism ve ikisinde yenidoğan sarılığında G6PD eksikliğinin rolü üzerinedir (21,73,74). G6PD eksikliğine yol açan varyantlar ve bunların moleküler temeli üzerine Ege bölgesinde gerçekleştirilen herhangi bir çalışmaya rastlanılmadı. Türkiye'nin coğrafik bölgelerindeki G6PD eksikliğinin moleküler temeli hakkında ise herhangi bir yayın bulunamadı. Ayrıca yayınlanmış makalelerin sonuçları karşılaştırıldığında bazı tutarsızlıklar saptandı. Örneğin Kılınç Y ve arkadaşları (ark.). Adana’da bir çalışmada %1, bir diğerinde %20.2 oranında G6PD eksikliği saptamışlardır (31,33,75). Öteyandan Yüreğir ve ark. Çukurovada G6PD eksikliğini % 5 olarak rapor etmiştir (76). Akoğlu T ve ark. ise Adana civarında yaşayan Eti Türklerinde G6PD eksikliğinin %11.2 ve %4.9 arasında değiştiğini saptamışlardır (77). Ancak bu farklılıkların Eti Türkleri içindeki alt gruplardan mı kaynaklandığı hususu ile nedenleri belirtilmemiştir. Aksoy K. ve ark. Çukurova bölgesinde üç tane biyokimyasal varyantı (G6PD Samandağ, Adana, Balçalı) tanımladıklarını rapor etmişlerdir (78). Ancak bu varyantların moleküler temeli henüz aydınlatılamadığından hepsinin tek bir mutasyondan mı yoksa ayrı ayrı mutasyonlardan mı köken aldıkları şu an için bi-

linmemektedir. Aksoy ve ark. Trakya bölgesinde G6PD eksikliğini %5 olarak saptarken, 1968 yılında yaptığı bir başka çalışmada %0.6 bulmuştur (79,80). Say B. ve ark. 1965 yılında Türkiye genelini kapsadığını ifade ettikleri çalışmalarında G6PD eksikliği sıklığını Eti Türklerinde %11.4 yenidoğanlarda %0.5 İzmirde %0.94 Kıbrıs Türklerinde %3.5, Karadenizde %0 olarak saptamışlardır (32). Ülkemizin değişik bölgeleri ve aynı bölge için yukarıda verilen rakamların ne kadar gerçek ve geçerli olduğu ise daha geniş kapsamlı örnek gruplarında standardize edilmiş güncel tarama testleriyle tekrarlanarak doğrulanmayı beklemektedir.

1.19 G6PD Eksikliği Ege Bölgesinde Çalışılmaya Değer mi?

İl sağlık Müdürlüklerinin istatistik şubelerinden alınan 1992 yılı istatistiki verilerine göre İzmir -Aydın- Manisa illerinin toplam nüfusu 4,608,698' dir. 1992 yılında bu üç vilayette saptanabilen canlı doğum sayısı 58,447 olup, 0-12 aylık bebek sayısı 72,237, hamile sayısı ise 37,474'dür. Bu üç vilayette kaba doğum hızı yaklaşık binde 16'dır (81). Bu veriler değerlendirildiğinde G6PD eksikliğinin görülme sıklığı %1.5 kabul edilirse, bu üç vilayette 69,130 kişi G6PD eksikliğine sahiptir. Üç vilayette toplam yıllık canlı doğum sayısı yaklaşık 58,447 olduğundan %1-1,5 görülme sıklığı üzerinden hesaplandığında her yıl 584-876 çocuğun G6PD eksikliğine sahip olarak doğacağı ön görülebilir.

Hesaplanan rakamlar dikkate alındığında, yaşamı tehlikeye sokucu önemli sağlık sorunlarına yol açabilmesi, ancak bu sorunların kesin önlenebilir olmasından dolayı ciddi düzeydeki G6PD eksikliğinin Ege bölgesinde yaşayan ailelerde saptanmasının ve moleküler temelini aydınlatılmasının birey ve toplum sağlığı açısından gerekli ve önemli olduğu sonucuna varıldı. Bu düşünceden yola çıkılarak, bu çalışma planlandı.

2. MATERYEL VE METOD

Çalışmanın amacı G6PD eksikliğinde Akdeniz mutasyonunun DNA teknolojisi ile araştırılması olduğundan, araştırmanın ilk aşamasını, Akdeniz mutasyonunun bulunma olasılığı yüksek, ciddi düzeydeki G6PD eksikliği olgularının belirlenmesi oluşturdu.

2.1 Ege Bölgesinde Ciddi Düzeyde G6PD Eksikliğine Sahip

Ailelerin Saptanması ve Olası Akut hemolitik Kriz Önlenim Listesinin Hazırlanması

2.1.1 Sağlık Kurumları ve Doktorlardan Bilgi Sağlanımı, Mektup Yazımı, Örnek kanların Alımı ve Anket Uygulanması

İzmir'deki hastanelere veya özel kliniklere G6PD eksikliğine bağlı akut hemolitik anemi şikayetiyle başvurmuş veya G6PD eksikliği tanısı konmuş kişiler araştırıldı. Bu amaçla ziyaret edilen Prof Dr. Baha Taneli'den (Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü'nün protokol defterleri 1968- 1993 yılları taranarak) 72; Doç Dr. Füsun Atlıhan'dan 34 ve Dr. Demet Can'dan 15 (İzmir Behçet Uz Çocuk Hastanesi Büyük Çocuk Kliniği Şefi ve Acil servis Doktoru) Doç. Dr. Işın Yaprak'dan (Tepecik SSK hastanesi Çocuk sağlığı bölümü) 10; Doç Dr. Gülersu İrken'den (Dokuz Eylül Tıp Fakültesi Çocuk Hematolojisi Bölümü) 10 ve Prof. Dr. Galip Köse'den (özel klinik sahibi-Alsancak-İzmir) 5 olmak üzere toplam 146 olgunun adresleri sağlandı. Belirlenen ailelere çalışmayı açıklayan ve gönüllü olarak hastanemize gelip kan vererek çalışmaya katılıp katılmayacaklarını soran mektup gönderildi (Şekil-2.1). Mektuba olumlu yanıt veren 45 ailenin randevu verilen tarihlerde Dokuz Eylül Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalına gelmesi planlandı ve bu gerçekleştirildi. Her bir aileyle bire-bir karşılıklı konuşarak tarafımızdan hazırlanan anket sorularının yanıtları alındı (Şekil-2.2). Anket sorularını yanıtlayan aile bireylerinden (çocuk - anne - baba - kardeşler) kan örnekleri, Dokuz Eylül Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Alma Merkezinde hemşire kontrolünde alındı. Her bir kişiden venöz kan örnekleri K₂EDTA'lı tüplere (2.5 ml x 3) alındı. Buz üzerinde kapalı kap içerisinde laboratuvara getirilen kan örneklerinin birinden 0.1 mililitre(ml) alınarak spot testi için +4 °C'de saklanıldı. Bunun dışındaki tüm kan örnekleri, DNA izolasyonunda kullanılıncaya kadar derin dondurucuda saklandı.

Tarih: ...1./...11.../1994

Sayın.....

Biz, dünyadaki son bilgilerin ışığında, **Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Eksikliği** veya **Favizm** hastalığına yol açan mutasyonlar konusunda 9 Eylül Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalında araştırma yapmaktayız. Çalışma öncesi İzmirdeki hastanesi arşivinde yapmış olduğumuz çalışmalar neticesinde bu hastalığı taşıdığınızı öğrenmiş bulunmaktayız.

Sizlere bu mektubu göndermekteki amacımız, bu hastalığın önlenmesi ve zararlı etkilerinden kaçınılmasına yönelik çalışmalar için, sizin ve/veya anne-babanızın herhangi bir ücret ödmeden sadece 2-3 ml kan verip veremeyeceğinizi bilmek istiyoruz. Bu konudaki çalışmamıza yardımcı olmayı arzu ederseniz, telefonla veya yazarak bizimle irtibata geçebilir misiniz? Cevabınız evet ise; sizlerden kan alma işini yapabilmemiz için iki seçenek vardır.

Birincisi; Bizimle irtibata geçtikten sonra, telefonla sizleri arayacak ve belirli gün ve saatte hastanemize (9 Eylül Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.Bilim Dalı, I. Bina 2. kat İnciraltı-İZMİR) bizzat kendiniz ve/veya anne-babanızla birlikte gelmeniz için randevu alınacaktır. Ki bu seçenek, çalışmanın doğru yürümesi açısından öncelikle tercih edilen durumdur.

İkincisi; Sizlerin İzmir'deki hastanemize gelmeniz maddî açıdan imkânsız ise, o zaman bizler imkânlarımız dahilinde sizlerle önceden randevulararak hem sizleri ziyaret edeceğiz hemde kan alacağız.

Cevaplarınızı olumlu veya olumsuz telefonla veya adresimize yazarak en geç 26 Kasım 1994 tarihine kadar bildirmeniz bizleri çok memnun edecektir.

Şimdiden gösterdiğiniz ilgi ve desteğe teşekkür eder. Sağlıklı ve mutlu günler geçirmeniz temennisiyle selam ve saygılar sunarım.

Selim UZUNOĞLU

Adres:

İş: Selim UZUNOĞLU veya

Prof. Dr. Orhan TERZİOĞLU

9 Eylül Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı,

I. Bina 2. Kat İnciraltı - İZMİR

Tel: Direkt: (0232)-2777777-4602

Santral: (0232)-2595959 Dahili: 4602 veya 4630

Ev: Selim UZUNOĞLU

Kazım Dirik mah. 196 Sok.

Yavuz Apt. No: 6/4 Bornova-İZMİR 35040

Tel: (0232)-3889377 veya 3880208

Fax: (0232)-3747754

Şekil-2.1: G6PD eksikliği olgusuna sahip ailelere gönderilen mektup örneği

GLUKOZ-6 FOSFAT DEHİDROGENAZ (G6PD) EKSİKLİĞİ ARAŞTIRMASI.

ADI SOYADI: DOĞUM TA:/...../.....
DOĞUM YERİ: KAN GR:..... CİNSİYETİ: ERKEK KIZ
ADRESİ:
.....
TEL: MEDENİ HALİ: BEKAR NİŞAN EVLİ
NERELİSİNİZ: BULUNDUĞUNUZ YERE NE ZAMAN YERLEŞİLDİ?.....
KAÇ KARDEŞİNİZ VAR: KIZ ERKEK AYRI AYRI BELİRTİNİZ
AİLENİZDE AKRABALAR ARASI EVLENME VAR MI? HAYIR EVET
.....
EĞİTİM DÜZEYİ SİZİN İ-Ö-L-Ü-LÜ BABANIZIN İ-Ö-L-Ü-LÜ ANNENİZİN İ-Ö-L-Ü-LÜ
HASTALIK AİLEDE SİZDEN BAŞKA KİMDE veya KİMLERDE GÖRÜLDÜ?
 KARDEŞLER..... ANNE BABA AKRABA
KULLANDIĞINIZ HERHANGİ BİR İLAÇ-YİYECEK SİZDE VEYA AKRABALARINIZDA,
SARILIK, KANSIZLIK, VEYA ÇAY RENGİNDE İDRAR YAPMANIZA YOL AÇTI MI?
 HAYIR EVET İSE İLAÇ(LAR)?
..... YİYECEK(LER)
BU DURUMDA HASTANEYE GİTTİNİZ Mİ? HAYIR EVET İSE
HANGİ HASTANEYE GİTTİNİZ?.....
SİZE HANGİ TESTLER YAPILDI? G6PD TARAMA TESTİ VEYA AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ
 KANDA Hb, Htc. Eritrosit Retikülosit
.....
TEDAVİ OLARAK NE YAPILDI? KAN DEĞİŞİMİ VEYA KAN NAKLİ-
ALMAMANIZ GEREKEN İLAÇ VE YİYECEK LİSTESİ VERİLDİ Mİ? HAYIR EVET
AİLE BİREYLERİNDEN BİRİ DOĞDUĞUNDA İLK İKİ HAFTA İÇİNDE SARILIK GEÇİRDİ Mİ?
 HAYIR EVET
CEVABINIZ EVET İSE HANGİ HASTANEYE GİTTİNİZ VE HANGİ TESTLER YAPILDI?
 TOTAL BİLİRUBİN G6PD TARAMA TESTİ G6PD AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ
AİLENİZDE ŞEKER HASTASI (DİYABET) OLAN VAR MI? YOK VAR; VARSA KİMLER?
.....
AİLENİZDE RENK KÖRLÜĞÜ VEYA KATARAKT ŞİKAYETİ OLAN VAR MI? YOK
 VAR; VARSA KİMLER?
AŞAĞIDAKİ GENETİK HASTALIKLAR HAKKINDA BİLGİNİZ VARMİ? HİÇBİRŞEY BİL-
MİYORUM EVET G6PD EKSİKLİĞİ FAVİSM AKDENİZ ANEMİSİ(TALASSEMİ)
AİLENİZDE VEYA AKRABALARINIZDA BU HASTALIKLARDAN HERHANGİ BİRİSİ VAR MI?
ANKETİ YAPAN KİŞİ:..... CEVAPLAYAN KİŞİ:.....

Şekil-2.2: Ailelere uygulanan anket örneği.

2.1.2 Çalışmaya Alınan Ailelerde Ciddi Düzeyde G6PD Eksikliğinin Floresans Spot Test ile Saptanması

İzmir'deki belirtilen hastanelere başvuran ve klinik tablo açısından G6PD eksikliği tanısı konmuş kişilerin ve ailedeki diğer bireylerin ciddi düzeyde G6PD eksikliğine (severe-full-deficient) sahip olup olmadıklarını saptamada, floresans spot testi tercih edilip kullanıldı (55).

KİMYASALLAR	Stok Çözelti	Gerekli Miktar
Glukoz-6-Fosfat (Sodyum tuzu)	10mmol/L	10ml
β -NADP (sodyum tuzu)	7.5 mmol/L	5ml
Saponin (%1)	10gr/L	10ml
Tris-HCl (pH:7.8)	750mmol/L	15ml
Oksitlenmiş Glutatiyon (Disodyum.tuzu)	8mmol/L	5ml
Deiyonize Su	-	5ml

Tablo-2.1: Floresans spot testi çözeltisinde kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları (55).

Yukarıdaki kimyasallar moleküler grade olup, sigma firmasından satın alındı. Tabloda belirtilen konsantrasyonlarda ve miktarlarda herbir maddeden alınarak test çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan spot test çözeltisi, 1.5 ml'lik ependorf tüplerine birer mililitre dağıtılarak -20°C'de saklandı. Stoklanan çözelti, bir ay içinde kullanıldı.

Uluslararası Hematoloji Standardizasyon Komitesinin belirlediği kompozisyona ve miktarlara uyularak, testin kendi koşullarımızdaki internal standardizasyonu, sigmanın standartları (normal G6PD sağlam hemolizat - aktivite düzeyi: 9-12 Ü gr/Hb ve ciddi düzeyde G6PD eksikliği olan kan hemolizati - aktivite düzeyi: 0.0-0.4 Ü gr/Hb) kullanılarak gerçekleştirildi. Laboratuvarda hazırlanan spot test çözeltisi, sigma standartları ve G6PD eksikliği saptanan kan örnekleri, yurtdışına (Hematoloji Bölümü-Hammersmith Hospital, Londra) gönderilerek testin eksternal standardizasyonu ve kalibrasyonu da sağlandı. İnternal ve eksternal olarak standardize edilen test protokolü çalışmada kullanıldı.

Floresans Spot Testini Uygulama Protokolü

-Derin dondurucuda saklanan stok test çözeltilisinden gereği kadar çıkarılarak soğuk odada çözünmesi sağlandı.

-Otomatik pipet ile daha önce işaretlenmiş ependorf tüplerinin herbirine 100'er µl çözünmüş test çözeltilisi dağıtıldı.

-K₂EDTA'lı tüplere alınan ve spot test için ayrılmış +4°C'de saklanan kan örnekleri ve sigma standartları homojenize edildikten sonra işaretli tüplere 5'er µl dağıtıldı. Ependorf tübüne konan kan örneği ve standart hemolizattaki enzimin açığa çıkması ve homojenizasyonu için tüpler parmakla fiske vurularak karıştırıldı.

-Tüpler oda sıcaklığında 10 dakika(dk) bekletildi.

-Bu reaksiyon tüplerinin her birinden 10 µl reaksiyon çözeltilisi alınarak uygun aralıklarla whatman (1 numara) kağıdı üzerine damlatıldı.

-Whatman kağıtları, doğrudan güneş ışını almayan kapalı alanda oda sıcaklığında 10 dk kurumaya bırakıldı.

-Whatman kağıdı üzerindeki kurumuş hemolizat+test çözeltilisi karışımı spotlar, ultraviyole lamba (Multiband UV 254/366 nm San Gabriel California marka-Model UVGL- 58 veya Cedex- Fransa yapımı 6x15W-312 nm tüp içeren TFX-20M modeli Vilber Lourmat marka UV ışık gösterge cihazı) altında karanlıkta doğrudan incelemeye alındı. Her deney setinde kullanılan sigma standartlarında(kontrol sağlam ve kontrol hasta) oluşan renklerle örnek kanların spotları karanlık odada ultraviyole ışık altında karşılaştırıldı (55).

Floresans spot testin değerlendirilmesi

Whatman kağıdı üzerine damlatılmış ve kurutulmuş reaksiyon örneği spotları, ilk 30 dakika içinde değerlendirildi. Karanlıkta ultraviyole ışık altında doğrudan çıplak gözle incelendiğinde, G6PD aktivitesi normal olan veya ciddi düzeyde G6PD eksikliği içermeyen kan örnekleri, reaksiyona konan kan örneğinin hemoglobin miktarına bağlı olarak açık -koyu yeşilimsi renk(floresans parlaklık) verir. Bu durumda testin sonucu, ciddi düzeydeki G6PD eksikliği açısından negatif olarak değerlendirildi. Kan örneklerine ait reaksiyon spotları, ultraviyole ışık altında floresans parlaklık vermiyorsa

diğer bir ifadeyle, spotlar açık veya koyu kahverengimsi renkte görünüyorsa, bu renk, ciddi düzeydeki enzim eksikliğinin (severe-full-deficient) göstergesi kabul edildi. Dolayısıyla test sonucu, ciddi düzeydeki G6PD eksikliği açısından pozitif olarak değerlendirildi. Ciddi düzeyde G6PD eksikliği saptanan kan örneklerinin üçlü seyreltilmeleri, ikişer defa çalışılarak hemoglobün miktarına bağımlı olarak oluşabilecek yanlış pozitifliklerden kaçınıldı.

Akut Hemolitik Kriz Önlenim tablosunun Hazırlanması

Anket sırasında ailelere hemolitik kriz sonrası yasak ilaç ve yiyecek listesinin verilip verilmediğı soruldu. Liste verilen ailelerden listelerin birer kopyesi alındı. Bu listeler WHO-G6PD grubunca yayınlanan ve daha sonra güncelleştirilen listelerle karşılaştırıldı (2,13). Farklı kurumlar tarafından verilen listeler arasında tutarsızlıklar olduğu saptandı. Çalışılan olgulara verilmek üzere ilgili alanda uzman doktorlarla işbirliğine gidilerek güncel akut hemolitik kriz önlenim tablosunun hazırlanması planlandı. WHO-G6PD grubunun yayınladığı ve Beutler tarafından güncelleştirilen liste esas alındı (2,13). İzmir Eczacılar Odasından sağlanan ilaç rehberi kullanılarak listeye ilaçların Türkiye'deki ticari isimleri eklendi (86). Enzim eksikliği saptanan ailelere çalışma sonunda sonuçlarla birlikte klinisyenlere danışılarak hazırlanan akut hemolitik kriz önlenim tablosu da gönderildi (Tablo-3.2 ve Ek-9).

2.2 Ciddi Düzeyde G6PD Eksikliğine Saptanan Olgularda Akdeniz Mutasyonunun DNA Teknolojisi İle Araştırılması

2.2.1 Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda, sigma moleküler grade kalitesinde kimyasallar ve tip-1 kalitesinde deiyonize su (18 mega-ohm/cm) kullanıldı.

Stok çözeltiler

NaCl (5 mol/L):

146.1 gram (gr) NaCl tartılıp deiyonize su ile 500 ml'ye tamamlanarak çözününceye kadar karıştırıldı.

Tris-HCl (1 mol/L , pH: 8.5)

60.5 gr Trizma base tartılarak 350 ml deiyonize suda çözüldü. pH 8.5 değerine

düşünceye kadar konsantre HCl ilave edilerek, su ile 500 ml'ye tamamlandı.

Tris-HCl (1 mol/L , pH: 7.4) :

Yukarıdakine benzer şekilde hazırlanarak sadece pH değeri 7.4 düşürüldü.

NaOH (5 mol/L):

200 gr NaOH tartılarak 800 ml su içinde çözüldü. Deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) - (0.5 mol/L pH:8.0):

93 gram disodyum tuzu (dihidrat) EDTA tartıldı. Üzerine 400 ml su ilave edilerek çözününceye kadar karıştırıldı. pH'sı 8.0 oluncaya kadar 0.5 mol/L NaOH ilave edildi. Tamamen çözülmüş çözelti deiyonize su ile 500 ml 'ye tamamlandı.

PBS: Phosphate Buffered saline-Fosfat Tamponlanmış Tuz çözeltisi-pH:7.3

NaCl	8gr
KCl	0.2 gr
Na ₂ HPO ₄	1.44 gr
KH ₂ PO ₄	0.24 gr
Deiyonize su	800 ml

1N HCl ilave ederek pH değeri 7.3'e ayarlandı ve deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra aliquotlara bölünerek otoklavda steril edilip, oda sıcaklığında saklandı.

%10 -Nonidet P-40 (NP40) :

10 ml NP40'ın üzerine 90 ml deiyonize su ilave edildi. İyice karıştırılarak hazırlandı.

%10'lik Sodyum Dodecyl Sülfat (SDS, Lauryl Sülfat):

50 gr SDS tartılarak üzerine 350 ml deiyonize su ilave edildi. Tamamen çözününceye kadar ısıtıcı (65°C) karıştırıcıda çözüldü. Tamamen çözüldükten sonra su ile 500 ml'ye tamamlandı.

Kullanıma hazır çözeltiler:

PBS + %0.1'lik NP 40 :

%10'luk NP40'tan 5 ml, PBS tamponun 495 ml'sine ilave edilerek hazırlandı.

10 defa konsantre (10x) lizis Tampon :

5 mol/L NaCl'den 60 ml

0.5 mol/L EDTA'dan 20 ml

1 mol/L Tris pH 7.4 'den 10 ml

Deiyonize sudan 10 ml

alınarak karıştırıldı ve 100 ml çözeltide son konsantrasyonda

3 mol/L NaCl

100 mmol/L EDTA

100 mmol/L Tris, bulunması sağlandı.

Lizis Çözeltisi:

21 gr. üre (7 mol/L) tartılıp üzerine (10x) lizis tampondan 5 ml ilave edildi ve deiyonize su ile 50 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. (Her kullanımda bu çözelti taze hazırlandı.)

Kloroform/İzoamil Alkol (24 : 1)

İzoamil alkolden 20 ml alınarak üzerine 480 ml kloroform ilave edildi.

Etanol (%70):

%99.9'luk etanolün (Tekel marka) 70 ml'sine 30 ml deiyonize su ilave edilerek hazırlandı.

TE Tamponu :(10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA):

pH'i 7.4 olan 1 mol/L Tris'ten 5 ml alınıp, 494 ml deiyonize suya ilave edildi. Ayrıca 0.5 mol/L Sodyum EDTA'dan 1 ml alınarak aynı çözeltiliye eklendi.

Proteinaz K (20mg/ml)

Liyofilize Proteinaz K'dan 20 miligram(mg) tartılarak 1 ml deiyonize suda çözüldü. Birer ml ependorf tüplere dağıtılarak derin dondurucuda saklandı.

TE tamponu ile dengelenmiş fenol çözeltisi:

Hazırlanışı: Deiyonize su ile doyurulmuş fenolden 500 ml. alındı.

-0.5 mol/L Tris pH 8.5 'den 500 ml hazırlandı. Bunun 150 ml'si fenole ilave edildi. 2 dakika döndürerek karıştırıldı.

-Organik faz ile sıvı faz ayrılıncaya kadar beklenildi. Sonra üstteki sıvı tabaka uzaklaştırıldı.

-Tekrar 0.5 mol/L Tris'ten 125 ml fenole ilave edildi. Benzer şekilde karıştırılıp beklenildi ve üstteki sıvı tabaka uzaklaştırıldı.

-Bu işlemler bir kez daha tekrarlandı.

-Geride kalan 0.5 mol/L Tris'ten 100 ml'sinin üzerine 400 ml su ilave edilerek 500 ml 0.1 mol/L Tris elde edildi.

-Bunun 150 ml'si, fenole ilave edilip karıştırıldı ve üstteki sıvı daha sonra uzaklaştırıldı.

-Bu işlemler iki kez tekrarlandı.

-Geride kalan 0.1 mol/L Tris'in 50 ml'sine 449 ml su ilave edildi. Üzerine 0.5 mol/L EDTA çözeltisinden 1 ml ilave ederek, toplam 500 ml TE tamponu hazırlandı.

-Yukarıda yapıldığı şekilde TE tamponunu kullanarak fenol, 3 defa daha yıkandı ve üstteki sıvı her defasında uzaklaştırıldı. Her seferinde üstteki sıvının pH'sı ölçülerek, fenolün asiditesinin yok edilme süreci izlenildi.

-Bu işlemlerle asiditesi yok edilen fenolün pH'sının 7.6 değerinden yüksek olması sağlandı. Başlangıcındaki ilk miktarından azalan ve TE tamponu ile dengelenmiş fenol, DNA ekstraksiyonunda kullanıldı.

DNA İzolasyonunda Uygulanan Protokol

Maniatis, T tarafından tanımlanan fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemine dayalı protokole göre DNA izolasyonu yapıldı (66,67,84).

-K2EDTA'lı tüplere alınıp -20°C'de saklanan donmuş kan örneklerinden biri (2.5mlx1) oda sıcaklığında çözüldü.

-Çözünen kan örneği, silikonlanmış cam tübe aktarılarak, 900 devir/dk hızda 15 dk santrifüj edildi. Üstteki dökelti kısmı, tüpten çökeltiyi kaldırmadan uzaklaştırıldı.

-Çökelti üzerine 1 ml PBS+%0.1 NP40 çözeltisi ilave edildi. Çökeltinin homojenizasyonu, geniş ağızlı steril plastik pipet ile sıvı yukarı aşağı çekilerek gerçekleştirildi. Elde edilen süspansiyon üzerine toplam hacim 2,5 ml olacak şekilde PBS+%0.1 NP40 çözeltisinden ilave edildi.

-900 devir/dk hızda 15 dk tekrar santrifüj edilerek üstteki kısım uzaklaştırıldı. Çökelti kırmızı renginin çoğunu kaybedinceye kadar bu işlemler bir veya iki kere daha tekrar edildi.

-Hücre peletinin lizis edilmesi için lizis çözeltisinden önce 100 µl pelet üzerine ilave edildi. Disposable steril plastik pipet kullanılarak pelet, lizis çözeltisi içinde çözüldü. Her seferinde 500 µl lizis çözeltisinden ilave edilerek, kolaylıkla pipetaj yapılabilir hale gelinceye kadar pelet, homojenize edildi.

-Bu örnek üzerine 150 µl %10'luk SDS ve 20 µl Proteinaz K(20mg/ml) çözeltilerinden ilave edildi. Steril plastik pipet ile nazikçe karıştırıldıktan sonra 37 °C su banyosunda 8 saat bekletildi.

-SDS ve Proteinaz K ile inkübe edilmiş örneğin üzerine kloroform/izoamilalkolden ve fenolden ayrı ayrı olmak üzere eşit hacimde ilave edildi. Çözelti, 5 dk oda sıcaklığında nazikçe karıştırıldıktan sonra 2500 devir/dk hızda 15 dk santrifüj edildi.

-Üstteki sıvı faz, yeni silikonlanmış cam tübe aktarılırken, aradaki beyaz protein-lipid tabakası ile organik fazın tüpde kalması sağlandı.

-Organik faz ile sıvı faz arasındaki bölme açık ve şeffaf hale gelinceye kadar son iki basamaktaki işlemler tekrarlandı.

-Çözelti üzerine kloroform/izoamil alkolden 2 ml ilave edilerek oda sıcaklığında 5 dk nazikçe karıştırıldı. Aynı şekilde santrifüj edilip üstteki sıvı faz yeni bir tüpe aktarıldı.

-Yeni tüpe transfer edilen sıvı fazın üzerine -20°C' de soğutulmuş mutlak alkolden (%99.9'luk Tekel üretimi) 4 ml ilave edildi. Çözelti, DNA opak ipliksi bir yapı şeklinde çıplak gözle görülünceye kadar hafifce çalkalandı. Ortaya çıkan iplik şeklindeki DNA yığını, bekletilmeden 1 ml %70'lik etanol içeren mikrosantrifüj tüpüne mikropipet ucu ile transfer edildi.

-DNA örneği, mikrosantrifüjde 14000 devir/dk hızda 5 dk santrifüj edildi. DNA

çökeltisi üzerindeki % 70'lik etanol uzaklaştırıldı. DNA içeren ependorf tüpü, bench üzerinde ters çevrilerek, kalan alkol tüpden uzaklaştırılıncaya kadar oda sıcaklığında bekletildi.

-Örnekde 1 µg/µl DNA olacak şekilde, pelet üzerine TE tamponu (yaklaşık 40 µl) kondu. TE tamponu ilave edilmiş DNA peletinin, 37°C'de süspansiyon olması sağlandı.

İzole edilen DNA'nın Konsantrasyonunun ve Kalitesinin Saptanması

Örneklerin DNA konsantrasyonu tayini için önce izole edilen DNA örneğinden 5 µl alındı. ve 245 µl deiyonize su ilave edilerek seyreltildi. İyi karıştırılarak homojenize edilen DNA örneğinin optik dansitesi, spektrofotometrede 260 nanometrede (nm) suya karşı okundu. 50 µg/ml çift iplikli DNA içeren çözeltinin spektrofotometrede 260 nm'de, 1.0 optik dansite(OD) değerinde bir okuma verdiği kabul edilmektedir (84). Bundan dolayı spektrofotometrede okunan OD değeri, seyreltme faktörü de hesaba katılarak 2500 ile çarpıldı. Sonuçta µg/ml olarak örnek DNA çözeltisinin konsantrasyonu elde edildi.

Örnekdeki DNA miktarı (µg/ml) = {OD260} X50 (seyreltme faktörü) X50 µg/ml (1 OD.'ye karşılık gelen çift iplikli standart DNA miktarı)

Seyreltilmiş DNA örneklerinin spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında optik dansiteleri (OD) okunup; OD260 / OD280 oranları elde edildi. Bu oran DNA çözeltisinin saflığının göstergesi olarak değerlendirildi (84).

Elde edilen DNA'nın bütünlüğü, 1XTBE tamponu ile hazırlanan %0.5'lik mini agaroz jel elektroforezi sisteminde örneklerin yürütülmesi ile test edildi.

Konsantrasyonu ve saflık derecesi ölçülen, ayrıca agaroz elektroforeziyle bütünlüğü kontrol edilen DNA örnekleri, kullanıma kadar -20°C'de saklandı.

2.2.2 Akdeniz Mutasyonunun Yer Aldığı Exon 6-7'nin PCR ile Çoğaltımı

Çoğaltımda Kullanılacak Primerin Seçimi:

Akdeniz mutasyonu, G6PD geninin exon 6-7 bölgelerini çapraz geçen 583 baz çiftlik DNA parçası içinde yer alır. Bu DNA parçasının çoğaltımında kullanılan

primerlerin saptanması için kaynak taraması yapıldı ve bulunan primerler listelenerek karşılaştırıldı (Tablo-1.4). Karşılaştırma sonunda exon 6-7 çoğaltılmasında kullanılan birden fazla primerin olduğu ve nükleotid sayısı ve dizilişi bakımından birbirlerinden farklılaştığı gözlemlendi. Bu noktadan hangi primerin çalışmada kullanılmasının daha doğru olacağına karar verebilmek için yurtdışındaki yayın sahiplerine ayrı ayrı mektup yazılarak bilgi istendi (Ek-4,5,6). Alınan yanıtların değerlendirilmesi sonucunda Akdeniz mutasyonunu ilk defa moleküler düzeyde tanımlayan T. Vulliamy ve L. Luzzatto grubunun(Hematoloji Bölümü. Hammersmith Hospital, Londra) en son güncelleştirdikleri ve halen kullandıkları 91 ve 92 koduyla tanımlanan oligonükleotid primerleri tercih edilip kullanıldı (67).

91: 5' CCCC GAAGAGGAATTCAAGGGGGT 3'

92: 5' GAAGAGTAGCCCTCGAGGGTGACT 3'

Yukarıda dizisi verilen primerler, -Oswell DNA Service, Department of Chemistry, Kings Buildings, West Mains Road, Edinburgh EH9 3JJ Scotland-adresinden Hematoloji bölümü (Hammersmith Hospital- Londra) aracılığıyla sağlandı.

Kullanılan Çözeltiler ve Enzimler:

10X PCR "EDTA" Tamponunun Hazırlanışı

Çözelti	Alınan Miktar	Karışımdaki Son Konstrasyon
2 mol/L Tris-HCl pH 8.8,	3.35 ml.	670 mmol/L
1 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄	1,66 ml.	166 mmol/L
2 mol/L MgCl ₂	0.125 ml.	25 mmol/L
0.5 mol/L Na ₂ EDTA	13.4 µl.	670 mmol/L
20 mg/ml BSA	80 µl.	160 µg/ml
14.3 mol/L β-mercaptoethanol	70 µl.	100 mmol/L

Deiyonize su, toplam karışım 10 ml oluncaya kadar ilave edildi. Kullanılan tüm kimyasallar Sigma moleküler grade kalitesindedir. Hazırlanan bu tampon 10x olup PCR reaksiyonunda %10 DMSO ile birlikte kullanıldı.

Universal 10x RE Tampon Çözeltisi:

300 mmol/L Tris-asetat pH 7.5

660 mmol/L K-asetat

100 mmol/L Mg-asetat

1 mg/ml BSA

10 mmol/L DTT

30 mmol/L spermidin

Hazırlanan universal 10x konsantre RE tamponu mikrosantrüfuj tüplerine aliquot yapılarak kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

DNA Polimeraz enzimi (Taq Polimeraz: *Thermus aquaticus* isimli sıcak sularda yaşayan bakteriden izole edilen ısıya dayanıklı enzim) Promega'dan, nükleotidler (dNTP) Boehringer firmasından satın alındı.

PCR reaksiyonu için Perkin Elmer model thermal cycler makinası kullanıldı.

DNA dışında PCR için gerekli tüm bileşenler önceden hazırlandı ve ependorf tüplerine aliquot yapılarak derin dondurucuda saklandı.

PCR Tüpünün İçeriği ve PCR Protokolü

PCR reaksiyonu, T. Vulliamy ve L. Luzzatto grubunun (Hematoloji Bölümü. Hammersmith Hospital, Londra) kullanmakta olduğu protokole göre gerçekleştirildi (38,39,87).

Madde İsmi	Konsantrasyon	Konulan miktar
PCR-EDTA Tamponu	-	2.5 µl
dNTP	100 pmol	5.0 µl
primer	10 pmol	5.0 µl
Taq polimeraz	1 Ü	0.2 µl
Deiyonize su	-	11.3 µl
Örnek DNA	1 µg/ul	1.0 µl
Toplam miktar	-	25.0 µl

DNA thermal cycler makinasında exon 6-7 bölgesini çoğaltmada kullanılan protokol:

95 °C de ----> 5 dk.

56 °C de ----> 1 dk.

72 °C de ----> 1 dk.

95 °C de ----> 1 dk.

X30 döngü

72 °C de ----> 5 dk.

PCR Ürününün Elektrofrezinde Kullanılan Gereçler ve Çözeltiler

5X TBE (Tris Buffered EDTA) Stok Tampon Hazırlanışı:

54 gr Tris base ve 27.5 gr borik asid tartılarak 800 ml deiyonize suda çözüldü. Üzerine 20 ml 0.5M EDTA(pH:8.0) ilave edildikten sonra 1000 ml'ye tamamlandı. Elektrofrezde stok TBE tamponununun 1XTBE konsantrasyonu kullanıldı.

-Elektrofrez için, mini horizontal jel(8x12cm) yöntemi kullanıldı. Hybaid marka mini jel yatakları kullanılarak %2.5'lik agarozjelleri hazırlandı ve kullanıldı. Güç kaynağı olarak ATTA-Crosspower 500 kullanıldı.

-Yükleme tamponu (loading buffer) olarak %50 sükröz+ %0.1 bromofenol mavisi karışımı kullanıldı.

-Hematoloji bölümü labaratuvarında (Hammersmith hospital-Londra) pEMBL 8'in TaqI ve PvuII kesimi ile hazırlanan DNA marker, örnek değişimi yoluyla hematoloji bölümünden sağlandı ve elektrofrezde kullanıldı.

-MboII(restriction endonükleaz-kesici enzim) (Biolab-148S (PBS) -II 5000Ü/ml) firmasından satın alınıp kullanıldı.

-Elektrofrez sonrası DNA bantlarının saptanabilmesi için jel, etidium bromid çözeltisinde bekletildi. Son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olan etidium bromid çözeltisi, 1XTBE tamponu kullanılarak 10mg/ml stok çözeltiden hazırlandı. Yürütülen jeller bu çözelti içinde 30 dk bekletildikten sonra UV lamba (Cedex- Fransa yapımı 6x15W-312 nm tüp içeren TFX-20M modeli Vilber Lourmat marka UV ışık gösterge cihazı) altında incelendi (84).

PCR Ürününün Kontrolü

PCR sonrası ürün oluşup oluşmadığını test etmek üzere, PCR tübünden alınan 8 µl örnek, 4 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak yukarıda tanımlanan elektroforez sisteminde yürütüldü. Jel etidium bromid çözeltisinde 30 dk bekletildikten sonra ultraviyole ışık altında PCR ürünü DNA bantları, incelendi ve fotoğraflandı. (Bulgular Şekil-3.2)

Elektroforez sonuçlarının fotoğraflanması

-Jellerin fotoğrafının çekiminde, polaroid 667 film kullanıldı. Kırmızı turuncu (590 nm) eksitasyon dikkate alınarak R21 Hoya (USA) UV filtre serisiyle jeller fotoğraflandı. Power PC bilgisayara tarayıcı ile aktarılan fotoğraflar, adobe photoshop (3.0) yazılımında işlendikten sonra metine yerleştirildi. (Bulgular şekil-3.2 ve 3.3)

2.2.3 MboII ile Kesim ve Akdeniz Mutasyonunun Saptanması

MboII kesim ürünlerinin elektroforezinde “PCR Ürününün Elektroforezinde Kullanılan Gereçler ve Çözeltiler” alt başlığında tanımlanan çözeltiler ve gereçler aynen kullanıldı.

PCR ürünü saptanmış PCR reaksiyon tüplerinin herbirinden 8 µl alınıp, aşağıda belirtilen çözelti ve MboII enzimiyle karıştırıldı. 37°C’de 18 saat süreyle kesim işlemi gerçekleştirildi.

MboII ile kesim reaksiyon tüpünün içeriği

PCR ürünü	8 µl
10x universal RE tamponu	2 µl
MboII	1 µl
Deiyonize su	9 µl

-MboII ile kesilen herbir PCR ürünününün 10 seyreltisi hazırlandı. Her dilüsyon yükleme tamponu ile 2:1 oranında karıştırıldıktan sonra jeldeki yuvalara dağıtıldı. 1XTBE tamponu içeren mini elektroforez sisteminde, 10volt/cm elektrik uygulanarak

MboII kesim ürünleri, hematoloji bölümünden sağlanan (Hammersmith hospital) marker DNA ile birlikte yürütüldü. Gerekli işlemlerden geçirilen jel üzerindeki DNA bantları, ultraviyole ışık altında incelendi.

-Yürütülen jelde, olgulardan hazırlanan DNA'ya ait kesim ürünleri, kontrol Akdeniz mutasyonu taşıyan ve taşımayan DNA örneklerinki ile karşılaştırıldı. Akdeniz mutasyonu varlığında, exon 6-7 gen bölgesinde yeni bir MboII kesim bölgesi oluşur. Akdeniz mutasyonu içermeyen (nonmed) PCR ürünü, MboII ile kesim sonrası, elektroforezde 379, 120, 60 ve 17 baz çifti büyüklüğünde 4 bant verirken, Akdeniz mutasyonu içeren (med) PCR ürünü, 4 bant yerine, 5 bant (276, 103, 120, 60 ve 17) verir. Dolayısıyla Akdeniz mutasyonu içermeyen DNA örneklerinde MboII ile kesim sonrası gözlenen 379 baz çifti büyüklüğündeki bant, nonmed mutasyonun kanıtıdır. Akdeniz mutasyonu içeren örneklerde MboII kesimi ile açığa çıkan farklı büyüklüklerdeki iki bant (276 ve 103 baz çifti) Akdeniz mutasyonunun kanıtıdır. MboII ile kesim sonrasında jelde kesim ürünü olarak 379 baz çifti büyüklüğündeki tek bantın varlığı, Akdeniz tipi olmayan (nonmed) mutasyonun kanıtı olarak değerlendirildi. Jeller daha önce tanımlandığı şekilde fotoğraflandı ve metine yerleştirildi.

Akdeniz mutasyonu saptanan ve saptanmayan (nonmed) DNA örneklerinin eksternal kontrolleri, hematoloji bölümünde (Hammersmith hospital-Londra) gerçekleştirildi.

3. BULGULAR

3.1 Ege Bölgesinde Ciddi Düzeyde G6PD Eksikliği Saptanan Olgular

Farklı üniversite, hastahane ve özel kliniklere yapılan ziyaretlerden sağlanan adreslere mektup yazımı sonucunda 45 aileden kan alındı. Floresans spot testi sonunda ciddi düzeyde enzim eksikliği saptanan olgularda ikinci aşamada, Akdeniz tipi mutasyon tarama çalışması yapıldı. Ciddi düzeyde enzim eksikliği saptanan ve yakın akraba olmayan ailelerin elde edildikleri kaynaklara bağlı olarak dağılımı tablo-3.1'de verildi.

KURUM ADI	KİŞİ	AİLE SAYISI
Ege Tıp Fak. Çocuk Sağlığı ve Hast.	Prof. Dr. Baha TANELİ	13
Behçet Uz Hast. B.Çocuk Sağlığı	Doç Dr. Füsun ATLIHAN	(10)
Acil Servis	Dr. Demet Can	(3) 13
Tepecik SSK Hastanesi	Doç Dr. Işın YAPRAK	5
Dokuz Eylül Tıp Fak. Çocuk Sağlığı ve Hast.	Doç.Dr. Gülersu İRKEN	3
Özel Klinik	Prof Dr. Galip Köse	2
Hasta Anketleri	-	1
Toplam		37

Tablo-3.1: Ciddi düzeyde G6PD eksikliği saptanan yakın akraba olmayan ailelerin adreslerinin sağlandığı kaynağa göre dağılımı.

3.1.1 Ailelere Uygulanan Anketin Bulguları

45 aileye karşılıklı görüşme şeklinde uygulanan anket sonucunda yakın akrabalığı olmayan 34 olgunun bakla yemeye bağlı akut hemolitik kriz geçirdiği görüldü. Akut hemolitik krize yakalanmış kişilerde 18-48 saat içinde ortaya çıkan sararma-bitkinlik ve çay renginde idrar yapma, tipik klinik bulguları. Akut hemolitik krize yakalanmış 32

olgu kan verilerek tedavi edildiklerini bildirdi. Anket sırasında 14 olgu, doğum sonrasında ilk iki hafta içinde ciddi düzeyde sarılık geçirdiklerini rapor etti.

Çalışmaya alınan ailelerden 4 nolu ailede 2 çocuk, 20 nolu ailede bir çocuk ve 32 nolu ailenin köyünde bir çocuk olmak üzere toplam 4 kişinin bakla yemeye bağlı akut hemolitik kriz sonucunda öldükleri saptandı. Ayrıca 5 aile, akrabaları arasında bakla yemeye bağlı akut hemolitik kriz geçirmiş kişiler olduğunu rapor ettiler. Mektup gönderilen bu kişilerden sadece biri (4K) geldi. Kendisine anket uygulanıp kan alındı.

Akut hemolitik kriz geçirmiş 8 olguya, tedavi sonrası kullanmamaları gereken güncel yasak ilaç ve yiyecek listesi verilmemişti. Bu olgulara sadece bakla yememeleri ve sıtma ilaçlarıyla aspirini kullanmamaları söylenmişti. Bunun dışında değişik hastanelerdeki doktorlar tarafından olgulara verilen ilaç listeleri incelendiğinde, listelerin standart olmadığı ve birbirlerinden farklılıklar gösterdiği saptandı. Ayrıca listede ilaçların Türkiye’de satılan ticari isimleri olmadığı gibi güncel de değildi. Elle yazılan bazı ilaç listelerini okumak çok güçtü. Hastalar bu listeleri günlük hayatlarında kullanamadıklarından şikayetçiydiler.

22 olgu, G6PD eksikliği veya favism hakkında doktor tarafından yetersiz düzeyde bilgilendirildiklerini, bakla zehirlenmesi dışında hastalık hakkında hiç birşey bilmediklerini rapor ettiler. Çalışılan ailelere anket sırasında hastalık hakkında yapılan açıklamalar olumlu tepki aldı ve yakın akrabaları ile buldukları yerleşim birimlerinin G6PD eksikliği taramasından geçirilmesini istediler.

Yukarıda verilen bulgular dikkate alınarak, akut hemolitik krize yol açan ilaç ve yiyecek listesi güncelleştirildi. İlaçların Türkiye’deki ticari isimleri eklenerek olası akut hemolitik krizleri önlenim tablosu hazırlandı. Çalışma sonrası bu tablo olgulara gönderildi ve gerekli açıklamalarda bulunuldu (Tablo-3.2 ve Ek.9).

3.1.2 Floresans Spot Testi Sonuçları

Floresans spot testin ciddi düzeyde enzim eksikliğini ortaya çıkardığı konusunda yapılan internal standardizasyon çalışmalarında, sigma firmasından sağlanan kontroller kullanıldı. Tüm çalışmalarda testin özgüllüğü ve duyarlılığının %100 olduğu gözlemlendi. Ayrıca eksternal kontrol olarak hematoloji bölümünde (Hammersmith hospital, Londra) yapılan çalışmalarda, testin Akdeniz mutasyonunun yer aldığı ve aktivite düzeyi nor-

G6PD EKSİKLİĞİNE SAHİP KİŞİLER VE İLGİLİ SAĞLIK PERSONELİ İÇİN G6PD'YE BAĞLI AKUT HEMOLİTİK ANEMİ ÖNLENİM TABLOSU		
•Etken madde —> Ticari isimleri		
İLAÇ GRUBU	HAFİF DÜZEYDE HEMOLİZE YOL AÇABİLENLER [Tedavideki dozların üstünde kullanıldığında] (Tedavideki dozları, hekim tavsiyesiyle ve kontrolünde kullanılabilir)	AĞIR SEYREDEN AKUT HEMOLİTİK ANEMİYE YOL AÇABİLENLER. (Bu gruptaki ilaçlar ve yiyecekler kesinlikle kullanılmamalıdır.)
ANALJEZİK VE ANTİPİRETIKLER	<ul style="list-style-type: none"> • Acetyl salicylic acid —> Aspirin; Aİgo; Aİgo bebe; Aİko-Seİtzer Anacın; Analgol; APC; Asabrin; Asegan; Asimpirine; Aspimirin; Aspirin fort; Aspirin plus C; Alca-C; Asporan; Ataspin; Babyprin; Cafespin; Ceparla; Coraspın; Dİspril; Dolvİram; Fulpon; İsaşpın; Nİtraz; Opon; Pedİanoks; Penaspın; Sasİptin; Sodergİne VitC; Tuba • Antipyrin —> Antipyrine salicylate • Aminopyrine —> Pyramidon; Amlodopyrine • Acetophenetidin —> phenacetin 	<ul style="list-style-type: none"> • Acetanilid
SITMA İLAÇLARI	<ul style="list-style-type: none"> • Chloroquine —> Klorokin; Rezokin • Pyrimethamine —> primetamin; Daraprim • Quinine —> Kinin 	<ul style="list-style-type: none"> • Primaquine —> Primakin • Pamaquine —> Kinosid • Quinocida
SULFONAMİDLER ve SÜLFONLAR	<ul style="list-style-type: none"> • Sülfadiazine —> Sülfadiazin; Sülfatrim • Sülfamerazine —> sulfamerazin • Sülfamethoxyypyridazine —> Depo-Sulfan; Metamit; Sülfakayn; Novasul; Kyrax • Sülfisozazole —> Gantrisin; Azo-Gantrisin; Gansol • Sülfaguanidina 	<ul style="list-style-type: none"> • Sülfacetamide —> Albucid; Blephamid; Liqifilm; Optamid • Sülfamethoxazole —> Gantanol; Bactrim; Bactrim fort; Bektan; Bektanfort; Bektrelid DS; Bİbakrim fort; Bİotrin; Kemoprİm; Kemoprİm fort; Metoprİm; Metoprİm fort; Mikrosid; Mikrosid fort; Seprin; Seprin fort; Sülfaprim; Trİmoks fort;
		<ul style="list-style-type: none"> • Sulfanilamide —> sulfanilamid • Sulfapyridine —> sulfapiridin • Thiazolesulfone
DiĞER ANTİBAKTİRIYEL AJANLAR	<ul style="list-style-type: none"> • Chloramphenicol —> Aramisetin; Blomisetin; Dİasetin; Fenicomycin; K ermitetine; Klorasüksinat; Misetin; Otozili; Süperklorin; Viklorin; Kloromislin; Colimycine 	<ul style="list-style-type: none"> • Furazolidone —> Ankolit; Diyareks; Fureks; Gastrofuran; Furoxone; • Nitrofurantoin —> Piyeloseptyl; Ürİseptin; Ürİneks; Furadantin • Nitrofurazone —> Dermikolin; Ekzematol; Furacin; Furederm; Furazol; Nitrazon • Nalidixic Acid —> Negram; Naligram; Urogram; NegGram
ANTİHELMİNTİK AJANLAR		<ul style="list-style-type: none"> • Niridazole (Ambilhar) • Stibophan • B-Naphthol
DiĞER MADDELER	<ul style="list-style-type: none"> • Probenecid —> Benemid • Vitamin K ve Analogları —> Libavit-K; K-vitampli; Konakion ampul; menaphone • Quinidine —> Kinidin; Quinocardine; Natİsedine; Longacor 	<ul style="list-style-type: none"> • Naphthalene —> Nafalin; elbİse güvelerİne karşı kullanılır. Koklanması hemolİze yol açabilir. • Phenylhydrazine —> fenilhidrazin • Toluidin mavisi • Metilen mavisi —> Methylene Bleu; Buco Bleu; Helmo Bleu; Bucasol • Phenazopyridine —> pyridium • Trinitrotoluene • Isobutyl nitrite • Urate oxidase
YIYECEKLER		<ul style="list-style-type: none"> • Yaş ve kuru iç bakla (özellikle bakla taze ve çiğ yenildiğinde) akut hemolitik krize (çay rengi idrar, halsizlik-sararma) yol açar.
HASTALIKLAR		<ul style="list-style-type: none"> • Viral hepatit, • Üst solunum yolu enfeksiyonları, pnömoni, • Diyabetik asidosis gibi durumlar

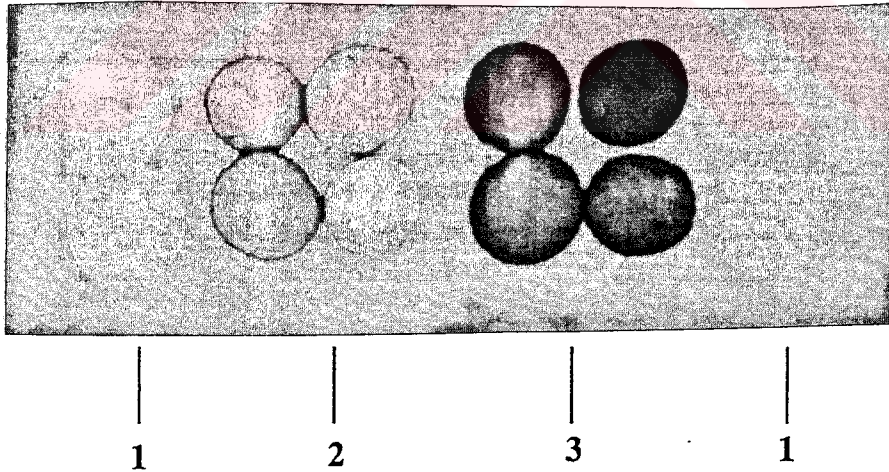
Tablo-3.2: Olgulara gönderilen güncel akut hemolitik kriz önlenim tablosu (2,13,86).

malin %10'undan daha düşük enzim eksikliği olgularını güvenilir düzeyde saptadığı doğrulandı. Spot testin pozitif (hasta) ve negatif (sağlam) sonuçlarını gösteren fotoğraf Şekil-3.1'de sunuldu.

Standardize edilen floresans spot testi 45 ailede, toplam 130 kişiye uygulandı. Taranan yakın akraba olmayan 45 aileden 37'sinde, ciddi düzeyde enzim eksikliğine sahip toplam 42 olgu saptandı. 8 ailede ise floresans spot testi ile ciddi düzeyde enzim eksikliği saptanamadı. Ancak 2 ailede ciddi düzeyde enzim eksikliği, rapor edilen çocukta değil, babalarında (6 ve 27 nolu aile) saptandı. Anket sırasında rapor edilen kuzende (4 nolu aile) ciddi düzeyde enzim eksikliği floresans spot testi ile doğrulandı. Ayrıca 13 nolu ailede ilave olarak annede de enzim eksikliği saptandı. 20,28,30,31 nolu ailelerde oğlan kardeşlerde de enzim eksikliği saptandı. Bu bulgular, ilerideki olası hemolitik krizden aile bireylerini koruma açısından önemliydi.

X'e bağlı kalıtım desenine uygun olarak yakın akraba olmayan 37 olgunun 36 tanesi erkek ve bir tanesi kadın idi.

Olguların yaş dağılımı tablo-3.3'te verildi. 28 kişi 20 yaşın altındaki gençler ve çocuklardan oluşurken sadece 9 kişi 20 yaş ve yukarisında idi.



Şekil-3.1 : Ciddi düzeyde G6PD eksikliği olan ve olmayan kan hemolizati örneklerinde floresans spot test sonucu.

- 1) Hazırlanan spot test çözeltisinin UV ışık (366 nm) altında görünümü.
- 2) Ciddi düzeyde G6PD eksikliği olmayan 2 kan hemolizatının reaksiyon sonunda UV ışık (366 nm) altında hemoglobin miktarına bağlı olarak oluşturduğu açık koyu yeşilimsi renk.
- 3) Ciddi düzeyde G6PD eksikliği olan 2 kan hemolizatının reaksiyon sonunda UV ışık (366 nm) altında hemoglobin miktarına bağlı olarak oluşturduğu açık koyu kahverengimsi renk.

YAŞ GRUBU	FREKANS
0-5	6
6-10	7
11-15	9
16-20	6
21-25	3
26-30	0
31-35	1
36-40	4
41-45	1
Toplam	37

Tablo-3.3: Ciddi düzeyde G6PD eksikliği saptanan ve yakın akraba olmayan 37 olgunun yaş dağılımı

Floresans spot testi ile ciddi düzeyde enzim eksikliği saptanan 37 ailedeki toplam 42 olgunun 34 tanesi, daha önce bakla yemeye bağlı olarak akut hemolitik kriz geçirmiş ve 32 tanesi kan verilerek tedavi edilmişti. Bir olgu, doğum sonrası ciddi düzeyde yenidoğan sarılığına yakalanmış ve kan değişimi yoluyla tedavi olmuştu. İki olgu ise önemli bir klinik tabloya yakalanmadığını belirtmiştir. Aile içi bireyler olan diğer 5 olgu ise floresans spot testi ile ilk defa saptandı.

Ciddi düzeyde enzim eksikliği saptanan 42 bireyin tümünde Akdeniz mutasyonu taraması yapıldı. Ancak mutasyon sıklığı hesaplamasında yakın akraba olmayan 37 olguya ait veriler esas alındı (91). Bundan dolayı tablolar ve şekiller, yakın akraba olmayan 37 olgu esas alınarak hazırlandı. 37 olgunun yerleşim birimlerine göre dağılımı tablo-3.4'de sunuldu.

YERLEŞİM YERİ	KİŞİ SAYISI	YERLEŞİM YERİ	KİŞİ SAYISI
İZMİR	11	TİRE	1
TORBALI	4	BAYINDIR	1
MENDERES	1	İVRİNDİ	1
MENEMEN	1	ALAÇATI	1
BERGAMA	2	MANİSA	3
FOÇA	1	AKHİSAR	1
KARABURUN	1	KIRKAĞAÇ	1
ÖDEMİŞ	2	SÖKE	1
KIRAZ	1	KUŞADASI	2
DİKİLİ	1	TOPLAM OLGU SAYISI	37

İzmir ve İlçeler Toplam : 28

Manisa ve İlçeler Toplam : 5

Aydın ve İlçeler Toplam : 3

İvrindi : 1

Tablo-3.4: Ciddi düzeyde G6PD eksikliği saptanan ve yakın akraba olmayan 37 olgunun Yerleşim birimlerine göre il ve ilçe bazında dağılımı

3.2 Ciddi Düzeyde G6PD eksikliği Saptanmış Olgularda Akdeniz Mutasyonunun Taranmasına Ait Bulgular

Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Kan örneklerinden izole edilen DNA'ların saflığı 260/280 nm dalga boyunda verdikleri optik dansiteler oranlanarak ölçüldü (84). Ayrıca elde edilen DNA'nın parçalanıp parçalanmadığını saptamak için DNA örneklerinin 5 seyreltisi yapılarak agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. 260/280 nm optik dansite oranı 1.7 üzerinde olan ve bütün bir DNA bandı veren örnekler PCR'da kullanıldı (59).

3.2.1 PCR ürününün Kontrolü

Akdeniz mutasyonunu saptamada kullanılan standart marker DNA ve Akdeniz mutasyonu pozitif (med) ve negatif (nonmed) kontrol örnekleri, hematoloji bölümünden (Hammersmith hospital) sağlandı ve kullanıldı.

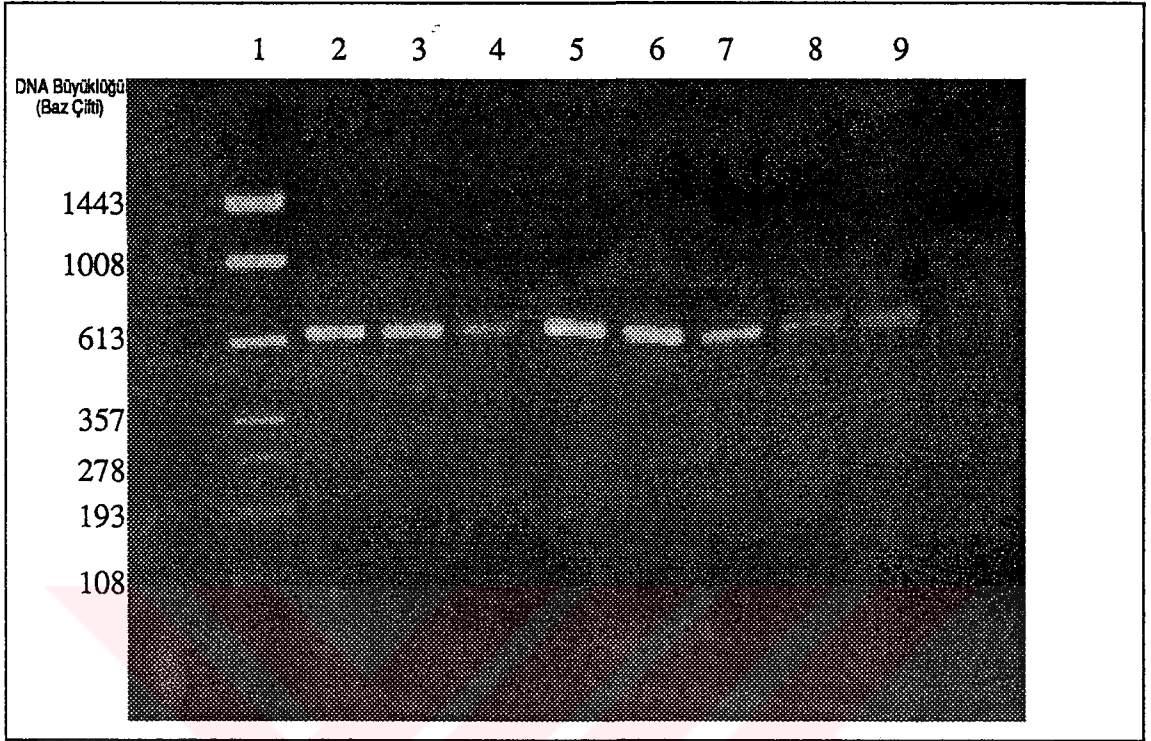
PCR sonunda çoğaltım olup olmadığını test etmek için PCR ürünü elektroforezde yürütüldü. Band oluşumu gözlemlendikten sonra MboII ile kesim işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünü DNA bantlarına ait fotoğraf örneği Şekil-3.2'de sunuldu.

3.2.2 MboII ile Kesim ve Akdeniz Mutasyonu Taranması

PCR yoluyla çoğaltılmış exon 6-7 gen bölgesinin MboII ile kesim ürünleri elektroforezde yürütüldü. Kesim olan ve sonuçta ayırt edici iki DNA bandı (276 ve 103) veren örnekler, Akdeniz mutasyonu açısından pozitif olarak değerlendirildi. Negatif kontrollerde kesim işlemi sonunda ayırt edici olarak 379 baz çifti büyüklüğünde tek band gözlemlendi. Bu sonuçlara ait fotoğraf örneği, Power PC bilgisayarda adobe photoshop (3.0) yazılımı kullanılarak işlendi ve metine yerleştirildi (Şekil-3.3)

Yakın akraba olmayan 37 olgu esas alınarak hazırlanan mutasyon tarama sonuçları, tablo-3.5'de verildi. 37 olgunun 29 tanesinde (%78.3) Akdeniz mutasyonu (med) saptanırken, 8 olguda (%21.6) Akdeniz mutasyonu saptanamadı (nonmed). Ciddi düzeyde G6PD eksikliği olan ancak Akdeniz mutasyonu saptanamayan (nonmed) DNA örneklerinde, diğer mutasyonların taranması veya yeni mutasyonların saptanması, eksternal kontrollerin gerçekleştirildiği referans laboratuvar (Hematoloji bölümü, Hammersmith Hospital-Londra) ile ortak çalışma protokolüne bağlandı.

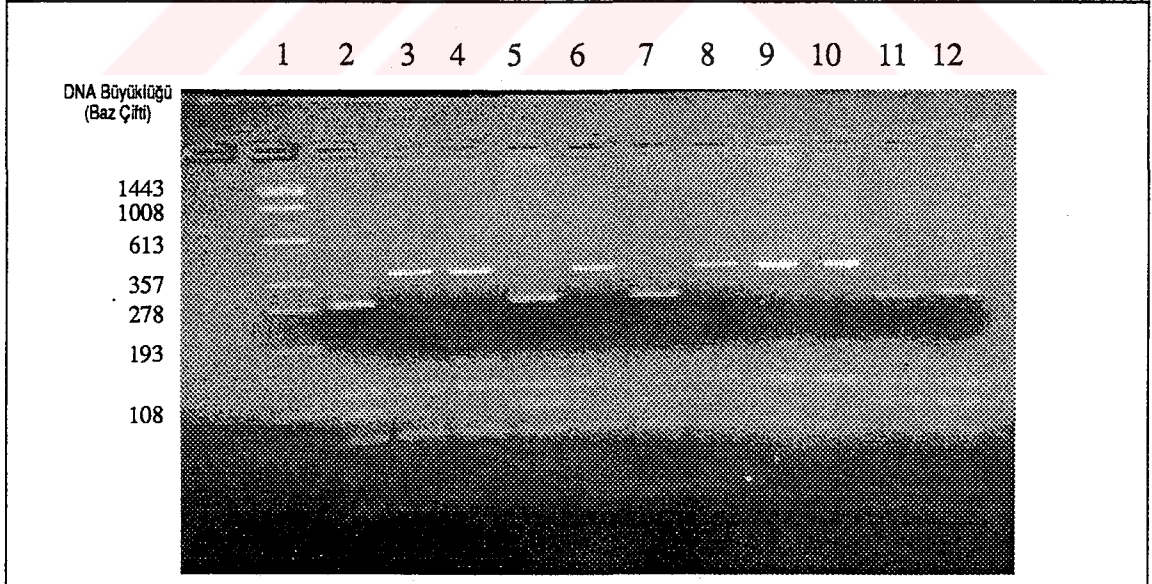
Yakın akraba olmayan olgularda saptanan Akdeniz (Med) ve Akdeniz olmayan (Nonmed) mutasyonların yerleşim birimlerine dağılımı tablo-3.6'da; harita üzerindeki coğrafik dağılımı şekil-3.4'te verildi.



Şekil-3.2: Exon 6-7'nin PCR'da çoğaltımına ait elektroforez görüntüsü

1: pEMBL 8'in TaqI ve PvuII ile kesimi ile hazırlanmış DNA marker.

2-9: Örnek DNA'lara (1H, 2H, 3H, 4K, 5H, 6B, 7H, 8H) ait exon 6-7'nin PCR'da çoğaltımına ait bantlar



Şekil -3.3 : MboII ile kesim sonrası, Akdeniz mutasyonu (med) içeren ve içermeyen (nonmed) kontrol DNA örnekleri, marker DNA ve çalışılan olguların DNA örneklerinin elektroforez sonuçlarına ait örnek fotoğraf. 1: DNA büyüklüğünü gösteren marker, 2: Standart kontrol med, 3: Standart kontrol Nonmed, 4: Olgu (4K) Nonmed, 5: Olgu (1H) Med, 6: Olgu (5H) Nonmed, 7: Olgu (7H) Med, 8: Olgu (15H) Nonmed, 9: Olgu (20H) Nonmed, 10: Olgu (32H) Nonmed, 11: Olgu (21H) Med, 12: Olgu (22H) Med

AİLE NO	ADI SOYADI	CİNSİYETİ	YERLEŞİM YERİ	AKDENİZ MUTASYON (563 C → T)
1H	F.G.	E	MENDERES	MED
2H	M. P.	E	İZMİR	MED
3H	İ.S.	E	İZMİR	MED
4K	C.K.	E	İZMİR	NONMED
5H	M.Ş.	E	TORBALI	NONMED
6B	K.A.	E	İZMİR	NONMED
7H	N.A.Ç.	E	İZMİR	MED
8H	Ç.K.	E	İZMİR	MED
9H	S.K.	E	İZMİR	MED
10H	Ş.Ç.	E	MENEMEN	MED
11H	Z.G.	E	FOÇA	MED
12H	O.A.	E	KARABURUN	MED
13H	T.Y.	E	İZMİR	NONMED
14H	A.T.	E	İZMİR	MED
15H	B.B.	E	BERGAMA	NONMED
16H	S.K.	E	AKHISAR	MED
17H	H.K.	E	ÖDEMİŞ	MED
18H	Ö.Ö.	E	TORBALI	MED
19H	A.İ.	E	TORBALI	MED
20H	İ.C.	E	TORBALI	NONMED
21H	S.T.	E	İZMİR	MED
22H	M.K.	E	MANİSA	MED
23H	E.T.	E	KIRAZ	MED
24H	İ.Ö.	E	ÖDEMİŞ	MED
25H	Ö.K.	E	İZMİR	MED
26H	E.Ç.	E	KIRKAĞAÇ	MED
27B	H.K.	E	KUŞADASI	MED
28H	H.B.	E	SÖKE	MED
29H	T.Y.	E	BERGAMA	MED
30H	S.Ç.	E	DİKİLİ	MED
31H	M.M.	E	BAYINDIR	MED
32H	F.P.	E	MANİSA	NONMED
33H	D.Ö.	E	TİRE	MED
34H	M.D.	E	MANİSA	NONMED
35H	H.A.	E	ALAÇATI	MED
36H	N.E.	K	İVRİNDİ	MED
37H	S.K.	E	KUŞADASI	MED

Toplam 37 29 Med (%78.3) 8 Nonmed(%21.6)

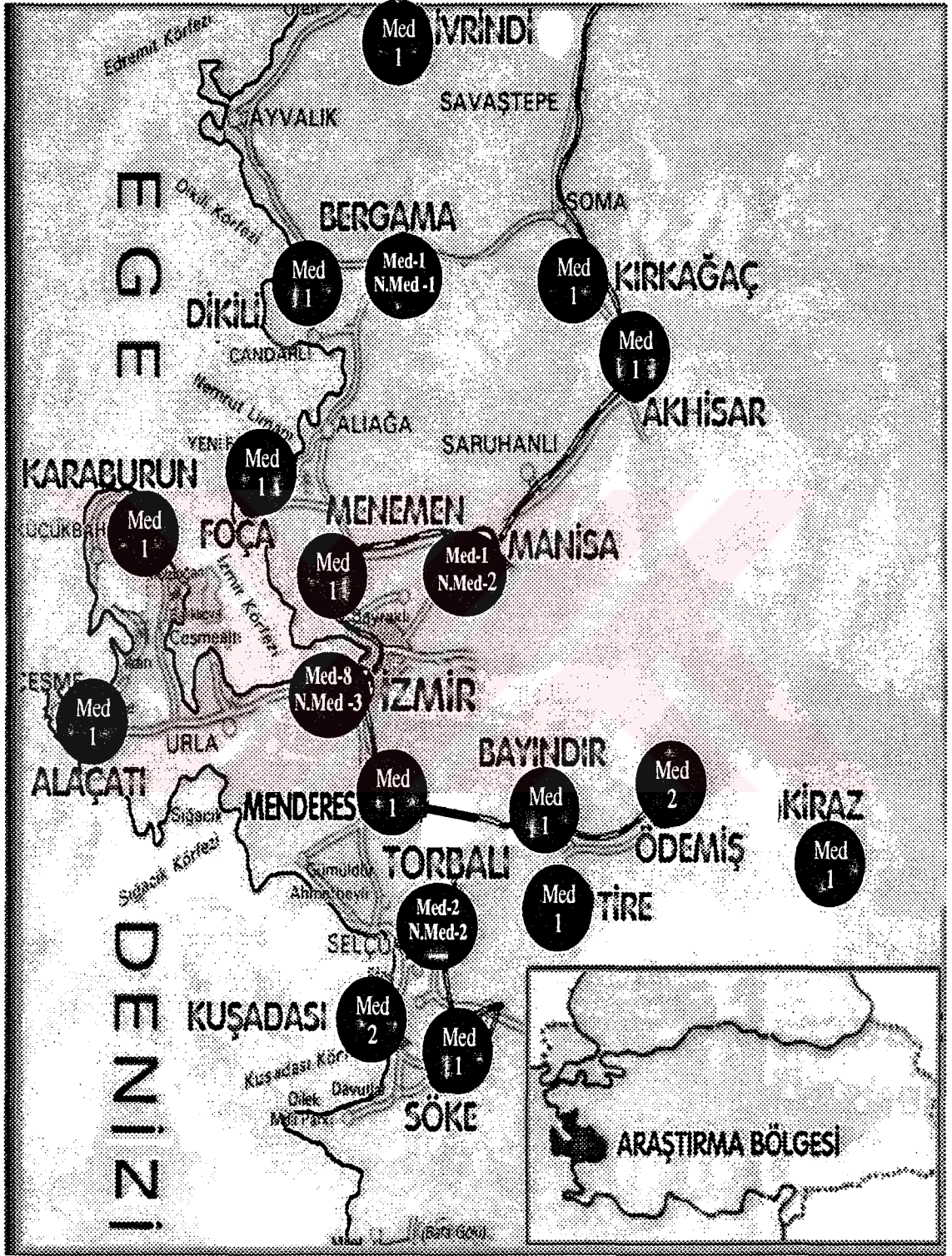
Med: Akdeniz mutasyonu saptandı, **Nonmed:** Akdeniz mutasyonu saptanamadı.

H: Hasta Çocuk, **B:** Baba, **K:** Kuzen,

Tablo-3.5 : Floresans Spot testine göre ciddi düzeyde G6PD eksikliği saptanan yakın akraba olmayan olgularda Akdeniz mutasyonu(Med) Taraması Sonuçları

Yerleşim Yeri	Toplam Olgu Sayısı	Akdeniz Mut.(Med) Saptanan Olgu Sayısı	Akdeniz Mut.(Nonmed) Saptanamayan Olgu Sayısı
İzmir	11	8	3
Torbali	4	2	2
Menderes	1	1	-
Menemen	1	1	-
Foça	1	1	-
Karaburun	1	1	-
Bergama	2	1	1
Ödemiş	2	2	-
Kiraz	1	1	-
Dikili	1	1	-
Bayındır	1	1	-
Alaçatı	1	1	-
İvrindi	1	1	-
Tire	1	1	-
Manisa	3	1	2
Kırkağaç	1	1	-
Akhisar	1	1	-
Kuşadası	2	2	-
Söke	1	1	-
Toplam	37	29 (%78.3)	8 (%21.6)

Tablo-3.6: Çalışılan Ailelerde saptanan Akdeniz (Med) ve Akdeniz Olmayan (Nonmed) Mutasyonların Yerleşim Birimlerine Dağılımı



Şekil-3.4: Ciddi düzeydeki G6PD eksikliği olgularında saptanan Akdeniz(Med) ve Akdeniz olmayan (N.Med) mutasyonların coğrafik dağılımı

4. TARTIŞMA

4.1 Konu Seçiminde ve Sınırlarının Belirlenmesinde İzlenen Stratejiler ve Gerekçeleri

Kalıtsal metabolik hastalıklar, insan yaşamında doğrudan veya koşullara bağlı olarak değişik düzeylerde sağlık sorunlarına yol açar. Ancak kalıtsal hastalıkla ilişkili güncel bilimsel bilgi ve teknolojinin doğru kombinasyonu oluşturulup uygulandığında, bu sağlık sorunlarının ortaya çıkması önlenmektedir. G6PD eksikliği bu tür kalıtsal metabolik hastalıklardan biri olup, koşullara bağlı olarak(bazı besin ve ilaçların alımı) ölümcül olabilen akut hemolitik krize yol açar. Ayrıca doğum sonrası gelişen ciddi yeni doğan sarılığının nedenlerinden biridir. Bununla beraber G6PD eksikliğinin yol açtığı bu sağlık sorunları, risk altındaki aileler doğum öncesinde veya sonrasında erken tanı ile saptandığında kesin olarak önlenebilmektedir (2,13). Bu nedenlerden dolayı Ege bölgesinde ciddi düzeydeki G6PD eksikliğini moleküler düzeyde çalışmak, hastalığın zararlı ve ölümcül etkilerini önlemek için bilimsel verilerden yola çıkarak, ilgili alandaki güncel teknolojik gelişimi bölgeye kazandırmak üzere bu çalışma planlandı. Ayrıca Ege bölgesinde bu tür bir çalışmanın yapılmamış olması da bu tercihi, uygulama alanına koymanın gerekliliğini gösterdi. Araştırmanın yürütülmesinde kullanılan güncel bilimsel bilgi ve teknoloji aşağıda özetlenmektedir (2):

-G6PD eksikliğinin fenotipinin(septomlarının) klinik bulgular ışığında doğru tanımlanmış olması. Fenotipik bulguları ortaya çıkaran metabolik olayların doğru tanımlanmış ve ilişkilendirilmiş olması.

- Hastalığa neden olan enzimin aktivite düzeyinin güncel standardize edilmiş testlerle doğru saptanabilmesi.

-G6PD eksikliğine yol açan enzimi kodlayan genetik bilginin kromozomal yerleşiminin doğru bilinmesi ve ilgili genin baz dizisinin deşifre edilerek genin moleküler yapısının çıkarılmış olması. Genin değişik bölgelerindeki 60 adet mutasyonun saptanarak tanımlanmış olması.

-Tanımlanan mutasyonların bulunduğu özgün gen bölgelerini PCR ile çoğaltmada kullanılan özgül primerlerin tasarlanıp geliştirilmesi ve kullanımda olması. Mutasyonun bulunduğu gen bölgelerinin çoğaltımı sonrasında elde edilen DNA parçalarının özgün dizilerini tanıyan ve kesen kesici enzimlerle kesilebilmesi. Sağlam ve hasta DNA örneklerinden çoğaltılan DNA parçalarının kesim ürünlerine bakarak ilgili mutasyonun varlığının veya yokluğunun DNA düzeyinde saptanabilmesi.

-Bu bilgi kümelerinin doğru kombinasyonu sonucu elde edilen bulguların, birbiriyle ilişkilendirilmesi. Hasta kişilerin hastalığın zararlı etkilerinden korunabilmeleri için akut hemolitik kriz önlenim tablosu gönderimi. Koruyucu sağlık hizmetine katkı.

Dünya Sağlık Örgütü G6PD Eksikliği Çalışma Komitesinin(WHO-G6PD) önerileri esas alınarak yukarıda özetlenen güncel yaklaşımın ve kaynaklardaki bilimsel bulgular doğrultusunda, uluslararası ilişkilerle her kademesi kontrol edilerek bu araştırma yürütüldü. Dolayısıyla elde edilecek verilerin bilimsel güvenilirliği ve geçerliliği artırıldı.

1990'lı yıllara gelinceye kadar G6PD eksikliği ile ilgili çalışmalar biyokimyasal temele dayanmaktaydı ve hastadan çok miktarda kan örneği alımı gerekiyordu. Biyokimyasal düzeyde saptanan 442 G6PD varyantı, alyuvarlarda bulunan az miktardaki aktif enzimin biyokimyasal özelliklerine dayanarak tanımlanmıştı (2). 1967 yılında Dünya Sağlık Örgütünün oluşturduğu komitenin biyokimyasal çalışma metodlarını standardize edip kitaplaştırmasına rağmen, her araştırmacı bu standartlara tam olarak bağlı kalmamıştı. Bağlı kalmış olsa bile, belirli bir özelliğe ait değerlerin, normalden veya diğer varyantlardan sapmasının ne kadar gerçek olduğu test edilemiyordu. Enzimin biyokimyasal özelliklerinin ölçümüne ait farklı değerlerin kanın nakli, saklanması veya enzimin izolasyonu sırasındaki değişimlerden kaynaklanabilmesi ise diğer bir olasılıktı. Çünkü G6PD eksikliği olan kişilerden alınan kan örneklerinde bulunan çok az miktardaki enzimle yapılan çalışmaları tekrarlamak ve ölçümleri kontrol etmek çoğu kez mümkün olmamaktadır. Ayrıca 1980 yılında Fairbanks ve arkadaşları G6PD Cornell olarak tanımlanan bir enzimin, gerçekte G6PD Şikago varyantı ile aynı olduğunu saptamışlardır (90). Genellikle G6PD eksikliği eksikliği enzimlerin stabiliteelerini kaybetmelerinden kaynaklandığı için çalışılan örnekde enzimler çoğu zaman stabil değildi. Kullanılan reaktiflerin farklı zamanlardaki üretim serilerinden veya laboratuvarlarda kullanılan tekniklerden kaynaklanan farklılıklar çok yaygındı. Bu açıdan yeni biyokimyasal

varyantları belirlemede kullanılan parametrelerden biri olan NADP Km değerlerinden 2.4 μM , 4.6 veya 10 μM değerden önemli ölçüde farklı olup olmadığı kesin olarak söylenememektedir. Bu alandaki araştırmacılar, küçük biyokimyasal farklılıkları, yeni ve farklı bir varyant yapacak düzeyde önemli görmeye zihnen hazırıldılar. Çünkü yeni bir varyant yeni orjinal bir araştırma makalesi demektir. Bütün bunlar kümülatif olarak yüzlerce varyantın bulunmasına yol açtı. Son yıllarda DNA teknolojisini kullanarak yapılan çalışmalar ise, biyokimyasal özellikleri açısından oldukça farklılaşan iki veya daha fazla varyantın Akdeniz varyantında gösterildiği gibi ortak (akdeniz mutasyonu)moleküler temele sahip olduğunu göstermiştir. Sonuçta 1994 yılı itibarıyla farklı olduğu düşünülen 442 varyantın gen düzeyinde 60 mutasyondan köken aldığı ortaya çıkarıldı (2, 15, 29).

Öteyandan G6PD genine ait DNA dizisindeki değişimlerin analizine dayalı olarak G6PD varyantlarının tanımlanması, biyokimyasal yöntemlere dayalı tanımlarla karşılaştırıldığında daha güvenilir ve tutarlıdır. Ayrıca metilasyon ve katlanma gibi ikincil modifikasyonları ihmal ettiğimizde DNA dizisi, enzimden daha stabil ve kararlıdır (29). Bundan dolayı kalıtsal metabolik hastalıkların tanısında kullanılan güncel DNA teknolojisine dayalı test sistemi, ciddi düzeydeki G6PD eksikliğine yol açan mutasyonların saptanmasına uyarlandı (58,91).

Maliyet ve uygulanabilirlik açısından da çalışmanın kapsamı ve sınırları belirlendi. Dolayısıyla çalışma, toplum sağlığı açısından önem arzeden ve ölümcül klinik belirtilere yol açabilen sınıf 2'ye dahil G6PD eksikliğine sahip olguların saptanması ve bu olgularda Akdeniz mutasyonunun güncel DNA teknolojisi kullanılarak araştırılması ile sınırlandırıldı (2). Ayrıca çalışılacak hasta kişilerde ortaya çıkabilecek olası krizleri önlemeye yönelik hizmet üretimi planlandı. Bu amaçlara ulaşılabilmesi için örnek grubunun ciddi düzeyde G6PD eksikliğine sahip olgulardan oluşturulması hedeflendi.

4.1.1 Ege Bölgesinde Ciddi Düzeyde G6PD Eksikliği Olgularının Saptanması

Çalışmanın temel hedefi, Akdeniz mutasyonunu DNA teknolojisini kullanarak saptama olduğundan, kısıtlı malzeme ve mali imkanlar da dikkate alınarak, İzmir'deki hastanelerin çocuk bölümleri ve özel poliklinik arşivleri, hemolitik kriz geçirmiş ciddi düzeydeki G6PD eksikliği olguları açısından tarandı. Hedef olgulara ulaşma açısından zaman ve maliyet tasarrufu sağlandı. Bu şekilde çalışılacak hemolitik kriz geçirmiş ol-

guların sayısı da arttırılmış oldu. Hastaların çalışmaya gönüllü katılım oranlarının yüksek tutulabilmesi için kendilerine çalışmanın amacını ve kapsamını içeren mektup gönderildi. Bire-bir yazılı ve sözlü iletişim kurularak çalışmaya katılımın yüksek olması sağlandı. Bu iletişimin kurulması, çalışmaya hemolitik kriz geçiren olguların yanında, anne-baba ve diğer çocukların da katılımını kolaylaştırdı. Böylece diğer aile bireylerinde de ciddi düzeyde enzim eksikliğinin olup olmadığını saptama imkanı doğdu. Örneğin aile bazında floresans spot testinin uygulanması sonucunda 37 ailenin 8'inde annede, babada veya diğer oğlan kardeşlerde ciddi düzeyde G6PD eksikliği ilk defa ortaya çıkarıldı.

Hastalığın ortaya çıkış şeklini, klinik belirtilerini, yapılan tedaviyi ve benzer klinik bulguların yakın aile çevresinde ve komşularında olup olmadığını öğrenebilmede ve kişilerin ileriki yaşamlarında hastalığın klinik belirtilerinden korunma yönünde ne düzeyde bilgilendirildiklerini saptamada bire-bir anket uygulama yöntemi tercih edildi. Uygulanan ankette elde edilen veriler, laboratuvar sonuçlarının, klinik bulgularla ilişkilendirilip doğrulanmasında belirleyici oldu. Ayrıca ciddi düzeyde G6PD eksikliği saptanan yakın akraba olmayan 5 olgunun, anket verilerine dayanarak ortaya çıkarılması ve birinin çalışmaya katılması, kalıtsal hastalıkları çalışırken anket uygulamanın gerekliliğini doğruladı.

Hedeflenen coğrafik bölgenin 19 farklı yerleşim biriminden gelen olguların çalışmaya alınmasıyla, örnek grubunun hedef bölgeyi temsil etme yüzdesi arttırıldı.

Anket uygulamaları sırasında çalışılan ailelerin önemli bir kısmına hemolitik krizi önlemeye yönelik yasak ilaç ve yiyecek listesi verilmediği ortaya çıktı. Bir kısmına verilen listeler arasında uyuşmazlıklar vardı. Diğer bir kısmı İngilizceydi. Hiç bir listede etken maddelerin eczanelerde satılan ticari isimleri yoktu. Bütün bunlar dikkate alınarak önce yasak ilaç ve yiyecek listesindeki etken maddelerin güncelleştirilmiş listesi hazırlandı (2,13). İkinci olarak İzmir Eczacılar Odasından sağlanan ilaç rehberi kullanılarak etken maddelerin ticari isimleri saptandı (86). Türkçe olarak yeni hazırlanmış güncel akut hemolitik kriz önlenim tablosu hazırlanarak çalışılan ailelere gönderildi. Böylece hasta kişilerin yaşamlarının ileriki dönemlerinde olası hemolitik krizlere yalanmamaları için laboratuvar sonuçları bilgilendirme hizmetlerinde kullanılmış oldu.

4.1.2 Floresans Spot Testinin Tercih Nedenleri ve Sonuçların Tartışılması

G6PD eksikliğine ait klinik bulguları(fenotip) tanımlanan kişilerin doğrulanmasında ve diğer aile bireylerinin de G6PD eksikliğine sahip olup olmadıklarını saptamada floresans spot testin kullanımı tercih edildi. Çünkü spot testi, WHO-G6PD grubu ve Uluslararası Hematoloji Standardizasyon Komitesince önerilen ve ciddi düzeyde (severe - full-deficient) enzim eksikliğine sahip olanları, sağlam ve sağlıklı taşıyıcı olan kişilerden ayırt etmek için geliştirilen biyokimyasal bir testtir (2,13,55).

Spot testinin kullanım öncesinde standardizasyon ve kalibrasyonu, birinci aşamada testte kullanılan kimyasallar ve sigma standartları(sağlam hemolizat örneği G6PD aktivitesi normal(4.6- 13.0 Ü gr/Hb) ve hasta(severe-full-deficient) hemolizat örneği G6PD aktivite düzeyi(0.0- 0.4 Ü gr/Hb) ayrı ayrı satın alınarak gerçekleştirildi. İnternal kontrolleri laboratuvarında gerçekleştirilen spot testin eksternal kalibrasyonu, hematoloji bölümünde (Hammersmith hospital, Londra) örnek değişimi yoluyla yapıldı.

Test sonuçlarının değerlendirilmesinde sigma standart kontrol sağlam ve hasta hemolizat örneklerinin oluşturduğu renkler(UV lamba altında sağlam kişiye ait hemolizat açık veya koyu yeşil spot; hastaya ait hemolizat kahverengi spot) esas alınarak ciddi düzeyde G6PD eksikliği var veya yok tanısı kondu. Herbir standart örnekte, farklı seyreltilmeleri çalışılarak renk oluşumundaki farklılıklar standardize edildi. Ayrıca ciddi düzeyde G6PD eksikliği saptanan kan örneklerinin farklı dilüsyonları tekrar çalışılarak hemoglobinin yüksek konsantrasyonuna bağlı olarak spotlarda ortaya çıkabilecek olası yanlış pozitiflikler önlendi (88,89). Spot test reaksiyonu sonrası whatman kağıdına damlatılan tüm örnek spotlar, ilk 20 dakika içinde değerlendirilerek ikinci kez olası yanlış pozitifliklerden kaçınıldı. Floresans spot testiyle yapılan diğer çalışmalarda da benzer bir sonuçla karşılaşmış ve floresans spot testinin yukarıda belirtilen yanlış pozitif sonuç verme noktalarının standardizasyonuna dikkat çekilmiştir. Yayınlanmış literatür verilerinin tümünde, standardize koşullarda floresans spot testinin, normal değerlerin %10 ve altında enzim aktivitesi içeren kan örneklerinde her zaman negatif sonuç verdiği belirtilmektedir (88,89). Bundan dolayı spot test bir kişinin ciddi düzeyde enzim eksikliğine sahip olduğunu kesin ortaya çıkarırken, spot testin negatif sonucundan, kişinin G6PD eksikliğine sahip olmadığını söyleyebilmek, testin geçerlilik ve güvenilirlik sınırlarının dışında kalmaktadır.

G6PD aktivite düzeyinin erişkindeki normal değerinin uluslararası hematoloji standardizasyon komitesinin yayınladığı veriler ışığında 12.1 ± 2.09 Ü gr/Hb civarında seyrettiği kabul edildiğinde, floresans spot testi ile ciddi düzeyde G6PD eksikliği olduğu doğrulanan kişilerin G6PD aktivite düzeyi yaklaşık normalin %10 ve altında (1.2 ± 0.20 Ü gr/Hb ve daha aşağıdaki değerlerde)seyrettiği söylenebilir (51). Çalışmanın temel amacı Akdeniz mutasyonu taraması olduğundan olgularda, enzimatik aktivite düzeyinin ayrıca kantitatif olarak saptanmasına gerek duyulmadı.

İnternal ve eksternal kontrolleri gerçekleştirilen ve standardize edilen spot testinin bu çalışmada kullanılmasıyla hedeflenen Akdeniz mutasyonunun yol açtığı enzim eksikliği olguları doğru şekilde saptanarak, gereksiz malzeme kullanımı ve zaman israfı önlendi. Bir başka deyişle ciddi düzeyde (normalin %10'dan aşağısı) enzim eksikliği gösteren olguları saptamaya yönelik spot testi kullanılarak örnek grubunun hedeflenen sınıf 2'ye giren G6PD varyantlarını kapsaması sağlandı. Dolayısıyla araştırılacak Akdeniz tipi mutasyonunu içeren olası G6PD eksikliği olguları, DNA izolasyonu öncesi hem doğru saptandı hemde örnek grubuna dahil edildi.

Maliyet ve uygulanabilirlik açısından hazır kit kullanma yerine testin sadece kimyasalları satın alınarak, laboratuvarında hazırlanması sonucunda testin geçerlilik, güvenilirlik ve duyarlılığı aynı düzeyde tutulacak şekilde standardize edildi hem de testin fiyatı ucuzlatıldı. Örneğin 50 testlik spot test kiti (Sigma) 175 US\$ olup birim testin fiyatı 3.5 US\$ iken laboratuvarında hazırlanan birim testin maliyeti 0.35 US\$ olup 10 misli daha ucuzdur. Uluslararası Hematoloji Standardizasyonu Komitesinin belirlediği kompozisyon ve miktarlar esas alınarak spot testin geçerliliğini ve güvenilirliğini bozmadan yapılan bu iyileştirme ve ucuzlatma, ülkemizde spot testi kullanılarak yapılacak G6PD eksikliği populasyon taramaları için önemli bir kazanç ve uygulama açılımı sağladı.

Çalışma aile bazında (hasta çocuk/kardeşler/baba/anne) yürütüldüğünden, eğer erkek çocuklarında ciddi düzeyde(severe-full-deficient) enzim eksikliği saptanmış ve baba sağlam bulunmuş ise annenin kesin taşıyıcı olduğu söylenebilmektedir. Bu açıdan sağlıklı taşıyıcı olduğu dolaylı olarak saptanmış doğurganlık yaşındaki annelere, gelecekte enzim eksikliğine sahip erkek çocuğu doğurmalarının olası olduğu hatırlatıldı. Kendilerine gerekli bilgilendirme ve uyarılar yapıldı. Böylece hedeflenen doğum öncesi veya sonrası koruyucu sağlık hizmeti çalışılan ailelere verilmiş oldu.

Ege bölgesinde yenidoğan sarılığında G6PD eksikliğinin rolü konusunda G6PD

aktivitesi ölçümlerine dayalı olarak yapılan iki çalışma vardır (73,74). Her iki çalışmanın G6PD eksikliğinin tanımlanması ve saptanmasına yönelik laboratuvar bulgularının güvenilirlik ve geçerlilik yüzdeleri, güncelleştirilmiş uluslararası standartlar dikkate alındığında oldukça düşüktür. Örneğin sigma kiti kullanılarak kantitatif yapılan G6PD aktivite ölçümlerinde kullanılan kitin çalışılan popülasyonuna ait normal değerleri, standart sapmalarıyla birlikte ölçülmeden doğrudan sigma kitinin normal değerler için verilen ölçüm aralığı, çalışılan popülasyon veya örnek grubu için normal değer olarak algılanmış ve 4.6-13 Ügr/Hb arasında değişen bir skalanın normalden %20 ve altındaki ölçüm değerleri G6PD eksikliği kriteri olarak kullanılmıştır (73,74). Uluslararası Hematoloji Standardizasyon Komitesinin kriterleri noktasından bu kabilenmenin doğruluğu ve geçerliliği yok denecek kadar azdır. G6PD eksikliğinde eksiklik tanımı ve içeriği değişik gruplarca farklı tanımlanabileceği dikkate alındığında, G6PD eksikliği ile ne kastedildiği ve nasıl tanımlandığı çok net şekilde bu çalışmada yapıldığı gibi belirtilmesi gerekli olmakta ve ancak bu şekilde ilgili alandaki sonuçların güvenilirliği ve kullanılabilirliği olanaklı hale gelmektedir.

Ege bölgesi dışında Adana ve Antalya bölgesinde yapılan kalitatif veya kantitatif aktivite ölçümüne dayalı G6PD eksikliği sıklığıyla ilgili popülasyon çalışmalarında uluslararası G6PD eksikliğini çalışma standartlarının güncelleştirilmiş versiyonlarının (sürümlerinin) kullanılmaması bunun yerine 1967 yılındaki ilk geliştirilen standartlara uyulması ve testin değerlendirilmesinde yanlış pozitiflik noktasında yapılan hatalar, birarada değerlendirildiğinde, bu bölgelere ait G6PD eksikliği sıklığı sonuçlarının doğruluğu şüpheli hale gelmekte, güvenilirliği azalmaktadır (31,33,75,76,77). Uluslararası güncelleştirilmiş standartlara uygun olarak internal ve external standardizasyonu gerçekleştirilmiş testlerle bu çalışmaların tekrarlanmasının gerekli olduğu ortaya çıkmıştır. Türkiye'de G6PD eksikliği konusunda yapılan yayınlar incelendiğinde ciddi düzeydeki G6PD eksikliği olgularını saptamaya yönelik floresans spot testinin ülkemizde sigma standartları ile internal ve external kalibrasyonları yapılarak ilk defa bu çalışmada kullanıldığı ortaya çıkmaktadır. İnternal ve eksternal standardizasyonu yapılan floresans spot testi ile ölümcül olabilen klinik belirtilere yol açan ciddi düzeyde G6PD eksikliğine yol açan varyantların(veya olguların) görülme sıklığı ve buna bağlı olarak ilgili mutasyonların bölgemizden başlayarak tüm ülkeyi kapsayacak şekilde saptanması, ilgili alanın öncelikleri olmaktadır. Say ve arkadaşları tarafından yapılan Türkiye genelini kıs-

men kapsayan G6PD eksikliği sıklığı çalışmasına ait bulguların, örnek sayıları incelendiğinde her bir bölge için örnek sayılarının yeterli olmadığı görülmektedir (32). Dolayısıyla bölgelere ait örnek sayılarının artırılarak bulguların doğruluk ve geçerliliklerinin yükseltilmesine ihtiyaç vardır. Ülkemizin değişik bölgelerinde saptanan G6PD eksikliği olgularının moleküler düzeyde uluslararası standartlara uygun olarak tanımlanması çalışmalarının da yapılarak, ülkemize ait G6PD eksikliği sıklığına ait bulguların daha anlamlı -geçerli ve güvenilir hale getirilmesine gereksinim olduğu ortaya çıkarıldı. İlgili alanda en fazla yayını olan Çukurova bölgesindeki farklı araştırma birimleri tarafından enzimatik aktivite ölçümüne dayalı olarak verilen G6PD eksikliği sıklığına ait bulgular arasındaki tutarsızlıklar, konunun önemini ve aciliyetini açıkça ortaya koymaktadır (31,33,75,76,77). Ayrıca ülkemizin değişik üniversite ve araştırma kurumlarınca yürütülen G6PD eksikliği konusundaki çalışmaların bulgularının birbirleriyle karşılaştırılabilmesi, güvenilirlik ve geçerlilik yüzdelerinin artırılabilmesi için WHO-G6PD grubu gibi bölge ve ülke genelinde, kullanılan yöntemlerin ve testlerin standardizasyonunu ve izlenecek stratejilerin saptanmasını gerçekleştirecek ve izleyecek bölgesel ve ulusal G6PD eksikliği standardizasyon komitelerine acilen gereksinim vardır.

4.2 Ciddi Düzeyde G6PD Eksikliği Saptanan Olgularda Akdeniz Mutasyonunun Araştırılmasına Ait Bulguların Tartışılması

DNA düzeyinde yapılacak testlerin maliyeti, biyokimyasal testlerle karşılaştırıldığında 5-10 misli daha pahalı olduğundan ve 1994 yılı itibarıyla tanımlanan G6PD eksikliğine yol açan mutasyonların 60 adet olması, hedefe uygun örnek seçilmeden yapılacak mutasyon taramalarının maliyetini yüksek düzeylere çıkarmaktadır. Ancak hastalığın klinik ve biyokimyasal bulguları doğru saptanıp değerlendirildiğinde, taranması gereken öncelikli olası mutasyonların sayısı bire veya birkaç taneye azaltılabilmektedir (29). Ciddi düzeyde G6PD eksikliği saptanan olgulardan izole edilen DNA örneklerinde olası mutasyonlardan Akdeniz tipinin taranmasında, Akdeniz ülkelerinde ve Ortadoğu da en sık olduğu ileri sürülen ve kısmen doğrulanan biyokimyasal G6PD varyantının Akdeniz (Mediterranean) ve buna yol açan mutasyonun da Akdeniz tipi olması ve bunun ölümcül klinik belirtilere yol açabilen mutasyon olması tercih edici faktörler oldu. Maliyet ve uygulanabilirlik açısından da çalışılan çoğ-

rafik bölgede rastlanması en olası mutasyon olan Akdeniz (Mediterranean) tipinin taranması, öncelikli olarak çalışma kapsamına alındı.

Biyokimyasal düzeyde ciddi G6PD eksikliği saptanmış olgulardan izole edilen DNA örneklerinin saflığı spektrofotometrik olarak (OD260/280 nm değerleri) kontrol edildi. 1.7 ve üzerinde optik dansite veren örnekler PCR için kullanıldı(59, 84). Ayrıca ekstraksiyon sonrası elde edilen DNA'nın bütünlüğü agaroz jel elektroforezinde 5'li dilüsyonları çalışılarak kontrol edildi. Bütün ve keskin bantlara sahip DNA örnekleri PCR aşamasında kullanıldı. Bu şekilde izole edilen DNA örneklerinde PCR reaksiyonu sonrasında elde edilen PCR ürününde artış sağlandı.

4.2.1 G6PD Genine Ait Exon 6-7 Bölgesinin Çoğaltımında Kullanılacak Primerin Seçimi

G6PD geninde Akdeniz mutasyonunun bulunduğu exon 6-7 bölgesinin PCR yoluyla çoğaltımını ve çoğaltılan PCR ürününün MboII ile kesimini kapsayan yayınlar incelendiğinde, kullanılan primer dizilerinin nükleotid sayısı, dizisi ve çoğaltılan PCR ürününün büyüklüğü açısından farklılıklar gösterdiği saptandı(39, 47, 63, 64, 65, 66,67). Farklı tarihlerde yayınlanan primerler tablolandı. Özellikle 5' ucunda ve iç kısımlarda gözlenen farklılıklar sonucunda şüpheye düşüldü. Kısıtlayıcı maddi koşulların gereği olarak tek bir primer satın alınabilecekti. Daha doğru ve kesin sonuç verme noktasından hangisinin tercih edilmesi gerektiği konusunda bilgi edinmek üzere yayın sahiplerine ve primerin geliştirilip kullanıldığı laboratuvarlara mektup gönderildi. Alınan cevaplar, saptanan farklılıkların doğru olduğunu ve yazışmanın önemini kanıtladı (66,67). Akdeniz mutasyonunu ilk defa saptayan ve primerlerin doğru ve kesin sonuç verdiğini garanti eden, örnek primer ve DNA göndererek karşılıklı çalışmayı ve kontrolleri kabul eden Luzzatto ve Vulliamy grubu tarafından(Uluslararası G6PD Eksikliği Araştırma referans merkezlerinden olan Londra Hammersmith Hospital Hematoloji bölümü) tasarlanıp kullanılan 91 ve 92 nolu primerlerin çalışmada kullanılmasına karar verildi. Böylece hem maliyet ve zaman tasarrufu sağlandı hem de elde edilen sonuçların doğruluğu ve geçerliliği eksternal olarak da kontrol edilmiş oldu.

Çalışma öncesi, Hammersmith Hospital Hematoloji bölümünden sağlanan primerler, standart sağlam ve hasta Akdeniz mutasyonu içeren DNA örnekleri ve Taq polimeraz ve nükleotidler, MboII kesici enzim ve DNA markerları kullanılarak, PCR ve

ürünlerinin kesimi ve elektroforez koşulları paralel çalışılarak standardize edildi. Bu aşamadan sonra primer ve MboII kesici enzim sipariş edilerek çalışabilirliği kendi koşullarımızda test edilmiş kimyasal ve enzimlerle çalışma gerçekleştirildi. Böylece çalışma güncel uluslararası standartlara uygun olarak yürütüldü ve sonuçta olası hatalardan ve yanlış bulgulardan kaçınılmış oldu.

Olgulara ait DNA örnekleri, hematoloji bölümünden (Hammersmith hospital, Londra) gönderilen standart kontrol Akdeniz mutasyonu içeren (med) ve içermeyen (nonmed) DNA örnekleri, olgulara ait DNA örnekleri ile birlikte PCR aşamasında G6PD gen bölgesinin ilgili kısmının (exon 6-7) çoğaltımında kullanıldı. PCR sonrası DNA çoğaltımı olup olmadığı, agaroz jel elektroforezi yapılarak kontrol edildi. Sadece PCR ürünü saptanan örnekler, MboII kesici enzimiyle 18 saat 37°C'de kesim işlemine maruz bırakıldı. Bu şekilde her bir aşamada kontrol yöntemleri uygulanarak malzeme ve zaman israfı önlenmiş oldu ve olası hatalar önlendi. Bu şekilde çalışmanın problemlerin kaynağını doğru saptama açısından izlenmesi gerekli bir strateji olduğu doğrulandı.

4.2.2 Yayınlanmış Çalışmalar Işığında Bulguların Yeri

1994 yılı sonu itibarıyla yayınlanmış kaynaklar incelendiğinde Türkiye'ye ve çalışılan bölgeye ait G6PD mutasyonları hakkında deneysel bir veriye rastlanılmadı (2). Ancak Akdeniz bölgesinde ve Ortadoğuda yapılan çalışmalara dayanarak Ege bölgesinde ve Akdeniz sahillerinde Akdeniz mutasyonunun yaygın olabileceği tahmin edilmekteydi. Bu çalışmadan elde edilen %78.3 oranındaki Akdeniz mutasyonu ile bu öngörüler, deneysel olarak kanıtlandı. Ege bölgesinde ciddi düzeyde G6PD eksikliğine yol açan mutasyonların DNA düzeyinde tanımlanması yönünde başka bir çalışma olmadığı için, elde edilen bulgular çalışılan coğrafik bölge için ilk ve orjinaldir. Buna rağmen elde edilen bulgular, Akdeniz bölgesini ve Ortadoğuyu kapsayan diğer çalışmaların verileriyle karşılaştırılacaktır.

Kuzey İtalya'da Ninfali, P. ve arkadaşları tarafından 18 örnek ile yapılan çalışmada 12 örnekte (%66.6); Güney İtalya'nın Calabria bölgesinden alınan G6PD eksikliği içeren 53 örnek üzerinde yapılan bir başka mutasyon taramasında 22 örnekte (%41.5), Akdeniz mutasyonu (G6PD_{Med}) saptanmıştır (91, 58). Vives-Corrans J.L ve arkadaşları tarafından etnik kökeni İspanyol ve Ashkenazi Yahudisi olan 5 örnek üze-

rinde yapılan taramada örneklerin hepsinde Akdeniz mutasyonu saptanmıştır (38). Beutler ve arkadaşları, İran, Mısır, Yunanistan, Yugoslavya, İspanya, Hindistan, Pakistan, İtalya ve Sardinya kökenli toplam 22 kişiden 21 tanesinde(%95.5) Akdeniz mutasyonu saptamışlardır (46).

Kürdi-Haidar, B. ve arkadaşları tarafından Suudi Arabistan, Irak, İran, Ürdün, Lübnan ve İsrail kökenli yakın akraba olmayan 21 örnek ile yapılan çalışmada 20 örnekte G6PD Akdeniz mutasyonu(%95.2) saptanmıştır (39). Oppenheim, A. ve arkadaşları tarafından Kürdistan Yahudileri ismiyle belirtilen ve %70 sıklıkta G6PD eksikliğine sahip etnik grup içinden alınan 22 örnekle yapılan çalışmada, 21 tanesinde (%95.5) Akdeniz mutasyonu saptanmıştır (47). Ayrıca Kürdistan isimli coğrafik bölgede yapılan bu çalışmanın coğrafik sınırları da belli değildir. Sınırlı sayıda örnek ile yapılan bu çalışmanın örnek populasyonunu ne düzeyde temsil ettiği ise şüpheli olup, daha büyük sayıdaki örnek gruplarıyla rakamların geçerliliğinin test edilmesi gerekmektedir.

Saha N. ve arkadaşları tarafından 1994 yılında Kuzey Batı Pakistanda G6PD eksikliği içeren 17 örnek ile yapılan mutasyon taramasında 13 olguda (%76.4) Akdeniz mutasyonu saptanmıştır (65). Ancak bu çalışmada kullanılan primerin yanlışlığı yazışmalar sonunda ortaya konmuştur (66,67).

Akdeniz mutasyonu taraması ile ilgili yapılan bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, yakın akraba olmayan 37 olguyu kapsayan örnek grubu ile yürütülen bu tez çalışmasının, alanında yayınlanmış çalışmalar içerisinde en yüksek örnek grubunu kapsayan iki araştırmadan birisi olduğu görülmektedir.

Çalışılan DNA örneklerinin 29/37'sinde (%78.3) Akdeniz mutasyonu ve 8/37'sinde (%21.6) nonmed mutasyon saptanması, Akdeniz ve Ortadoğu ülkelerinde yapılan diğer çalışmaların verileriyle uyumakta ve tutarlılık göstermektedir. Sonuçta Akdeniz ülkelerinde ve Ortadoğuda G6PD Akdeniz mutasyonunun en sık rastlanılan mutasyon olduğu deneysel olarak biraz daha doğruluk kazanmaktadır. Çalışılan bölgeye ait ilk deneysel verileri kapsayan bu araştırmanın Akdeniz bölgesindeki ve Ortadoğudaki G6PD eksikliğinin moleküler temelini aydınlatılması yönünde yürütülen uluslararası çalışmalara da önemli bir katkı olduğu görülmektedir.

Ayrıca bu bölgelerdeki G6PD eksikliğinin moleküler temelini homojen olmadığı, belirli oranda heterojenite içerdiği bu çalışmadan elde edilen bulgularla da (%21.6 ora-

nında nonmed mutasyon) doğrulandı. Ayrıca komşu ülkelerin bazı araştırmacıları etnik ve coğrafik açıdan insanları gruplamada G6PD mutasyonlarına ait verileri, politik malzeme olarak kullanmaya yatkın oldukları görülmektedir (47). Bundan dolayı Ege bölgesinden başlayarak Türkiye'nin tüm bölgelerini kapsayacak şekilde G6PD eksikliğinin moleküler temelini ve buna bağlı heterojen yapısının aydınlatılması, konunun öncelikleri arasında yer almaktadır.

Akdeniz mutasyonu saptanmayan 8 tane (%21.6) nonmed DNA örneklerinde diğer olası mutasyonların taranması veya yeni mutasyonların saptanması, hematoloji bölümü (Hammersmith Hospital-Londra) ile ortak çalışma protokolüne bağlandı.

Bu çalışmada uygulanan stratejinin, gelişmekte olan ülkelerde ciddi düzeydeki G6PD eksikliği konusunda yapılacak çalışmalar için bir model oluşturabilecek özelliklere sahip olduğu görülmektedir. Örneğin klinik açıdan birinci derecede önemli G6PD varyantları saptanacaksa, öncelikle standardize edilen floresans spot testi ile, aile bazında (çocuk/baba/anne) tarama yapılmalıdır. Bireylerden biri ciddi düzeyde G6PD eksikliğine sahipse, o zaman taşıyıcılık düzeyini saptamak veya enzim aktivite düzeyini annede ve diğer aile bireylerinde sayısallaştırmak gerekli olmaktadır. Ayrıca orta ve hafif düzeyde G6PD eksikliğine yol açan G6PD varyantları da araştırılmak isteniyorsa, mutlaka G6PD aktivitesi spektrofotometrik testlerle kantitatif olarak ölçülmelidir. Çünkü spot testi ile sadece ciddi enzim eksikliği gösteren ve normalin %10'unun altında enzim aktivitesine sahip varyantlar (hasta) kalitatif olarak saptanabilmekte ama kişinin sağlam(G6PD aktivite düzeyi normal sınırlar içinde) olduğu söylenememektedir. Ciddi düzeyde G6PD eksikliği saptanmış ve doğrulanmış örneklerde, ikinci basamakta G6PD varyantının etnik ve coğrafik kökenine, klinik ve biyokimyasal özelliklerine bakılarak sınıf 2 içindeki en olası mutasyonlar, özgün primerler kullanılarak araştırılmalıdır.

5. SONUÇ

Tanımlanan sınırlar içerisinde Dünya Sağlık Örgütü G6PD Eksikliğini Çalışma Komitesinin güncelleştirilmiş uluslararası standartlarına ve bilimin evrensel kriterlerine uyularak yürütülen ve tamamlanan bu çalışmada elde edilen bulguların, bu alandaki moleküler genetik çalışmalara ve toplum sağlığına yaptığı başlıca katkıları:

1- Çalışma ölümcül olabilen akut hemolitik anemiye neden olan ciddi düzeyde G6PD eksikliğine sahip olgulardan oluşan tanımlanmış örnek grubu üzerinde belirli bir coğrafik bölgede gerçekleştirilmiş ve olgular, anket ve ciddi düzeydeki enzim eksikliğini saptayıcı floresans spot testi kullanılarak seçilmiştir.

2- Ölümcül olabilen akut hemolitik anemiye ve ciddi yenidoğan sarılığına yol açabilecek düzeyde G6PD eksikliğine sahip olguların doğru şekilde saptanmasını sağlayan floresans spot testi, kendi içinde sigma standartları kullanılarak standardize edildi ve Uluslararası G6PD Eksikliğini Araştırma merkezlerinden olan Hematoloji bölümünde (Hammersmith Hospital- London) eksternal kontrolleri yapılarak çalışmada kullanıldı. Testin hazır ticari kiti yerine laboratuvarında hazırlanarak standardize edilmiş test çözeltisi kullanılarak testin maliyeti, geçerliliği ve güvenilirliği korunarak ucuzlatıldı. Böylece maliyet açısından ucuzlatılan ve doğruluğu-güvenilirliği-geçerliliği aynı tutularak standardize edilen spot testi, ülkemizdeki sağlık kuruluşları tarafından popülasyon taramalarında kullanılabilir hale getirilerek uygulama açılımı sağlandı.

3- Anket uygulamaları sırasında çalışılan ailelerin önemli bir şikayeti de hemolitik kriz sonrası verilmesi gereken krizi önlemeye yönelik yasak ilaç ve yiyecek listesinin bir kısmına verilmeyişi, verilenlerin de bir kısmının İngilizce oluşu ve Türkiye'deki eczanelerde satılan ticari preparatlarının isimlerinin bulunmayışı dolayısıyla listeyi kullanamamaları ve listeler arasındaki farklılıklardı. WHO- G6PD komitesinin raporları ışığında klinisyenlere danışılarak hazırlanan 1994 yılı itibarıyla güncelleştirilmiş ve ülkemizdeki ticari preparatlarının isimleri de dahil edilmiş, Türkçe, akut hemolitik kriz önlenim tablosu ilk defa hazırlanarak kullanıma hazır hale getirildi. Bu tablo çalışmaya alınan ciddi düzeyde G6PD eksikliğine sahip bireylere ve ailelerine

gönderilerek yaşamlarının ileriki dönemlerinde hemolitik krize yakalanmamaları için uyarıldı. Bu uygulama, bölgemizdeki kalıtsal hastalıkların zararlı etkilerinden korunmaya yönelik sağlık hizmetlerine-özellikle ciddi düzeydeki G6PD eksikliğine sahip kişiler için- yeni bir katkıdır.

4- Bölgedeki ciddi düzeydeki G6PD eksikliğine yol açan hakim mutasyonun %78.3 (29/37) oranıyla Akdeniz tipi olduğu saptandı. Ege bölgesinde yaşayan insanlarda gözlenen ciddi düzeydeki G6PD eksikliğinin uluslararası standartlara uygun olarak saptandığı ve bölgede ilk defa moleküler düzeyde eksikliğin tanımlandığı ilk çalışmadır. Akdeniz mutasyonu içermeyen nonmed 8 tane G6PD eksikliği olgusunda (%21.6) diğer olası mutasyonların veya yeni mutasyonların saptanması, Hematoloji bölümü (Hammersmith Hospital-Londra) ile ortak çalışma protokolüne bağlandı.

5- Çalışılan bölgeye ait ilk deneysel verileri kapsayan bu araştırma, Akdeniz bölgesindeki ve Ortadoğudaki G6PD eksikliğinin moleküler temelini aydınlatılması yönünde yürütülen uluslararası çalışmalara da önemli bir katkı sağlamıştır.

6- Bölgemizde ciddi düzeyde G6PD eksikliği konusunda, internal ve eksternal kontrolleri yerleştirilmiş ve ileri DNA teknolojisi uygulanabilen laboratuvar çalışması, toplumun yararlanmasına hazırlanmıştır.

Bu tez çalışması, bilimin evrensel kriterlerine ve Dünya Sağlık Örgütü G6PD Eksikliği Çalışma ve Uluslararası Hematoloji Standardizasyon Komitelerince belirlenen güncellenmiş standartlara uygun şekilde planlandı, yürütüldü ve tamamlandı. Bu bağlamda Uluslararası G6PD Eksikliği Referans Merkezlerinden biri olan Londra Hammersmith Hospital, Hematoloji Bölümünde; kullanılan yöntemlerin, testlerin ve çalışılan kan ve DNA örneklerinin karşılıklı değişim yoluyla eksternal kontrolleri de yapılmıştır.

6. EKLER

- 6.1 (Ek. 1-8): Bu Çalışmanın Uluslararası Standartlara ve Bilimin Evrensel Kriterlerine Uygun Olarak Yürütülmesini Sağlamak İçin Yurt Dışındaki Konunun Otorite Kişileriyle Yapılan Yazışmalar Sonucunda Alınan Cevaplardan Bazı Örnekler**
- 6.2 (Ek.9-10): Çalışma Sonunda Ailelere Gönderilen Teşekkür ve Bilgilendirme Mektup Örneği**



THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE

10666 NORTH TORREY PINES ROAD
LA JOLLA, CALIFORNIA 92037

January 4, 1993

Mr. Selim UZUNOĞLU
196 Sk. Noi 6/4
Bornova-Ismir 35040
Turkey

Dear Mr. UZUNOĞLU:

I was pleased to learn of your plans to perform screening for G6PD deficiency on the Aegean Coast. The protocols that we use for the preparation of DNA and for the detection of mutations are described in the reprints that I enclose. We employ standard techniques such as those described in the Manniatis manual to extract DNA.

We receive numerous requests from investigators asking us to supply them with primers and other materials for their research. You must understand that we are dependent on such grants as we can obtain from the NIH to support our own research, and our resources are too limited to allow us to provide materials for their work to other investigators.

Very sincerely yours,

Ernest Beutler, M.D.

ENCLOSURES

EB/jpv

Ek-1: Kalifornia'da (ABD) The Scripps Research Enstitüsünde Moleküler ve Deneysel Tıp Bölümünün başkanı ve WHO-G6PD grup üyesi olan E. Beutler tarafından gönderilen mektup.

HAEMATOLOGY DEPARTMENT
DIRECT LINE: 081-740-3234
FAX: 081-742-9335



LL/BM
20 January 1993

Selim Uzunoglu
Dokuz Eylul University Medical Faculty
Medical Biology and Genetics Department
Balçova, Izmir
Turkey

Dear Uzunoglu

good

Thank you for your letter and for your lovely card. It was to hear that you are going to embark on a major study of G6PD deficiency in Southern Turkey. The approach you are planning seems very rationale and I think it will be most interesting to find out what proportion of G6PD deficiency in your area is due to G6PD Mediterranean and what proportion to other variants.

I am not sure that I can immediately supply all details you have requested. However, I am enclosing relevant information and also I will send, under separate cover, a copy of some methods in the PhD thesis of a former student of mine, now Dr Margaret Town. I hope this can be of some use.

As an added point, let me just mention that on those samples in which you find the G6PD Mediterranean mutation (which I suspect will be relatively common) there would be no point doing further biochemical characterization. On the other hand, for samples that do not have the G6PD Mediterranean mutation, I think it would be very important to obtain biochemical characterization, otherwise some of the information will be lost. Please let me know if I can be of any further assistance.

With very best wishes

Lucio Luzzatto

Lucio Luzzatto
Professor of Haematology

encl.:

Ek-2: Londra Hammersmith Hospital Hematoloji Bölüm Başkanı ve WHO-G6PD Grup Üyesi Lucio Luzzatto ile yapılan yazışmalardan alınan cevaplar.

HAEMATOLOGY DEPARTMENT
DIRECT LINE: 081 740 3234
FAX: 081 742 9335

15 August 1994

FAX NO: 010 90 236 2372442

Selim Uzunoglu
Dokul Eylül University Medical Faculty
Medical Biology and Genetics Dept
Inciralti/Izmir
TURKEY



Hammersmith Hospital
Du Cane Road
London W12 0NN
Tel: 081 743 2050

Dear Uzunoglu

Thank you for your letter of 27 July. I am glad that you are now ready to start the work that you wrote to me about in December 1992.

I shall try to answer briefly your questions.

1. The best way to store blood is with sterile ACD or CPD. You can usually get this solution ready made from the blood transfusion unit or from a haematology department. In my experience this is better than storage in EDTA. In ACD, normal G6PD is quite stable for up to 28 days. In EDTA, it is probably OK for up to 7 days. This applies to normal G6PD and to several variants which I have studied. Of course if you have a new variant there is no guarantee that it will be equally stable.
2. In my own view lysis in "lysis buffer" is perfectly adequate. Indeed, for just measuring the enzyme activity lysis in 10 μ M NADP, 1 μ M EDTA will be OK. I do not recommend storing the lysates at all and certainly I do not recommend freezing and thawing. It is best to do the assays immediately or within hours from preparing the haemolysate and removing the stroma.
3. Filtration through cellulose is OK to remove white cells. My colleague David Roper has kindly contributed notes and a protocol.
4. Removal of white cells is not absolutely essential, in the sense that most cases a G6PD deficient red cell sample, even with white cell contamination will in white cells still give you a deficient value. On the other hand, G6PD deficiency is less expressed in white cells than in red cells; therefore if you do not remove the white cells you may get an over-estimate of the residual enzyme activity.
5. I do not believe that the activity of 6-phosphogluconate dehydrogenase is a problem at all. In normal haemolysates it will lead to a slight over-estimate of G6PD activity. However, when G6PD is deficient the contribution given by 6 PGD is negligible. I would not bother with those assays.

6. DNA extraction by any method is usually OK.

7. I am enclosing our protocol for Mbo II restriction of amplified exons 6 and 7 - that is usually not a problem.

As for trying the techniques here I should mention that from 1 October my new address will be as follows. Department of Human Genetics, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, 1275 York Avenue, New York, NY 10021, USA. On the other hand I am fortunate to have excellent and experienced collaborators here and I am sure that Dr Tom Vulliamy may be willing to accommodate you if you wish to come for a few days.

I hope you will keep in touch.

With very best wishes



Lucio Luzzatto
Professor of Haematology

Encs

cc David Roper
Tom Vulliamy

"Universal" 10x RE buffer is prepared using the following stock solutions:

2 mol/l Tris-acetate pH 7.5 : dissolve 24.2 g Trizma base in 60 ml of water, adjust the pH to 7.5 with glacial acetic acid and make up to 100 ml.

2 mol/l potassium acetate: weigh out 19.62 g, make up to 100 ml with water and dissolve.

2 mol/l magnesium acetate: weigh out 42.89 g, make up to 100 ml with water and dissolve.

20 mg/ml BSA fraction V (molecular biology grade).

0.5 mol/l dithiothreitol (DTT): weigh out 0.771 g, make up to 10 ml with water, dissolve and store at -20°C .

1 mol/l spermidine (N-(3-aminopropyl)-1,4-butanediamine): weigh out 1.273 g, make up to 10 ml with water, dissolve and store at -20°C .

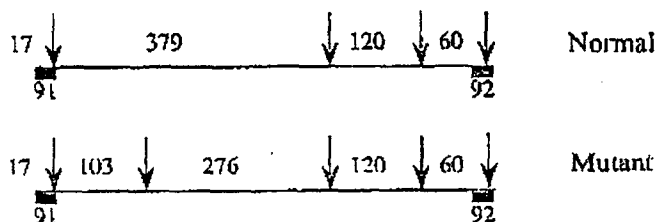
For a 10 times concentrated buffer (10x RE buffer) prepare a solution that is 300 mmol/l Tris-acetate pH 7.5, 660 mmol/l K-acetate, 100 mmol/l Mg-acetate, 1 mg/ml BSA, 10 mmol/l DTT and 30 mmol/l spermidine; aliquot into microcentrifuge tubes and store at -20°C .

PCR "EDTA" buffer : take 3.35 ml of 2 mol/l Tris-HCl pH 8.8, 1.66 ml of 1 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.125 ml of 2 mol/l MgCl_2 , 13.4 μl of 0.5 mol/l Na_2EDTA , 80 μl of 20 mg/ml BSA (molecular biology grade) and 70 μl of 14.3 mol/l β mercaptoethanol and make up to 10 ml with water. Again, this is a 10x buffer, the final concentration of which is 670 mmol/l Tris, 166 mmol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25 mmol/l MgCl_2 , 670 $\mu\text{mol/l}$ Na_2EDTA , 160 $\mu\text{g/ml}$ BSA and 100mmol/l β mercaptoethanol. This buffer is used in conjunction with 10% DMSO in the final reaction mixture.

G6PD Mediterranean

563 C->T 188 Ser->Phe

Exon 6 Mbo II site gained



Oligonucleotide primers 91 and 92 amplify a 583 bp fragment across exons 6 and 7. After Mbo II digestion, the fragment sizes obtained are as shown above

91: 5' CCCCGAAGAGGGAATTCAAGGGGGT 3'

92: 5' GAAGAGTAGCCCTCGAGGGTGACT 3'

These are the oligos currently used in our lab. The underlined bases are deliberate mismatches, introduced to create artificial restriction sites.

PCR CONDITIONS:

"EDTA" buffer is used in conjunction with 10% DMSO (see attached sheet)

All components of the PCR, except for the DNA, are premixed and aliquoted.

After denaturation at 95C for 5 min, 30 cycles of 56C for 1 min, 72C for 1 min, 95C for 1 min, followed by extension at 72C for 5 min.

MBO II DIGESTION:

The "universal" RE buffer (see attached sheet) is simply added to the product of the PCR, and an excess of Mbo II is used

e.g. Take 31µl of the PCR, and add 3.5µl of 10x RE buffer and 0.5µl of Mbo II

The products of this digestion are run on a 2.5% agarose gel that is prepared as a 1:1 mixture of normal (medium FEO) agarose and Nusieve agarose

A photocopy of an example is shown on the back

If any further details are required, please don't hesitate to contact Tom Vulliamy

OSPEDALE MAGGIORE DI MILANO
Istituto di ricovero e cura a carattere scientifico

CATTEDRA DI MEDICINA INTERNA
Università di Milano
Padiglione Litta
Direttore: Prof. G. Fiorelli

20121 Milano, 29.8.89
Via Sforza, 35 - Tel. (02) 5503.1
Reparto tel. 3795
Segreteria: Int. 3792
Fax (02) 551.80.241

To Selim UZUNOGLU
Dokuz Eylül University, Medical Faculty
Medical Biology and Genetics Department
Inciralti/Izmir - Turkey
FAX # (+90--232) 2372442

Dear colleague,

we are very glad to help you in the establishment in your lab of standard G6PD analysis protocols and we hope to satisfy your requests.

G6PD activity determinations

- It is better to determine G6PD activity on freshly-drawn blood samples but, in our experience, there's no significant activity loss within one week from proper storage in K₂EDTA at 4°C.

- In our experience of haemolysate preparation for G6PD determination, a 1:10 dilution of packed RBCs in either 0.02 % digitonin or "lysing solution" followed by a 1:2 dilution in cold saline of 12000 rpm supernatants (final dilution 1:20) gives reproducible results. I've never prepared haemolysates in saponin before, but I guess it is an equally appropriate preparation for G6PD determinations.

- Filtering blood through mixed 1:1 microcrystalline/alpha-cellulose is the standard WHO recommendation to remove "buffy coats" for RBC enzyme determinations. This is a very important step because leucocytes and platelets are the main contaminants in determining G6PD activities in RBCs; in fact G6PD activities in these cell types are much

Ek-3: Milano Üniversitesinde (İtalya) Fisiopatologia Medica, Pad. Litta, Istituto di Medicina Interna e öğretim üyesi M.D. Cappellini ile yapılan yazışmanın cevabı.

higher than in RBCs and if their removal is not complete from erythrocytes you certainly will obtain much higher values in your routine. For this reason any activity measurements of G6PD done in whole-blood haemolysates is unacceptable at all!

Microcrystalline/alpha-cellulose column filtration is, however, a time-consuming procedure, so in our lab we employ a different device to rapidly remove serum and WBCs from whole blood samples: in a 12 mL centrifuge tube, you can stratify a layer of a 1:3 dilution of whole blood in cold saline on 3 vol of 8% sucrose solution and centrifuge at 3000 rpm for at least 10 min. Due to gradient formation, RBCs and reticulocytes are pelleted on the bottom of the tube, while serum and any other cell component is supernatant (remove it quickly!). Now you can wash RBCs in cold saline at least once before lysis. In both these ways you don't deplete any preparation from reticulocytes as happens in manually removing "buffy coats".

In any case, if you decide to employ the filtration step, you can purchase the resins from SIGMA: alpha-cellulose cat.# C-8002 and SIGMACELL Type 50 (microcrystalline cellulose) cat.# S-5504.

- About the use of inhibitors of 6-phosphogluconate dehydrogenase activity in G6PD determination, we can assess that no significant differences are detectable in the presence or absence of such inhibitors in crude haemolysates.

- PCR amplification strategy

- We amplify both G6PD exons VI and VII from phenol-chloroform purified genomic DNA using the following conditions:

oligo B (sense): 5' ACTCCCGAAGAGGGGTTCAAGG 3' (23mer)
oligo J (antisense): 5' CCAGCCTCCCAGGAGAGAGGAAG 3' (23mer).
You can perform this PCR amplification employing 20 picomoles of each primer, 500 nanograms of genomic DNA and 2.5 IU Taq DNA polymerase in a final volume of 50 microliters. This protocol is better accomplished in our lab at the annealing temperature of 55-56°C and 1.5 mM MgCl₂, but these conditions may be different depending on the instrumentation and reagent quality you are using.

- You can perform Mbo II digestion using one-tenth of amplified product in the presence of 10 IU of restriction endonuclease.

PCR undigested fragment length: 547 bp
Normal restriction fragment lengths: 377-119-26-25 bp.
Mutant restriction fragment lengths: 277-119-100-26-25 bp.

-We deliver our primers from Pharmacia Biotech and Mbo II restriction endonuclease from Amersham.

Pharmacia Biotech Europe- Head office
Procordia EuroCentre
Rue de la Fusée 62
B-1130 Brussels, Belgium
Tel.# 32 (2) 7274251
Telefax # 32 (2) 7274269

Amersham (Turkish sales support company)
Nuclear Technology
Tunali Hilmi Caddesi
Buyukelci Sokak N°: 2o Daire 1-2
Kavaklidere - Ankara (Turkey)
tel.# 90 312 468933
90 312 4670950
90 312 4271073.

We hope that these informations may be satisfactory and useful for you to get started in G6PD analysis in your lab; of course we guess you need some time to acquire confidence with these protocols. If you have any kind of problem in working in your lab, you can certainly ask some advise from us, and in the future we can talk about your coming here in our lab to analyse your samples. In any case, we'll be grateful if you let us know about some atypical cases you can find during your G6PD screening.

Sincerely yours.

Lies Coffey

PS Sorry for the delay in answering, but I was off for vacation when your fax arrived.

OSPEDALE MAGGIORE DI MILANO
Istituto di ricovero e cura a carattere scientifico

CATTEDRA DI MEDICINA INTERNA
Università di Milano
Padiglione Littà
Direz. Prof. G. Fioravelli

20122 Milano, ^{25.10.94}
Via Sforza, 35 - Tel. (02) 5503.1
Reperto: Int. 3755
Segreteria: Int. 3752
Fax (02) 551.80.241

To Selim UZUNOGLU
Dokuz Eylül University, Medical Faculty
Medical Biology and Genetics Department
Inciralti/Izmir - Turkey
FAX # (+90--236) 2372442

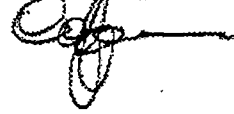
Dear colleague,

after receiving your fax dated 3/10/1994, we examined the published literature about PCR amplification of exons 6 and 7 of G6PD gene and we found the same discrepancies you have detected in your research. Moreover we examined the published sequence of G6PD gene (Chen EY et al. Sequence of human G6PD cloned in plasmids and a yeast artificial chromosome. Genomics 10, 792-800, 1991) and the DATA BANK which both accord to the sequences used in our lab (Ref. 6) and to Ref. (1) and (2).

In conclusion, we suppose that oligo B sequences (3) and (4) contain publishing errors but we don't know if sequence (5) is a result of a new and more correct sequencing. On the other hand, we use successfully the protocol we described you in our previous letter as you can see in the figure enclosed, even if the length of restriction fragments does not correspond completely with the published ones.

Sincerely yours,

M.D. Cappellini



Address for correspondence:
Cappellini Maria Domenica, MD

Istituto di Medicina Interna e
Pneumologia Medica, Pad. Littà,
Ospedale Maggiore Policlinico, IRCCS
via F. Sforza 35,
20122 Milano, Italy
Phone 039-2-55033757/5465571
FAX 039-2-55180241

Ek-4: Milano Üniversitesinden M.D. Cappellini ile Akdeniz mutasyonu taramasında kullanılan farklı primerlerin hangisinin PCR reaksiyonunda daha iyi sonuç verdiği konusunda yapılan yazışmanın cevabı.

Department of Haematology
FAX: 081 742 9335

7th September, 1994

S. Uzunoglu
Medical Biology and Genetics Dept.
Medical Faculty
Dokuz Eylul University
Inciralti / Izmir
Turkey



Hammersmith Hospital
Du Cane Road
London W12 0NN
Tel. 081 743 2440

Dear Uzunoglu,

Thanks for your fax of the 7th of September. I enjoyed your table showing the comparison of the published oligo sequences used for the amplification of exons 6 and 7 of the G6PD gene.

These sequences have evolved over time. I believe that there may be a mistake in the sequence of oligo B in ref 3, in that there should be 4Cs not 3 after the ACT.

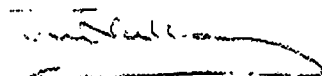
Also, the sequence number 5 (oligo B) should start with 4Cs and not 5Cs as you have it. These "new" oligos, which we call 91 and 92, were designed several years ago now when we were introducing deliberate mismatches into our primers in order to generate artificial restriction sites that could be used for cloning the amplified products prior to sequencing in M13.

We still use these oligos routinely and to reiterate their sequences they are:
number 91 (exon 6, 5') 5' CCCCCAAGAGGAATTCAAGGGGGT 3'
number 92 (exon 7, 3') 5' GAAGAGTAGCCCTCGAGGGTGACT 3'

I am enclosing a small aliquot of these primers for you to try out. But you are right to say that different primers, including those with mismatches, can be used to amplify the same region of DNA. And as such there are no "international standards".

I wish you all the best with your studies. Please let us know how you get on.

With best wishes,


Tom Vulliamy

cc Lucio Luzzatto

Ek-5: Londra Hammersmith Hospital Hematoloji bölümünde araştırmacı Tom Vulliamy ile Akdeniz Mutasyonu taramasında kullanılan farklı primerlerin hangisinin PCR reaksiyonunda daha iyi sonuç verdiği konusunda yapılan yazışmanın cevabı.

Department of Haematology
FAX: 081 742 9335

1st November, 1994

S. Uzunoglu
Medical Biology and Genetics Dept.
Medical Faculty
Dokuz Eylul University
Inciralti / Izmir
Turkey

FAX: 010 90 236 2372442

PAGES: 2



Hammersmith Hospital
Du Cane Road
London W12 0NN
Tel. 081 743 2333

Dear Uzunoglu,

I have just received your second fax. As you see from the attached letter I had replied on the 7th September. This letter was sent by post as it contained an aliquot of the oligos we use to help you get started. Maybe it has gone astray, or maybe it will still reach you in time!

As for your additional questions, we obtain our oligos from Oswell DNA Service, Department of Chemistry, Kings Buildings, West Mains Road, Edinburgh EH9 3JJ Scotland. We obtain Taq polymerase from a number of sources, including Perkin Elmer and Gibco BRL. The nucleotides we obtain from Pharmacia.

I hope this is helpful and that the letter gets to you this time! If I can help any further, please let me know.

With best wishes, and good luck.

Tom Vulliamy

Ek-6: Londra Hammersmith Hospital Hematoloji bölümünde araştırmacı Tom Vulliamy ile Akdeniz Mutasyonu taramasında kullanılan kimyasallar, enzim ve primerin nereden elde edileceğine dair yazışmanın cevabı.



DEPARTMENT OF HUMAN GENETICS

Phone +1 212 639 6165
Fax +1 212 717 3374

November 15, 1994

Selim Uzunoglu
Dokuz Eylul University
Medical Faculty, Medical
Biology and Genetics Dept.
Inciralti
Izmir TURKEY

Dear Uzunoglu:

Thank you very much for your letter dated 1st November. I am sorry if there was delay in my reply but I seem to remember that I referred your letter to my colleague, Dr. Tom Vulliamy and I am sure he did reply in detail on your questions regarding oligonucleotides. I agree with you entirely that you should get everything well in order before wasting money in useless oligos but I can assure that those that we have published work well. I am copying this letter to Tom Vulliamy in case that my memory is wrong. I am very much looking forward to hearing about your results.

With best wishes,

Lucio Luzzatto

cc: T. Vulliamy

*Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
1275 York Avenue, New York, New York 10021*

NCI-designated Comprehensive Cancer Center

Ek-7: Newyork Memorial Sloan-Kettering Kanser merkezinde İnsan Genetiği Bölümünde davetli profesör olarak bulunan Lucio Luzzatto ile primerler konusunda yapılan yazışmanın cevabı.

Department of Haematology
FAX: 081 742 9335

21st November, 1994

S. Uzunoglu
Medical Biology and Genetics Dept.
Medical Faculty
Dokuz Eylul University
Inciralti / Izmir
Turkey

FAX: 010 90 236 2372442

PAGES: 4



HammerSmith Hospital
Du Cane Road
London W12 9NN
Tel 0181 743 2040

Dear Uzunoglu,

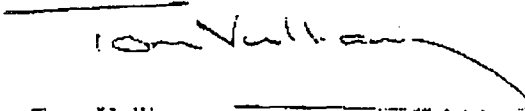
Thank you for your faxes of the 4th and 18th of November. I am wondering whether you ever got my package with the oligos in it. We have currently run a bit low of those two oligos. I will send some to you when we get a new batch, but please confirm to me your postal address.

I am glad to hear that you are making progress with the project. I am sure the Maniatis method will be perfectly adequate for obtaining good DNA. The only warning I give is that the phenol must be of good quality. We use a slightly different protocol, which I attach.

I would be happy to test some DNA samples if you want to send them to me. Please explain how the samples were selected and what data you have on them (assay/electrophoresis; clinical information; ethnic origin) and I will look for the Mediterranean mutation.

I look forward to hearing from you.

With best wishes,


Tom Vulliamy.

Ek-8: Örnek değişimini, primerlerin kontrolünü ve testlerin eksternal kalibrasyonunu ve kontrolünü yapmayı kabul eden Londra Royal Postgraduate Medical School Hematoloji Bölümü (HammerSmith Hospital) yetkililerinden Tom Vulliamy ile yapılan bir yazışmanın cevabı.

Tarih: / / 1995

SAYIN

Kasım-Aralık 1994 döneminde hastanemize gelerek aileniz fertlerinde kalıtsal bir enzim bozukluğu olan **Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) Eksikliğinin** olup olmadığı veya bunun doğrulanması konusunda verdiğiniz kan örneklerinde Türkiyede ve İngilterede yapmış olduğumuz laboratuvar çalışmaları sonucunda isimli aile bireyinde/ bireylerinde klinik açıdan önemli olan ve sınıf 2 grubuna dahil edilen ciddi düzeydeki enzim eksikliği saptanmış ve doğrulanmıştır.

Enzim eksikliği saptanan kişinin, yaşamının diğer dönemlerinde olası hemolitik krizlere yalanmaması için, ekte Türkiye'de ilk defa hazırlanan ve kullanıma sunulan **akut hemolitik kriz önlenim tablosundaki** tavsiyelere uyması gerekmektedir. **Bu tablodaki ilaçlar, maddeler ve yiyeceklerden, ağır seyreden akut hemolitik anemiye yol açabilenler kesinlikle kullanılmamalıdır.** Aksi takdirde bu listedeki ilaç ve yiyecekler vücuda herhangi bir yolla alındığında, ölümcül olabilen kriz ortaya çıkabilmektedir. Bu listeye uygun hareket edildiğinde, ilgili kişinin yaşamında korkulacak herhangi bir ciddi durum söz konusu olmamaktave normal sağlıklı yaşam sürebilmektedir.

Bu hastalık, kalıtsal (irsi) olduğu için, ailenin diğer bireylerinde veya akrabalarda veya ileride sahip olunabilecek çocuklarda da ortaya çıkması söz konusudur. Dolayısıyla enzim eksikliği saptanan ailenin yeni doğan bireylerinde bu hastalık ilk yaşlarda saptanırsa, bilgilendirmeden dolayı bu çocukların krize yakalanma ihtimalleri oldukça düşük olmaktadır.

Başlatmış olduğumuz bu çalışmanın öncelikle akrabalarınıza ve bölgeniz insanına faydalı hale getirilebilmesi için, aile çevrenizden başlayarak akrabalarınızı ve tüm köyünüzü veya yerleşim biriminizi bu hastalık açısından tarama testinden geçirmeyi planlıyoruz. Aile ve akrabalarınızı kapsayan böyle bir çalışmaya destek vermeyi düşünürseniz bize yazabilirsiniz. Aynı şekilde bulunduğunuz yerleşim biriminde(köyde) böyle bir taramanın yapılması konusunda yapabileceğiniz yardımları da bilmek istiyoruz. Çalışma imkanlar ölçüsünde ücretsiz gerçekleştirilecektir.

Bu konuda bizlere yardımcı olup olamayacağınızı telefonla veya mektupla bildirirseniz memnun olacağız. Ayrıca bu hastalık hakkında ilave olarak öğrenmek istediğiniz şeyler olursa her zaman bize telefon veya mektupla ulaşabilirsiniz.

Kan örneği vererek ve ankete katılarak bu çalışmaya gösterdiğiniz ilgi ve desteğe teşekkür eder, sağlıklı ve mutlu günler geçirmeniz temennisıyla selam ve saygılar sunarım.

Selim UZUNOĞLU

ADRES: İş: Selim UZUNOĞLU (veya)
Prof. Dr. Orhan TERZİOĞLU
9 Eylül Tıp Fakültesi , Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı
I. Bina- 2. Kat- İnciraltı- İZMİR
Tel: Direkt: (0232)- 2777777-4602
Santral: (0232)- 2595959 Dahili: 4602-4630

Ev: Tel: Selim UZUNOĞLU (0232)-3889377-3880208
Prof. Dr.Orhan TERZİOĞLU (0232)- 2391440

EK-9: Çalışma Bitiminde Ciddi Düzeyde G6PD Eksikliği Saptanan ve Moleküler Düzeyde Doğrulanmış Kişilere Gönderilen Teşekkür ve Bilgilendirme Mektubu. Bu kişilere mektuba ek olarak Tezin Bulgular Kısmında (Tablo-3.2) Verilen Akut Hemolitik Kriz Önlenim Tablosu da gönderilmiştir.

Tarih: .../...../1995

SAYIN

Kasım-Aralık 1994 döneminde hastanemize gelerek aileniz fertlerinde kalıtsal bir enzim bozukluğu olan **Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz(G6PD) Eksikliğinin** olup olmadığı veya bunun doğrulanması konusunda verdiğiniz kan örneklerinde yapmış olduğumuz laboratuvar çalışmaları sonucunda isimli aile bireyinde/bireylerinde klinik açıdan önemli olan ve sınıf 2 grubuna dahil edilen ciddi düzeydeki enzim eksikliği saptanamamıştır. Klinik açıdan şikayetleriniz var veya devam ediyorsa bu şikayetleriniz, ciddi düzeydeki G6PD eksikliğinden kaynaklanmamaktadır.

Ayrıca aile bireylerinizde saptanamayan ciddi düzeydeki enzim eksikliği hakkında ilave olarak öğrenmek istediğiniz şeyler olursa her zaman bize telefon veya mektupla ulaşabilirsiniz.

Kan örneği vererek ve ankete katılarak bu çalışmaya gösterdiğiniz ilgi ve desteğe teşekkür eder, sağlıklı ve mutlu günler geçirmeniz temennisiyle selam ve saygılar sunarım.

Selim UZUNOĞLU

ADRES: İş: . Selim UZUNOĞLU (veya)
Prof. Dr. Orhan TERZİOĞLU
9 Eylül Tıp Fakültesi , Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı
I. Bina- 2. Kat- İnciraltı- İZMİR
Tel: Direkt: (0232)- 277777-4602
Santral: (0232)- 2595959 Dahili: 4602-4630

Ev: Tel: Selim UZUNOĞLU (0232)-3889377-3880208
Prof. Dr.Orhan TERZİOĞLU (0232)- 2391440

EK-10: Çalışma Bitiminde Ciddi Düzeyde G6PD Eksikliği Saptanmayan Kişilere Gönderilen Teşekkür ve Bilgilendirme Mektubu.

7. KAYNAKLAR

- 1- Levy R.H.(1979). **Glucose-6-Phosphate Dehydrogenases**. Advances in Enzymology. pp:97-192.
- 2- Beutler E.(1994). **G6PD Deficiency**. Blood. Vol.84(11). pp: 3613-3636.
- 3- Kirkman H.N., Wilson W.G., et al. (1980). **Regulation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase.(I.Intact red cells)**. J.Lab.Clin.Med.Vol.95(6).pp:877-887.
- 4- Scott M.D., Zuo L., et al.(1991). **NADPH, Not Glutathione, Status Modulates Oxidant Sensitivity in Normal and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase-Deficient Erythrocytes**. Blood.Vol.77(9).pp:2059-2064.
- 5- Kirkman H.N., Gaetani G.D., et al. (1975). **Red Cell NADP+ and NADPH in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency**. J. Clinical Investigation. Vol.55.pp:875-878.
- 6- Piomelli S.(1987). **G6PD Deficiency and Related Disorders of the Pentose Pathway** (Chapter 19 in Hematology of Infancy and Childhood. Third Edit. Editör: Nathan and Oski) W.B Saunders Comp. London pp:583-612.
- 7- Yoppida A., Lin M.(1973). **Regulation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activity in Red Blood Cells From Hemolytic and Nonhemolytic Variant Subjects**. Blood. Vol.41(6).pp:877-891.
- 8- Halliwell B., Gutteridge J.M.C., et al. (1992). **Free radicals, antioxidants, and human disease:Where are we now?** J.Lab.Clin.Med.Vol.119(6). pp: 598-620.
- 9- Martin B.R(1987). **Metabolic Regulation. A molecular Approach**. Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp:268-280
- 10- Benson P.F ve Fensorn A.H.(1985). **Genetic Biochemical Disorders**. Oxford Üniv. Press. Oxford. pp:386-396
- 11- Luzatto L.(1974). **Genetic Heterogeneity and pathophysiology of G6PD Deficiency**. Brit.J. Haematology.Vol.28. pp:151-157.

- 12- Arese P., De Flora A.(1990). **Pathophysiology of Hemolysis in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency**. *Seminars in Hematology*.Vol.27 (1). pp:1-40.
- 13- WHO Working Group.(1989). **Update: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency**. *Bulletin of WHO*. Vol.67(6) pp: 601-611.
- 14- Vulliamy, T.,Mason,P., ve Luzzatto, L. (1992). **The Molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency**. *Trends in Genetics*. vol.8(1) pp. 138-143.
- 15- Beutler E.(1993). **Study of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: History and Molecular Biology**. *Am. J. Hematology*.Vol.42. pp: 53-58.
- 16- Beutler E.(1990). **Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency**. chapter 58 in *Hematology* edited by Williams W.J et al. International edition. McGraw-Hill, Newyork. pp:591-606
- 17- Beutler,E. (1991). **Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Current Concepts**. *The New England J. Medicine*. vol.324 (3). pp. 169-174
- 18- Belsey M.A.(1973).**The epidemiology of favism**. *Bull.Wld Hlth Org(WHO)* Vol.48 pp:1-13.
- 19- Gaetani G.F., Mareni C.,et al.(1979). **Favism: Erythrocyte Metabolism during Haemolysis and Reticulocytosis**. *B.J. Haematology*. Vol.43.pp:39-48.
- 20- Beutler E.(1990). **The Genetics of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency**. *Seminars in Hematology*.Vol. 27.(2). pp: 137-164.
- 21- Gök O.(1962). **Favizm**. *Uzmanlık Tezi*. İzmir (Dr. Behçet Uz) Çocuk Hastanesi I.Dahiliye Servisi. sh:1-33.
- 22- Kaplan M., Abramov A.(1992). **Neonatal Hyperbilirubinemia Associated With Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Sephardic-Jewipp Neonates:Incidence, Severity, and the Effect of Phototherapy**. *Pediatrics*. Vol. 90(3). pp:401-405.
- 23- Verma M., Singla D., et al.(1990). **G6PD Deficiency in Neonates: A Prospective Study**. *Indian J. Pediatr*. Vol. 57 pp:385-388.

- 24- Persico M.G., Viglietto G., et al.(1986). **Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 5 non-coding region.** Nucleic Acids Research. Vol.14(6) pp: 2511-2522.
- 25- Takizawa T., Huang I.Y., et al.(1986). **Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: Primary structure and cDNA cloning.** Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 83 pp: 4157-4161.
- 26- Martini G., Toniolo D.,(1986). **Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose-6-phosphate dehydrogenase.** EMBO J.Vol.5(8) pp:1849-1855.
- 27- Hirono A., Kuhl W., et al.(1989). **Identification of the binding domain for NADP+ of human glucose-6-phosphate dehydrogenase by sequence analysis of mutants.** Proc.Natl.Acad.Sci.Vol.86. pp:10015-10017.
- 28- Luzzatto L., Battistuzzi G.(1985).**Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase.** (Chapter 4) Advances in Human Genetics. Plenum Publipping Newyork. pp: 217-329.
- 29- Beutler E.(1992). **The Molecular Biology of G6PD Variants and Other Red Cell Enzyme Defects.** Annu. Rev.Med. Vol.43. pp: 47-59.
- 30- Yoppida A., Beutler E.(1983). **G6PD Variants:anotherupdate.** Ann. Hum. Genet. Vol. 47. pp: 25-38.
- 31- Kılınç Y.(1982). **The Incidence of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Cord Blood in Mid-South Part of Turkey.** Ç.Ü. Tıp Fak. Der. Sayı:3 sh:233-236.
- 32- Say B., Ozand P., ve ark. (1965). **Erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Turkey.** Acta Paediatrica Scandinavica.Vol.54 pp:319-324.
- 33- Aksu T.A., Esen F., ve ark. (1990). **Erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (1.1.1.49.) Deficiency in Antalya Province, Turkey: An Epidemiologic And Biochemical Study.** Am. J. Epidemiology. Vol:131 (6).pp:1094-1097.

- 34- Aksoy M., Dinçol G., ve ark.(1980). **Survey on Haemoglobin Variants, β -Thalassaemia, Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Haplotyping Types in Turkish People Living in Manavgat, Serik and Boztepe (Antalya).** Hum.Hered. Vol.30.pp:3-6.
- 35- WHO Report of Advisory Group.(1985). **Community Approaches to the control of hereditary diseases.** WHO publication No: HDP/WG/.85.10. 3-5 October pp:1-47.
- 36- Beutler E., Kuhl W., et al.(1989). **Molecular Heterogeneity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase A-.** Blood. Vol.74(7) pp:2550-2555.
- 37- Vulliamy T.J., D'Urso M., et al.(1988). **Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia.** Proc.Natl.Acad. Sci.Vol.85 pp: 5171-5175.
- 38- Corrons-Vives J.L., Kuhl W., et al.(1990). **Molecular Genetics of the glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Mediterranean Variant and Description of a New G6PD Mutant, G6PD Andalus.** Am.J.Hum.Genet.Vol.47 pp: 575-579.
- 39- Kurdi-Haidar B., Mason P.J, et al.(1990). **Origin and Spread of the Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Variant(G6PD-Mediterranean) in the Middle East.** AmJ.Hum.Genet.Vol 47 pp: 1013-1019.
- 40- Filosa S., Calabro V., et al. (1993). **G6PD Haplotypes Spanning Xq28 from F8C to Red/Green Color Vision.** Genomics.Vol.17. pp: 6-14.
- 41- Stevens J., Wanachiwanawin W., et al. (1990). **G6PD Canton a common deficient variant in South East Asia caused by a 459 Arg->Leu mutation.** Nucleic Acids Research. Vol.18(23).
- 42- Luzzatto L.(1979). **Genetics of Red Cells and Susceptibility to Malaria.** Blood. Vol. 54(5). pp: 961-976.
- 43- Tzoneva M., Bulanov A.G., et al. (1980). **Frequency of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Relation to Altitude: A Malaria Hypothesis.** Bulletin of WHO Vol. 58(4). pp:659-662.

- 44- Roth. E.F. Suarez C.R., et al.(1983). **Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Inhibits in Vitro Growth of Plasmodium Falciparum.** Proc.Natl.Acad.Sci. Vol.80 pp:298-299.
- 45- Roth E.F et al. (1986). **Ribose metabolism and nucleic acid synthesis in normal and G6PD deficient human erythrocytes infected with plasmodium falciparum.** J. Clinical Investigation. vol.77. April. Sh0 1129-1135
- 46- Beutler E., Kuhl W. (1990). **The NT 1311 Polymorphism of G6PD:G6PD Mediterranean Mutation May Have Originated Independently in Europe and Asia.** Am.J.Hum.Genet. Vol.47. pp: 1008-1012.
- 47- Oppenheim A., Jury C.L., et al.(1993). **G6PD Mediterranean accounts for the high prevalence of G6PD deficiency in Kurdish Jews.** Hum. Genet. Vol.91. pp: 293-294.
- 48- Piomelli S., Corapp L.M., et al. (1968). **In Vivo Lability of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in GdA- and GdMediterranean Deficiency.** J. Clinical Investigation. Vol. 47. pp: 940-948.
- 49- Gahr M., Bornhalm D., et al.(1976). **Haemolytic Anaemia due to Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficiency: Demonstration of Two New Biochemical Variants, G6PD Hamm and G6PD Tarsus.** Brit. J.Haematology.Vol.33.pp:363-370.
- 50- Betke K, Beutler E, et al. (1967). **Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase: report of a WHO Scientific Group.** WHO Tech. Rep. Ser. No:366
- 51- Beutler E., Blume K.G., et al. (1977). **International Committee for Standardization in Haematology:Recommended Methods for Red-Cell Enzyme Analysis.** Brit. J. Haematology.Vol.35 pp:331-341.
- 52- Catalano E.W., Johnson G.F., et al.(1975). **Measurement of Erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activity with a Centrifugal Analyzer.** Clinical Chemistry. Vol.21(1) pp:134-138.
- 53- Miller D.R., Kotok D., et al.(1968). **The Micro-methemoglobin Reduction Screening Test for G6PD Deficiency in Childhood.** Pediatrics.Vol.41 (2).pp:528-531.

- 54- Fairbanks V.F., Beutler E.(1962). **A Simple Method for Detection of Erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency.(G6PD Spot Test).** Blood.Vol.20.(5).pp:591-601.
- 55- Beutler E., Blume K.G., et al. (1979). **International Committee for Standardization in Haematology: Recommended Screening Test for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase(G6PD) Deficiency.** Brit.J.Haematology.Vol.43 pp:469-477.
- 56- Hayappi, K. (1992). **PCR-SSCP: A Method for Detection of Mutations.,** GATA. 9(3) pp: 73-79
- 57- Landegren, U. (1992). **Detection of Mutations in Human DNA.** GATA. vol.9(1) pp: 3-8
- 58- Calabro V., Mason P.J., et al. (1993). **Genetic Heterogeneity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Revealed by Single-Strand Conformation and Sequence Analysis.** Am.J. Hum. Genet.Vol.52 pp: 527-536.
- 59- Templeton S.N. (1992). **The polymerase chain reaction: history, methods, and applications.** Diagnostic Molecular Pathology vol.1(1) pp: 58-72
- 60- Beutler E., Kuhl W. (1990). **Linkage between a PvuII restriction fragment length polymorphism and G6PD A-202A/376G: evidence for a single origin of the common G6PD A- mutation.** Hum.Genet.Vol.85.pp:9-11.
- 61- Hirono A., Beutler E.(1988). **Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A (-).** Proc.Natl.Acad.Sci.Vol.85 pp:3951-3954.
- 62- Beutler E., Kuhl W.(1991). **DNA Sequence Abnormalities of Human Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Variants.** J. Biological Chemistry. Vol.266(7) pp: 4145-4150.
- 63- Poggi V., Town M., et al.(1990). **Identification of a single base change in a new human mutant glucose-6-phosphate dehydrogenase gene by polymerase-chain- reaction amplification of the entire coding region from genomic DNA.** Biochem. J. Vol 271 pp:157-160.

- 64- Corcoran C.M., Calabro V. et al. (1992). **Molecular heterogeneity underlying the G6PD Mediterranean phenotype.** Hum. Genet. Vol.88 pp: 688-690.
- 65- Saha N., Ramzan M., et al. (1994). **Molecular Characterisation of Red Cell Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in North-West Pakistan.** Hum Hered. Vol. 44 pp: 85-89.
- 66- Kişisel Yazışma Yoluyla Sağlanan bilgi. Tezin ekler kısmında Kişisel Yazışmalar. Ek.3
- 67- Kişisel Yazışma Yoluyla Sağlanan bilgi. Tezin ekler kısmında Kişisel Yazışmalar. Ek.5
- 68- Beutler E., Kuhl W., et al. (1992). **Prenatal Diagnosis of Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase Deficiency.** Acta Haematol. Vol.87. pp:103-104.
- 69- Meloni T., Forteleoni G., et al. (1992). **Marked Decline of Favism after Neonatal Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Screening and Health Education: The Northern Sardinian Experience.** Acta Haematol. Vol.87 pp:29-31.
- 70- Mallough A.A., Imseeh G., et al. (1992). **Screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency can prevent severe neonatal jaundice.** Annals of Tropical Pediatrics. Vol.12 pp:391-395.
- 71- Akoğlu T., Özdoğu H., ve ark. (1984). **Erythrocyte membrane ATPase activity of G6PD-deficient individuals and the effect of primaquine metabolite (s) on membrane ATPase enzymes.** J. Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 87. pp:219-224.
- 72- Ünlükurt İ., Aksoy K., ve ark. (1993). **Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi ile eser element arasındaki ilişki.** Ç.Ü.Tıp: Fak. Dergisi. C.18.sh:141-145.
- 73- Günay İ., (1993). **Yenidoğan Sarılığında Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Eksikliğinin Rolü.** Uzmanlık Tezi. İzmir (Dr. Behçet Uz) Çocuk Hastanesi. İZMİR
- 74- Yeşilkılıç A. (1987). **Yenidoğan Hiperbilirubinemisinde G6PD Eksikliğinin Kantitatif Değerlendirilmesi.** Uzmanlık Tezi. İzmir (Dr. Behçet Uz) Çocuk Hast. İzmir.

- 75- Kılınç Y., Kümi M. ve ark. (1986). Adana Bölgesinde Doğan Bebeklerde Kordon Kanı Çalışması ile Alfa -Talasemi Glukoz-6 Fosfat Dehidrogenaz Enzim ve Hemoglobin S, Sıklığının Araştırılması. Doğa Tr. Tıp ve Ecz. D. Vol.10(2) sh:162-167.
- 76- Yüreğir G., Aksungur SH: ve ark.(1989). A Survey of High A2 Beta Thalassemia, Hemoglobin Variants, G6PD Deficiency and Iron Deficiency Anemia In Karataş, Çukurova, Southern Turkey. Doğa TU.J.Medical Sciences.Vol.13(3) pp:203-211.
- 77- Akoğlu T. Özer FL., Akoğlu, E (1986). The coincidence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and hemoglobin S gene in Çukurova Province, Turkey. American J. of Epidemiology Vol.123(4) pp:677-680., Türkiye, Adana, Tarsus
- 78- Aksoy K., Yüreğir. G.T., ve ark. (1987). Three new G6PD variants. G6PD Adana, G6PD Samandağ, and G6PD Balcali in Çukurova, Turkey. Hum. Genet.Vol.76 pp:199-201.
- 79- Aksoy M., Kutlar A., ve ark. (1985). Survey on haemoglobin variants, β thalassaemia, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, and haptoglobin types in Turks from Western Thrace. J. Medical Genetics.Vol.22 pp:288-290.
- 80- Aksoy M., Erdem Ş.(1968). Kordon Kanında Talassemik Gruplarda G6PD ve diğer enzimlerin, anormal ve fetal hemoglobinlerle serbest alfa ve beta zincirlerinin ve haptoglobinlerin tayini IV. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz ve Piruvat-Kinaz Problemleri. İstanbul Üniv.Tıp Fak. Mec.Vol.31 sh:39-49
- 81- İzmir, Aydın ve Manisa il sağlık müdürlükleri istatistik Şubelerinden alınan 1992 yılı Raporları.
- 82- Chang J., Chiou S.,et al.(1992). Molecular Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficiency by Natural and Amplification Created Restriction Sites: Five Mutations Account for Most G6PD Deficiency Cases in Taiwan. Blood.Vol.80(4) pp:1079-1082.

- 83- Johnson M. R. et al (1994). **Oxidant damage to Erythrocyte Membrane in G6PD Deficiency: Correlation with in vivo Reduced Glutathione Concentration and Membrane Protein Oxidation.** Blood. Vol. 83 (4) pp: 1117-1123.
- 84- Sambrook J. Fritsch; E.F. and Maniatis T. (1989). **Molecular Cloning: A Laboratory manual.** 2 nd edition. Vol.3. Cold Spring Harbor Lab. Press Newyork.
- 85- Leonard G.D (1986). **Methods in Molecular Biology.** Elsevier Science Publication Newyork Chapter 5. pp: 41-67.
- 86- Baktır, E ve Baktır, G. (1993). **İlaç Rehberi.** Gözlem Yayıncılık Ltd. İstanbul.
- 87- Kişisel Yazışma Yoluyla Sağlanan Bilgi: Tezin ekler kısmında kişisel yazışmalar Ek-2
- 88- Barbette S.S., Versie D.J. et al.(1976). **Modification of Neonatal Screening Test For Erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency.** Clinica Chimica Acta.Vol.71.pp:239-244.
- 89- Solem E., Pirzer C., et al. (1985). **Mass screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency:improved fluorescent spot test.** Clinica Chimica Acta.Vol.152.pp:135-142.
- 90- Fairbanks V.F., Nepo A.G., et al.(1980). **Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Variants: Reexamination of G6PD Chicago and Cornell and a New Variant (G6PD Pea Ridge) Resembling G6PD Chicago.** Blood. Vol.55 (2).pp:216-220.
- 91- Ninfali P., Baronciani L., et al.(1993). **Molecular analysis of G6PD variants in northern Italy: study on the population from the Ferrara district.** Hum.Genet.Vol.92 pp:139-142.
- 92- Beutler E.(1966). **A Series of New Screening Procedures for Pyruvate Kinase Deficiency, Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency, and Glutathione Reductase Deficiency.** Blood. Vol. 28(4).pp:553-562.