

T.C.
DENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KİMYA ANABİLİM DALI

ERİTROSİT G6PD ENZİMİNE AİT
TEMEL LABORATUVAR YÖNTEMLERİ, NORMAL DEĞERLERİ VE
BAZI KİNETİK PARAMETRELERİN BELİRLENMESİ

T450/1-1

UZMANLIK TEZİ

Dr. G.Fügen ESEN

ANTALYA - 1986

İ Ç İ N D E K İ L E R

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
GEREÇ VE YÖNTEM	29
BULGULAR	43
TARTIŞMA	61
ÖZET	96
KAYNAKLAR	100

G İ R İ Ő V E A M A Ğ

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), karbonhidrat metabolizmasının ikincil katabolik yolu olan heksoz monofosfat (HMP) döngüsünün ilk enzimidir⁸¹. Glukozdan enerji sağlama dışında da yararlanma olanağı veren bu döngünün başlıca amacı, hücrelere nükleik asid prekürsörlerinin yanısıra redüktif bir potansiyelin kazandırılmasıdır⁹⁷. G6PD enzimi glukoz metabolizmasının farklı amaçlara yönelik dallanma noktasındaki stratejik pozisyonu nedeniyle metabolik kontrolün düzenlenmesinde önemli bir yere sahiptir⁶³. Enzimin eritrosit metabolizmasındaki önemi ise, bu hücreler için tek redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADPH) kaynağı olan ve onları oksidatif hemolizden koruyan HMP döngüsünü başlatıcı enzim olmasından gelmektedir⁹⁷.

G6PD aktivitesi ilk kez 1931 de Warburg ve Christian tarafından at eritrositlerinde gösterilmiştir⁴⁹. Enzimin eritrosit me-

tabolizmasındaki önemi ise ilk kez 1953 de Chicago Üniversitesinde, zenci askerlerde hemoliz ile sonuçlanan primaquin duyarlılığı üzerine yapılan araştırmalar sonucunda ortaya çıkarılmıştır⁹⁷. Daha sonra çeşitli metabolik ve enfeksiyöz etkenlerin G6PD yetmezliği olan kişilerde hemolize yol açtığı anlaşılmıştır¹⁰⁷.

Enzimin kantitatif aktivitesi ve kalitatif karakteristikleri etnik gruplar ve coğrafi yöreler arasında önemli farklılıklar göstermektedir²⁶. Bugün G6PD yetmezliğinin insanlarda en sık rastlanan klinik öneme sahip genetik bozukluk olduğu¹⁶⁻¹⁸ ve dünyada 300 milyondan fazla kişinin bu anomaliyi taşıdığı düşünülmektedir⁷⁶. Yetmezliğe özellikle Akdeniz ve Doğu toplumlarında olmak üzere subtropikal yörelerde daha sık rastlanmaktadır^{34,97}. Yöremizde de bu anomalinin oldukça sık görüldüğü bildirilmektedir¹¹¹⁻¹¹⁵.

G6PD yetmezliği kendisini başlıca ilaca ve enfeksiyona bağlı hemoliz, favizm, Konjenital nonsferositik hemolitik anemi (CNSHA) ve yenidoğan sarılığı şeklinde göstermektedir⁹⁷. Fötal eritrositlerin oksidan etkenlere daha duyarlı oluşu^{104,132,133} yetmezliğin yenidoğanlarda bir kat daha önem kazanmasına yol açmaktadır.

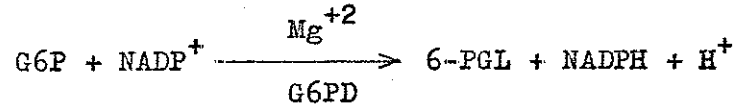
Bu çalışmada yöremizdeki yenidoğanlarda ;

- a- G6PD in kantitatif aktivitesinin ve bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi,
- b- Bu amaçla gerekli yöntemlerin laboratuvarımızda standardize edilmesi ve normal değerlerin saptanması,
- c- Yetmezliğin fötal kan tablosu üzerine olan etkilerinin araştırılması,
- d- Risk altında bulunan yenidoğanların taramasında Floresan spot testin tanı değerinin araştırılması amaçlanmıştır.

G E N E L B İ L G İ L E R

G6PD ve HEKSOZ MONOFOSFAT DÖNGÜSÜ

G6PD, D-glukoz-6-fosfatı (G6P) D-glukano-5-lakton-6-fosfata (6-PGL) yükseltgeyen ve bu sırada NADP^+ ı, NADPH a indirgeyen bir oksidoredüktazdır. Reaksiyon esnasında glukoz-6-fosfatın birinci karbonunda bulunan bir hidrojen ve iki elektron NADP^+ ın nikotinamid halkasına taşınır ve molekül redüklenerek $\text{NADPH} + \text{H}^+$ oluşur. Reaksiyon Mg^{+2} tarafından aktive edilir.



Bu reaksiyon HMP döngüsünün ilk basamağını oluşturmaktadır. HMP döngüsü diğer adıyla pentoz fosfat metabolik yolu sitoplazmada 3, 4, 5, 6 ve 7 karbonlu bileşiklerin birbirlerine dönüşümünden sorumlu çok devirli bir yoldur^{49, 70, 81}.

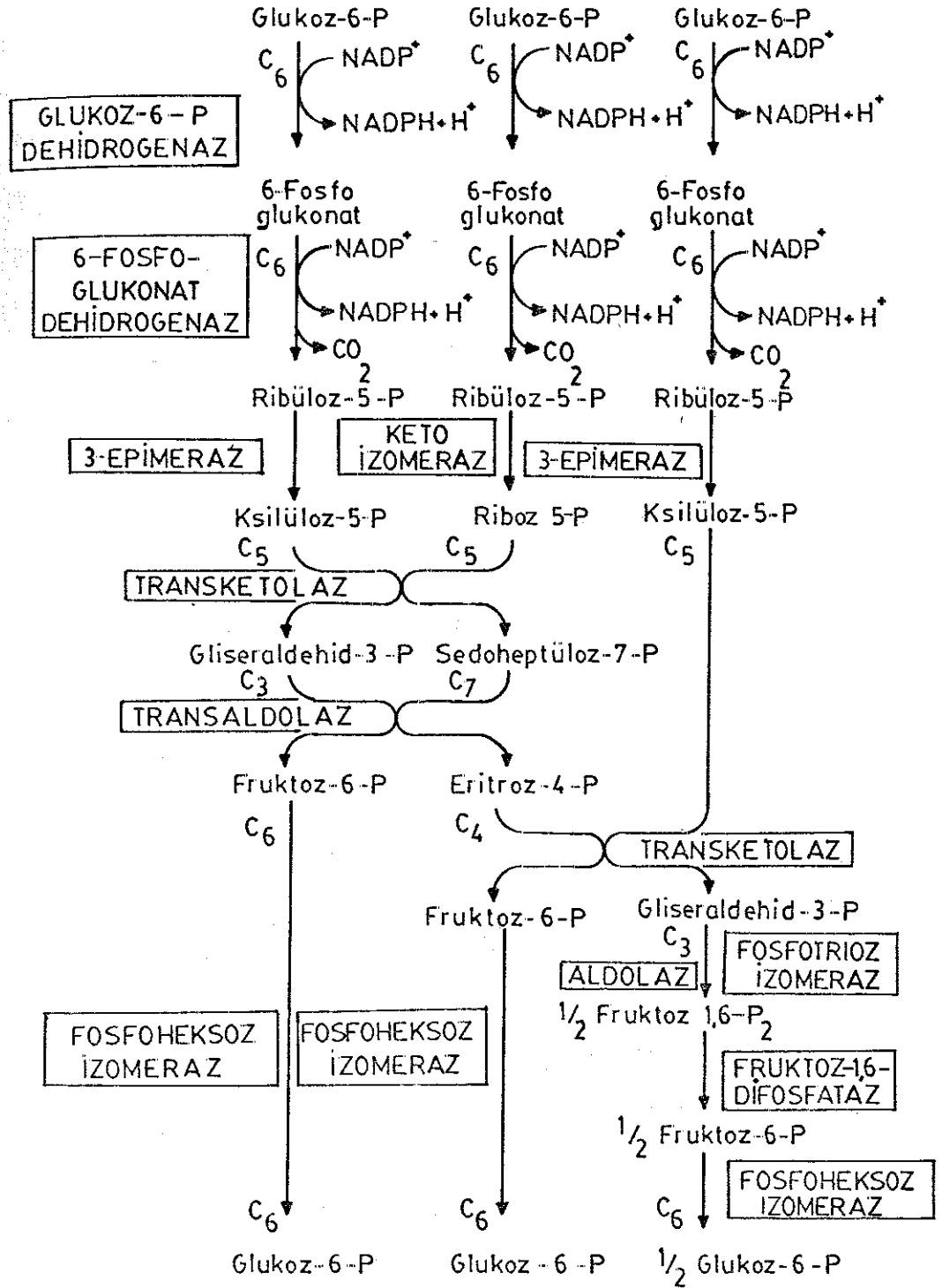
HMP döngüsüne ait reaksiyonlar dizisi başlıca, glukoz-6-fosfatın direkt oksidasyonu ve dekarboksilasyonu ile ribüloz-5-

fosfata, daha sonra bir seri transketolasyon ve transaldolasyon reaksiyonları ile fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehid-3-fosfata dönüşümünü kapsar. Bu iki madde aynı zamanda Embden-Meyerhof yolunun ara ürünleridir ve glikolizi tersine işleten reaksiyonlar aracılığı ile glukoz-6-fosfata rejenere olarak döngüyü yeniden başlatabilirler (Şekil : 1)⁸¹. Böylece HMP döngüsüne giren her 6 mol glukozdan biri tamamen CO₂ e yıkılmakta ve bu sırada 12 mol NADPH oluşmaktadır^{56,70,80,97,118,129}.

Glukozun tam ve direkt oksidasyonuna olanak veren HMP döngüsü, Embden-Meyerhof yolu ve sitrik asit siklusuna alternatif bir yoldur, ancak enerji üretmek için çalışmaz⁷⁰. HMP döngüsünün fizyolojik önemi ara ürün olarak nükleotid ve nükleik asitlerin prekürsörü olan pentoz fosfatları vermesi ve redüktif biyosentezler için gerekli NADPH ı sağlamasıdır. NADPH başlıca yağ asitleri, kolesterol, steroid hormonlar, redükte glutatyon (GSH), bazı aminoasitlerin sentezinde ve methemoglobin redüksiyonunda koenzim olarak görev alır. Aşırı enerji gereksinimi duyulduğunda NAD⁺ yi indirgeyerek NADH dan ATP sentezi yapılmasını da sağlayabilir^{49,56,80}.

NADPH, O₂ ile direkt oksidasyona NADH dan daha az eğilimli olduğundan intrasellüler komponentlerde redüksiyonun sağlanmasında daha değerlidir⁹⁷. Böylece mitokondri dışında redüktif bir güç oluşmakta ve bu güç hücreyi oksidan stresslere karşı korumaktadır^{70,118}.

HMP döngüsünün bütün enzimleri sitoplazmada yer alır. Redüktif bileşiklerin çok miktarda sentezlendiği adrenal korteks, yağ dokusu, süt veren meme bezi, testis, karaciğer, tiroid bezi ve eritrositlerde çok aktiftir^{70,129}.



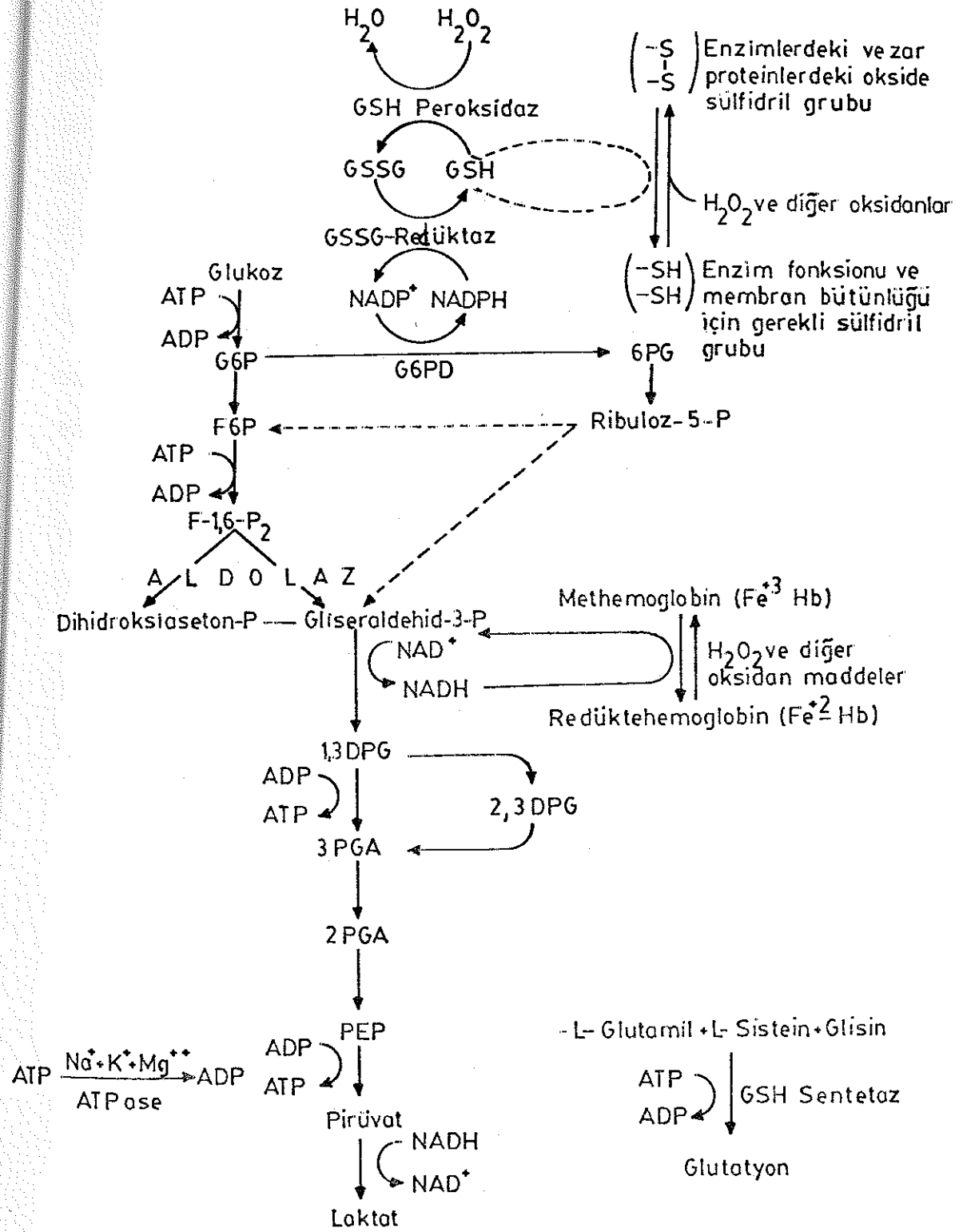
Şekil 1 : Heksoz monofosfat döngüsü ve Embden-Meyerhof yolu ile bağlantısı

ERİTROSİT BİYOKİMYASI

Normoblast ve retikülositin aksine, nükleus, ribozom ve mitokondrisini kaybetmiş olan olgun eritrositin metabolik aktivitesi anaerobik glikoliz ve HMP döngüsü ile sınırlıdır (şekil : 2). Bu nedenle, fizyolojik fonksiyonu ve yapısal bütünlüğü için gerekli olan ve daha önceden sentezlenmiş olan birçok dayanıksız bileşiği yaşamı boyunca korumak zorundadır. Bu sınırlı metabolizması ona ancak 120 günlük bir yaşam süresi tanımaktadır^{17,58,132}.

Glikolitik yol başlıca, katyon pompası ve membran devamlılığının sağlanması için ATP sentezi, methemoglobin redüksiyonu için NADP sentezi ve dokularda hemoglobinden O_2 serbestleşmesinde etkili olan 2, 3-difosfogliserat sentezinden sorumludur^{58,132}.

HMP döngüsü ise, yüksek oksidasyon potansiyeline sahip eritrositin otooksidasyondan korunması için gereksimi olan redüktif gücün kaynağı oluşturur^{42,48}. Mitokondrilerinin kaybıyla aerobik bir oksidatif yoldan yoksun bırakılmış olan eritrosit NADPH üretimi için HMP döngüsüne bağımlıdır^{42,58,60,97,133}. NADPH redükte glutatyon sağlamak için glutatyon redüktazın kofaktörü olarak çalışır^{58,133,141}. GSH çeşitli hücre elemanlarına göre daha kolay okside olma eğiliminde olduğundan, redükte sülfidril grubu (-SH) taşıyan elemanları oksidasyondan korur. Böylece -SH grubu taşıyan bazı enzimler, membran lipoproteinleri ve hemoglobinin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü sağlanır^{17,49,58}. GSH ayrıca, H_2O_2 ve diğer serbest oksijen radikallerinin redüksiyonu için gereklidir^{48,133}. Bütün bunlar GSH ve dolayısıyla NADPH ın sürekli rejenerasyonunu gerektirir ki bu da glukozun HMP döngüsü üzerinden metabolizması ile sağlanır.



Şekil 2: Eritrosit metabolizması ve biyokimyasal olayların birbirleri ile ilişkisi ^{17, 58, 118}

G6PD ın YAPISAL VE KİNETİK ÖZELLİKLERİ

Genel olarak metabolik yolların başında ve dallanma noktalarında bulunan enzimler, birden fazla alt birimden oluşan kuartet yapıya sahiptir. Alt birimlerinin birleşme-ayrılma özellikleri bu enzimlerin içinde buldukları metabolik yol üzerinde düzenleyici görev yapmalarını sağlar^{81,118}.

G6PD alt birimlerden oluşmuş polimer bir moleküldür^{9,28,41,49,61,63,76,97,118,137}. Alt birimler aynı molekül büyüklüğüne sahiptir^{102,118}. Ancak insan eritrositlerinde enzimin N-ucu amino asitlerinin alanin ve/veya tirozin olarak bulunması^{98,118} ve poliakrilamid jel elektroforezi^{9,102} ve izoelektrik çöktürme⁴¹ yöntemleri ile birden fazla band vermesi, alt birimlerin homojen olmayıp yapısal farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur⁴⁹.

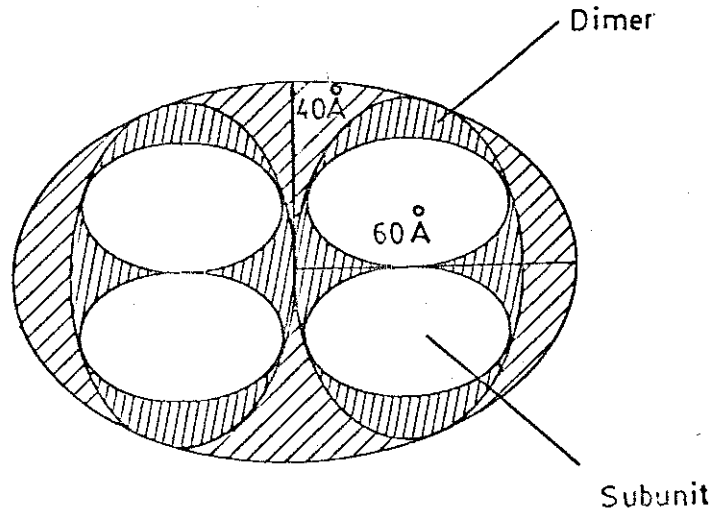
Enzim, içinde bulunduğu ortamın pH, protein ve NADP^+ konsantrasyonları ve iyonik gücüne bağlı olarak değişik oligomerik formlarda bulunur^{133,137}. Enzimin aktivite gösterebilmesi için en az dimer yapıda bulunması gerekir. Hücre içinde çoğunlukla dimer-tetramer karışımı halinde bulunur^{76,97}. En aktif formun heksamer yapıda olduğu bildirilmiştir^{49,118}. Tetramer yapıya ait geometrik bir hipotetik model şekil 3 de görülmektedir¹¹⁸.

Enzimin monomer formu NADP^+ bağlamaz. Bu şekliyle enzim substratına bağlanamayacağından inaktiftir^{118,137}. Enzimin aktif formunda yapısal NADP^+ bulunur. Enzim molekülünde NADP^+ için birden fazla bağlanma yeri vardır ve ilk bağlanan NADP^+ , enzimde aktiviteyi arttıracak bir modifikasyon yapar^{9,76,97,118}. NADP^+ enzimin aktif polimerizasyonu ve kararlılığı için gereklidir^{28,97,98,118}. NADP^+ nin enzim yüzeyinden alınması, oligomerik enzimin inak-

tif monomerlerine ayrışmasına ve NADP^+ ye karşı affinitesinin düşmesine yol açmaktadır. Ancak NADP^+ konsantrasyonlarının artırılması enzim molekülünde NADP^+ ye karşı daha yüksek affinite gösteren yapısal değişikliklere yol açarak enzimi reaktive etmektedir^{8,49,76,97,98,137}. Veriler NADP^+ saturasyon eğrisinin sigmoidal olduğunu göstermektedir⁹⁷. Enzim NAD^+ yi de koenzim olarak kullanabilmekte¹ ancak bu durumda aktivitesi normalin % 4-10 u kadar olmaktadır^{49,118}.

Enzimin doğal substratı D-G6P dır. G6P ile saturasyon eğrisi hiperbolik olup Michaelis-Menten kinetiğine uymaktadır. Enzimin G6P ile saturasyonu onu alt birimlerine ayrışmaktan korumaktadır⁷. Enzim 2-deoksi G6P, Gal-6-P ve F6P ı da düşük aktivite göstererek okside edebilmektedir¹¹⁸.

Fizyolojik şartlarda eritrositlerde enzimin başlıca inhibitörleri NADPH ve ATP dır. ATP enzimi G6P ile NADPH ise NADP^+ ile yarışmalı olarak inhibe etmektedir¹³⁷. NADPH kuvvetli bir inhibitör olmasına karşın NADP^+ düzeyinin çok düşük olduğu durumlarda enzimi tetramer yapıda tutarak aktif şekilde kalmasını sağlayabilir^{49,118}.



Şekil 3 : NADP^+ ye bağımlı G-6-PD'in tetramer yapısı¹¹⁸.

G6PD AKTİVİTESİNİN VE HMP DÖNGÜSÜNÜN KONTROLÜ

G6PD aktivitesi başlıca intrasellüler $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ oranı ile kontrol edilmektedir^{49,65,76,118,137}. Bunun dışında alınan besinler, hormonal denge ve enzimin genetik varyant şekli aktivitenin düzenlenmesinde etkilidir^{49,77}.

G6PD aktivitesi NADP^+ konsantrasyonları ile doğru, NADPH konsantrasyonu ile ters orantılı olarak değiştiğinden ve normal eritrositlerde nükleotidlerin hemen hepsi redükte formda olduğundan, normal şartlarda enzim maksimum aktivitesinin % 0.1-0.2 hızıyla çalışmaktadır^{65,137}. Hücre içinde NADP^+ ve NADPH ın total konsantrasyonları sabit olduğuna göre, NADPH ın azalması NADP^+ nin artması ile birlikte ve her iki durumda G6PD ı stimüle eder⁷⁶. Hücrede NADPH ın azalmasına yol açan bir oksidatif stresin oluşmasıyla :

- NADP^+ konsantrasyonu ve enzimin NADP^+ ye karşı affinitesi artmakta

- NADPH ın inhibitör etkisi kalkmakta

-Enzim aktive olarak V_m değeri aniden artmakta

-HMP döngüsünün tetiği çekilmekte

-G6P konsantrasyonu azalmakta

-Hekzokinaz uyarılmakta ve daha fazla glukozun kullanımına yol açılmaktadır. Meydana gelen bu değişimler HMP döngüsü üzerinden glukoz oksidasyonunu arttırarak hücre lehine NADPH ın hızla rejenerasyonu ile sonuçlanır. G6PD aktivitesi yeniden inhibe olur ve HMP döngüsü tekrar neredeyse inaktif durumuna döner⁹⁷.

Normal şartlarda glukozun % 10 kadarı HMP döngüsünde kullanılmaktadır^{17,28,29,48,58,137}. Ancak NADPH ın oksidasyonuna yol

açan herhangi bir redoks stres karşısında, G6PD aktive olarak, glukozun HMP döngüsü üzerinden metabolizmasını arttırmaktadır^{48,97,137}. Bu durumda HMP döngüsünün akım hızı heksokinaz aktivitesinin kontrolü altındadır. Çünkü normal şartlarda hücre içinde G6P konsantrasyonu G6PD ın saturasyon değerlerinin çok altındadır⁹⁰. Özellikle oksidan stres karşısında enzimin yeterli aktivite gösterebilmesi için heksokinaz tarafından daha fazla glukozun fosforilasyonuna gereksinim vardır. G6PD potansiyel aktivitesine sahip hücreler artmış olan bu metabolik akımla kolaylıkla başa çıkabilirler. Bununla birlikte yetmezlikli hücrelerde G6PD aktivitesinin hızı sınırlı kalacağından glukozun HMP döngüsüne akımı ve NADPH rejenerasyonu çok az veya hiç olmayabilir⁹⁷. Bu durumda döngünün akım hızı G6PD aktivitesi ile sınırlıdır^{12,90}.

G6PD aktivitesini etkileyen bir diğer faktörde eritrositin yaşıdır. Enzim aktivitesi eritrosit yaşına bağımlı olarak giderek düşmektedir^{9,28,35,45,77,80,102,103,135}. Bu düşüş yarı ömrü 62 gün olan eksponansiyel bir hız göstermektedir^{97,99,116,126,129}. Yine yenidoğanlarda aktivite erişkinlerden yüksek^{41,43,51,68,71,126}, yaşlılarda ise düşüktür⁹⁹. Enzim yaşlanmasından enzime bağlanan NADP⁺ miktarının yaşa bağımlı olarak azalması sorumlu tutulmaktadır⁹. Buna, eritrositin yaşlanması ile NADP⁺ nin NADP-az enzimi tarafından parçalanması^{28,80}, ve yaşlı enzimin NADP⁺ ye karşı affinitesinin azalması⁹ yol açar. Çok az veya hiç protein sentezi yapamayan eritrositte, eritrositin yaşlanması ile enzim aktivitesindeki düşüş, protein sentezi yapabilen diğer dokulara göre daha fazla olmaktadır⁸⁰.

G6PD, mikrozomal NADP-glukohidrolaz, solubl NADP-pirofosfat ve henüz izole edilmemiş bir protein tarafından inaktive olur⁴⁹.

YETMEZLİKLİ ERİTROSİTİN BİYOKİMYASAL DEFEKTİ

G6PD yetmezliği, mutant enzimin intrasellüler aktivite sınırlılığının yol açtığı bir ürün (NADPH) yetmezliği olarak tanımlanabilir⁶⁵. Bu ürün yetmezliğinin eritrositlerdeki sonucu oksidatif hemolizdir⁴⁸.

Eritrositlerde oksidatif hasarın en iyi bilinen etkisi hemoglobinin üzerinedir. Hemoglobinin oksidasyona duyarlılığı iki şekilde olmaktadır. Birincisi hemgruplarının oksidasyonu ile methemoglobin oluşumu, ikincisi ve daha önemlisi globinin sisteinil yan zincirlerinde sülfidril gruplarının oksidasyonu ile disülfid köprülerinin oluşumudur. Bu ikinci etki ile molekülün tetramer yapısı bozulmakta ve polipeptid zincirleri gözülerek çökmektedir. Bu denatüre olmuş globin kitlesi (Heinz body) membran sülfidril gruplarıyla disülfid köprüleri oluşturmaktadır. Bu gibi inklüzyonları içeren eritrositler fleksibilitelerini kaybederek rijidleşmektedirler. Retiküloendotelial sistemden özellikle dalaktan geçerken bu intrasellüler inklüzyonların fagositoz yoluyla alınması membranda parça kaybına, hatta eritrositin tamamen parçalanmasına yol açmaktadır⁴⁶
48,59,97,132.

Oksidatif hasarın ikinci etkisi membran sülfidril grupları üzerine olmaktadır. Bu grupların oksidasyonu spektrin, globin, ve diğer membran ve sitoplazma proteinlerinin disülfid köprüleri ile bağlanarak çökmesine ve membran deformabilitesinin kaybıyla eritrositin yıkımına yol açmaktadır^{6,10,33,133}.

Ayrıca oksidan stres membran lipidlerinin peroksidasyonu yoluyla hemolize neden olmaktadır^{10,58,59}.

G6PD YETMEZLİĞİNİN GENETİĞİ

G6PD enziminin sentezinden sorumlu gen insan ve diğer memelilerde X kromozomu üzerinde bulunur^{16,58,61,76,86,97,121,124,130,133,137}.

G6PD geninin X bağlantısı ilk kez 1958'de Childs ve arkadaşları tarafından gösterilmiş, bundan sonra birçok araştırmacı tarafından X kromozom haritasının çıkarılmasında bir genetik marker olarak kullanılmıştır^{28,76,97}. X kromozom haritasında G6PD lokusu, uzun bacağın subterminal parçasında, deuteranopia, protonopia ve Faktör VIII'e ait lokusları içeren genler kümesi içinde lokalizedir^{58,97,124}.

X'e bağlı kalıtım kalıbının sonucu olarak defekt erkeklerde tam olarak ortaya çıkar. Erkekler yalnızca bir X kromozomuna sahip olduklarından G6PD enzimi için ya hemizigot normal, ya da hemizigot yetmezlikli olacaklardır. Kadınlar ise iki X kromozomu taşıdıklarından, homozigot normal, homozigot yetmezlikli veya heterozigot olabilirler^{97,124,133}. Bugün G6PD enziminin kalıtımı X'e bağlı resesif olarak kabul edilmekle birlikte¹⁰⁸, heterozigotların fenotipik görünümleri açısından bu kalıtım şeklinin tipik kalıbına uymamaktadır¹²⁴. Çünkü bunlar, bu bozukluk için yalnızca taşıyıcı olmayıp klinik olarak değişik şiddetlerde yetmezlik gös-

termektedirler^{16,17,97,133}. 1962 de Beutler heterozigot genotipin farklı fenotipik görünümünün açıklanmasında Lyon tarafından öne sürülen X-inaktivasyon hipotezini kullanmıştır¹⁶. Bu hipotezin 3 varsayımı şöyledir⁹⁷:

1- Kadınların her bir hücresinde iki X kromozomundan yalnız-biri aktif, diğeri uyku halindedir.

2- İki X kromozomundan hangisinin inaktif kalacağı erken gelişim safhalarında rastgele tayin edilir.

3- Her bir hücrenin çoğalmasında, aynı X kromozomu bundan sonra inaktif kalır.

Lyonizasyonun sonucu olarak heterozigot bir kadının her hücresinde enzim aktivitesi eşit derecede azalmış bulunmaz. Aynı kişide biri normal aktivite gösteren diğeri yetmezlikli iki hücre popülasyonu vardır (hücresel mozaizm)^{131,11,16,17,92}. Heterozigot kadınlarda iki ayrı hücre popülasyonunun varlığı eritrosit ve fibroblastlarda histokimyasal metodlarla gösterilmiştir^{97,104}. Daha açıklayıcı bulgular heterozigotlarda elektroforetik olarak iki farklı mobilitede enzimin gösterilmesi ile sağlanmıştır. Hücre klonlarında bir veya diğeri tipten enzim bulunmakta fakat hiçbir zaman ikisi birden bulunmamaktadır. Bu bulgu Lyonizasyonun somatik hücre klonlarında yalnızca bir alelin kendini göstermesine izin verdiğini ispatlar^{61,97,121}. G6PD heterozigotlarda hücresel mozaizmin gösterilmesi ve hücre klonlarında yalnızca bir X e ait fenotipin ortaya çıkması bu enzimin tümör hücrelerinin klonal orjinlerinin araştırılmasında işaretleyici olarak kullanılmasına olanak vermiştir^{16,28,39,93,97,133}.

Teorik olarak heterozigot bir kadının eritrositlerinin % 50

sinin normal, % 50 sinin yetmezlikli olması beklenir. Ancak, her kişide yetmezlikli ve normal hücrelerin göreceli oranı rastgele tayin edildiğinden, bazı kişilerde normal bazılarında ise yetmezlikli hücrelerde artış vardır. Tipik bir çan eğrisi veren bu dağılımın uç noktalarında, hücrelerden bir tip çok artmış olarak bulunabilir ve kadın tamamen normal veya yetmezlikli olarak görülebilir^{37,92,97,104}.

Heterozigot bir kadında bir veya diğer tipten eritrositlerin en son yüzdesinin postinaktivasyon seleksiyonu sonucunda belirlendiği düşünülmektedir. Bir X kromozomu üzerinde selektif değere sahip diğer genlerin G6PD geni ile birlikte bulunuşu, o X kromozomunun aktif kaldığı hücreler için avantajla sonuçlanacaktır. Yani selektif mekanizmaların varlığı bir veya diğer tipten eritrositlerin yüzdesini etkileyecektir. Bu etki Lyonizasyonla birleştiğinde heterozigotlarda bir veya diğer tipten hücrelerin kişiler arasında gösterdiği farklılığı açıklayabilir^{16,92,97}.

GENETİK HETEROJENİTE VE VARYANTLAR

G6PD yetmezliği normal enzimin yokluğu veya sentezinin azalması değil, mutant enzimin yapısal olarak anormal oluşunun sonucudur^{30,77,133}. G6PD lokusunda X geninin hipermutabilitesi birbirlerinden kalitatif ve kantitatif özellikleri ile farklı çok sayıda mutantın doğmasına yol açmaktadır^{16,28,34,90,97}. Mutantların çoğunun moleküler yapısındaki anomaliler kesin olarak bilinmemektedir. Henüz yalnızca 3 mutantın (GdA^+ , $Gd^{Hektoen}$, $Gd^{Frankfurt}$) tek amino asid yer değişimine bağlı olduğu gösterilmiştir¹³³.

Bugüne kadar bilinen mutantların hemen hepsinin yapısal gendeki nokta mutasyona bağlı olduğu kabul edilmektedir^{8,77,89,133}.

Yapısal gendeki mutasyon sonucu enzim molekülünün primer yapısının değişmesi : enzim molekülünün yıkım hızının artmasına ($Gd A^-$)⁸, katalitik etkinliğinin azalmasına ($Gd^{Portroyal}$)⁷⁷, veya her iki anomalinin birarada bulunmasına ($Gd^{Akdeniz}$)⁸⁹ yol açmaktadır. Bazen de enzimin biyolojik aktivitesi normal olarak kaldığı halde yalnızca bazı fiziksel özelliklerinin değişmesi ile ($Gd A^+$)¹³⁸ sonuçlanmaktadır. Henüz G6PD için özgün bir regülatuvar genin varlığına veya buna ait mutasyona dair kesin bir kanıt yoktur^{8,77}.

Farklı mutantlar, eritrosit enzim aktivitelerine ve klinik gösterimlerine göre 5 grupta sınıflandırılırlar¹³⁸ :

- 1- Kronik non-sferosifik hemolitik anemi (CNSHA) ile seyreden ciddi enzim yetmezliği
- 2- Ciddi enzim yetmezliği (Aktivite < % 10)
- 3- Hafif-orta şiddette enzim yetmezliği (aktivite : % 10-60)
- 4- Normal veya çok hafif enzim yetmezliği (aktivite: % 60-150)
- 5- Artmış enzim aktivitesi (aktivite % > 150)

1. gruba giren varyantlar değişik şiddetlerde fakat her zaman klinik olarak belirgin hemoliz gösterirler. 2 ve 3. gruba giren varyantlar yalnızca oksidan ajanlarla karşılaştıklarında akut hemolitik ataklarla seyrederekler. 4 ve 5. gruba giren varyantlar klinik öneme sahip değildir^{97,133}.

Bu sınıflamada gruplar arasında kesin bir ayırım yapmak mümkün değildir¹³⁸. Çünkü enzim aktivitesinin düzeyi klinik tabloyu etkileyen tek karakteristik değildir. Ayrıca enzimin optimal deney şartlarında ölçülen in vitro aktivitesi, onun değişik fizyolojik ve patolojik şartlar altında hücre içindeki aktivitesini doğru olarak yansıtamaz^{57,77,133,137}.

Hücre içinde NADP^+ nin düşük, NADPH ın yüksek olduğu fizyolojik şartlarda G6PD aktivitesi mutant enzimin bu metabolitlere karşı afinitesine ($K_m \text{NADP}^+$ ve $K_i \text{NADPH}$) bağımlı olduğundan, eğer kinetik parametreler uygunsa, çok düşük düzeylerde enzim bile eritrositin yaşamını sürdürmek için yeterli olabilmektedir. Ama enzim kinetiği uygun değilse eritrosit yaşamını sürdürememektedir. Ancak oksidan stres karşısında NADP^+ nin artıp NADPH ın azalması ile enzim maksimum hızına yakın aktivitede çalıştığından bu durumda kinetik parametreler görelî olarak önemini kaybetmekte ve eritrositin yaşamı NADPH üretebilecek total enzim miktarına bağlanmaktadır. Bu nedenle bazı varyantlar yalnızca oksidan ajanlarla karşılaştıklarında akut hemolize uğramalarına karşın, bazıları değişik şiddetlerde kronik hemolizle seyrederekler^{76,77}.

Bugüne kadar G6PD nin hepsi allelik olan 150 den fazla mutanti tanımlanmıştır^{131,97}. Bunların çoğu bazı ailelere ve küçük etnik gruplara özeldir. Bazı mutantlara bazı popülasyonlarda sık rastlanmaktadır.

Tüm popülasyonlarda en yüksek prevalansa sahip Gd B^+ normal enzim standardını temsil eder¹³³. Gd B^- bununla aynı elektroforetik mobiliteye fakat çok düşük enzim aktivitesine (normalin % 3 ü kadar) sahip bir mutanttır^{131,77}. İlk olarak 1964 de Kirkman ve arkadaşları tarafından güney Akdeniz halkında tespit edildiği ve bu yörede yaygın olarak bulunduğu için " $\text{Gd}^{\text{Akdeniz}}$ " de denmektedir⁹⁷. Gd B^- mutantında temel patoloji, enzim molekülünün hem spesifik aktivitesinin hem de invivo stabilitesinin şiddetle düşük oluşudur⁸⁹. Bu varyant aktivitesindeki düşüklüğü substratlarına karşı afinitesinin yüksekliği ile bir miktar kompanse ederek normal şartlarda

belirgin hemoliz göstermemektedir^{77,107}. Ancak CNSHA ile seyreden olgularda bildirilmiştir^{17,21,34}. Gd B⁻ tek bir defekt olmayıp, elektroforetik ve kinetik özellikleri birbirinden farklı birçok alt gruba (Gd^{Athens-Like}, Gd^{Union}, Gd^{Menorca}, Gd^{U-M}, Gd^{Orchomenos}, Gd^{Corinth}) ayrılmaktadır³⁴.

Gd A⁺ Amerikan zencilerinin % 20 sinde bulunan normal kinetik karakteristiklere, normale yakın enzim aktivitesine (normalin % 80-100 ü kadar) fakat hızlı elektroforetik mobiliteye sahip bir varyanttır^{7,130,97,138}. Gd A⁺ nın Gd B⁺ daki asparajin amino asidinin aspartik asid ile yer değiştirmesi sonucu ortaya çıktığı gösterilmiştir^{49,97}.

Gd A⁻ yine zenci ırkta sık görülen Gd A⁺ ile aynı elektroforetik mobiliteye sahip ancak aktivitesi oldukça düşük (Normalin % 15 i civarında) unstabil bir varyanttır. Bu varyantın Gd B⁺ daki bir başka amino asid yer değişimine bağlı olduğu⁷ veya Gd A⁺ daki ikinci bir amino asid yer değişimi sonucunda ortaya çıktığı⁸ düşünülmektedir. Bu varyantta yeni sentezlenmiş enzimin aktivitesi normaldir. Ancak amino asid yer değişimine bağlı olarak kuarterner yapısının değişmesi⁷⁷ ve intermoleküler disülfid bağları oluşturmaya eğilimli olması^{8,89} nedeniyle stabilitesi azalmıştır. Eritrositlerdeki yarı ömrü yalnızca 13 gündür^{77,97}.

A ve B dışındaki varyantlar buldukları yörenin coğrafi isimleri ile tanınırlar. Bunların çoğunda yetmezlik görülmele birlikte, bazılarında aktivite normal veya hafifçe düşüktür¹³⁰.

G6PD YETMEZLİĞİNİN COĞRAFI DAĞILIMI

Bugün dünyada 300 milyondan fazla kişinin G6PD yetmezliğine sahip olduğu sanılmaktadır⁷⁶. Varyantların coğrafi dağılımı incelendiğinde Orta Afrika'da Gd A⁻, Kuzey Afrika'da Gd^{Debreusse}, Ak-

deniz ülkeleri ile Orta ve Uzak Doğu'da Gd B⁻, Güney Asya'da Gd^{Can-}ton başta olmak üzere, G6PD yetmezliğinin özellikle tropikal ve subtropikal yörelerde yoğunlaştığı görülmektedir^{11,130,97,133}. Bu dağılım, tropikal alanlarda defektif enzimin dezavantajlarına rağmen çoğalmasını sağlayan selektif faktörler olduğunu düşündürmüştür⁹⁷. Bu yörelerde yapılan epidemiyolojik araştırmaların, G6PD yetmezliğinin bugünkü coğrafi dağılımı ile geçmişteki malaryal enfeksiyonunun kuvvetle superimpoze olduğunu göstermesi, bu defektin malaryaya karşı koruyucu etki sağladığı hipotezini ortaya çıkarmıştır. Gerçekten de Plasmodium falciparum'un insan eritrositleri ile kültürü, parazit gelişim hızının G6PD aktivitesi ile doğru orantılı olduğunu göstermiştir^{131,23,28,44,97,100,133}.

G6PD YETMEZLİĞİNİN KLİNİĞİ

G6PD yetmezliğinin klinik gösterimleri 3 başlık altında toplanabilir. Bunlar : Akut kazanılmış hemolitik anemi, konjenital non-sferositik hemolitik anemi ve favizmdir⁹⁷.

AKUT KAZANILMIŞ HEMOLİTİK ANEMİ

G6PD varyantlarının sınıflamasında 2 ve 3. grup kapsamına giren ve Gd^{Akdeniz} ve Gd A⁻ nin en yaygın örneğini oluşturduğu bu varyantlar normal şartlarda herhangi bir klinik bulgu vermezler. Ancak dikkatli hematolojik incelemeler, herhangi bir oksidan etkenin bulunmadığı bazal şartlarda dahi klinik olarak önemsiz kronik bir hemolizin varlığını desteklemektedir^{14,96,97}. Bu gruptaki kişiler herhangi bir redoks strese maruz kaldıklarında ise oksidan ajanın doğasına ve mutant enzimin kalitatif ve kantitatif özelliklerine bağımlı olarak değişen şiddetlerde hemoliz göstermektedirler. Sorumlu faktör ne olursa olsun, akut hemoliz, mutant enzimin

HMP döngüsünde gerekli olan ani metabolik dalgalanmayı yapamamasının bir sonucudur⁹⁷.

Sorumlu ajanın tatbikinden sonra, hemolitik olay birkaç saat ya da 2-3 gün içerisinde ortaya çıkar. Hasta ani olarak gelişen halsizlik, solukluk, idrar renginde koyulaşma, daha ciddi durumlarda sırt ve karın ağrıları, sarılık, hatta dolaşım yetmezliği şikayetleri ile başvurur^{131,133}. İntravasküler oksidatif hemolizin sonucu olarak "Heinz body" oluşumu ile birlikte anemi, retikülositoz, hemoglobinemi ve hemoglobinüri vardır⁹⁷.

Periferik yaymada polikromazi ve nonspesifik anizositoz, poikilositoz görülür. Kısa bir süre sonra "Heinz body" içeren eritrositler yerlerini oksitlenmiş hemoglobin ve membranı fagositoz yoluyla alınmış hücrelere (pincer cell, bite-cell, eccentrocyte) bırakırlar^{45,97,108}.

Gd A⁻ varyantında hemolizin şiddeti orta derecede olup eritrositlerin % 20-30 u ile sınırlıdır. 7-10. günlerde retikülosit cevabının maksimuma ulaşması ile akut hemolitik faz sonlanır. Bu kişilerde oksidan stres devam etse dahi hemoliz otokontrollü olup, kendi kendini sınırlamaktadır. Bu Gd A⁻ mutantında yeni sentezlenen enzimin normal enzim kadar aktif oluşunun sonucudur. Hemolitik olay, aktivitesini kaybetmiş yaşlı eritrositleri elimine etmekte⁵⁵, ve sirkülasyona geçen genç hücreler oksidan stresle başa çıkabilecek enzim düzeyine sahip olduklarından hemoliz sınırlanmaktadır^{16,17,28,45,97,108,133}.

Gd^{Akdeniz} varyantında hemolizin klinik seyri daha ağırdır ve oksidan stres devam ettiği sürece hemoliz devam eder. Çünkü bu kişilerde en genç hücrede bile enzim aktivitesi çok düşüktür^{8,17,28,45,133}. Oksidan stres altında defektif hücrenin yaşam süresi o den-

li kısadır ki sirkülasyona geçen genç eritrosit birkaç saat için - de hemolize uğrar. Eğer oksidan ajan ortadan kaldırılmaz veya normal eritrosit transfüzyonu yapılmazsa ölümle sonuçlanabilir⁹⁷. Ölüm genellikle akut renal yetmezlik ve laktik asidoz sonucu olur¹³¹.

Akut hemolizin en sık rastlanan nedeni enfeksiyonlardır^{131, 45, 108, 133}. Viral enfeksiyonlar bakteriyel olanlara göre daha ciddi hemolize yol açmaktadır¹⁰⁸. Enfeksiyon sırasında makrofajlar tarafından üretilen süperoksit anyonu (O_2^-) ve hidrojen peroksidin (H_2O_2) etken olduğu düşünülmektedir^{131, 133}.

Başta antimalaryaller olmak üzere yüksek redoks potansiyeline sahip ilaçlar yetmezlikli kişilerde hemolize yol açmaktadır. İlaça bağlı hemolizin şiddeti, yetmezliğin tipine, ilacın tabiatına, aynı anda eşlik eden enfeksiyonun varlığına ve doza bağlı olarak değişmektedir^{131, 133, 132}.

Diabetik ketoasidoz da hemolizi başlatıcı bir etkidir. Bu metabolik bozuklukta kan glukoz, pirüvat ve pH sındaki değişiklikler hemolizden sorumlu tutulmaktadır¹³³.

YENİDOĞAN SARILIĞI

Yenidoğan eritrositleri glutatyon peroksidaz ve methemoglobin redüktaz aktivitelerinin ve vitamin E düzeylerinin düşüklüğüne bağlı olarak oksidan ajanlara karşı yetişkinlerden daha hassastır. Bu özelliğin G6PD yetmezliği ile birleşmesi yenidoğanların hemoliz ve hiperbilirubinemiye eğilimini arttırmaktadır^{131, 24, 97, 104, 132}. Ancak yetmezlikli bebeklerde, oksidan bir etkenin bulunmadığı durumlarda dahi ciddi hiperbilirubinemi gelişebilmektedir^{48, 125, 132}.

Sarılığın ortaya çıkışı genellikle post-natal 2-3. günlerde-

dir^{26,88,132}. 4-8. günlerde pik değerine ulaşarak uzun süre yüksek değerlerde seyreder^{52,125}. Olguların çoğu exchange transfüzyonu gerektirir. Tedavisiz bakılması halinde kern ikterus riski büyüktür. 133,132. Oksidan ajanların transplental geçişi, prenatal hemolizi başlatarak hidrops fötalise yol açabilmektedir^{45,97,133}.

G6PD yetmezliğine bağlı neonatal hiperbilirubinemi insidansı, coğrafi bölgeler ve etnik gruplar arasında geniş farklar göstermektedir^{25,26,84,88,127,132}. Bütün yetmezlikli bebeklerde sarılık gelişmemesi, bu komplikasyonun ortaya çıkışında G6PD yetmezliği dışında bazı çevresel ve genetik faktörlerin rol oynadığını göstermektedir^{16,84,88}. Kan uyumsuzluğu, prematurite, asidoz, hipoksi gibi faktörlerin varlığı sarılık riskini ve ciddiyetini çok arttırmaktadır^{131,101}. Birçok olguda hemolizin şiddeti yüksek bilirubin düzeylerini açıklamaktan çok uzaktır^{87,101,127}. Sarılığın nedeni hemolizden çok yetmezlikli bebeklerin karaciğer konjugasyon gücündeki yetersizliğe bağlamaktadır^{78,79}.

KONJENİTAL NON-SFEROSİTİK HEMOLİTİK ANEMİ (CNSHA)

1. grup kapsamına giren varyantlar değişik şiddetlerde fakat her zaman klinik olarak belirgin hemoliz gösterirler⁹⁷. İlaç ve enfeksiyonlar akut ataklara yol açabilir^{16,133}. Neonatal sarılığa eğilim vardır¹³².

Hemoglobin düzeyleri genellikle % 8-10 gr arasındadır. Retikülositoz sürekli olup % 10-15 civarındadır. Buna bağlı olarak ortalama eritrosit hacmi (MCV) büyüktür. Eritrosit yarı ömürleri 2-17 gün arasında değişir. Eritrosit morfolojisi normale yakın olup nadiren parçalı eritrositler, polikromazi ve anizositoz gözlenebilir. Ataklar dışında periferik kanda Heinz body tespit edilememiş -

tir^{97,132,133}. Eritrosit ozmotik fragiliteleri normaldir²¹.

CNSHA ile seyreden varyantların çoğunda eritrosit enzim aktivitesi çok düşük olmasına karşın bazılarında yalnızca ılımlı bir yetmezlik vardır. Yetmezliğin derecesi ile hemolizin şiddeti arasında tam bir korelasyon gözlenmemektedir. Bugün halen CNSHA gösteren varyantların hepsinin ciddi ve sürekli etkilerini açıklayabilecek ortak bir biyokimyasal defekt tespit edilememiş olmakla birlikte varyantların çoğu anormal kinetik karakteristikler (yüksek Km G6P, yüksek Km NADP ve düşük Ki NADPH) ve/veya anormal termal instabilite göstermektedirler^{21,33,42,77,97,137}. Spontan hemolizin membran SH gruplarında ve membran lipidlerindeki defekte bağlı olduğunu düşündüren çalışmalar da vardır^{17,60}. Kronik hemoliz bu faktörlerden herhangi biri veya birkaçının birarada olmasıyla eritrositin normal şartlarda dahi yaşamını sürdürememesinin sonucudur⁹⁷. Bu varyantların lökosit G6PD aktiviteleri de düşük olup, bazılarında kronik granülomatöz hastalık ve enfeksiyonlara karşı duyarlılık artışı görülmektedir³³.

FAVİZM

Favizm duyarlı kişilerde çiğ veya pişirilmiş baklanın yenmesi ve seyrek olarak da bakla çiçeği polenlerinin inhalasyonu ile akut hemolitik anemi şeklinde görülen bir hastalıktır⁵⁴.

Favizmin kliniği ilaca bağlı hemolize benzer, ancak tablo çok daha ağır ve akuttur¹³². Bulgular bakla alımını takiben 5-24 saat içinde ortaya çıkar¹³³. Hemolize, baklada bulunan L-dopa vicine, convicine gibi maddelerin yetmezlikli eritrositlerde GSH düzeylerini düşürmesi neden olur^{47,69}. Olguların büyük çoğunluğunda hemoglobin ciddi düzeylere düşmekte ve transfüzyon yapılamadığı

hallerde mortalite % 8 e ulaşmaktadır¹³³. Bakla alımından 72 saat sonra metabolik etkilerin dinmesi ile klinik tablo yavaş yavaş düzelmeye başlar⁴⁰.

Çocuklar favizme erişkinlerden daha duyarlıdır. 2-6 yaş grubunda ve erkeklerde daha sıktır^{64,86,108,133}. Annenin bakla yemesi sonucu sütle beslenen bebeklerde de görülebilmektedir^{86,107}.

Favizme Akdeniz ve Doğu toplumlarında rastlanmaktadır^{40,86,132}. Gd A⁻ varyantında rastlanmamıştır^{16,28,131,132,133}. Genellikle ailesel bir predispozisyon gözlenmekle birlikte^{86,107}, aynı aile bireyleri arasında geniş duyarlılık farkları olabilmektedir^{132,133}. Ayrıca bu hastalıkta bakla alımı her zaman hemolize yol açmamakta⁸⁶ ve daha önce favizm geçirmiş bir kişi baklaya karşı her zaman aynı duyarlılığı göstermemektedir^{107,133}. Bu özellikleri favizmin ortaya çıkışında G6PD yetmezliğinin gerekli ancak yeterli olmadığını ve patogeneğinde bazı ek faktörlerin rol oynadığını göstermektedir^{16,28,59}. Bu gün favizm, intra ve ekstraeritrositer faktörlerin rol oynadığı "multifaktöryel bir sendrom" olarak tanımlanmaktadır^{86,107}. Çeşitli genetik, immünolojik, metabolik ve çevresel faktörler öne sürülmüş ancak bunların hiçbiri henüz favizmin değişik karakterini açıklayabilmiş değildir^{86,133}.

G6PD YETMEZLİĞİNİN TANISI

Bugüne kadar G6PD yetmezliğinin tanısı için birçok tarama testi geliştirilmiştir. Bunlar avantaj ve deavantajları ile tablo: 1 de gösterilmiştir¹⁸.

Tablo : 1 G6PD yetmezliğinin tanısında kullanılan tarama testleri

Test	Avantaj	Dezavantaj
1- Heinz body test	Tarihi değeri var	
2- Glutasyon stabilite testi	Güvenilir	Teknik güçlük
3- Brilliant cresyl blue dekolorizasyon testi	Yapılığı kolay	Aneorobik şart gerektirir Bazı boyalar yanıltır Enküasyonu uzun sürer Anemiden etkilenir
4- Metilen mavisi dekolorizasyon testi	Yapılığı kolay	CO gazı gerektirir Enküasyonu uzun sürer Anemiden etkilenir
5- DCIP dekolorizasyon testi	Yapılığı kolay aneorobik şart gerektirmez	Enküasyonu uzun sürer Anemiden etkilenir
6- Methemoglobin redüksiyon testi	Ucuz Güvenilir	Taze veya koruyucu ek- lenmiş kan gerektirir İyi yorumlanmak için spek- trofotometre ve çok mik- tarda kan gerekebilir Enküasyonu uzun sürer
7- Askorbat-siyanid test	Basit ve ucuz Heterozigotlar için duyarlı	Çok miktarda kan gerekir Tam spesifik değildir Değerlendirme subjektif Enküasyonu uzun sürer
8- Metilen mavisi absorpsiyon testi	Ucuz	Modern yöntemlere göre daha güçtür
9- MTT spot test	Kolay, güvenilir Çok az kan gerekir Hızlı değerlendirir	Elüsyon yöntemleri Zaman alıcıdır
10- Floresan spot test	En spesifik ve basit yöntemdir Anemiye karşı kendi kendini düzeltir Enküasyonu 5 dak.	U. V el lambası gerektirir

Glutasyon stabilite ve Heinz body testleri, asetil fenil hidrazin ile enkübe edilen yetmezlikli eritrositlerin redükte glutasyon düzeylerini sabit tutamayarak çok sayıda Heinz body oluşturmalarına dayanmaktadır⁹⁷.

Dekolorizasyon testleri elektron akseptörü olarak davranan ve NADPH ı, NADP ye oksitleyerek kendileri indirgenen boyaları içerir. Bunların indirgenmiş formları renksiz olup, renklerinin kayboluş hızı G6PD aktivitesi ile orantılıdır^{16,50,131}. Tetrazolyum tuzları (MTT) ise indirgendiklerinde gözülmeyen koyu mavi granüller oluştururlar. Bu yöntem enzimin sitokimyasal gösterimi³⁸ ve elektroforez bandlarının renklendirilmesinde kullanılmaktadır⁹⁷.

Metilen mavisi ve fenazin metasülfat methemoglobin redüksiyonunda NADPH dan H^+ transferini hızlandırırılar. Methemoglobin redüksiyon testi bu prensibe dayanmaktadır. Bu testin, intakt eritrositlerden methemoglobin elüsyonunu sağlayan sitokimyasal teknikle birleştirilmesi (methemoglobin elüsyon testi) tek tek hücrelerde enzim aktivitesinin incelenmesine olanak sağlar^{50,97,133}.

Askorbat-siyanid test yetmezlikli hücrelerde hemoglobinin oksidatif denaturasyonunun gözlenmesine dayanır^{18,133}.

Floresan spot test G6PD aktivitesi ile orantılı olarak oluşan NADPH ın ultraviole ışığı ile aktive edilerek gözlenmesi esasına dayanır¹³⁴. Kantitatif ölçümlerle iyi korelasyon gösteren bu test kısa zamanda sonuç vermesi, hematokrit değerlerinden fazlaca etkilenmemesi ve en ucuz yöntem olması nedeniyle tercih edilmektedir¹³¹.

Tarama testleri yapılırken önemle hatırlanması gereken nokta G6PD aktivitesinin eritrosit yaşına bağımlı olduğudur¹³⁰. Bu neden-

le ileri derecede retikülositoz gösteren post hemolitik kişiler tarama testleri ile rahatlıkla gözden kaçırılabilir. Bu özellikle Gd A⁻ varyantında önem taşır^{17,20,55}. Bu varyantta genç eritrositlerin enzim aktivitesi normaldir ve ortalama eritrosit yaşının 12 günün altına inmesi, dolaşımdaki eritrositlerin enzim aktivitesinin normalden bile yüksek bulunmasına yol açabilir⁹⁷. Retikülositoz sırasında doğru tanı eritrositleri yaşlarına göre ayırıp, yalnız yaşlı eritrositlerde aktivite ölçümüne olanak veren yöntemleri gerektirir⁵⁵. Mümkün olmadığı durumlarda hastanın ortalama eritrosit yaşı tamamen normale döndükten sonra (yaklaşık 2-4 ay) yeniden incelenmesi gerekir^{16,17,28,130,133}. Gd B⁻ varyantında en genç hücrede bile aktivite çok düşük olduğundan hemolize rağmen yetmezliğin tesbiti genellikle mümkündür^{11,28,50,130}.

G6PD yetmezliğinin tanısında bir diğer problem heterozigot genotipe sahip mutantlardır^{11,16,17}. Tarama testlerinin hemen hiç biri heterozigot tanısı için yeterli değildir^{18,38,134}. Çünkü bu testlerin çoğunun (+) sonuç verebilmesi için sirkülasyondaki yetmezlikli eritrosit miktarı en az % 60 veya üzerinde olmalıdır³⁷. Yetmezlikli eritrosit yüzdesi daha düşük olan heterozigotlarda yalnız (-) sonuç alınmakta ve dolayısıyla heterozigotların % 80 kadarı gözden kaçabilmektedir³⁷. Heterozigotların tanısında sitokimyasal tekniklerden^{38,50}, aile çalışmalarında⁹⁷ ve elektroforetik çalışmalardan¹¹⁷ yararlanılabilir.

G6PD aktivitesinin kantitatif ölçümü için spektrofotometrik¹³⁰ ve fluorometrik⁷⁵ yöntemler geliştirilmiştir. Bunların hemen hepsinin prensibi, NADPH ın 340 nm de verdiği absorbansın ölçümüne dayanmaktadır⁹⁷. Laboratuvarlar arası birliğin sağlanabilmesi için

WHO tarafından ölçüm yöntemleri standardize edilmiş ve enzim aktivite ünitesi bu şartlar altında 25°C de, 1 dakikada 1 mikromol NADP redüksiyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır¹³⁰.

Son yıllarda eritrosit hemolizatında enzim proteininin spesifik aktivitesinin ölçümüne olanak veren, bir radioimmunoassay (RIA) geliştirilmiştir^{89,131}.

G6PD YETMEZLİĞİNİN TEDAVİSİ

Henüz geçerli bir tedavi yöntemi bulunmuş değildir. Tedavi yetmezlikli kişinin klinik görünümüne göre planlanır. CNSHA göstermeyen varyantlar sürekli bir tedavi gerektirmezler. Tanı almış hastalar eğitilerek, hemolize yol açabilecek etkenlerden mümkün olduğunca korunmaları sağlanmalıdır.

Hemolitik krizde destek ve koruyucu tedavi uygulanır. Mümkün olan her durumda hemolitik ajan tespit edilmeli ve ortamdan uzaklaştırılmalıdır. Gd^{Akdeniz} tipinde, sorumlu ajanın tespit edilemediği veya ortadan kaldırılamadığı durumlar, genellikle exchange transfüzyonu gerektirir. Burada önemle dikkat edilecek nokta donör kanında G6PD aktivitesinin normal olmasıdır. Gd A⁻ tipinde hemoliz otokontrollü olduğundan transfüzyon ancak aplastik krizin ortaya çıkması halinde gerekli olabilir.

CNSHA ile seyreden varyantlarda, anemi düzenli kan transfüzyonlarını gerektirecek ciddiyette olabilir. Splenektomi nadiren hemoglobin düzeylerinde hafif bir düzelme sağlamakla birlikte genellikle yararsızdır. Antioksidan özelliği dolayısıyla 30-35 IU/kg/gün dozda uzun süreli E vitamini uygulamasının yararlı olabileceği şeklinde çalışmalar vardır^{28,45,97,108,131,133}.

G E R E Ç V E Y Ö N T E M

ÖRNEKLERİN ELDE EDİLiŞİ

Bu çalışma, ilgili makamların izni ile, Mayıs 1985-Eylül 1985 ayları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Antalya Devlet Hastanesi Doğumevi, Antalya S.S.K. Hastanesinde doğan bebekler üzerinde yapıldı. Bu hastanelerin doğum salonlarında görevli personel tarafından, mümkün olan her durumda hiçbir kriter gözletilmeksizin bütün canlı doğumlardan kordon kanı alındı. Örnek sayısı 500 e ulaşınca, örnek toplama işlemi durduruldu.

Kordon kanları önceden heparinize (Liquiemine flacon-Roche) edilerek, etiketlenip doğum salonlarına dağıtılmış olan plastik kaplı küçük şişelere alındı. Etiketlerine bebeği tanıtıcı gerekli bilgiler yazıldıktan sonra buzdolabına (+4°C) kaldırıldı.

Her sabah hastaneler dolayarak kan örnekleri alınan bebekler ziyaret edildi. Bebeklerin anneleri ve doğumu yaptıran doktor veya ebelerle görüşülerek, bebeğin doğumsal özellikleri ve ailede olası G6PD yetmezliğine yönelik soruları içeren anket formları dolduruldu. Kullanılan anket formlarının bir örneği ek 1 de sunulmuştur.

Alınan örneklerin aynı gün kalitatif G6PD aktiviteleri retikülosit ve hemoglobin düzeyleri ölçüldü. Aşağıdaki durumlarda bebekler aynı gün içinde tekrar ziyaret edilerek alınan venöz kan örneklerinde ölçümler tekrarlandı.

a- Tam yetmezlik gösteren olgular

b- Azalmış aktivite gösteren olgular

c- Normal aktivite göstermesine karşın görece olarak retikülositi yüksek veya hemoglobini düşük bulunan olgular.

Test sonuçları doğrulandıktan sonra tam yetmezlik veya azalmış aktivite gösteren olgulara ait kordon kanlarında kantitatif enzim aktiviteleri ölçüldü. Yanı sıra doğum ağırlığı ve gestasyon yaşı açısından mümkün olduğunca eşdeğer özelliklere ve normal enzim aktivitesine sahip bir kız ve bir erkek bebek kontrol olgusu olarak seçilerek kantitatif enzim aktiviteleri çalışıldı. Bütün analizler bebeğin doğumu ve kan alınışını takiben, en geç 72 saat içinde tamamlandı.

Erişkinlere ait venöz kan örnekleri hiçbir hematolojik bozukluğu ve özellikle hemolitik hikayesi olmayan sağlıklı laboratuvar personelinin kanından alındı.

TOTAL HEMOGLOBİN TAYİNİ

Total Hb tayini Sigma Chemical Company kit : 525-A ile yapıldı.

Prensip : Alkalen pH da potasyum ferrisiyanid varlığında hemoglobin, ve sulfhemoglobin dışındaki hemoglobin deriveleri methemoglobine oksitlenir. Methemoglobin potasyum siyanid ile 540 nm de maksimum absorpsiyon veren siyanmethemoglobin bileşimini oluşturur, Bu dalga boyundaki renk şiddeti total Hb konsantrasyonu ile orantılıdır¹⁰⁹.

Ayrıraçlar :

1- Drabkin's ayıracağı, stok : 100 kısım Sodyum bikarbonat, 20 kısım Potasyum ferrisiyanid, ve 5 kısım Potasyum siyanid içeren kuru karışım. Oda ısısında, karanlıkta saklandı.

2- Drabkin's solusyonu : Stok Drabkin's ayıracağı 1000 cc arık suda çözümlenerek üzerine 0,5 cc % 30 Brij-35 solusyonu eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra koyu renkli şişede oda ısısında saklandı. Bu ısıda en az 6 ay stabildir.

3- Brij-35 solusyon, stok : 100 ml sinde 30 gr Brij-35 içerir. Oda ısısında saklandı.

4- Hemoglobin standard, stok : Liyofilize insan methemoglobini- dir. Bu yöntemle göre çözümlenerek kullanıldığında 100 ml tam kan için 18 gr hemoglobine karşılık gelir. 0-5°C de buzdolabında saklandı.

5- Siyanmethemoglobin standart solusyon : Bir şişe stok hemoglobin standardı 50 ml Drabkin's solusyonunda çözülür. İyice karıştırılarak 30 dakika bekletildikten sonra kullanılabilir. Koyu renkli şişede ve 0-5°C de saklandığında en az 6 ay stabildir.

GEREÇLER :

- 1- Spektrofotometre : Bausch-Lomb, spectronic 88
- 2- Test tüpü : 10 ml lik
- 3- Pipet : 20 mikrolitrelik Sahli tipi, 10 ml lik serolojik

YÖNTEM :

- 1- Çalışılacak örnek sayısından bir fazla test tüpü alınarak kör, örnek 1, örnek 2, şeklinde işaretlendi.
- 2- Bütün tüplere 5 ml Drabkin's solusyonu kondu.
- 3- Test tüplerine 20 mikrolitre tam kan konarak pipet 3-4 kez solusyonla yıkandı. İyice karıştırılarak en az 15 dakika oda ısısında beklendi.
- 4- 540 nm de köre karşı örneklerin absorbansı okundu.
- 5- Total hemoglobin konsantrasyonu % gr olarak kalibrasyon grafiğinden değerlendirildi.

KALİBRASYON GRAFİĞİNİN ÇİZİLİŞİ :

1-4 adet test tüpü alınarak aşağıdaki şekilde hazırlandı.

1 Tüp No	2 Siyanmethemoglobin Standart solusyonu (ml)	3 Drabkin's solusyonu (ml)	4 Absorbans (A)	5 Kan Hb (% gr)
1	0.0	6.0		0.0
2	2.0	4.0		6.0
3	4.0	2.0		12.0
4	6.0	0.0		18.0

2- 540 nm de 2, 3, ve 4 numaralı tüplerin absorbansı 1 numaralı tüpe karşı okunarak 4 nolu kolona kaydedildi.

3- Kolon 4'e karşı kolon 5'e ait değerler grafik kağıdına geçirilerek orjinden geçen bir doğru elde edildi.

Dilüe standartlar ağzı sıkı kapatılmış tüplerde 0-5°C de karanlıkta saklandığı takdirde 6 ay stabildir.

RETİKÜLOSİT SAYIMI :

Prensip : Retikülositler içerdikleri RNA artıkları nedeniyle supravital boya ile boyanırlar. Bu yöntemde parlak krezil mavisi kullanılmıştır. Bu boya ile eritrositler açık veya orta koyulukta yeşile, retikülositlerin RNA sı ise koyu maviye boyanırlar¹³.

Ayırıcılar :

1- Parlak krezil mavisi alkol çözeltisi

Parlak krezil mavisi 1 gr.

Etanol % 95 lik 100 ml.

Boya alkolde iyice eritildikten sonra süzülerek koyu renkli bir şişede oda ısısında saklandı.

Gereçler :

1- Işık mikroskopu : Carl Zeiss Jena, monoküler (649686)

2- Lam ve lamel

Yöntem :

Temiz ve kuru bir lam üzerine iri bir damla boya konup bir başka lam yardımıyla boya lama yayıldı. Bundan sonra, retikülosit sayılacak kandan bir damla alınıp temiz bir lamelin ortasına damlatıldı. Lamelin kanlı yüzü, lamın boyalı yüzü üzerine gelecek şekilde lamel lam üzerine bırakıldı. Boya ve kan karışımının sağlanması amacıyla lam sabit tutularak, lamelin kenarları 2-3 kere aşağı, yukarı yalpalandırıldı. Böylece kan damlasının lam ve lamel

arasına kendiliğinden yayılması sağlandı. Hücrelerin boyanabilmesi için en az 10 dakika beklendikten sonra sayıma geçildi.

Preparat mikroskopta küçük büyütme ile incelenerek yayma tabakanın ince olduğu, eritrositlerin birbirine değmediği ve eşit dağılım gösterdiği bir saha bulundu. Bundan sonra büyük büyütmeye geçilip lam lökosit formülü sayımındaki gibi hareket ettirilerek, her biri ortalama 100 kadar eritrosit içeren 10 objektif alanında görülen retikülositler sayıldı. Bir örnekten aynı lam üzerine 2 preparat hazırlanarak sayımların birbirini tutup tutmadığı kontrol edildi. Her iki sayımın birbirine \pm 5 hücrelik bir fark ile uymaması halinde üçüncü bir preparat hazırlanarak sayım tekrarlandı. Her iki sonucun ortalaması alındıktan sonra retikülosit sayısı aşağıdaki şekilde hesaplandı.

$$\% \text{ retikülosit} = 1000 \text{ eritrosit için sayılan retikülosit} / 10$$

KALİTATİF G6PD AKTİVİTE TAYİNİ

Kalitatif G6PD aktivite ölçümünde Beutler¹⁵ tarafından tanımlanan "Floresan spot test" küçük bir değişiklik ile uygulandı. Eritrositleri hemoliz etmek için Beutler tarafından uygulanan doymuş Digitonin çözeltisi yerine, % 0,02 lik Digitonin çözeltisi kullanıldı.

Prensip : G6PD aktivitesi varlığında, koenzim NADP^+ nin NADPH^+ a indirgenmesi ve bu son bileşiğin uzun dalga U.V. ışığı ile aktive edildiğinde floresan vermesi esasına dayanır¹⁵.

Ayrıraçlar :

1- NADP 0,0075 M : 63.4 mg β -Nicotinamid Adenin Dinucleotide Phosphate monosodium salt (Sigma N-0505) tartılarak 10 ml arık su-

da çözüldü.

2- G6P 0,01 M : 35.8 mg D-Glucose-6-Phosphate disodium salt (Sigma G-7250) tartılarak 10 ml arık suda çözüldü.

3- Digitonin % 0,1 : 100 mg Digitonin (Merck) tartılarak 100 ml arık suda çözüldü.

4- Fosfat tamponu, 0.25 M, pH : 7.4 :

K_2HPO_4 anhydrous (Merck) 34,8 gr, KH_2PO_4 (Merck) 6,8 gr tartılarak 900 ml arık suda çözüldü. pH kontrolü yapılarak, eğer gerekiyorsa 1 M HCl veya 1 M NaOH ile PH : 7.4 e ayarlandı. Bundan sonra arık su ile hacim litreye tamamlandı.

Gereçler:

- 1- Test tüpü : 8x100 mm lik
- 2- Pipet : 20 mikrolitrelik Sahli tipi, 1 ml lik serolojik
- 3- Süzgeç kağıdı : Whatman No 1
- 4- Ultraviöle lambası : Model UVSL-25 mineralight Lamp
Multiband UV-254/366 NM

Yöntem :

a) Reaksiyon karışımının hazırlanışı :

			Son konst.
NADP	0.0075 M	10 ml	0.75 mM
G6P	0.01 M	10 ml	1.00 mM
Digitonin	% 0.1	20 ml	% 0.02
Fosfat tamponu			
pH : 7.4	0.25 M	30 ml	75.00 mM
Arık su		30 ml	

100 ml lik balonjoje içinde yukardaki şekilde hazırlanan reaksiyon karışımı küçük test tüplerine 0,2 ml hacimde dağıtılarak -20°C ye donduruldu. Reaksiyon karışımı bu ısıda en az 3 ay stabildir¹⁵.

b) Deneyin yapılışı :

Deney yapılacağı gün çalışılacak örnek sayısı kadar reaksiyon karışımı içeren test tüpü dondurucudan çıkarılarak oda ısısında erimeye bırakıldı. Bu sırada örnek kanlar, test tüpleri ve üçgen şeklinde kesilmiş olan süzgeç kağıtları numaralandırıldı. Reaksiyon karışımları oda ısısına geldikten 5 dakika sonra her bir test tüpüne, karşılık gelen numaralı kandan .02 ml eklendi. Berrak bir hemolizat elde edilene kadar tüpler karıştırıldı. Karışımdan süzgeç kağıdının bir köşesine bir damla emdirilerek bu damla 0 zamanı olarak işaretlendi. Tüpler oda ısısında 5 dakika enkübe edildikten sonra her örnek için aynı süzgeç kağıdının ikinci köşesine 1 damla daha emdirildi. Bu damla 5. dakika olarak işaretlendi. Aynı işlem 10. dakikada da tekrarlanarak süzgeç kağıdının üçüncü köşesine alınan son damla 10. dakika olarak işaretlendi. Damlalar tamamen kurduktan sonra değerlendirmeye geçildi.

Değerlendirme :

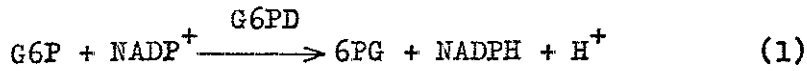
Süzgeç kağıtları tamamen karanlık bir ortamda uzun dalga U.V. ışığı altında gözlemlendi. 0 zamanı kontrol olarak kabul edildi. Aktivitenin normalin % sine göre gösterimi WHO¹³⁰ tarafından önerildiği şekilde yapıldı.

	F l o r e s a n		Ş i d d e t i	
5. dakika	Yok	Çok hafif	Az parlak	Çok parlak
10. dakika	Yok	Hafif	Parlak	Çok parlak
Değerlendirme:	(-)	(+)	(+)	(++)

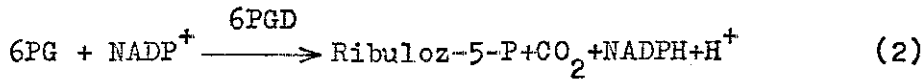
KANTİTATİF G6PD AKTİVİTE TAYİNİ

Eritrosit hemolizatında kantitatif G6PD aktivitesi WHO¹³⁰ tarafından önerilen modifiye Zinkham yöntemiyle ölçüldü.

PRENSİP : Reaksiyon sırasında G6PD aktivitesi ile orantılı olarak oluşan NADPH in 340 nm de verdiği absorbans artışının kinetik olarak izlenmesine dayanmaktadır¹³⁰.



(1) numaralı reaksiyonda G6P dan NADP⁺ ye 1 H⁺ ve 2 elektron transfer olmakta, böylece G6P yükseltgenirken NADP⁺, NADPH a indirgenmektedir⁴⁹. Ancak biolojik sistemlerin çoğu 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) aktivitesine de sahip olduklarından (1) numaralı reaksiyon sonucunda açığa çıkan 6PG aşağıdaki reaksiyona girecektir¹¹.



Sonuç olarak ölçülen NADPH (1) ve (2) numaralı reaksiyonların toplam ürünü olup, ölçülen aktivite yalnızca G6PD a değil aynı zamanda 6PGD aktivitesine de bağlıdır. Bununla birlikte, birçok durumda oluşan NADPH G6PD aktivitesi ile orantılıdır¹³⁰.

A- HEMOLİZATIN HAZIRLANIŞI :

Ayıraçlar :

1- İzotonik sodyum klorür :

9.0 gr NaCl (Merck) tartılarak 1000 ml arık suda çözüldü.
+4°C de saklandı.

2- Stabilize edici solusyon : 2.7 mM EDTA, 0,7 mM 2-merkap -
toetanol

a- Stok EDTA 0,27 M pH:7.0

10 gr Ethylenedinitrilotetraacetic acid (Merck) tartılarak önceden içine 50 ml arık su konmuş olan 100 ml lik balonjojeye kondu. EDTA çözülünceye kadar damla damla 2,5 M NaOH eklenerek karıştırıldı. pH:7.0 e ayarlandıktan sonra hacim arık su ile 100 ml ye tamamlandı.

b) Litrelik bir balon jojeye 10 ml stok EDTA solusyonu kondu. Üzerine 0,05 ml 2-mercaptoethanol (Merck) eklenerek arık su ile hacim litreye tamamlandı. Koyu renkli şişe içinde +4°C de saklandı.

GEREÇLER :

- 1- Soğutmali santrifüj : Heraeus Christ Minifuge 2 model
- 2- Vakum pompası : Beckman Model 260 Vacum Pump
- 3- Derin Dondurucu : Karteknik marka dondurucu (-20°C inebi-
len ilave motorlu)
- 4- Su Banyosu : Grant marka, BS
- 5- Santrifüj tüpü : 15x100 mm, dibi konik
- 6- Pipet : 1,2 ve 10 ml lik serolojik

YÖNTEM :

2-3 ml heparinize tam kan +4°C de, 6000 devir/dakikada 10 dakika santrifüjlenerek plazma ve beyaz hücre tabakası dikkatle aspire edildi. Bundan sonra iki kez 10 hacim soğuk izotonik sodyum klorür (FTS) ile yıkandı. Son yıkamadan sonra dipte kalan eritrosit paketi 1 hacim FTS ile % 50 süspanse edildi. Eritrosit süspansiyondan 0,2 ml alınarak üzerine 1,8 ml stabilize edici solusyon eklendi. Karıştırılarak derin dondurucuda -20°C ye donduruldu. Tamamen dondurulduktan sonra oda ısısında su banyosuna alınarak eritildi. Böylece 1:20 oranında dilüe edilmiş hemolizat hazırlandı.

Hemolizat diğ er analizler yapılınca ya kadar buzlu su banyosu içinde bekletildi. Bundan sonraki aşamada uygulanan tüm analizler 3 saat içinde tamamlandı.

B- HEMOLİZAT HEMOGLOBİN İÇERİĞİNİN ÖLÇÜMÜ :

Hemolizat hemoglobini daha önce anlatılan Siyanmethemoglobin yöntemi ile ölçüldü. Ancak hemolizatın 1:20 dilüe oluşu nedeniyle yeterli renk şiddeti elde edilmek için 5 ml Drabkin's solusyonuna 0,02 ml yerine 0,1 ml hemolizat eklendi. Okunan absorban sa karşı kalibrasyon grafiğinden bulunan değ er aşağıdaki dilüsyon faktörü ile çarpılarak sonuç hesaplandı.

$$\text{Dilüsyon faktörü} : \frac{5,1 \times 0,02}{0,1 \times 5,02} \times 0,196$$

C- HEMOLİZAT G6PD AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ :

Ayır aç lar :

1- NADP 2 mM

168.9 mg β-Nicotinamid Adenin Dinucleotide Phosphate monosodium salt (Sigma N-0505) tartılarak 100 ml arık suda çözüldü.

2- G6P 6 mM

214.9 mg D-Glucose-6-Phosphate disodium salt (Sigma G-7250) tartılarak 100 ml arık suda çözüldü. -20° de saklandı. Bu ısıda 1 yıl stabildir¹³⁰.

3- MgCl₂ 0,1 M

2033.1 mg MgCl₂·6H₂O (Merck) tartılarak 100 ml arık suda çözüldü.

4- Tris-HCl tamponu 1M, pH:8

121.1 gr Tris (hydroxymethyl -aminomethan) tartılarak litrelik balon j o j e y e kondu. Üzerine 250 ml arık su ve 650 ml 1 N HCl

eklenerek gözülünceye kadar karıştırıldı. pH:8.0 e ayarlandıktan sonra hacim arık su ile litreye tamamlandı.

Gereçler :

- 1- Spektrofometre : Beckman model 26 Spectrophotometer
- 2- Yazdırıcı : Beckman model 39 Printer
- 3- Derin dondurucu: Karteknik marka dondurucu (-20°C ye inebilen ilave motorlu)
- 4- Test tüpü : 10 ml lik
- 5- Pipet : 1 ve 2 ml lik serolojik

YÖNTEM :

Reaksiyon karışımı :

Ayırıklar	Kör	Örnek	Son Konst.
H ₂ O	1.65 ml	1.65 ml	
NADP 2 mM	0.30 ml	0.30 ml	0.20 mM
Tris - HCl			
1 M, pH : 8.0	0.30 ml	0.30 ml	0.10 M
MgCl ₂ 0.1 M	0.30 ml	0.30 ml	0.01 M
Hemolizat			
1/20 dilüe	0.15 ml	0.15 ml	
G6P 6 mM	-	0.30 ml	0.60 mM
H ₂ O	0.30 ml	-	
Total Hacim	3.00 ml	3.00 ml	

Test tüplerine 1.65 ml arık su, 0.30 ml NADP, 0,30 ml Tris-HCl ve 0,30 ml MgCl₂ pipetlenerek -20°C de donduruldu. Bu karışım -20°C de bir yıl stabildir¹³⁰.

DENEYİN YAPILIŞI :

Ölçüm yapılacağı gün gerektiği kadar test tüpü oda ısısına

getirilerek kör ve örnek olarak işaretlendi. Her iki tüpe 1/20 hemolizattan 0,15 ml eklendi. Karışım kapaklı kare kuartz küvetlere (Q6) konarak spektrofotometreye yerleştirildi. Küvetler 37°C de 10 dakika enkübe edildi. Bu sırada 0 ayarı yapıldı. Kör küvetine 0,30 ml arık su ve örnek küvetine, 0,30 ml G6P eklenerek reaksiyon başlatıldı. 340 nm deki optik dansite (O.D) değerleri 18 dakika boyunca 30 saniyede bir yazdırıcıya kaydedildi.

Değerlendirme :

Yazdırıcıdan alınan sonuçların grafik analizi ile reaksiyon hızının en lineer olduğu aralık bulundu. Bu aralıktaki O.D. farkının zamana bölünmesi ile dakikadaki O.D. artışının ortalama değeri ($\Delta OD/dak$) bulundu. Bulunan değer aşağıdaki formüle uygulanarak gram Hb başına düşen enzim aktivitesi hesaplandı.

$$IU/gr Hb = \frac{(\Delta OD/dak) \cdot 10^5}{(6.22) \cdot (Hb)^x \cdot (Hemolizat hacmi)^{xx}}$$

x % gr olarak

xx mikrolitre hemolizat/ml reaksiyon karışımı

Km G6P TAYİNİ

Enzimin G6P için Michaelis sabiti (Km G6P) eritrosit hemolizatında ölçüldü. Ölçümlerde WHO¹³⁰ önerilerine uyularak, G6P in 0,2-2 mM arasında değişen 6 ayrı konsantrasyonu kullanıldı. Her serisinde değiştirilen G6P konsantrasyonu dışında, bütün deney şartları kantitatif aktivite ölçümü ile aynı tutuldu.

6 ayrı G6P konsantrasyonu hazırlamak için kantitatif aktivite ölçümünde kullanılan 6 mM lık G6P solusyonu arık su ile uygun oranlarda dilüe edilerek 2 mM, 1,5 mM, 1 mM, 0,8 mM, 0,4 mM ve 0,2

mM lık G6P solusyonları hazırlandı.

Enzim aktivitesi 6 ayrı substrat konsantrasyonunda ayrı ayrı ölçülerek her bir substrat konsantrasyonuna (S) karşılık gelen reaksiyon hızları (V) bulundu. (V) değeri olarak reaksiyon hızının en lineer olduğu zaman aralığında, dakikadaki ortalama optik dansite artışı alındı. (V=40D/dak)

Bulunan (V) değerlerinin (S) değerlerine karşı grafiğe geçirilmesi ile Michaelis-Menten kinetiğine uygun bir eğri elde edildi. Bundan sonra (1/V) ve (1/S) değerleri bulunarak Lineweaver-Burke doğrusu çizildi. Bu doğrunun X eksenini kestiği noktadan Km değeri hesaplandı.

İSTATİSTİK DEĞERLENDİRMELER

Elde edilen veriler parametrik test varsayımlarını yerine getirdiğinden iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testleri t testi ile yapıldı. Yanılma olasılığı olarak $\alpha = 0,05$ seçildi. Ortalamalar arasındaki farkın daha küçük α değerlerinde önemli bulunması halinde bu değerler ilgili tabloların altında verildi.

Korelasyon ve regresyon analizleri standart formüllerle yapıldı¹²². Korelasyon katsayılarının önem kontrolleri ve regresyon doğrularının doğrusallıktan ayrılış önem kontrolleri yapılarak $y=a+bx$ denklemine göre regresyon doğruları çizildi.

B U L G U L A R

I- KALİTATİF ÖLÇÜMLERE AİT VERİLER

A- FLORESAN SPOT TEST SONUÇLARI

264 erkek ve 236 kız bebekten oluşan 500 kordon kanının floresan spot test ile incelenmesi sonucunda 7 erkek ve 5 kız olmak üzere toplam 12 bebekte G6PD yetmezliği saptandı.

İncelenen 500 olgunun 461 tanesi merkez ilçe ve buna bağlı köylerde, 39 tanesi (25 erkek ve 14 kız) Antalya'nın diğer ilçelerine bağlı çeşitli köylerde yaşamaktaydı. Yetmezlik saptanan olguların hepsi merkez ilçe ve buna bağlı köylerde yaşayan ailelerin bebekleriydi.

Yetmezlik saptanan 7 erkek bebeğin hem 5. hem de 10. dakika spotlarında hiç floresan gözlenmedi. Tam yetmezlik gösteren bu olgularda floresan (-) olarak değerlendirildi.

Yetmezlik saptanan 5 kız bebeğin 2 sinde hem 5., hem de 10. dakika spotlarında hiç floresan gözlenmedi. Tam yetmezlik gösteren bu olgularda floresan (-), olarak değerlendirildi.

Diğer 3 kız bebeğin 5. dakika spotlarında çok hafif, 10. dakika spotlarında ise biraz daha parlak olmasına karşın normale göre oldukça hafif floresan gözlendi. Ara şekil gösteren bu olgularda floresan (+) olarak değerlendirildi.

257 erkek ve 231 kız bebeğin hem 5., hem de 10. dakika spotlarında parlak floresan gözlendi. Normal aktivite gösteren bu olgularda floresan (+) olarak değerlendirildi.

Yetmezlikli bebeklerin yetmezliğin şiddeti ve cinsiyete göre dağılımları tablo 2 de gösterilmiştir.

İncelenen Olgular		Tam yetmezlik gösteren olgular	Ara şekil gösteren olgular	Yetmezlikli toplam olgular
Erkek	n :	7	0	7
n=264	% :	2.65	0	2.65
Kız	n :	2	3	5
n=236	% :	0.85	1.27	2.12
Toplam	n :	9	3	12
n=500	% :	1.80	0.60	2.40

Tablo 2 : G6PD yetmezlikli olguların dağılımı

İncelenen 500 olgunun 90'ında anne-baba arasında akrabalık bulunduğu saptandı (%18). G6PD yetmezlikli olgularda akraba evliliğine rastlanma sıklığı, G6PD aktivitesi normal olgulardan yüksek ve aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < .01$). Olguların G6PD aktiviteleri ve akraba evliliğine rastlanma sıklığı açısından dağılımları tablo 3 de gösterilmiştir.

G6PD Aktivitesi	İncelenen olgular	Akraba bulunan	evliliği olgular
	<u>n</u>	<u>n</u>	<u>%</u>
Normal	488	87	17.8*
Yetmezlikli	12	3	25.0*
Toplam	500	90	18.0

Tablo 3 : Olguların G6PD aktiviteleri ve akraba evliliğine rastlanma sıklığı açısından dağılımları (* $p < .01$)

İncelenen 500 olgudan 13'ünün ailesinde bakla zehirlenmesi görüldüğü saptandı (%2.6). G6PD yetmezlikli olguların ailelerinde favizme rastlanma sıklığı, G6PD aktivitesi normal olgulardan yüksek ve aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < .01$). Olguların G6PD aktiviteleri ve ailelerinde favizme rastlanma sıklığı açısından dağılımları tablo 4 de gösterilmiştir.

G6PD Aktivitesi	İncelenen olgular	Ailelerinde Favizm hikayesi veren olgular	
	<u>n</u>	<u>n</u>	<u>%</u>
Normal	488	11	23*
Yetmezlikli	12	2	16.7*
Toplam	500	13	2.6

Tablo 4 : Olguların G6PD aktiviteleri ve ailelerinde favizme rastlanma sıklığı açısından dağılımları (* $p < .01$)

II- KANTİTATİF ÖLÇÜMLERE AİT VERİLER

A- KONTROL GRUBUNA AİT VERİLER

Kantitatif parametrelerin incelenmesinde kontrol grubu olarak seçilen 15 kız ve 15 erkek bebeğe ait veriler tablo:5 de toplu halde gösterilmiştir.

1- G6PD AKTİVİTELERİNE AİT VERİLER

Kontrol grubunu oluşturan yenidoğanların G6PD aktivitelerine ait değerler tablo:6 da gösterilmiştir.

Kontrol grubunda kız ve erkek bebeklerin ortalama G6PD aktiviteleri arasında önemli farklılık bulunmadı ($p > .05$). Bunun üzerine her iki cinse ait değerler birleştirilerek yenidoğanlara ait normal G6PD aktivitesi 13.395 ± 2.284 IU/gr Hb olarak bulundu. Bu değer normalin % 100 ü olarak kabul edildi. WHO¹³⁰ tarafından normalin % 65 ile % 150 si arasında enzim aktivitesi normal kabul edildiğinden laboratuvarımızın yenidoğanlara ait normal değerleri 8.707-20.092 IU/gr Hb olarak bulundu.

2- HEMATOLOJİK VERİLER

Kontrol grubunu oluşturan yenidoğanların hemoglobin düzeylerine ait değerler tablo:7 de retikülosit düzeylerine ait değerler tablo:8 de gösterilmiştir.

Kontrol grubunda kordon kanı hemoglobin ve retikülosit düzeyleri açısından kız ve erkek bebekler arasında önemli fark bulunmadı ($p > .05$). Bunun üzerine her iki cinse ait değerler birleştirilerek kordon kanında normal hemoglobin düzeyi 16.83 ± 2.03 % gr, normal retikülosit düzeyi 3.31 ± 1.01 % olarak bulundu.

Olgu Sıra No	Seks	G6PD Akt. (IU/gr Hb)	Hemoglobin (% gr)	Retikulosit (%)	Doğum Haftası	Doğum Ağırlığı
8	E	9.30	20.8	2.4	40	3000
17	E	10.09	20.1	2.6	40	2700
15	K	10.18	19.0	2.8	40	3200
84	K	10.62	16.2	2.7	40	3500
120	K	11.17	20.1	4.0	40	3200
145	K	11.25	16.6	4.9	40	3600
245	E	11.53	18.3	3.9	39	1780
10	E	11.66	18.0	4.0	40	3200
238	K	12.13	18.5	2.6	40	3000
77	K	12.20	16.4	4.6	40	4200
79	K	12.65	17.9	1.6	40	3100
107	E	12.72	18.8	2.9	38	3000
23	E	12.90	17.2	2.2	40	3350
322	E	13.06	17.8	3.0	38	3250
324	E	13.18	16.3	1.7	40	2600
388	E	13.21	17.6	2.9	40	2800
143	K	13.45	17.8	3.8	40	4000
127	K	13.57	15.7	3.2	40	4000
403	K	14.03	17.6	1.8	40	3300
246	E	14.10	16.1	4.4	38	2600
317	K	14.12	17.0	2.6	40	3900
303	K	14.15	15.7	2.6	41	2900
316	E	14.93	16.7	4.4	40	3600
392	K	15.02	14.8	5.1	40	3650
320	K	15.14	12.9	4.9	40	3000
39	E	16.16	13.7	2.8	38	2750
80	E	16.22	13.9	4.4	32	1600
81	E	16.25	15.2	3.9	43	3600
35	E	17.99	14.2	4.0	38	2500
87	K	18.88	13.3	2.6	43	3500
Ort : SD		13.395 ± 2.284	16.83 ± 2.03	3.31 ± 1.01	39.6 ± 1.85	3145 ± 596.6

Tablo 5 : G6PD aktivitesi normal yeni doğanlara ait değerler (olguların sıralaması G6PD aktiviteleri küçükten büyüğe artacak şekilde yapılmıştır.)

<u>Seks</u>	<u>Ort</u>	<u>SD</u>	<u>n</u>	<u>Min</u>	<u>Max</u>	<u>CV</u>
Erkek	13.553*	2.427	15	9.30	17.99	17.91
Kız	13.237*	2.206	15	10.18	18.88	16.67
Karışık	13.395*	2.284	30	9.30	18.88	17.05

Tablo 6 : Kontrol grubunu oluşturan yeni doğanların G6PD aktivitelerine ait değerler
* $p > .05$

<u>Seks</u>	<u>Ort</u>	<u>SD</u>	<u>n</u>	<u>Min</u>	<u>Max</u>	<u>CV</u>
Erkek	16.98*	2.14	15	14.2	20.8	12.60
Kız	16.63*	1.99	15	13.3	19.0	11.97
Karışık	16.83*	2.03	30	13.3	20.8	12.06

Tablo 7 : Kontrol grubunu oluşturan yeni doğanların hemoglobin değerleri
* $p > .05$

<u>Seks</u>	<u>Ort</u>	<u>SD</u>	<u>n</u>	<u>Min</u>	<u>Max</u>	<u>CV</u>
Erkek	3.30*	0.89	15	1.7	4.4	26.97
Kız	3.32*	1.15	15	1.6	5.1	34.64
Karışık	3.31*	1.01	30	1.6	5.1	30.51

Tablo 8 : Kontrol grubunu oluşturan yeni doğanların retikülosit değerleri
* $P > .05$

B- G6PD YETMEZLİKLİ YENİDOĞANLARA AIT VERİLER

Floresan spot test ile G6PD yetmezliği saptanan 5 kız ve 7 erkek bebeğe ait veriler tablo:9 da toplu halde gösterilmiştir.

1- G6PD AKTİVİTELERİNE AIT VERİLER

Floresan spot test ile yetmezlikli bulunan olguların kordon kanı G6PD aktivitelerine ait veriler, kontrol grubuna ait verilerle birlikte tablo:10 da gösterilmiştir.

Tam G6PD yetmezliği gösteren 7 erkek ve 2 kız bebeğe ait G6PD aktiviteleri 0.00 IU/gr Hb ile 0.69 IU/gr Hb arasında bulundu (Tablo:9). Bu değerler normalin % 0.00 ile % 5.15 ine karşılık geliyordu. Bu gruba ait ortalama enzim aktivitesi $0,252 \pm 0,208$ IU/gr Hb olarak bulundu. Bu değer normalin % 1,881 i idi (Tablo:10).

Ara şekil gösteren 3 kız bebeğe ait G6PD aktiviteleri 5,66 IU/gr Hb ile 7,37 IU/gr Hb arasında bulundu (Tablo:9). Bu değerler normalin % 42.25 i ile % 55.02 sine karşılık geliyordu. Bu gruba ait ortalama enzim aktivitesi 6.617 ± 0.873 IU/gr Hb olarak bulundu. Bu değer normalin % 49.399 u idi (Tablo:10).

2- HEMATOLOJİK VERİLER

G6PD yetmezlikli yenidoğanların kordon kanı hemoglobin düzeylerine ait değerler tablo:11 de retikülosit düzeylerine ait değerler tablo:12 de gösterilmiştir.

Olgu Sıra No	Seks	G6PD Akt. (IU/gr Hb)	Hemoglobin (% gr)	Retikülosit (%)	Doğum Haftası	Doğum Ağırlığı
244	K	0.00	14.3	4.2	39	1400
276	E	0.03	10.5	5.0	40	3300
397	E	0.15	16.9	3.7	40	3000
247	E	0.17	14.3	2.9	40	2820
159	E	0.23	14.9	3.2	40	3700
240	E	0.29	13.9	4.6	34	1700
300	K	0.33	18.3	3.0	43	3000
123	E	0.38	14.1	3.2	40	4200
102	E	0.69	13.8	4.9	40	3400
003	K	5.66	17.4	2.4	41	3000
144	K	6.82	18.3	2.7	40	3500
138	K	7.37	18.0	2.8	41	2900
Ort ± SD		(*)	15.39 ± 2.39	3.55 ± 0.91	39.83 ± 2.08	2993 ± 781.7

Tablo 9 : G6PD yetmezlikli yeni doğanlara ait değerler
(*) G6PD aktivitelerine ait Ort. ± SD değerleri tablo (10)
de verilmiştir.

		G6PD Aktivitesi	
		IU/gr Hb	% normal
Tam G6PD yetmezlikli olgular (n = 9)	Ort.	0.252	1.881
	SD	0.208	
	CV	82.54	
Ara şekil gösteren olgular (n = 3)	Ort.	6.617	49.399
	SD	0.873	
	CV	13.19	
Kontrol olguları (n = 30)	Ort.	13.395	100.000
	SD	2.284	
	CV	17.05	

Tablo 10 : G6PD yetmezlikli ve normal yeni doğanlarda kordon kanı G6PD aktiviteleri.

<u>İncelenen Olgular</u>	<u>Ort</u>	<u>SD</u>	<u>n</u>	<u>Min</u>	<u>Max</u>	<u>CV</u>
Tam yetmezlik	14.56	2.16	9	10.5	18.3	14.84
Ara şekil	17.90	0.46	3	17.4	18.3	2.57
Toplam	15.39	2.39	12	10.5	18.3	15.53

Tablo 11: G6PD yetmezlikli yeni doğanların kordon kanı hemoglobin değerleri

<u>İncelenen Olgular</u>	<u>Ort</u>	<u>SD</u>	<u>n</u>	<u>Min</u>	<u>Max</u>	<u>CV</u>
Tam yetmezlik	3.86	0.84	9	2.9	5.0	21.76
Ara şekil	2.63	0.21	3	2.4	2.8	7.98
Toplam	3.55	0.91	12	2.4	5.0	25.63

Tablo 12: G6PD yetmezlikli yeni doğanların kordon kanı retikülosit değerleri

3- G6PD YETMEZLİKLİ VE NORMAL YENİDOĞANLARIN HEMATOLOJİK VERİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Şekil : 4 de 30 kontrol ve 12 G6PD yetmezlikli yenidoğana ait hemoglobin ve retikülosit düzeyleri, G6PD aktivitelerine bağımlı olarak karşılaştırılmıştır.

Tablo 13 de hemoglobin ve retikülosit düzeyleri açısından karşılaştırılan yetmezlikli gruplar ile kontrol grubuna ait değerler verilmiştir.

Tam G6PD yetmezlikli olguların ortalama hemoglobin düzeyleri, kontrol grubundan düşük ve aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < .01$).

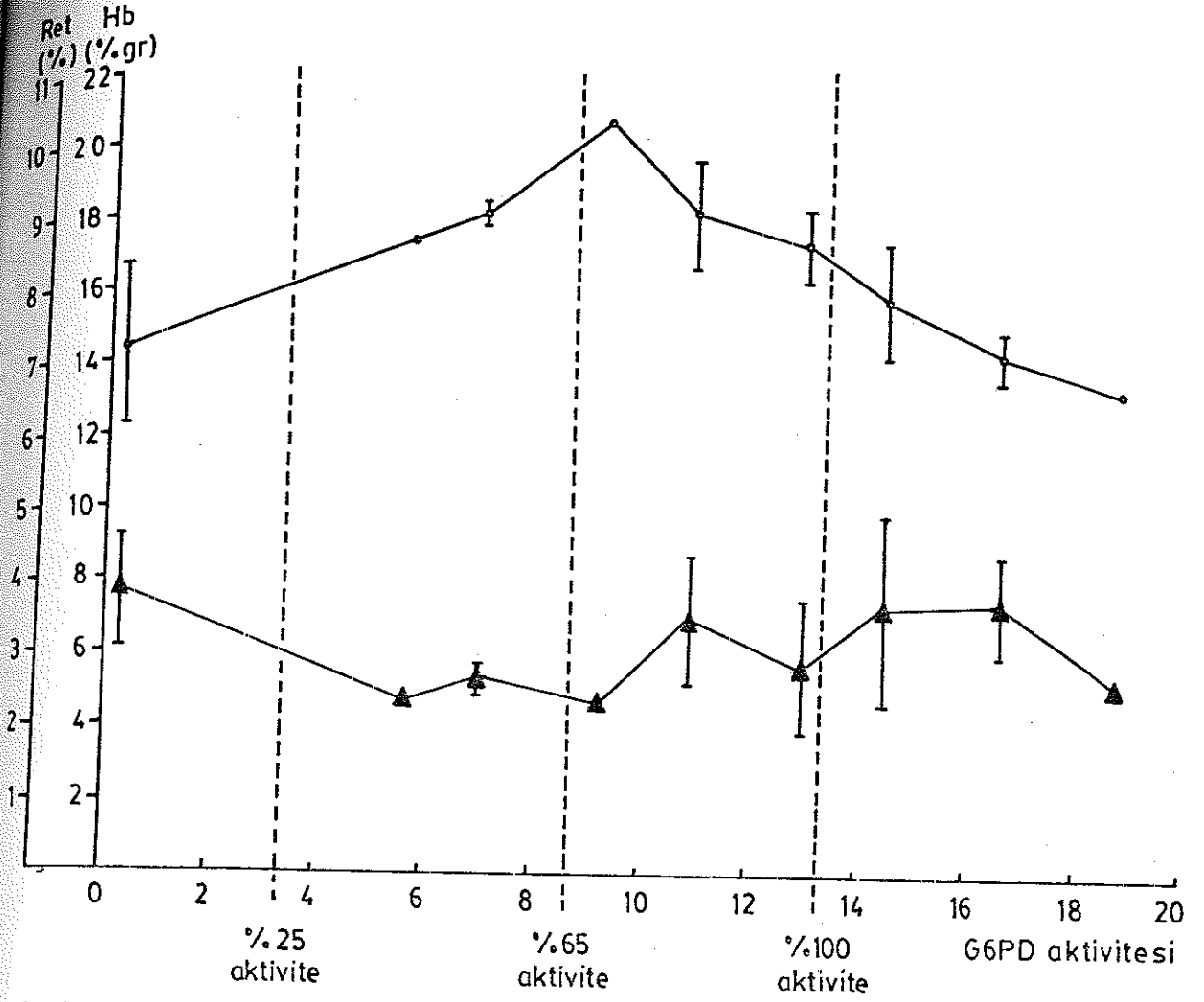
Ara şekil gösteren olguların ortalama hemoglobin düzeyleri kontrol grubundan yüksek bulundu. Bu gruptaki olgu sayısının azlığı ($n=3$) nedeniyle istatistiksel karşılaştırma yapılamadı.

Tam yetmezlik ve ara şekil gösteren olguların birleştirilmesiyle elde edilen G6PD yetmezlikli tüm olgulara ait ortalama hemoglobin düzeyi, kontrol olgularından düşük bulundu. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak önemsizdi ($p > .05$).

Retikülosit düzeyleri açısından karşılaştırıldığında, tam yetmezlik gösteren olgulara ait ortalama değer kontrol grubundan yüksek bulundu. Aradaki fark istatistiksel olarak önemsizdi ($p > .05$).

Ara şekil gösteren olguların ortalama retikülosit düzeyleri kontrol grubundan düşük bulundu ancak olgu sayısının azlığı nedeniyle önem kontrolü yapılamadı.

Yetmezlikli bulunan tüm olgulara ait ortalama retikülosit düzeyi kontrol grubundan yüksek bulundu. Aradaki fark istatistiksel olarak önemsizdi ($p > .05$).



Şekil 4 : Kordon kanında G6PD aktivitelere karşılık gelen hemoglobin ve retikülosit değerleri

—○— Hemoglobin
—▲— Retikülosit
I ± SD

		Hemoglobin (%gr)	Retikülosit (%)
Tam G6PD yetmezlikli olgular (n = 9)	Ort.	14.56*	3.86
	SD	2.16	0.84
G6PD yetmezlikli tüm olgular (n = 12)	Ort.	15.39	3.55
	SD	2.39	0.91
Kontrol olguları (n = 30)	Ort.	16.83*	3.31
	SD	2.03	1.01

Tablo 13 : G6PD yetmezlikli ve normal yeni doğanlarda kordon kanı hemoglobin ve retikülosit değerleri

*P < .01

C- Km G6P ÖLÇÜMLERİNE AİT VERİLER

1- YENİDOĞAN KORDON KANINA AİT VERİLER

Normal G6PD aktivitesine sahip 10 yenidoğana ait Km G6P değerleri ile aynı olguların eritrosit G6PD aktiviteleri tablo:14 de gösterilmiştir.

Kordon kanında enzimin G6P için Km değerleri 38,5-57,1 μM arasında ortalama $45.78 \pm 5.70 \mu\text{M}$ olarak bulundu. Aynı olguların enzim aktiviteleri 11.17-15.14 IU/gr Hb arasında ortalama 13.43 ± 1.37 IU/gr Hb bulundu. Enzim aktivitesi ile Km G6P değerleri arasındaki ilişkinin incelenmesi, bu iki parametre arasında doğrusal, ancak ters orantılı bir ilişki ($r=0.9311934, p<.01$) olduğu gösterdi. (Şekil : 5)

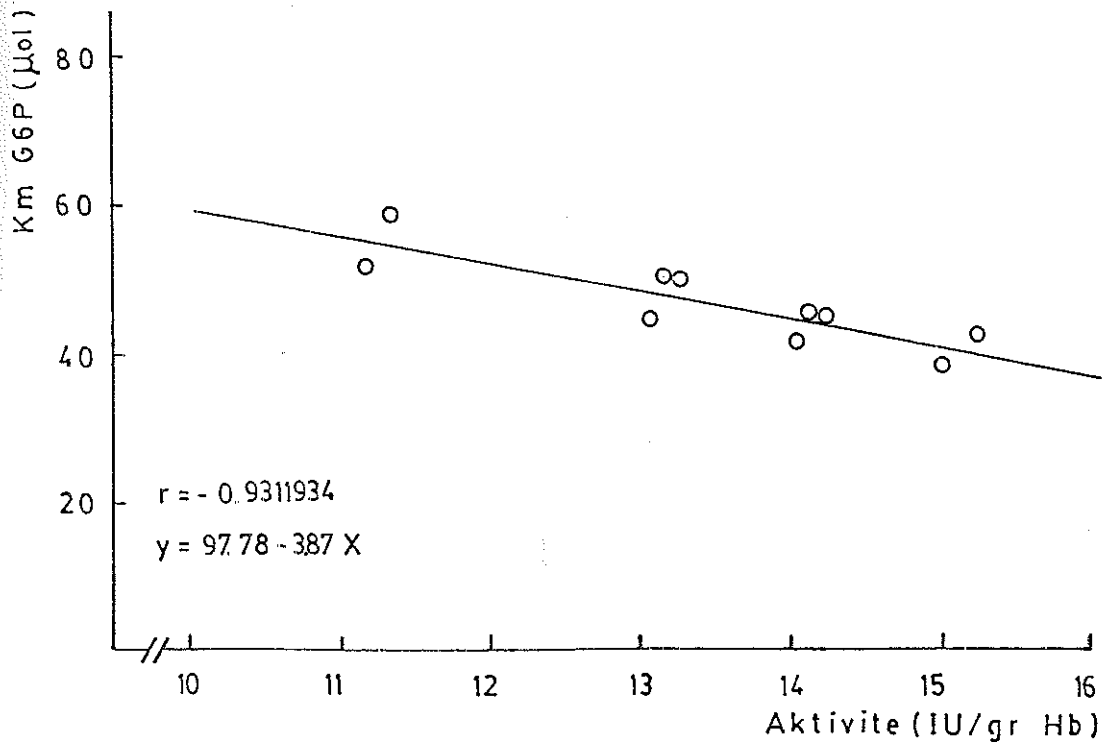
2- ERİŞKİN VENÖZ KANINA AİT VERİLER

Normal G6PD aktivitesine sahip 10 erişkine (yaş ortalamaları: 29) ait Km G6P değerleri ile aynı olguların eritrosit G6PD aktiviteleri tablo : 15 de gösterilmiştir.

Erişkin venöz kanında enzimin G6P için Km değerleri 41,6-62,5 mikromol arasında ortalama 51.62 ± 6.75 mikromol olarak bulundu. Aynı olguların enzim aktiviteleri 7.02 - 11.14 IU/gr Hb arasında ortalama 9.00 ± 1.23 IU/gr Hb bulundu. Enzim aktivitesi ile Km G6P değerleri arasındaki ilişkinin incelenmesi, bu iki parametre arasında doğru - sal ancak ters orantılı bir ilişki ($r= - 0.9049659, p<.01$) olduğunu gösterdi (şekil : 6).

Olgular	G6PD aktivitesi (IU/gr Hb)	Km G6P (μ mol)
P.K.	11.17	51.5
Z.F.	11.25	57.1
S.U.	13.06	45.0
A.A.	13.18	48.8
F.Y.	13.21	48.8
K.K.	14.03	41.6
I.A.	14.12	43.1
A.H.	14.15	42.6
P.A.	15.02	38.5
N.K.	15.14	40.8

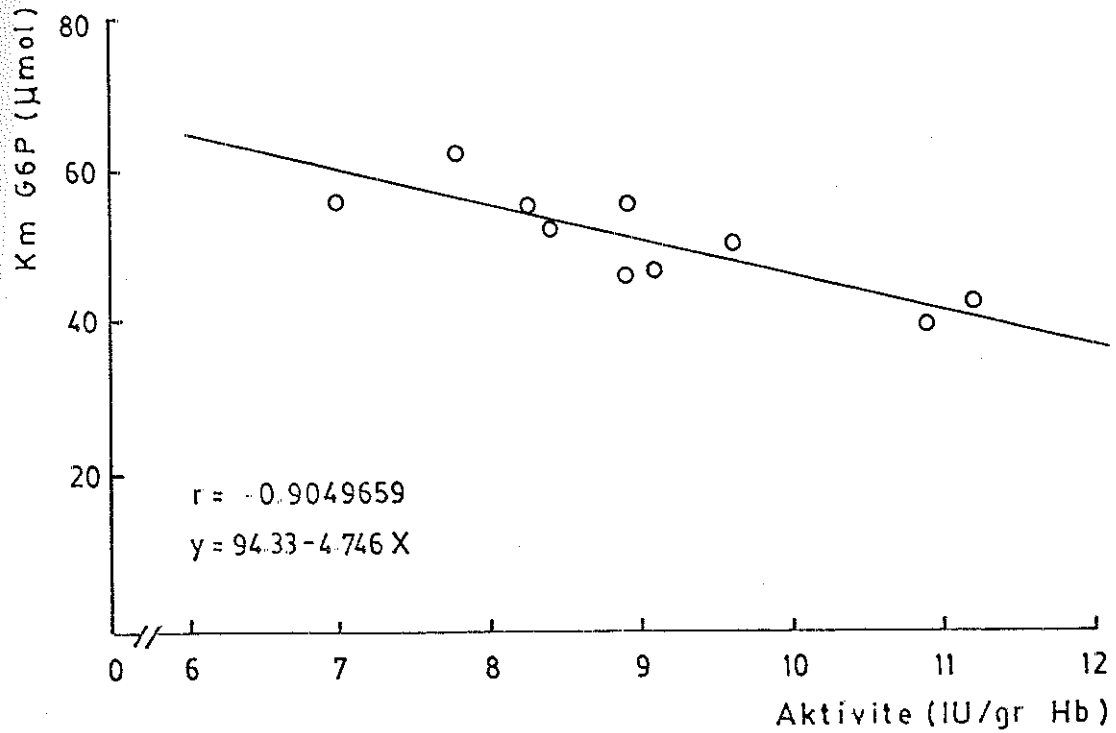
Tablo 14 : Kordon kanında eritrosit G6PD aktiviteleri ve Km G6P değerleri.



Şekil 5 : Kordon kanında eritrosit G6PD aktiviteleri ve Km G6P değerleri arasındaki ilişki.

Olgular (*)	G6PD aktivitesi (IU/gr Hb)	Km G6P (μ mol)
A.Ş (32)	7.02	58.1
B.Ş (35)	7.80	62.5
U.G (26)	8.24	55.6
M.İ (36)	8.41	54.0
İ.T (25)	8.88	55.6
N.O (32)	8.93	47.6
A.K (30)	9.10	48.8
FE (29)	9.53	50.0
A.K (23)	10.93	41.6
M.B (22)	11.14	42.4

Tablo 15 : Erişkin olgularda eritrosit G6PD aktiviteleri ve Km G6P değerleri
(*) Parantez içindeki rakamlar olguların yaşlarını göstermektedir.



Şekil 6 : Erişkin kanında eritrosit G6PD aktiviteleri ile Km G6P değerleri arasındaki ilişki.

3- ERİŞKİN VE YENİDOĞANLARIN ENZİM AKTİVİTESİ VE Km G6P DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Şekil : 7 - (a) da kendi grupları içinde ortanca değerlere sahip bir erişkin (İT) ve bir yenidoğana (F.Y) ait Michaelis Menten eğrileri, şekil : 7 - (b) de aynı olgulara ait Lineweaver-Burke doğruları gösterilmiştir.

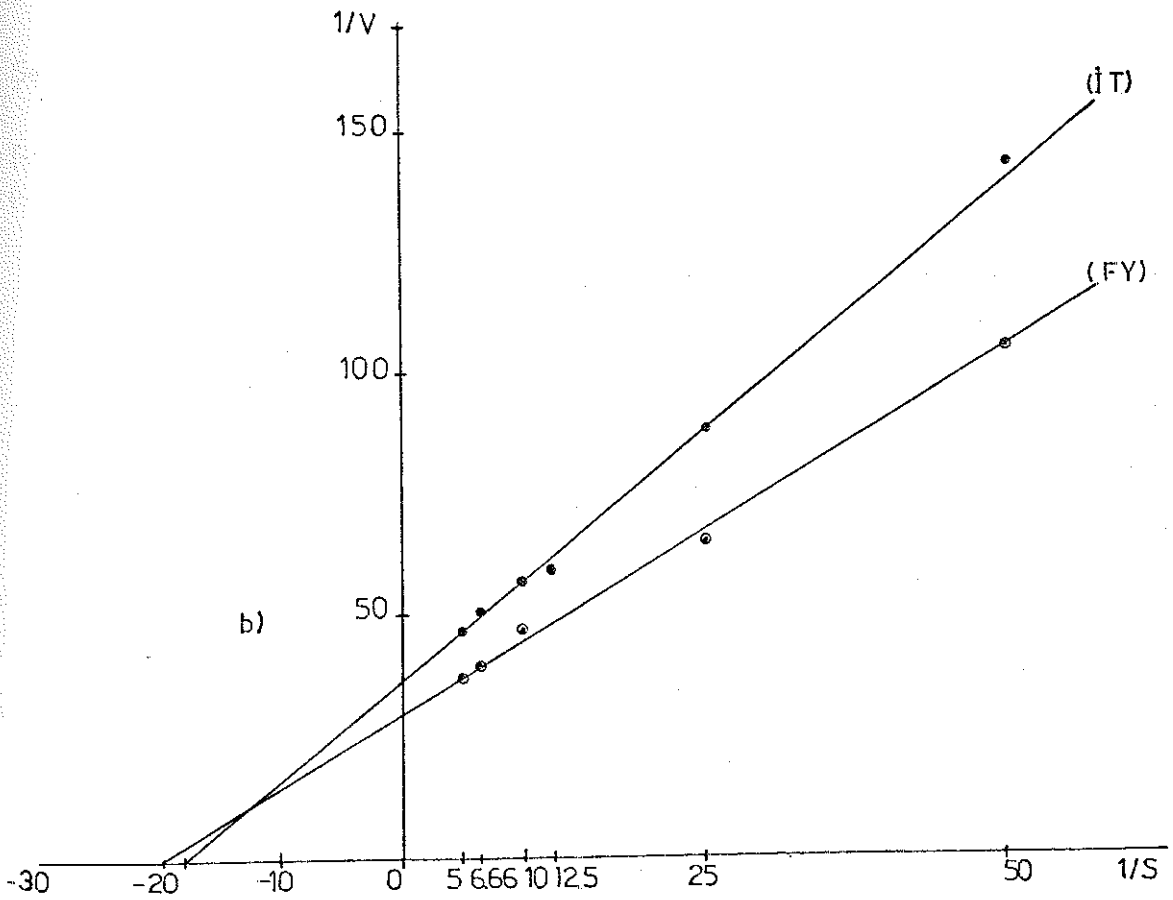
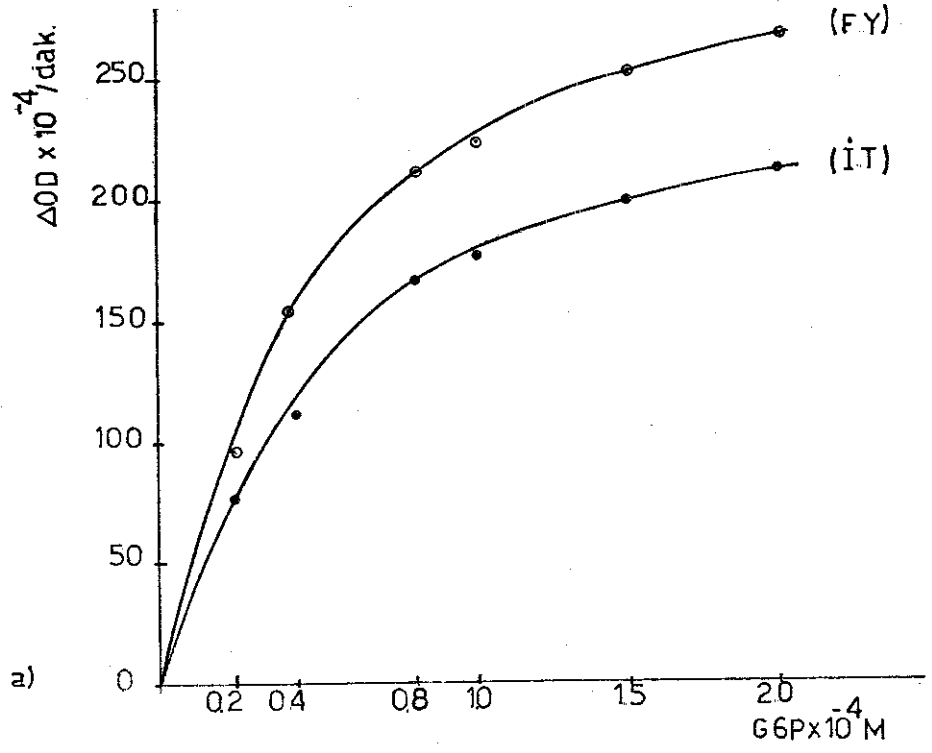
Şekil : 8 ve tablo : 16 da erişkin ve yenidoğanalara ait eritrosit enzim aktiviteleri ve Km G6P düzeyleri karşılaştırılmıştır.

Yenidoğanların ortalama eritrosit G6PD aktivite düzeyleri, erişkinlerden yüksek ve aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < .01$).

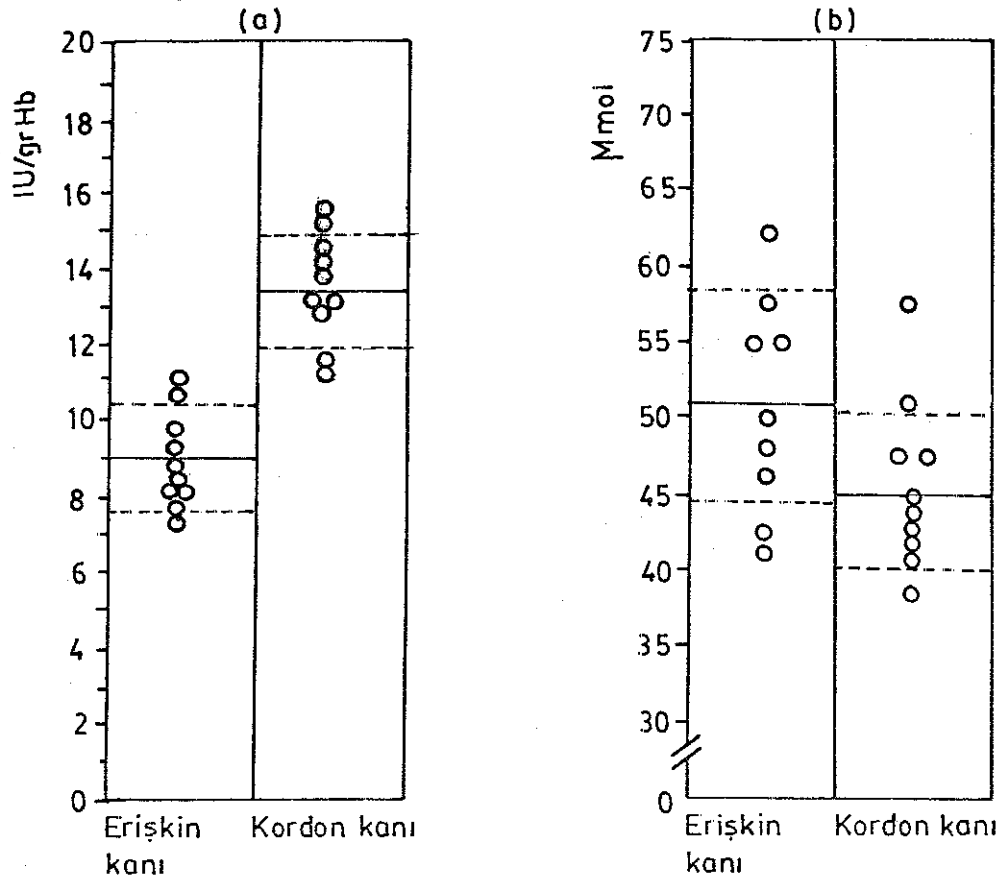
Yenidoğanlarda enzimin G6P için ortalama Km düzeyleri, erişkinlerinkinden düşük ve aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu. ($p < .05$)

Şekil : 9 da kontrol grubunu oluşturan 30 yenidoğan ve normal aktiviteye sahip 10 erişkinde eritrosit G6PD aktivitelerinin dağılımı gösterilmiştir. Yenidoğanlarda olguların % 70 inin \pm SD, % 93 ünün \pm 2 SD, ve % 100 ünün \pm 3 SD aralığına girdiği bulundu. Erişkinlerde değerlerin sola kaydığı ve olguların % 60 ının \pm SD ve % 100 ünün \pm 2SD aralığına girdiği görüldü.

Şekil : 10 da Km G6P değerlerinin erişkin ve kordon kanlarındaki dağılımı gösterilmiştir. Yenidoğanlarda olguların % 70 inin \pm SD ve % 100 ünün \pm 2 SD aralığına girdiği bulundu. Erişkinlerde değerlerin sağa kaydığı ve olguların % 70 inin \pm SD ve % 100 ünün \pm 2 SD aralığına girdiği görüldü.



Şekil 7 : Bir erişkin (İT) ve bir yeni doğana (FY) ait
a) Michaelis-Menten eğrileri
b) Lineweaver-Burke doğruları



Şekil 8 - (a) : Eritrosit G6PD aktivitelerinin (b) Km G6P değerlerinin erişkin ve kordon kanlarındaki dağılımı

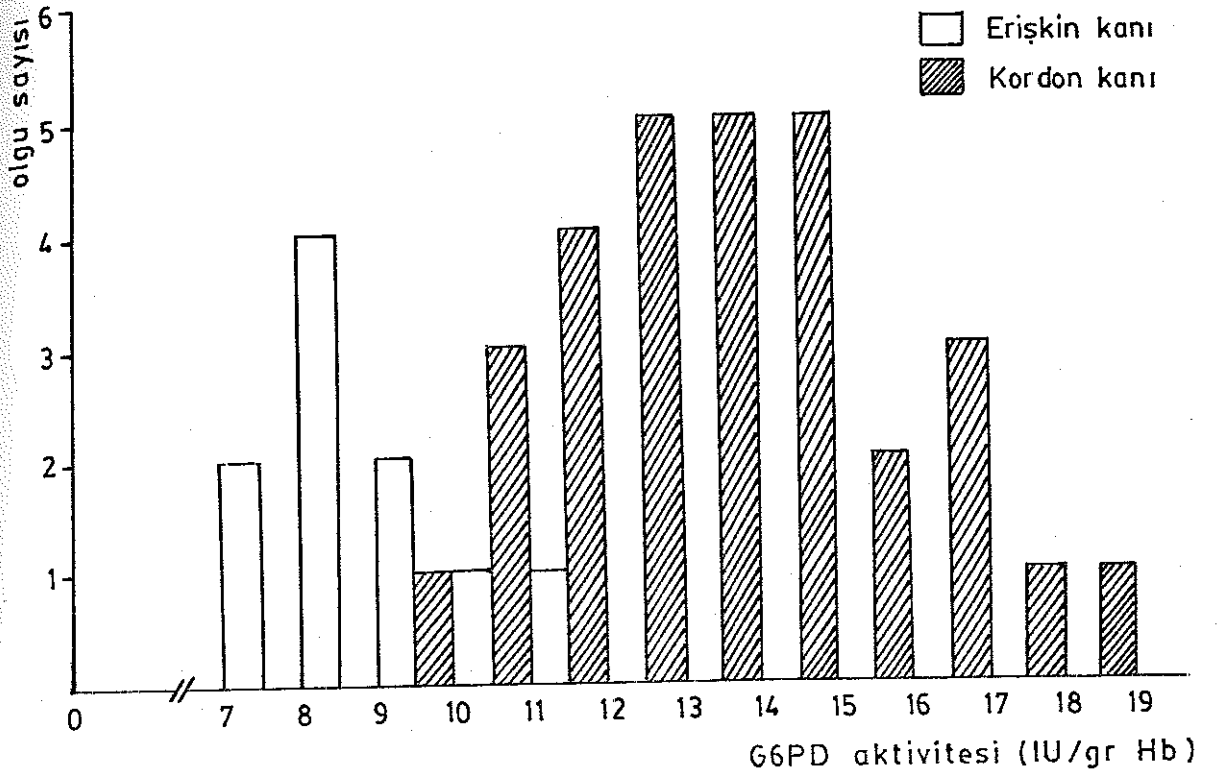
(—) aritmetik ortalama
 (-----) \pm SD aralığı

		G6PD Aktivitesi (IU/gr Hb)	Km G6P (μ mol)
Yenidoğan kordon kanı (n=10)	Ort.	13.43 *	45.78 ⁺
	SD	1.37	5.69
Erişkin venöz kanı (n=10)	Ort.	9.00 *	51.62 ⁺
	SD	1.29	6.74

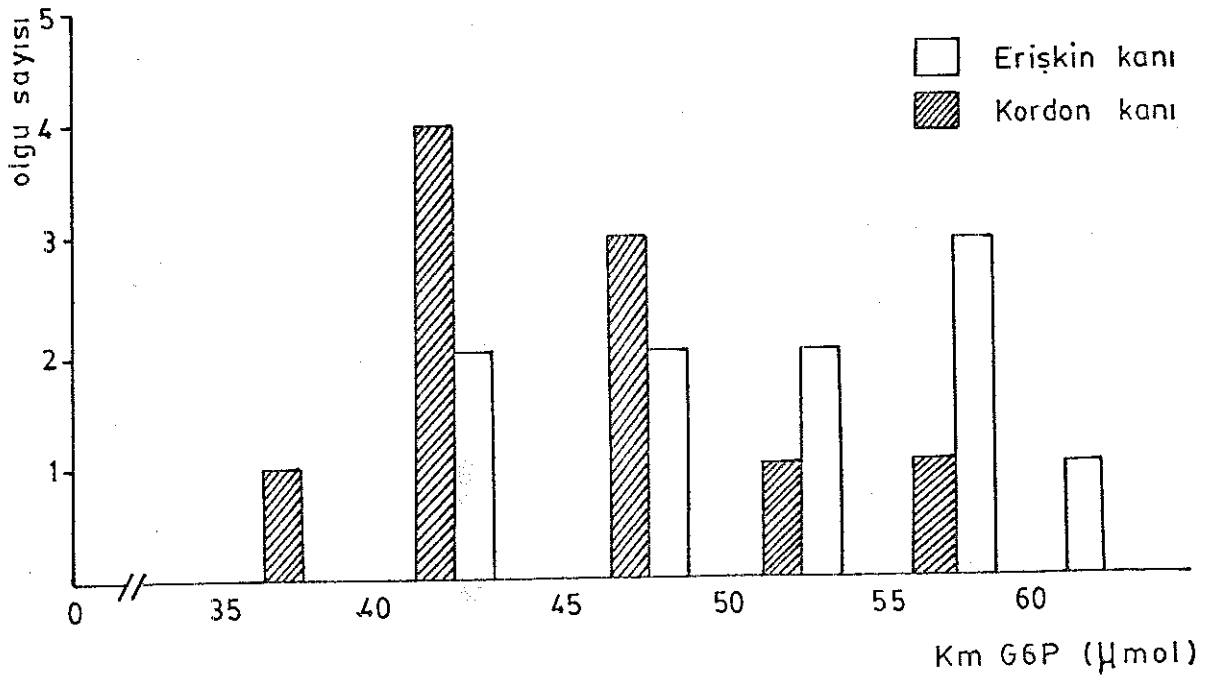
Tablo 16 : Yenidoğan ve erişkin olgularda G6PD aktivitesi ve Km G6P ortalama değerleri

* $P < .01$

+ $P < .05$



Şekil 9 : Eritrosit G6PD aktivitelerinin erişkin ve kordon kanlarındaki dağılımı ($P < 01$)



Şekil 10 : Km G6P değerlerinin erişkin ve kordon kanlarındaki dağılımı ($P < 05$)

T A R T I Ő M A

G6PD yetmezliği, değişik klinik görünümleri ile klinisyenleri, x kromozomu üzerinde G6PD lokusunun hipermutabilitesi ile medikal ve populasyon genetikçilerini ve böylece ortaya çıkan farklı fiziksel ve kinetik özelliklere sahip 150 den fazla izoenzimi ile biyokimyacıları yakından ilgilendiren bir problemdir.

Son otuz yıldır, bu yaygın ve çok yönlü problem üzerinde çalışmalar yoğunlaşmış ve yetmezliğin ortaya çıkarılabilmesi için birçok tarama testi geliştirilmiştir. Bu testlerin başlıcaları geğitli avantaj ve dezavantajları ile tablo 1 de özetlenmiştir.

Bu çalışmada tarama testi olarak aşağıda sıralanan avantajları nedeniyle Beutler'in¹⁴ floresan spot testi kullanılmıştır.

1- Ucuz oluşu : Bu günkü fiyatlarla 500 teste yetecek kadar reaksiyon karışımının maliyeti 12.500 TL civarındadır.

2- Yöntemin uygulama kolaylığı ve 10 dakika gibi kısa süre-

de sonuç vermesi.

3- Ayıraçların uzun süre stabil olması : Reaksiyon karışımı -20°C de en az 3 ay stabildir¹⁵.

4- Beklemiş kan örnekleri ile çalışılabilmesi : Kan örneklerinin 4°C de 21 gün, 25°C de 5 gün süreyle saklanması herhangi bir aktivite kaybına yol açmamaktadır²⁰.

Bu çalışmada heparinize şişelere alınan kan örnekleri, hastanelerden laboratuvarımıza nakli sırasında geçen kısa süre dışında $+4^{\circ}\text{C}$ de saklanmış ve floresan spot test çalışmaları 24 saat içinde tamamlanmıştır. Lowe ve arkadaşları⁷⁴ heparinize örneklerin 30°C de dahi 8 güne kadar stabilitesini koruduğunu bildirmişlerdir.

5- Anemiye karşı kendi kendini düzeltmesi :

Floresan spot testin tam kan ile yapılması NADPH'in verdiği floresan şiddetinin hemoglobin tarafından bir miktar baskılanmasına yol açmaktadır. Ancak bu yöntemde, NADPH'in verdiği floresansı aktive etmek için kullanılan dalga boyunun, hemoglobinin maksimum absorpsiyon bandının (Soret bölgesi) altında kalması, ve test solusyonunun adi filtre kağıtlarına damlatılması ile bir miktar hemoglobinin NADPH dan kromatografik olarak ayrışması, hemoglobinin bu istenmeyen etkisini en aza indirmektedir¹⁵.

Anemik örneklerde, kullanılan test hacminde mevcut enzim miktarındaki azalmaya bağlı olarak, açığa çıkan NADPH miktarı azalacaktır. Ancak örneğin hemoglobin içeriğinin de aynı oranda azalmış olması ile bu durum dengelenmekte ve gözlenen floresan şiddetinde önemli bir değişiklik olmamaktadır¹⁵.

Biz de, çalışmalarımızda kullandığımız kordon kanlarının hemoglobin düzeylerinin 10-20.8 % gr arasında değişmesine karşın,

test sonuçlarında belirgin bir interferansa yol açmadığını gözlemledik.

6- Test sonuçlarının kantitatif aktivite ölçümleri ile iyi korelasyon göstermesi :

Floresan spot test, G6PD aktivitesi ile orantılı olarak açığa çıkan NADPH ın verdiği floresansın U.V. ışığı ile aktive edilerek gözlenmesi esasına dayanır^{15,16,134}. 0,5 ve 10. dakika spotlarında gözlenen floresan şiddetinin enzim aktivitesine bağımlı ve görelî olarak değişmesi sonuçların semikantitatif değerlendirilmesine olanak vermekte⁵, böylece tam yetmezlik, ara şekil, normal ve artmış aktivite gösteren olgular spot test ile ayırdedilebilmektedir¹³¹.

Kantitatif ölçüm yöntemlerinin çoğu, yine enzim aktivitesi ile orantılı olarak oluşan NADPH ın ölçümüne dayanmaktadır⁹⁷. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) aktivitesi normalin % 25 inden az bulunan olguların (-), % 25-65 arasında bulunanların (⁺), % 65-150 arasında bulunanların (+) ve % 150 nin üzerindekiilerin (++) şeklinde değerlendirilmesini önermektedir¹³⁰. Yapılan çalışmalar, floresan spot test sonuçlarının kantitatif test sonuçları ile çok iyi korelasyon gösterdiğini ve WHO tarafından önerilen değerlendirmenin spot test sonuçlarına da uygulanabileceğini göstermiştir^{131,139,140}.

Biz çalışmamızda floresan spot test ile hem 5. hem de 10. dakika spotlarında hiç floresan göstermeyen 9 olgunun kantitatif enzim aktivitelerini normalin % 0,00-5,15 i arasında, ortalama % 1.88 olarak bulduk. (⁺) floresan gözlediğimiz 3 olgunun aktivitelerini ise normalin % 42,25-55.02 si arasında, ortalama % 49,39 olarak bulduk. Bu sonuçlar, WHO¹³⁰ değerlendirmesine uygun olup, Yüreğir

ve arkadaşlarının¹⁴⁰ bulguları ile de uyumludur.

7- Çok az miktarda kan örnekleri ile çalışılabilmesi :

Floresan spot testle kullanılan örnek hacmi yalnızca 20 mikrolitredir¹⁵. Bu, özellikle kitle taramaları ve yenidoğanlar üzerinde yapılan çalışmalarda büyük avantaj sağlanmaktadır¹³⁴. Test için filtre kağıtları üzerine alınarak kurutulmuş kan damlalarının da kullanılabilmesi ve bu örneklerde enzim aktivitesinin uzun süre stabilitesini koruması³⁶, yenidoğanlardan galaktozemi ve fenilketonüri taramaları amacıyla alınan örneklerin, G6PD yetmezliği açısından da taranabilmesine olanak vermektedir^{22,123}.

Bütün bu avantajlarına karşın, G6PD yetmezliğin tanısında genel olarak sorun yaratan 2 durum floresan spot testte de söz konusudur. Bunlardan birincisi, heterozigotların, diğeri yakın zaman içinde hemolitik bir atak geçirmiş ve retikülosit cevabı henüz yatışmamış olan olguların tanısıdır^{15,20}. Bu ikinci sorun özellikle Gd^A gibi orta şiddette yetmezlik gösteren varyantlarda önem kazanmaktadır^{17,20,55,108}. Bu varyantta genç eritrositlerin aktivitesi normaldir. Hemolitik olayın sirkülasyondaki aktivitesi azalmış yaşlı eritrositleri elimine etmesi ve retikülosit cevabıyla ortalama eritrosit yaşının azalması aktivitenin normal hatta ortalama eritrosit yaşının 12 günün altına inmesi halinde, normalden bile yüksek bulunmasına yol açabilir⁹⁷. Bu durumun heterozigotlarda gelişmesi tanıyı iyice zorlaştıracaktır¹⁶. Ancak, eritrositleri yaşlarına göre ayırıp yalnızca yaşlı eritrositlerin test edilmesine olanak sağlayan mikrogravimetrik yöntemin⁵⁵, floresan spot test ile birleştirilmesi Gd^A varyantında bile tanıyı mümkün kılmaktadır²⁰.

Heterozigot yetmezlik gösteren olgular değişik oranlarda iki ayrı hücre popülasyonuna sahip olduklarından, bunların tanısında

özel problemler çıkmaktadır^{15,20}. Heterozigotlarda Lyonizasyonun sonucu olarak yetmezlikli ve normal hücrelerin göreceli oranının % 50 olması beklenir, ancak Lyonizasyonun rastgele oluşu ve yetmezlikli ve normal hücrelerin son konsantrasyonunun postinaktivasyon seleksiyonundan etkilenişi bu oranın % 0 ile % 100 arasında herhangi bir değerde bulunmasına yol açmaktadır^{76,92,97}. Böylece kişi tamamen normal veya yetmezlikli sınırlarda bulunabilmekte ve bu kişiler yalnızca tarama testleri ile değil^{18,30}, kantitatif yöntemlerle dahi kolaylıkla gözden kaçırılabilir¹³¹. Fairbanks ve Lampe³⁸ spektrofotometrik yöntemlerle heterozigotların ancak % 70 inin yakalanabileceği kanısındadırlar. Beutler¹⁵ ve Smith¹¹⁷, hücre lizati kullanan yöntemlerle heterozigotları yakalamamanın güçlüğüne dikkat çekmişlerdir. Ancak intakt eritrositlerde yapılan hemoglobin elüsyon⁵⁰ ve G6PD tetrazolium sitokimyasal yöntemleri ile³⁸, tek tek hücrelerde enzim aktivitesini incelemek olasıdır.

Fairbanks ve arkadaşları^{37,38} yetmezlikli ve normal erkeklerin kanlarını belirli oranlarda karıştırarak hazırladıkları deneysel karışımlarda, methemoglobin elüsyon ve G6PD-tetrazolium sitokimyasal yöntemlerinin % 2-5 arasında yetmezlikli hücre içeren heterozigotları yakalayabilecek duyarlılıkta olduğunu bulmuşlardır. Floresan spot testin duyarlılığı için ise karışımın en az % 60 oranında yetmezlikli hücre içermesi gerektiğini, daha düşük değerlerde ise yalnızca negatif sonuç verdiğini bildirmişlerdir³⁷.

Biz incelediğimiz 236 kız bebeğin yalnızca 3 tanesinde (†) floresan gözledik. Bu olguların enzim aktivitelerini ölçtüğümüzde normalin % 42 si ile % 55 i arasında değiştiğini bulduk. Sanna ve arkadaşları¹⁰⁴ heterozigotlarda yetmezlikli hücre yüzdesinin enzim

aktivitesi ile önemli derecede korelasyon gösterdiğini vurgulamaktadırlar. Buna göre bizim floresan spot test ile yakaladığımız bu üç olgunun yetmezlikli hücre yüzdelerinin % 45 ile % 58 arasında değiştiği kabul edilebilir. Bu değerlerimiz, Fairbanks ve Fernandez'in³⁷ floresan spot testin duyarlılığı için en az bulunması gereken yetmezlikli eritrosit yüzdesi olarak verdikleri değer (% 60) altındadır. Bir başka deyişle, yetmezlikli hücre yüzdesini % 45 olarak kabul edebileceğimiz bir olgunun yakalanması, bizim çalışmamızda floresan spot testin daha duyarlı olduğunu düşündürmektedir.

Fairbanks ve Fernandez³⁷, çalışmalarını Gd A⁻ varyantında yaptıklarını ve daha ciddi yetmezlik gösteren varyantlarda test duyarlılığının daha yüksek bulunabileceğini söylemişlerdir. Bizim çalışmalarımızda varyant karakterizasyonu yapılmamış olmakla birlikte, bir Akdeniz şehri olmamız dolayısıyla, yakaladığımız olguların Gd Akdeniz varyantını taşımaları büyük olasılıktır. Bu nedenle çalışmamızda floresan spot testin daha duyarlı bulunması şaşırtıcı olmasa gerekir.

X e bağlı kalıtılan karakterler için, hemizigot yetmezlikli erkek yüzdesi bilinen bir toplulukta, bulunması gereken (beklenen) heterozigot yüzdesi Hardy-Weinberg eşitliğinden hesaplanabilir⁹⁷.

Bu eşitlikte :

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \text{ (Hardy-Weinberg eşitliği)}$$

q = hemizigot yetmezlikli erkek yüzdesi

p = hemizigot normal erkek yüzdesi = (1-q) olup,

p² = homozigot normal kadın yüzdesi

2pq = heterozigot yetmezlikli kadın yüzdesi

q² = homozigot yetmezlikli kadın yüzdesini verir.

Bu eşitliğe göre bizim incelediğimiz topluluk için beklenen heterozigot yüzdesi % 5.15 dir ($q=0,0265$, $2pq = 0,0515$). Oysa bizim bulabildiğimiz heterozigot yüzdesi % 1.27 (3/236) dır. Buna göre, floresan spot test ile beklenen heterozigotların ancak % 25 ini yakalayabildiğimizi ve testin % 75 oranında yalancı negatif sonuç verdiğini söyleyebiliriz.

Yakalayabildiğimiz olgulara ait en yüksek enzim aktivitesini normalin % 55 i olarak bulmamız, yakalayamadığımız olguların enzim aktivitelerinin büyük olasılıkla daha yüksek olduğunu ve normal fenotipe kaydığını düşündürmektedir. Sanna ve arkadaşları¹⁰⁴ yenidoğan heterozigotlarda yetmezlikli eritrosit yüzdesini (% 43.67), yetişkinlerden (% 53.27) önemli derecede düşük bulmuşlar ve bu nedenle yenidoğan heterozigotları yakalamanın erişkinlerden daha güç olduğuna dikkat çekmişlerdir.

Yenidoğan eritrositlerinin yaşam süresi, fetal ve neonatal dönemdeki bazı geçici metabolik defektlere bağlı olarak erişkinlerden daha kısadır^{27,127}. Bu özelliğin G6PD yetmezliği ile birleşmesi yenidoğan heterozigotlarda yetmezlikli hücrelerin yıkım hızının artmasına ve sirkülasyondan daha hızlı çekilmesine yol açacaktır¹⁰⁴. Yetmezlikli eritrosit yüzdesinde azalma ve dolayısıyla ortalama enzim aktivitesinde bir artışla sonuçlanacak olan bu durum, yenidoğan heterozigotların normal fenotipe kaymalarını açıklayabilir. Bu durumda tanının daha güç olacağı ve yenidoğanların oluşturduğu bir toplulukta testin daha fazla yalancı negatif sonuç vereceği muhtemeldir.

Bizim beklenen heterozigotların ancak % 25 ini yakalayabilme-miz, belki de yenidoğanlar üzerinde çalışmamızın bir sonucudur. Bu

bulgumuz yine yenidoğanlarda floresan spot testin tanı değerini araştıran Yeung ve arkadaşlarının¹³⁴ bulguları ile uyumludur. Bu araştırmacılar, yetmezlikli kız bebeklerin ancak % 20 sini yakalayabildiklerini bildirmişlerdir.

Değişik yaş gruplarından olgular üzerinde çalışan Hamamy ve Saeed⁵³ heterozigotların % 35 ini yakalayabildiklerini ve bu rakamın, klinik olarak risk altında bulunan heterozigot yüzdesine çok yakın olduğunu bildirmişlerdir.

Beutler¹⁵ daha sık aralıklarla alınan spotların incelenmesi ile heterozigotların yaklaşık % 60 ının yakalanabileceğini öne sürmüştür. Ancak literatürde bulabildiğimiz kadarıyla, bu denli yüksek bir sonuç bildirilmemiştir. Tablo 17 de bizim ve floresan spot test ile tarama yapmış bazı araştırmacıların bulguları ile bu bulgulara dayanarak Hardy-Weinberg eşitliğine göre hesapladığımız beklenen ve yakalanabilen heterozigot yüzdeleri verilmiştir.

Aktivitesi normalin % 30 undan düşük bulunan olguların klinik olarak risk altında olduğu bildirilmiştir³⁰. Bizde çalışmamızda, aktivitesi ortalama olarak normalin % 49 u civarında olan olguları yakalayabildiğimize göre floresan spot testin yetmezlikli erkeklerin olduğu kadar, klinik olarak risk altında bulunan heterozigotların tanısında da değerli bir test olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmamızda incelediğimiz 264 erkek bebeğin hiçbirinde (\pm) sonuç gözlemedik. Yüreğir ve arkadaşları¹⁴⁰ floresan spot test ile bir erkekte (\pm) sonuca rastladıklarını ve bu olgunun elektroforetik olarak Gd^{B+} ile aynı mobiliteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Yine Yüreğir ve İsbir¹³⁹ tarafından Çukurova'nın çeşitli yörelerinde yapılan geniş çaplı bir taramada erkeklerin % 3.8 inde (\pm) sonu-

ca rastlandığı ve bu olguların bazı yörelerde daha yoğun olarak bulunduğunu bildirilmiştir. Yazarlar¹³⁹ bu bulgularını G6PD in heterojenitesi ile açıklamaktadırlar.

Yine bu çalışmada hiçbir olguda (++) floresana rastlanmamasına karşın Yüreğir ve arkadaşları¹⁴⁰ 2 olguda (++) floresan gözlediklerini ve bu olguların kantitatif enzim aktivitelerini normalin % 150 sinin üzerinde bulduklarını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda erkekler arasında % 2.65 ve kızlar arasında % 2.12 olmak üzere toplam % 2.40 oranında G6PD yetmezliği tespit ettik. Yalnızca Antalya merkez ilçe açısından değerlendirildiğinde yetmezliğin, erkekler arasında % 2.93 e (7/239), kızlar arasında % 2.25 e (5/222) ve toplam % 2.60 a (12/461) yükseldiği görülmektedir. Olanaksızlıklar nedeni ile olgu seçiminde tam bir istatistiksel örnekleme yöntemine sıkı sıkıya bağlı kalamadık. Bu nedenle bulduğumuz yetmezlik sıklığının yöremize ait gerçek prevalansı yansıttığını söylemek doğru olmayacaktır. Ancak örnekleri topladığımız hastanelerin kayıtlarından kabaca elde ettiğimiz bilgiler, araştırmamız süresince olan doğumların büyük çoğunluğundan (% 80 in üzerinde) örnek alındığını göstermektedir. Bu nedenle bulduğumuz değerlerin yöremizdeki enzim yetmezliği prevalansı hakkında bir fikir verebileceği ve bunun gerçeklerden çok uzak olamayacağı inancındayız.

Literatürün taranması şimdiye kadar yöremizde G6PD yetmezliği sıklığının tespitine yönelik kapsamlı bir epidemiyolojik çalışmanın yapılmadığını göstermektedir. Ancak Antalya'nın bazı ilçelerinde yaşayan küçük topluluklar üzerinde herhangi bir örnekleme yöntemi uygulamaksızın yapılmış birkaç çalışma bulunabilmektedir.

Kaynak	İncelenen Olgular	Spot (+)	test sonucu		Heterozigot (%) *			
			(±)	(-)	Bulunan	Beklenen	Yakalanan	
Bu Çalışma	Erkek	264	257	—	7			
	Kadın	236	231	3	2	13	5.2	25
	Toplam	500	488	3	9			
Yüreğir Ve İsbir (139)	Erkek	771	706	29	36			
	Kadın	1224	1125	63	36	5.2	15.4	34
	Toplam	1995	1831	92	72			
Milbauer Ve ark. (88)	Erkek	3847	3582	—	265			
	Kadın	3597	3502	52	43	1.4	12.8	11
	Toplam	7444	7084	52	308			
Aksu ve Yanarates (5)	Erkek	463	461	—	2			
	Kadın	287	287	—	—	0.0	0.53	0
	Toplam	750	748	—	2			
Dow Ve ark. (36)	Erkek	140	127	—	13			
	Kadın	135	133	—	2	0.0	16.9	0
	Toplam	275	260	—	15			
Hamamy Ve Saeed (53)	Erkek	305	267	—	38			
	Kadın	394	359	?	?	7.4 [†]	21.1 [†]	35 [†]
	Toplam	699	629	?	?			

Tablo 17 : Bu çalışmada ve diğer çalışmalarda bulunan Floresans spot test sonuçları

* Yazarların spot test sonuçlarına göre hesaplanmıştır.

† Yazarların kendi bulgularıdır.

1968 de Aksoy ve arkadaşları² Antalya'nın Manavgat, Serik ve Boztepe ilçelerinde yaşayan 72 erkek üzerinde metilen mavisi dekolizasyon testi ile yaptıkları taramada % 5.4 oranında yetmezlik tespit etmişlerdir. Bu değerın bizim erkekler arasında bulduğumuz yetmezlik sıklığınının 2 katına yakın olduğu görülmektedir. Bu fark kullanılan tarama yönteminin, incelenen ilçelerin ve örnek sayısının farklılığından kaynaklanabilir.

Yöremizde Sipahioğlu tarafından yapılan çeşitli araştırmalarda ise yetmezliğin çok daha yüksek sıklıkta bulunduğu bildirilmiştir. Yazar¹¹⁰ 1966 da Alanya bölgesi Toros Selçuk Türklerinde Brewer testi (Methemoglobin redüksiyon) ile % 43 oranında yetmezlik saptamıştır. 1967 de yine Alanya yöresinde kadınlar arasında % 31.4-37.5 erkekler arasında % 25.3 oranında yetmezlik bildirilmiştir¹¹¹. Yazarın 1976 yılındaki yayınlarında ise^{114,115} yetmezliğin % 20 civarında bulunduğu bildirilmektedir. Yazarın bu denli yüksek değerler bulmasınının 2 nedeni olabilir. Birincisi o yıllarda Alanya'nın çevreye kapalı, kendi içlerinde evlenen homojen bir topluluğu barındırmasıdır. Ancak yazarın bulgularından da farkedilebileceği gibi yıllar ilerledikçe yetmezlik sıklığınının düşmesi büyük olasılıkla dışarıdan bu yöreye olan göçlerin sonucudur. İkincisi yazarın kullandığı methemoglobin redüksiyon testinin heterozigotların tanısında daha duyarlı oluşudur⁵⁰. Yazarın araştırmaları sırasında favizm ile seyreden bir olgudan alınan kan örneğinin Fransız araştırmacı Kahn tarafından yapılan enzimatik karakterizasyonu sonucu yeni bir varyant bulunmuş ve "G6PD Antalya" adı verilmiştir. Bu varyant^{Gd Akdeniz} varyantına benzemekle birlikte pH eğrisinin hafif bifazik oluşu (pH:7 ve 8 de), immünolojik spesifik aktivitesinin

(% 60) ve lökosit enzim aktivitesinin (normalin % 65 i) daha yüksek oluşu ile Gd^{Akdeniz} varyantından ayrılmaktadır. Bu varyantın Gd^{Akdeniz} varyantının ikinci bir mutasyonu olduğu düşünülmüştür¹¹⁵. Gd^{Akdeniz} varyantı tek bir genetik defekt olmayıp, şimdiye değin birçok alt grubu bulunmuştur³⁴.

Türkiye'nin diğer yörelerinde yapılan araştırmalar en yüksek sıklığın Çukurova yöresinde bulunduğunu göstermektedir. Bu yörenin önemli bir özelliği değişik kökenlere sahip heterojen bir topluluğu barındırmasıdır¹³⁹. Çeşitli araştırmacılar tarafından bu yörede, Arapça konuşan Eti Türklerinde G6PD yetmezliği % 8.1 ile % 11.4 arasında bulunmuştur^{106,131,139}. Türkmen, Ermeni, Çerkez, Gürcü ve yerli halktan oluşan topluluklarda ise yetmezlik % 0,5 ile % 3,7 arasında değişen sıklıklarda bulunmuştur^{131,139}. Yüreğir¹³⁹ ve Say¹⁰⁶ Eti Türklerinde Hb S sıklığının yüksekliğine dikkat çekmişlerdir. Hb S ve G6PD genleri farklı kromozomlar üzerinde bağımsız olarak kalıtılmakla birlikte, birçok araştırmacı G6PD yetmezliği ile ortak hücreli aneminin birarada bulunmasının organizmaya yaşama şansı vererek doğal seleksiyona sebep olduğu görüşündedir^{44,72,73,95}. Ancak bu görüşe katılmayan araştırmacılar da vardır^{84,94,116}. Çukurova'nın bir diğer özelliği de bu yüzyılın başlarında sıtma epidemisi yaşamasıdır. G6PD yetmezliğinin plasmodium falciparum enfestasyonuna karşı koruyucu etki sağladığı bilinmektedir^{23,44,47,100,133}. Ancak Türkiye'deki sıtma epidemisinden plasmodium vivax sorumlu olup, plasmodium falciparum'a hiç rastlanmamıştır¹⁰⁶. Tartışmaya açık noktaları olmakla birlikte Çukurova'da bu üç durumun birarada bulunuş sıklığı rastlantıdan ibaret olmasa gerekir.

Say ve arkadaşları¹⁰⁶ değişik yöre ve populasyonlarda yaptık-

ları çalışmalarında en yüksek sıklığa Eti Türklerinden (% 11.4) sonra % 3,5 ile Kıbrıs Türklerinde rastlamışlardır. Diyarbakır'da Kürtçe konuşan popülasyonda % 1.92, İzmir'de % 0,94, Ankara'da % 0,5, İstanbul'da Yunan, Ermeni ve Musevi asıllı kişilerde % 0, yine Rize civarında % 0 bulmuşlardır¹⁰⁶.

Aksoy ve Erdem³ Türkiye'nin çeşitli yörelerine mensup kişilerde % 0,6, Aksu ve Yanarates⁵ Erzurum civarında % 0,266 oranında yetmezlik saptamışlardır.

Bu çalışmalara dayanarak yurdumuzda G6PD yetmezliği gen frekansı için kesin bir şey söylemek olası değildir. Ancak Akdeniz yöresinde diğer Akdeniz ülkeleri kadar olmasa da halk sağlığı açısından üzerinde durulmaya değer sıklıkta bulunduğu görülmektedir. Bu nedenle bütün Antalya ilini kapsayan geniş çaplı bir tarama yapılarak, G6PD yetmezliği prevalansının bugünkü gerçek değerinin tespiti ve elde edilen sonuçlara göre gereken koruyucu ve tedavi edici hekimlik hizmetlerinin planlanmasının uygun olacağı kanısındayız.

Çalışmamızda, yetmezlik saptadığımız olguların anne-babaları arasında akraba evliliğinde rastlama sıklığı, normal olgulardan önemli derecede ($p < .01$) yüksek bulunmuş olup, bu, G6PD yetmezliğinin hereditör karakterinden beklenen bir sonuçtur.

Benzer şekilde, yetmezlikli olguların aile fertleri arasında favizme rastlanma sıklığı, normallerden önemli derecede ($p < .01$) yüksek bulunmuştur. Bununla beraber yetmezlikli olgulardan yalnızca % 16.7 sinin ailesinde favizm anamnezi vermesi her G6PD yetmezliğinde favizmin ortaya çıkmadığını göstermektedir. Bütün yetmezlikli kişilerde favizm görülmemesi, bu hastalığın ortaya çıkışında G6PD yetmezliğinin yeterli olmadığını ve patogeneğinde bazı ek fak-

törlerin rol oynadığını ortaya koymuştur^{16,28,40,59,130}.

Yöremizde bakla yeme alışkanlığının yaygın olmasına karşın, G6PD yetmezliğine sahip ailelerin yalnızca bazılarında favizm görülmesi, Stamatoyannopoulos ve arkadaşlarının¹²⁰ öne sürdükleri gibi favizme karşı ailesel bir predispozisyonun varlığını düşündürmektedir. Yazarlar¹²⁰ favizmin etyopatogenezinde G6PD yetmezliğine ek olarak, baklada bulunan oksidan ajanların absorpsiyonu veya metabolizmasında rol oynayan ayrı bir genin varlığını öne sürmüşlerdir. Ancak bu görüş, çocukluğunda favizm geçirdiği ve bu nedenle kendisine transfüzyon yapıldığı halde şimdi rahatlıkla bakla yiyebildiğini söyleyen bir ebeveynin durumunu açıklamaktan uzaktır. Favizmin en sık 2-6 yaşlar arasında görülmesi^{86,108,133} G6PD yetmezliği sabit olarak kaldığı halde, baklaya karşı duyarlılığın yaşla azaldığını düşündürmektedir. Kattamis ve arkadaşları⁶⁴, gastrointestinal absorpsiyon kinetiğinin yaşa bağımlı olarak değişmesinin, küçüklerde toksinin daha yüksek kan düzeylerine ulaşmasına ve daha şiddetli hemolize yol açtığını söylemektedirler.

Favizm anemnezi veren olgularımızın hepsi etkeni pişirilmiş taze bakla olarak tarif etmişlerdir. Kurutulmuş bakla alımı veya polen inhalasyonuna bağlı favizme rastlanmamıştır. Bu büyük olasılıkla toplumun beslenme alışkanlığına bağlı olabilir. Meloni ve arkadaşları⁸⁶ Sardunya'da taze bakla alımına, buna karşın Kattamis ve arkadaşları⁶⁴ Yunanistan'da kurutulmuş bakla alımına bağlı favizme daha sık rastlandığını bildirmişlerdir. Ancak her iki araştırmacıda^{64,86} polen inhalasyonuna bağlı olgu saptamamışlardır. Schilliro ve arkadaşları¹⁰⁷ ise Sicilya'da sık rastlanan etkenin taze bakla olduğunu ancak polen inhalasyonuna bağlı olgulara da rastladık -

larını bildirmişlerdir. Lattanzio ve arkadaşları⁶⁹ bakla tohumunun gelişimi boyunca, oksidan etkisinden sorumlu olan vicine, convicine ve Ldopa içeriğinin önemli değişikliğe uğradığını ve kurutulmuş baklanın taze baklaya göre bu metabolitleri daha az içerdiğini bulmuşlardır. Hedayat ve arkadaşları⁵⁴ ise baklanın taze veya kurutulmuş oluşunun favizmin kliniğini etkilemediği görüşündedirler.

Favizm Gd^{Akdeniz} varyantına özgün görünmektedir^{28,82,108,130,133}. Akdeniz ülkelerinden yapılan bir çok yayında^{34,86,107}, G6PD yetmezliğinin en sık rastlanan klinik şeklinin favizm olduğu, ilaca ve enfeksiyona bağlı hemolizin 2. veya 3. sıraları olduğu bildirilmiştir. Bu konuda Çukurova'da yapılan bir araştırmada, hemolitik krizle başvuran 68 yetmezlikli olgunun yalnızca 4 tanesinde (% 5,6) bakla alımının etken olduğu ve enfeksiyona ve ilaca bağlı hemolizden sonra 3. sırayı aldığı bulunmuştur¹³¹. Ancak Sipahioğlu¹¹² Akdeniz bölgesinde favizm görülme sıklığının (% 10-15) G6PD yetmezliği sıklığına paralel olduğu kanısındadır.

Çalışmamızda floresan spot test ile yetmezlik saptadığımız 12 olgunun kantitatif parametrelerini değerlendirmek amacıyla 15 i kız, 15 i erkek olmak üzere 30 kişilik bir kontrol grubu seçtik. Kontrol grubunu seçerken, her yetmezlikli olguya karşılık, aynı gün aynı hastanede doğmuş ve doğum ağırlığı, doğum haftası (gestasyon yaşı) ve doğum şekli açısından yetmezlik saptadığımız bebek ile mümkün olduğunca benzer özelliklere sahip en az bir kız ve bir erkek bebek seçmeye dikkat ettik.

İncelenen kantitatif parametrelerin hepsi yaşa bağımlı olduğundan kontrol grubu seçiminde en önemli kriter olarak gestasyon yaşını aldık. Böylece çalışmalarımızın sonunda, kontrol grubumuzun

gestasyon yaşı ortalaması (39.6 ± 1.85 hafta) yetmezlikli olgularımızın gestasyon yaşı ortalamasına (39.8 ± 2.08 hafta) oldukça yakın ve aradaki fark istatistiksel olarak önemsiz ($p > .05$) bulundu.

Kontrol grubunun yarısını kız, yarısını erkek olarak seçmek - teki amacımız ise inceleyeceğimiz kantitatif parametrelere ait normal değerlerin iki cins arasında farklı bulunması olasılığı idi. Bu durumda yetmezlikli olgularımızı kontrol grubu ile karşılaştırırken cinsiyet ayırımına gitmemiz gerekecekti. Ancak t testi ile yaptığı - mız karşılaştırmada, her üç parametre açısından da (eritrosit enzim aktivitesi, hemoglobin ve retikülosit düzeyleri) kızlarla erkekler arasında önemli fark bulunmadı. Bunun üzerine kontrol grubu tek gruba indirilerek 30 bebekten elde edilen ortalama değerler normal değer olarak kabul edildi ve yetmezlikli olgulara ait değerler kontrol grubu ile karşılaştırılırken cinsiyet ayırımı gözetilmedi.

Kantitatif G6PD aktivitesi eritrosit hemolizatında ölçüldü. Hemolizatın hazırlanışı sırasında enzimin aktivite kaybına uğramasına özellikle dikkat edildi. Bu amaçla :

- 1- Bütün santrifüjleme işlemleri $+ 4^{\circ}\text{C}$ de yapıldı.
- 2- Yıkamalarda $+ 4^{\circ}\text{C}$ ısıda izotonik sodyum klorür kullanıldı.
- 3- Yıkamalar arasında eritrosit paketinin üstünde kalan beyaz hücre tabakasının tamamen alınmasına ancak bu sırada en üst eritrosit tabakasının bozulmamasına özen gösterildi. Santrifügasyon sırasında dansite gradientine bağlı olarak en yaşlı eritrositler tüpün en altında en genç eritrositler ise tüpün en üstünde toplanmaktadır^{9,11,43,55}. Beyaz hücrelerin aspirasyonu sırasında üstteki eritrosit tabakasının da alınması genç hücrelerin bir kısmının kaybına, dolayısıyla örnek ortalama eritrosit yaşının yükselmesine yol açar.

caktır. Bu durumda ölçülen aktivite örneğin gerçek aktivitesinden düşük bulunacaktır. Bu durum yetmezlikli olgularda daha da önem kazanmaktadır¹⁰³. Çünkü normal enzimin (Gd^{B+}) eritrositlerdeki yarısı ömrü 62 gün iken, Gd^{A-} varyantında 13 gün, Gd^{B-} varyantında ise çok daha kısadır¹¹⁶.

Lökosit ve diğer kan hücrelerinin, eritrositlerden tamamen uzaklaştırılmaması halinde, bu hücrelere ait enzim aktivitesi de hemolizata dahil olacak ve ölçülen aktivite örneğin gerçek aktivitesinden (eritrosit enzim aktivitesinden) yüksek bulunacaktır. Bu durum defektif enzim taşıyan örneklerde ihmal edilemeyecek hatalara yol açabilir. Çünkü yetmezlikli kişilerde eritrosit G6PD aktivitesi diğer dokulardan çok daha düşüktür⁸⁰. Çok az veya hiç protein sentezi yapamayan eritrositlerde, eritrositin yağlanması ile enzim aktivitesindeki azalma, protein sentezi yapabilen diğer dokulara göre çok daha fazla olmaktadır⁸⁰. Değişik G6PD varyantlarında sentez ile azalma hızı arasındaki denge lökositlerde enzimin bazen normal, bazen de düşük bulunmasıyla sonuçlanır fakat hiçbir zaman eritrositlerdeki kadar düşük olmaz⁹⁷.

4- Hemoliz işlemi sırasında hücre dışına çıkan enzimi inaktivasyondan korumak amacıyla 27 mM EDTA (pH:7.0) ve 0,7 mM 2- mercaptoethanol içeren stabilize edici solusyon kullanıldı. Bu solusyon enzimin (-SH) gruplarına + 4°C de 10 gün süreyle korumaktadır. Yoshida¹³⁶ insan G6PD inin aktif dimer başına 18 sülfidril grubu içerdiğini bildirmiştir. Fizyolojik şartlarda 3 mM in üzerinde redükte glutatyon varlığı, enzimin tüm sülfidril gruplarına redükte formda tutmaya yeterlidir¹³⁶. Ancak hücre dışına çıkan enzimin hava ile teması sülfidril gruplarınının % 70 inin oksidasyonu ile sonuçlanmak-

tadır¹³⁶. Bununla birlikte Yoshida¹³⁶, hava ile oksidasyonun enzimde önemli bir aktivite kaybına yol açmadığını ve 2-mercaptoethanol eklenmemesi halinde enzim aktivitesinin yalnızca % 6 oranında azaldığını bildirmiştir.

Stabilize edici solüsyona NADP⁺ eklenip eklenmemesi konusunda yazarlar arasında fikir birliği yoktur^{19,130}. NADP⁺ enzimin aktif polimerizasyonu ve kararlılığı için gereklidir^{9,76,97,98,118}. Enzim NADP⁺ içermeyen ortamlarda inaktif monomerlerine dissosiyasyon olur¹³⁷. Ancak bu dissosiyasyon reversible olup, NADP⁺ konsantrasyonlarının arttırılması enzim molekülünde NADP⁺ a karşı daha yüksek affinite gösteren yapısal değişikliklere yol açarak enzimi reaktif etmektedir^{8,49,76,97,98,137}.

Biz yaptığımız ön çalışmada stabilize edici solüsyona NADP⁺ eklenip eklenmemesinin enzim aktivitesinde ölçülebilir bir değişikliğe yol açmadığını bulduk. Bunun nedeninin enzim aktivite ölçüm koşullarının pH:8,0 de ve yüksek NADP⁺ konsantrasyonlarında (0,2 mM) tutulması olabileceğini düşündük. Yoshida¹³⁷ enzimin bu pH da dimer oluşturma eğiliminde olduğunu bildirmiştir. Hemolizat hazırlama safhasında ortamda NADP⁺ bulunmaması enzimin monomerlerine dissosiyasyonuna yol açsa bile hemolizatın reaksiyon karışımı ile 37°C de 10 dakika preenkübasyonunun enzimin reaktivasyonu için yeterli olduğu kanısındayız. Stabilize edici solüsyona NADP⁺ eklenmemesi ile, kinetik olarak izlediğimiz reaksiyonun "Lag fazı" nda herhangi bir uzama gözleyişimiz, enzimin preenkübasyon süresince tamamen aktive olarak substratı ile birleşmeye hazır hale geldiğini göstermektedir. Kahler ve arkadaşları⁶¹ enzimin dimer formunun stabil olduğu ve lizis sırasında dissosiyasyon-assosiyasyona uğramadığı kanısındadır -

lar.

5- Hemoliz amacıyla Beutler ve arkadaşları¹⁹ tarafından önerilen hızla doldurulup çözme yöntemini uyguladık. Bu amaçla kullanılan diğer yöntemlerin çeşitli sakıncaları vardır. Digitonin, çözünlülüğü az ve yeterince saf olmayan bir maddedir¹⁹. Ayrıca hemoliz amacıyla digitonin ve saponin kullanılması enzim aktivitesinin yüksek bulunmasına yol açmaktadır⁷⁵. Hipotonik şok, membrana parsiyel olarak bağlı enzimlerin rezolüsyonu için yeterli değildir¹⁹. G6PD ın membrana parsiyel olarak bağlı bulunduğu bildirilmiştir⁹⁰. Sonikasyon ile tam hemoliz sağlanmakta, ancak bu yöntem özellikle unstabil varyantların parsiyel inaktivasyonuna yol açmaktadır¹⁹.

6- Yine Beutler ve arkadaşlarının¹⁹ önerilerine uyarak hemolizati santrifüjlemeden kullandık. Yazarlar¹⁹ solubl enzimlerin aktivite ölçümünde stroma varlığının herhangi bir interferansa yol açmadığını ve sistemin 340 nm de izlenen optik dansitesini yalnızca % 1 oranında arttırdığını bildirmişlerdir. Marks ve arkadaşları⁸⁰, hemolizata stroma eklenmesi ile G6PD aktivitesinde küçük bir artış gözlemişler, ancak bu etkinin stromada bulunması olası bir aktivatörden değil de, stromal G6PD aktivitesinden kaynaklandığını düşünmüşlerdir. Yazarlar⁸⁰ ayrıca, stromanın pürifiye enzim üzerinde stabilizatör etkisi olduğu görüşündedirler. Bizde, stroma varlığının enzimin in vivo koşullarına daha uygun olacağı düşüncesi ile hemolizati santrifüjlemekten kaçındık.

Hemolizat G6PD aktivitesini 37°C de, 0,2 mM NADP⁺ 0,6 mM G6P 0,01 M MgCl₂ ve 0,1 M Tris-HCl (pH:8.0) içeren modifiye Zinkham¹³⁰ yöntemi ile ölçtük. Burada MgCl₂ enzimin aktivatörü olarak rol oynamakta⁴⁹, eksikliği halinde enzim maksimum aktivitenin an-

cak % 70 i kadar aktivite göstermektedir⁸⁰. Reaksiyonun pH:8.0 de yürütülmesinin nedeni NADP⁺ e özgül enzimin optimum pH sının pH:8-9 arasında bulunuşudur^{49,80,82,118}. Bu yöntemde¹³⁰ olduğu gibi kantitatif aktivite ölçümünde kullanılan diğer yöntemlerin çoğunluğunda 29,75,91,118 Tris tamponu tercih edilmiş, fosfat tamponundan kaçınılmıştır. Bunun nedeni 0,1 M üzerindeki fosfat derişimlerinin enzim üzerinde inhibitör etki göstermesi olsa gerekir¹¹⁸.

Substrat olarak yalnızca G6P ve NADP kullanılan bu yöntem G6PD a özgün olmayıp beraberinde 6PGD aktivitesini de ölçmektedir 11,130. Çünkü ürün olarak açığa çıkan 6PG, hemen bütün hemolizatlar da bulunan 6PGD aktivitesi ile oksitlenerek daha fazla NADPH üretimine neden olmaktadır¹⁶. Enzim aktivitesinin hesaplanması sırasında 1 mol G6P in oksidasyonu ile yalnızca 1 mol NADPH oluştuğu kabul edildiğinden ölçülen aktivite G6PD a ait gerçek aktivitenin % 17-30 u kadar yüksek bulunmaktadır^{29,30,75}. Ancak 6PGD in substratı olan 6PG, G6PD in ürünü olduğuna göre, sonuç olarak açığa çıkan NADPH in tamamen G6PD aktivitesine bağımlı olacağı açıktır¹³⁰.

G6PD aktivitesini 6PGD aktivitesine göre düzeltilmiş olarak ölçen (enzyme-corrected assays) çeşitli yöntemler vardır^{11,29,30,75,91,130}. Bizim kullandığımız düzeltilmemiş yöntem (enzyme-uncorrected assay) göre daha pahalı ve zaman alıcı olan bu yöntemlerin herbirinin çeşitli sakıncaları bildirilmiştir.

Bunlardan iki aşamalı yöntem (standart assay)^{11,30,75,130} birinci aşamada substrat olarak yalnızca 6PG ikinci aşamada eşit konsantrasyonlarda G6P ve 6PG kullanılmaktadır. Böylece her iki enzimin total aktivitesi ve tek başına 6PGD aktivitesi ölçülerek aradaki farktan G6PD aktivitesi hesaplanmaktadır. Bu yöntemin duyarlılığı

düşük G6PD aktivitelerinde sınırlıdır¹³⁰. Çünkü bu durumda iki ölçüm arasındaki fark küçülmekte ve G6PD aktivitesi düştükçe hata payı artmaktadır^{11,29,30}.

6PGD ile birleştirilmiş yöntemde (enzyme-Linked assay)⁹¹ yüksek konsantrasyonlarda G6P ve NADP⁺ içeren reaksiyon karışımına 6PGD enzimi eklenmektedir. Eklenen 6PGD ile G6PD aktivitesine bağımlı olarak açığa çıkan 6PG'nin tamamı Ribuloz-5P'a kadar oksitlendiğinden reaksiyona giren her bir mol G6P'a karşılık iki mol NADPH meydana gelmektedir⁹¹. Buna göre hesaplanan sonuçlar yalnızca G6PD aktivitesini vermektedir. Bu yöntemde iki enzime ait reaksiyonlar arasında ara ürün olan 6-fosfoglukonolaktunun, 6-fosfoglukonik asitde hidrolizinin gerekmesi bazı sakıncalara yol açmaktadır. Enzimatik ve nonenzimatik olarak yürüyen bu hidroliz, izlenen total reaksiyonun "Lag fazının" uzamasına²⁹ ve duyarlılığın zayıflamasına³⁰ neden olmaktadır. Eklenen 6PGD'nin ticari preparatlarının bir miktar G6PD ile kontamine oluşu bir diğer sakıncadır²⁹. Chan³⁰ bu yöntemin yüksek aktivite düzeylerinde düşük sonuç verdiğini bildirmiştir.

2-3 difosfogliserat ve maleimid gibi 6PGD inhibitörlerinin¹³⁷ kullanıldığı bir diğer yöntemde²⁹ (enzyme-inhibited assay), endojen 6PGD aktivitesinin istenmeyen etkisi giderilmeye çalışılmıştır. Ancak bu yöntemin de pahalı oluşu ve kullanılan inhibitörün G6PD aktivitesini etkilemesi riski gibi sakıncaları vardır²⁹.

Bu gibi sakıncalarına ilaveten pahalı ve zaman alıcı oluşları nedeniyle, çalışmamızda düzeltilmiş yöntemleri kullanmaktan kaçındık.

Chan³⁰ bizim pH:8.0'de 18 dakika yürüttüğümüz reaksiyonun pH:7.6'da 3,5 dakika yürütülmesi ile 6PGD interferansının en aza indi-

rilebileceği ve G6PD aktivitesinin gerçek değerine yakın olarak bulunabileceğini bildirmiştir. Yazar³⁰ bu yöntemle kordon kanı G6PD aktivitesini 30°C de $8.6 \pm 3,3$ IU/grHb olarak bulmuştur. Bu değer bizim çalışma ısımız olan 37°C ye göre düzeltildiğinde 11.8 IU/grHb etmektedir ki bizim kordon kanı için bulduğumuz aktivitenin (13.4 IU/grHb) % 88 i kadardır. Bizim sonuçlarımızda endojen G6PD aktivitesinin de payı olduğuna göre bulgularımızın Chan'ın³⁰ bulguları ile uyumlu olduğu söylenebilir.

Lowe ve arkadaşları⁷⁵ hemolizatin hemoglobin içeriğinin spektrofotometrik yöntemlerin duyarlılığını önemli derecede sınırladığı görüşündedir. Hemoglobinin baskılayıcı etkisi çok dilüe (1/5000) örnek kullanılmasına olanak veren fluorometrik yöntemlerle % 7 e kadar düşürülebilmektedir⁷⁵. Ancak spektrofotometrik yöntemler bu kadar dilüe örneklerde ölçüm yapabilecek duyarlılığa sahip değildir⁷⁵. Bizim deney koşullarımızda, kullandığımız örneklerin reaksiyon karışımı içindeki son dilüsyon 1/400 civarındadır. Örneklerimizin hemoglobin konsantrasyonları % 10-20 gr arasında değiştiğine göre reaksiyon karışımlarımız 0,25-0,50 gr/lit hemoglobin içermektedir. Çalışmamızda bu derişimlerdeki hemoglobinin sonuçlarımızı interfere ettiğini gözledik. Şekil (4) e bakılacak olursa normal G6PD aktivitesine sahip olgularımızın (normalin % 65 inden büyük) hemoglobin değerleri ile G6PD aktiviteleri arasında ters bir ilişki bulunduğu göze çarpmaktadır ($r = -0.78$). Hemoglobinin bu baskılayıcı etkisi, kantitatif aktivite ölçümünde, floresan spot teste göre daha belirgin olmakta ve hemoglobin düzeyi yüksek olan olguların G6PD aktiviteleri görece olarak düşük bulunmaktadır. Ancak bu etkiden, enzim aktivitesini gram hemoglobin başına düşen ünite (IU/grHb) olarak

göstermemizin de sorumlu olacağı kanısındayız. Eritrosit G6PD aktivitesi, hemoglobin konsantrasyonundan çok eritrosit sayısı ile orantılıdır^{4,30,75}. Aktivitenin gram hemoglobin başına gösterimi demir eksikliği, hipokrom ve mikrositer anemilerde yalancı yüksek, buna karşın makrositer anemilerde düşük sonuçlar bulunmasına yol açacaktır^{30,75,96,105}. Aktivitenin 1 veya 100 ml kan başına gösterimi yine benzer hatalara yol açabilir⁴. Teorik olarak enzim aktivitesinin eritrosit sayısı başına gösterimi en doğru yöntem olmakla birlikte manuel eritrosit sayımlarının kişisel hatalara açık oluşu bunun pratik değerini çok azaltmaktadır^{75,131}. Ayrıca bir günden fazla bekletilmiş heparinize örneklerde eritrositlerin bütünlüğünün bozulması sayımları daha da güçleştirmektedir⁷⁵. Dünya Sağlık Örgütü¹³¹ eritrosit sayımlarının Counter ile yapılma olanağı olmayan laboratuvarlarda aktivitenin gram hemoglobin başına gösterimini önermektedir.

Çalışmamızda kontrol grubu oluşturan olgularımızın G6PD aktivitelerinde sekse bağlı bir fark gözlemedik. Bu bulgumuz Lowe⁷⁵, ve Rodgers'ın⁹⁹ bulguları ile uyumludur. Kordon kanında iki cins arasında aktivite farkı bulunmayışı, eritrositlerde X inaktivasyonunun ve böylece dozaj kompensasyonunun doğumdan önce tamamlanmış olduğunu göstermektedir. X inaktivasyonunun erken gelişim safhalarında meydana geldiği bilinmekle birlikte^{16,131}, insan embryosunda bu olayın ne zaman tamamlandığına dair kesin veriler yoktur¹²¹. Steele ve Migeon¹²¹ 14 haftalık bir fötüsün akciğer ve deri fibroblastlarında X inaktivasyonunun tamamlanmış olduğunu göstermişlerdir.

Piomelli ve Siniscalco⁹⁶ kadınlarda enzim aktivitesini erkeklerden yüksek bulmuşlar ancak kadınlarda hematokrit değerlerinin

düşük oluşu nedeniyle 1 ünite kan başına düşen aktivitenin erkeklerle aynı olduğunu bildirmişlerdir. Yazarlar⁹⁶ eritrosit başına düşen aktivitenin kadınlarda yüksek oluşunun dozaaj kompensasyonunun tam olmayışından kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir. Yine Yüreğir ve arkadaşları¹⁴⁰ kadınlarda enzim aktivitesini daha yüksek bulmuşlardır.

Tablo (18) de bizim bulgularımız ile bizimle aynı yöntemle çalışan diğer araştırmacıların bulguları karşılaştırılmıştır. Kullanılan reaksiyon ısıları Beutler ve arkadaşları¹⁹ tarafından verilen düzeltme faktörleri ile 37°C ye göre düzeltildiğinde bulgularımızın bu araştırmacılar^{40,71,104,115} ile oldukça uyumlu olduğu görülmektedir.

Beutler ve arkadaşları¹⁹, normal değerlerin laboratuvarlar arasında farklar gösterebileceğini ve bunun genellikle kullanılan kimyasalların ticari preparatlarının çeşitliliğinden kaynaklandığını vurgulamaktadırlar. Yazarlar¹⁹ her laboratuvarın kendi normal değerlerini saptaması ve kullandığı kimyasalları değiştirmesi halinde ölçümlerin tekrarlanması önermektedirler.

Çalışmalarımızda yenidoğan eritrositlerinde G6PD aktivitesi erişkinlerden önemli derecede ($p < .001$) yüksek bulunmuştur (şekil 8-a). G6PD aktiviteleri birbirine oranlandığında yenidoğanlara ait ortalama değer erişkinlerden 1.49 kat yüksek olduğu görülmektedir. Ancak biz bu değer gerçekte bizim bulduğumuzdan daha yüksek olduğu kanısındayız. Çünkü enzim aktivitesinin gram hemoglobinin başına gösterimi (IU/grHb), hemoglobin içeriği erişkinlerden daha yüksek olan yenidoğan eritrositlerinde aktivitenin göreceli olarak düşük bulunmasına yol açmaktadır^{4,71}. Bu nedenle bul-

duğumuz 1.49 luk oranın, yenidoğan ve erişkinlerin ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonuna göre düzeltilmesi gerekir. Yenidoğan eritrositlerinin ortalama hemoglobin konsantrasyonunun (34 pg), erişkinlerden (30 pg) 1.13 kat fazla olduğunu kabul edecek olursak ⁷¹, yenidoğan eritrositlerinde enzim aktivitesinin $1,49 \times 1,13 = 1,68$ kat yüksek olduğu bulunmaktadır.

Tablo (19) da çeşitli yöntemlerle çalışan araştırmacılar tarafından bulunan yenidoğan ve erişkin G6PD aktivitelerinin birbirine oranı verilmiştir. Enzim aktivitesini IU/grHb şeklinde ifade eden araştırmacıların ^{27,51,104} bulgularının bizim bulgumuz olan 1.49 luk orana çok yakın olduğu görülmektedir. Buna karşın enzim aktivitesini U/10¹⁰ eritrosit şeklinde gösteren Konrad⁶⁸ ve Vetrella¹²⁸ bu oranı daha yüksek bulmuşlardır. Çünkü enzim aktivitesinin bu şekilde gösterimi eritrosit hemoglobin konsantrasyonlarından etkilenmemektedir. Bu nedenle yenidoğan ve erişkin kanlarında G6PD aktivitelerinin karşılaştırılmasında, eritrosit sayısı başına düşen aktivitelerin kullanılmasının daha sağlıklı olacağı kanısındayız. Gerçekten de enzim aktivitelerini U/10¹⁰ eritrosit cinsinden hesapladığımızda (yenidoğanlar için : 43.3 ± 7.4 U/10¹⁰ eritrosit, erişkinler için $25.7 \pm 3,7$ U/10¹⁰ eritrosit) yenidoğan/erişkin aktivite oranının 1.68 e yükseldiği ve bu değer Konrad⁶⁸ ve Vetrella'nın ¹²⁸ sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir (tablo : 19).

Yenidoğanlarda G6PD aktivitesini erişkinlerden yüksek bulmamız, yenidoğanların ortalama eritrosit yaşının düşüklüğünden beklenen bir sonuçtur. Rejeneratif kapasiteden yoksun olan eritrositlerde G6PD aktivitesi yarı ömrü 62 gün olan eksponansiyel bir hızla düşmektedir ^{97,99,116,126,129}. Günümüzde halen bu düşüşün neden-

		<u>G6PD Aktivitesi (IU /gr Hb)</u>		
		<u>25°C</u>	<u>30°C</u>	<u>37°C</u>
Bu çalışma	Yenidoğan			13.4 ± 2.3
	Erişkin			9.0 ± 1.3
Sanna ve ark. ¹⁰⁴	Yenidoğan		8.8 ± 1.9	(12.1 ± 2.6)*
	Erişkin		6.0 ± 1.5	(8.2 ± 2.0)
Gaetani ve ark. ⁴⁰	Erişkin	4.7 ± 0.5		(9.3 ± 1.0)
Lestas ve ark. ⁷¹	Erişkin		6.2 ± 0.7	(8.5 ± 1.0)

Tablo 18 : Normal G6PD Aktivite değerleri

*Parantez içindeki rakamlar 37°C ye göre düzeltilmiş değerlerdir.
Düzeltilme faktörleri:¹⁹ 25°/37°C = 0.504, 30°/37°C = 0,730

	<u>Yenidoğan G6PD Aktivitesi</u>	
	<u>Erişkin G6PD Aktivitesi</u>	<u>U/10¹⁰ eritrosit</u>
Bu çalışma	1.49	(1.68)*
Sanna ve ark. ¹⁰⁴	1.48	
Gross ve Hurwitz ⁵¹	1.44	
Buonocore ve ark. ²⁷	1.55	
Konrad ve ark. ⁶⁸		1.74
Vetrella ve ark. ¹²⁸		1.77

Tablo 19 : Yenidoğan ve erişkinlerde G6PD aktivitelerinin oranı

*Parantez içindeki rakamlar düzeltilmiş değerlerdir
Düzeltilme faktörü⁷¹ : U/10 eritrosit / IU /gr Hb = 1.13

leri kesin olarak açıklanabilmiş değildir. Bakay ve arkadaşları⁹ enzim yaşlanmasından, enzimin katalitik yüzüne bağlanan NADP^+ miktarının azalmasının sorumlu olabileceğini öne sürmüşlerdir. Eritrositin yaşlanması ile NADP^- az aktivitesine bağımlı olarak NADP^+ içeriğinin azalması^{28,80} ve yaşlı enzimin NADP^+ ve karşı affinitesinin düşmesi⁹ bu görüşü desteklemektedir.

Ancak yenidoğan eritrositlerinde enzim aktivitesinin yüksekliğini, yalnızca eritrosit yaş ortalamalarının küçük oluşu ile açıklamak olası değildir. Çünkü yenidoğanlar ile aynı eritrosit yaş ortalamasına sahip erişkinlerin karşılaştırılması, yenidoğanlarda G6PD aktivitesinin eritrosit yaşından bağımsız olarak yüksek bulunduğunu göstermiştir^{43,68,126}.

Yenidoğanlarda eritrosit enzim aktiviteleri birçok açıdan erişkinlerden farklı olup kendilerine özgün bir metabolik kalıp göstermektedir⁶⁸. Gahr ve arkadaşları⁴³ G6PD ve enolaz aktivitelerinin yüksek ve fosfofruktokinaz aktivitesinin ise düşük bulunmasının yenidoğan eritrositlerinin "tipik fetal işaretleri" olduğunu bulmuşlardır.

Fetal eritrositlerde fosfofruktokinaz aktivitesinin düşüklüğü glikolizin önünde önemli bir engel oluşturarak, intrasellüler G6P ve F6P'ın birikimine yol açmaktadır⁶⁷. Ayrıca, aktivitesi yaşa bağımlı bir enzim olan heksokinazın yenidoğanlarda erişkinlerden önemli derecede yüksek bulunuşu^{43,67,68,126} daha fazla glukozun G6P'a fosforilasyonuna yol açacaktır. Böylece hücre içinde artan G6P heksozmonofosfat (HMP) yoluna koyacaktır.

HMP döngüsünün aktivitesi başlıca intrasellüler NADP ve G6P konsantrasyonlarına bağımlıdır⁹⁰. Normal erişkin eritrositlerinde

bunların konsantrasyonları (NADP^+ : 1 μM , G6P : 40 μM) G6PD saturasyon değerlerinin çok altında olup, enzim maksimum aktivitesinin % 0.1 - 0,2 hızıyla çalışmaktadır^{90,137}. Morelli ve arkadaşları⁹⁰ HMP döngüsünün akım hızının heksokinaz aktivitesinin kontrolü altında olduğunu bildirmişlerdir. Fötal eritrositlerde heksokinaz aktivitesinin yüksekliği G6PD için daha fazla substrat konsantrasyonlarının sağlanmasına yol açacaktır.

Bu bilgilerin ışığı altında, yenidoğan eritrositlerinde heksokinaz aktivitesinin yüksek, buna karşın fosfofruktokinaz aktivitesinin düşük bulunmasının, hücre içinde G6P konsantrasyonunu artırarak, potansiyel aktivitesinin çok altında çalışan G6PD ı aktive edebileceğini söyleyebiliriz. Bu görüşümüzün, Travis ve arkadaşlarının¹²⁶, yaşamın ilk yılı boyunca fosfofruktokinaz aktivitesi yükselirken, G6PD ve heksokinaz aktivitelerinin giderek düştüğü şeklindeki bulguları ile desteklenebileceği kanısındayız.

Yenidoğanların gelişim sürecinde yaşanan bu eritrositik farklılaşmanın etyolojisi ve nasıl düzenlendiği iyi bilinmemektedir⁴¹. Yenidoğan eritrositlerinde GSH stabilitesinin düşük oluşu^{51,141}, onların daha fazla NADPH a ve dolayısıyla daha aktif bir G6PD a gereksinim duymalarına yol açabilir. Glukoz metabolizmasının HMP döngüsüne kaydırılması da bu amaca yönelik olsa gerekir.

Gelişim sürecinde bazı proteinlerin sentez hızlarının değiştiği bilinmektedir. Bunun en iyi örneği fötal hemoglobinlerin, erişkin hemoglobinleri ile yer değiştirmesidir^{41,43}. Benzer şekilde enzim aktivitesindeki değişiklikler de izoenzim sentez hızlarının değişmesine bağlı olabilir⁴¹. Gahr⁴¹ izoelektrik çöktürme ile yenidoğan ve erişkin eritrositlerinde G6PD izoenzim kalıbının aynı

olduğunu ancak düşük izoelektrik noktaya sahip bir bandın aktivitesinin yenidoğanlarda daha yüksek bulunduğunu göstermiştir.

Biz yenidoğan ve erişkin izoenzim aktiviteleri arasındaki bu farkın kantitatif (sentez hızlarındaki fark) olabileceği gibi kalitatif (kinetik parametrelerdeki fark) özelliklerden de kaynaklanabileceği kanısındayız. Çalışmamızda yenidoğan eritrositlerinde enzimin Km G6P değerini erişkinlerden düşük (şekil : 8-b) bulmamız fütal G6PD ın substratına olan ilgisinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu bulgumuz Aksu'nun⁴ bulgusu ile uyumludur. Bizim çalışmamızda fütal/erişkin Km G6P oranı 0,87, Aksu'nun⁴ çalışmasında 0,82 olarak bulunmuştur. Ancak Aksu⁴ her iki yaş grubunda da KmG6P değerini bize paralel olmakla birlikte bizden oldukça düşük bulmuştur (tablo : 20). Bu büyük olasılıkla bizim pH:8.0 de Aksu'nun⁴ ise pH:7.4 çalışmasına bağlı olabilir. İnvitro şartlarda enzimin KmG6P değerinin pH ya bağımlı olduğu bilinmektedir^{7,62,76}. Bu etkiden enzim - substrat bağlanmasında rol oynayan grupların iyonizasyonu ve pK değerleri sorumlu tutulmaktadır⁷.

Çalışmamızda hem yenidoğan, hem de erişkinlerde KmG6P değerleri ile G6PD aktiviteleri arasında kuvvetli bir ilişki (sırasıyla $r=0,93$, $p<.01$ ve $r=0,90$, $p<.01$) bulunduğunu gördük (şekil 5 ve şekil 6). Bu bulgumuz yenidoğanlarda aktivitenin yüksekliğinden fütal G6PD ın KmG6P değerinin düşüklüğünün sorumlu olabileceği şeklindeki görüşümüzü desteklemektedir. Yenidoğan eritrositlerinde G6P konsantrasyonunun yüksekliği, fütal G6PD ın bu substrata karşı ilgisinin artması ile birleştiğinde, bu hücrelerde aktivitenin yüksekliğine iyi bir neden teşkil edebilir.

Ancak yenidoğanda G6PD aktivitesinin yüksekliğinin KmG6P de-

ğerlerinin düşüklüğünden beklenenden fazla olduğu görülmektedir (şekil 8-a ve -b). Bu da yenidoğanların enzim aktivitesinin yüksekliğinden yalnızca enzimin substratına karşı ilgisinin artmasının sorumlu olmadığını açıkça göstermektedir. Belki de yenidoğanlarda GSH instabilitesinin^{51,141} sonucu olarak intrasellüler NADPH konsantrasyonu düşmekte, böylece NADPH'ın enzim üzerindeki inhibitör etkisi azalmaktadır.

Sonuç olarak yenidoğanlarda ortalama eritrosit yaşının düşüklüğü, fosfofruktokinaz aktivitesinin düşük buna karşın hekzokinaz aktivitesinin yüksek oluşu, GSH instabilitesi ve bizim çalışmamızda bulunan fetal G6PD'nin KmG6P değerinin düşüklüğü gibi faktörlerin hepsi G6PD aktivitesinin yüksekliğinden sorumlu olabilir. Konunun açıklığa kavuşturulabilmesi için daha detaylı araştırmaların gerektiği muhakkaktır.

Çalışmamızda tam G6PD yetmezliği gösteren olguların ortalama hemoglobin düzeyleri kontrol olgularından önemli derecede düşük bulunmuştur. ($p < .01$) Ara şekil gösteren 3 olgumuzun değerlerinde ise herhangi bir düşme gözlenmemiştir. Bu olguların sayı azlığı nedeniyle kontrol grubu ile karşılaştırmaya gidilmemiştir. Ancak tam yetmezlik ve ara şekil gösteren olgularımızın hepsi bir arada değerlendirildiğinde (yetmezlikli tüm olgular) ortalama hemoglobin düzeyleri, kontrol grubuna göre önemli bir fark göstermemektedir. Yani hemoglobin düzeylerindeki düşüş yalnızca tam yetmezlikli olgularda önem kazanmaktadır (tablo : 13). Bu bulgumuz Tan'ın¹²⁵ bulguları ile tamamen uyumludur.

Tam yetmezlikli olgularımızın hemoglobin düzeylerindeki bu düşüş, bu olgularda prenatal bir hemolizin varlığını ortaya koymak-

	Km G6P (μ mol)	Çalışmanın yapıldığı yöre
Bu çalışma*	51.6 \pm 6.7 (45.7 \pm 5.7)**	Antalya
Aksu ^{4*}	38.0 (31.0)**	Erzurum
Dünya Sağlık Örgütü	47.3 \pm 7.0	Burhan
"	50.2 \pm 8.3	Adanalıoğlu
"	56.0 \pm 12.2	Kazanlı
"	46.0	Bahçe
"	47.5 \pm 14.0	Madenli
"	59.2 \pm 10.0	Keskincik
"	57.2 \pm 9.0	Mayadalı
Cornons ve ark. ³⁴	60.4 \pm 9.0	İspanya
Kahn ve ark. ⁶²	38.0 - 55.0	Fransa
Gahr ve ark. ⁴²	62.3 \pm 13.2	Batı Almanya
Mc Cann ve ark. ⁸²	50.0 - 70.0	İrlanda
Schirilo ve ark. ¹⁰⁷	48.6 \pm 12.3	Sicilya
Kitao ve ark. ⁶⁶	31 - 71	Japonya
Chockkalingam ve ark. ³¹	44.1 \pm 2.9	Yeni Gine
Mc Curdy ve ark. ⁸³	48.6 \pm 7.9	Porto Riko
Marks ve ark. ⁸⁰	35	New York
Yoshida ve ark. ¹³⁸	50 - 70	Çeşitli

Tablo 20 : Normal enzime ait Km G6P değerleri

* Eritrosit hemolizatında çalışılmıştır.

** Parantez içindeki değerler yenidoğanlara aittir.

tadır. Ancak bu olgularımızın ortalama retikülosit düzeyleri kontrol olgularından hafifçe yüksek bulunmakla birlikte bu yükselişin önemli olmadığı görülmüştür ($p > .05$). Bu bulgumuz Valares ve arkadaşlarının¹²⁷ bulguları ile tamamen uyumludur. Yetmezlikli tüm olgular açısından değerlendirildiğinde yine hafif ama önemsiz bir retikülosit gözlenmektedir.

Tam yetmezlik gösteren olguların hemoglobin düzeylerindeki önemli düşüklüğe karşın retikülosit cevabındaki yetersizlik iki şekilde açıklanabilir.

Birincisi hemoglobin düşüklüğünden sorumlu olan hemolitik olayın henüz bir retikülosit cevabı oluşturamayacak kadar yeni gelişmiş olabileceğidir. Annenin gebeliği sırasında kullandığı ve transplasental geçişi mümkün olan bazı ilaçların fötüsde prenatal hemolizi başlatabileceği bilinmektedir⁹⁷.

Ancak çalışmamızda hiçbir annenin gebeliğinin son 15 günü içinde herhangi bir ilaç kullanmadığı saptanmıştır. Tam yetmezlik gösteren 9 olgudan 6 sının doğumu spontan olmuş, yalnızca 3 tanesinde Oxytocin ile provakasyon yapılmıştır. Hiçbir ilaç etkisine maruz kalmayan 6 olgu değerlendirildiğinde hemoglobin düzeylerinin yine önemli derecede ($p < .01$) düşük olduğu ve bu etkiden oxytocinin sorumlu olmadığı görülmektedir. Yine annelerin hiçbiri gebeliğin son 3 ayı içinde herhangi bir enfeksiyon geçirmemişlerdir.

İkincisi hemolizin kronik ancak belirgin bir retikülosit cevabı oluşturmayacak şiddette olabileceğidir. Olgularımız prenatal dönemde herhangi bir oksidan etkene maruz kalmadıklarına göre, bu kronik hemolizden tek başına G6PD yetmezliği sorumlu görünmektedir. Burada vurgulanması gereken bir nokta, retikülosit sayımının orta-

lama eritrosit yaşını, dolayısıyla hemolizin şiddetini göstermede iyi bir kriter olmadığıdır⁴³. Çünkü retikülositler 2 gün içinde substantia granulofilamentosa tabakalarının kaybetmekte ve bundan sonra vizüel metotlarla ayırtedilememektedirler⁴³. Bu nedenle hemoglobinin düzeylerinden beklenen şiddette bir retikülositoz gözleyemeyişimiz, bu olgularda ortalama eritrosit yaşam sürelerinin kısalmadığı anlamına gelmez. Brown ve Boon²⁶ G6PD yetmezlikli yenidoğanların hem hemoglobin hem de retikülosit düzeylerinin normallerden önemli derecede farklı olduğunu göstermişlerdir.

Yenidoğanların ortalama eritrosit yaşam süreleri erişkinlerden kısadır^{27,43,67,71,104,127}. Yine yenidoğan eritrositleri glutatyon peroksidaz ve methemoglobin redüktaz aktivitelerinin, E vitamini ve kan şekeri düzeylerinin düşüklüğüne bağlı olarak oksidan yaralanmalara daha hassastır^{97,104,130,132,133}. Bu özelliklerin üzerine G6PD yetmezliğinin eklenmesi yetmezlikli eritrositlerin hemoliz eğilimlerini arttırarak sirkülasyondan daha hızlı çekimlerine yol açmaktadır¹⁰⁴.

Dikkatli hemotolojik incelemeler Gd^{A-} ve Gd^{Akdeniz} varyantına sahip erişkin erkeklerde herhangi bir oksidan etkenin bulunmadığı bazal şartlarda dahi klinik olarak önemsiz kronik bir hemolizin varlığını ortaya koymuştur^{14,96,97,127}. Yetmezlikli eritrositlerin okside glutatyon¹¹⁹ ve okside NADP⁶⁵ düzeylerinin normalden yüksek bulunuşu bu hücrelerin yaşam sürelerinin kısalığını açıklayabilir. Erişkinlerde artmış olan bu hemoliz tamamen kompanse edilmekte ve herhangi bir klinik bulgu vermemektedir¹²⁷.

Çalışmamızda tam yetmezlik gösteren olguların kordon kanı ve hemoglobin düzeylerinde belirgin bir düşüş, retikülosit düzey-

lerinde ise hafif bir artış saptamamız, erişkinlerde gözlenen bu hemolizin prenatal dönemde de mevcut olduğunu göstermektedir. Henüz bilirubini konjuge etme kabiliyeti maksimum düzeye erişmemiş olan yenidoğanlarda bu hafif hemoliz erişkinlerdeki gibi tam kompense edilemeyerek zaten mevcut olan hiperbilirubinemi eğilimi ve ciddiyetini çok arttırmaktadır¹⁰¹.

Birçok çalışmada G6PD yetmezliğine sahip yenidoğanlarda ciddi hiperbilirubinemi görülme sıklığı normal yenidoğanların 2-4 katı kadar yüksek bulunmuştur^{52,88,125,127}. Ancak sıklık coğrafi bölgeler ve etnik gruplar arasında geniş farklar göstermektedir^{25,26,84,88,127,132}.

Yetmezlikli yenidoğanlarda hiperbilirubineminin şiddeti ile anemi arasında her zaman korelasyon bulunmaması^{26,78,79,87,88,101,127}, bu komplikasyonun gelişiminde G6PD yetmezliğine ek olarak bazı yörelerde bilinmeyen bir ekzojen faktörün veya bazı etnik gruplarda ikinci bir genetik faktörün rolü olduğunu düşündürmektedir. Brown ve Boon²⁶ hiperbilirubinemi gelişme insidansının bu bebeklerin "bazal" veya "fizyolojik" hiperbilirubinemilerinden etkilenebileceği kanısındadırlar. Meloni⁸⁷ ve Roux¹⁰¹ yetmezlikli yenidoğanlarda hemoliz bulgularına nadiren rastlamışlar ve sarılığın hemolizden çok karaciğer konjugasyon gücündeki yetersizliğe bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir. Malaka-Zafiriu ve arkadaşları^{78,79} etyolojisi bilinmeyen ve G6PD yetmezliğine bağlı ciddi sarılığı olan yenidoğanlarda karaciğerin D-glukarik asit ve saliklamid glukoronid oluşturma kabiliyetinin çok düşük olduğunu göstermişlerdir. Yazarlar glukuronidasyondaki bu yetersizliğin 2. bir genetik defekte bağlı olabileceği ve bu olgulardaki unkonjuge hiperbilirubinemiden

sorumlu olabileceği kanısındadırlar. Gupta⁵² ise defektif hepatik metabolizmanın hepatositlerdeki G6PD yetmezliğinin sonucu gelişebileceğini öne sürmüştür.

G6PD yetmezliğinde ciddi hiperbilirubinemiden sorumlu predominant faktörün ne olduğu konusundaki spekülasyonlar günümüzde halen devam etmektedir. Ancak bizim çalışmamızda ortaya çıkan, birçok yazarında^{26,125,127} katıldığı gerçek, bu bebeklerde herhangi bir oksidan etkenin bulunmadığı şartlarda dahi hemolizin hafifçe artmış olduğudur. Bu tek başına neonatal hiperbilirubinemi için yeterli olabilir. Ayrıca bu olgularda artmış olan hemoliz eğiliminin üzerine ekzojen bir hemolitik ajanın (bebeğin naftalinli battaniye ile sarılması, bilinçsiz ilaç kullanımı, süt veren annenin bakla yemesi gibi) veya herhangi bir nedenle gelişebilecek asidoz, hipoksi, hipoglisemi gibi endojen faktörlerin eklenmesi neonatal sarılık riskini ve ciddiyetini çok arttırmaktadır^{26,52,101,131}. Bu nedenle G6PD yetmezliğinin erken tanısı ve bu bebeklerin karşılaşılabilecekleri bütün potansiyel hemolitik ajanlardan korunarak izlenmeleri kern ikterus insidansını çok düşürecektir^{26,131}.

Çalışmamızda yenidoğanlar arasında % 2.4 oranında G6PD yetmezliğine rastlanmış ve bunların 3/4 ü (% 1.8) tam yetmezlikli bulunmuştur. Bu hiç de azımsanacak bir rakam değildir. Bu nedenle yöremizde bütün yenidoğanların G6PD yetmezliği açısından taranması ve en azından tam yetmezlik gösterenlerin hemen taburcu edilerek bir süre gözlem altında tutulmalarının toplumumuza çok şey kazandıracağı ve bunun maliyetinin topluma sakat bir bireyin maliyetinin çok altında olacağı kanısındayız.

Ö Z E T

Bu çalışmada 1985 Mayıs-Ağustos ayları arasında Antalya'da doğan 500 (264 erkek , 236 kız) yenidoğanın kordon kanları Beutler'in floresan spot testi ile tarandı . Kızlar arasında % 2.12 (% 0.85 tam yetmezlik , % 1.27 ara şekil) , erkekler arasında % 2.65 (% 2.65 tam yetmezlik) olmak üzere ortalama % 2.40 oranında G6PD yetmezliği saptandı .

Floresan spot test ile kantitatif G6PD aktivite ölçümlerinin çok iyi uyum gösterdiği ve enzim aktivitesi normalin % 55 inden düşük olan heterozigotların yakalanabildiği bulundu . Testin ucuz , basit ve güvenilir oluşunun yanısıra klinik olarak risk altında bulunan yenidoğanların tanısında değerli bir yöntem olduğu görüldü .

Yenidoğanlarda G6PD aktivitesi (13.4 ± 2.3 IU/gr Hb) erişkinlerden (9.0 ± 1.3 IU/gr Hb) önemli derecede yüksek ($p < .01$) bulundu . Enzimin G6P için Km değerinin yenidoğanlarda (45.8 ± 5.7 μ M) erişkinlerden (51.6 ± 6.7 μ M) düşük ($p < .05$) olduğu bulundu . Her iki yaş grubunda da enzim aktivitesi ile Km G6P değerleri arasında kuvvetli bir ilişki olduğu (yenidoğanlar için $r = - 0.93$, $p < .01$, erişkinler için $r = - 0.90$, $p < .01$) görüldü . Fötal G6PD ın substratına olan ilgisinin fazla oluşunun , yenidoğanlarda enzim aktivitesinin yüksekliğinden sorumlu olabileceği düşünüldü .

Tam yetmezlik gösteren olguların ortalama hemoglobin düzeyleri (14.6 ± 2.2) kontrol grubundan (16.8 ± 2.0) önemli derecede düşük ($p < .01$) bulundu . Retikülosit düzeyleri ise tam yetmezlik gösteren olgularda ($3,9 \pm 0.8$) kontrol grubundan (3.3 ± 1.0) yüksek ($p > .05$) bulundu . Tam G6PD yetmezliğinin herhangi bir oksidan etkenin bulunmadığı şartlarda bile hafif bir prenatal hemolize yol açabildiği görüldü .

S U M M A R Y

In this study , the cord bloods of newborn infants in Antalya were screened for G6PD deficiency by the fluorescent spot test according to the method described by Beutler , between May and August 1985 . The incidences rate for G6PD deficiency were 2.12 % in female newborns (0.85 % in complete deficiency, 1.27 % in partial deficiency) , 2.65 % in male newborns (2.65 % in complete deficiency) and the mean percentage was 2.40 .

There was good agreement between the fluorescent spot test and the quantitative method . By use of the spot test , we could detect the heterozygote infants whose G6PD activities were lower than 55 % of normals . The screening spot test is cheap , simple, reliable and useful in the diagnosis of newborn infants at risk .

The mean G6PD activity of the newborns (13.4 ± 2.3 IU/gr Hb) was found to be significantly higher than the activity of the adults (9.0 ± 1.3 IU/gr Hb), ($p < .01$). The mean K_m value for G6P of the infants (45.8 ± 5.7 μ M) was lower than the value of the adults (51.6 ± 6.7 μ M), ($p < .05$). In both age groups there was a good correlation between the enzymatic activity and the K_m G6P values ($r = -0.93$, $p < .01$, and $r = -0.90$, $p < .01$ for the newborns and adults, respectively). We have assumed that the high affinity of the fetal G6PD for its substrate may be responsible for the high enzyme activity in newborns.

The mean hemoglobin level of cases with complete deficiency (14.6 ± 2.2 % gr) was found to be significantly lower than the level of controls (16.8 ± 2.0 % gr), ($p < .01$). The mean reticulocyte count was higher in cases with complete deficiency (3.9 ± 0.8) than that of controls (3.3 ± 1.0), ($p > .05$). Complete G6PD deficiency may cause a slight prenatal haemolysis even in the absence of any oxidative stress.

KORDON KANINDA G6PD YETMEZLİĞİ PREVALANSI		KOLON	KOD
TANITIM KODU		1-4	KGYI
Kişi Sıra No	:	5-7	
Soyadı	:		
Baba Adı	:		
Anne Adı	:		
Doğum Tarihi	:		
Ev Adresi	:		
Doğduğu Sağlık Merkezi	:		
1- Cinsiyeti	:		
1. Erkek			
2. Kız		8	
2- Gestasyon Yaşı (Hafta olarak)	:		
1. Premature (28-37 hafta)			
2. Miyadında (37-42 hafta)			
3. Postmature (42 haftanın üzeri)		9	
3- Doğum Ağırlığı (gram olarak)	:		
1. 1000-2500 gram			
2. 2500-4500 gram			
3. 4500 gramın üzerinde		10	
4- Doğum Şekli	:		
1. Normal, spontan			
2. Normal provakasyonlu			
3. Müdahaleli			
4. Sezeryan		11	
5- Doğum Sonrası Siyanoz olup olmadığı :			
1. Yok			
2. Hafif			
3. Şiddetli		12	
6- Anne-Baba arasında Akrabalık olup olmadığı :			
1. Var			
2. Yok		13	
7- Ailesinde Bakla Zehirlenmesi olup olmadığı :			
1. Var			
2. Yok		14	

K A Y N A K L A R

- 1 . ADAMS, M.J., LEVY, H.R., MOFFAT, K. : Crystallization and preliminary X-ray data for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* .
J. Biol. Chem. , 258:9 , 5867-8 , 1983
- 2 . AKSOY, M., DİNÇOL, G., ERDEM, S. : Survey on haemoglobin variants , Beta-Thalassaemia , Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency and haptoglobin types in Turkish people living in Manavgat , Serik and Boztepe (Antalya)
Human Hered. , 30 , 3-6 , 1980
- 3 . AKSOY, M., ERDEM, S. : Determination of G6PD and other enzymes in Turkish People . J. Ist. Med. Fac. ,
31 , 39-49 , 1968
- 4 . AKSU, T.A. : Muhtelif yaş gruplarındaki sağlam şahıslarda eritrosit Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz enzim kinetiği üzerine bir çalışma . Atatürk Üni . Tıp Fak. Dergisi ,
5:17 , 1-8 , 1972
- 5 . AKSU, T.A., YANARATEŞ, E. : Doğu Anadolu Bölgesinde eritrosit Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz enzimi noksanlığı hakkında preliminier bir çalışma . Atatürk Üniv. Tıp Fak. Dergisi ,
4:16 , 313-6 , 1972
- 6 . ALLEN, D.W., JOHNSON, G.J., et al. : Membrane polypeptide aggregates in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficient and in vitro aged red blood cells . J. Lab. Clin. Med. ,
91:2 , 321-7 , 1978
- 7 . BABALOLA, A.O.G., BEETLESTONE, J.G., LUZZATO, L. : Genetic variants of human erythrocyte G6PD . J. Biol. Chem. ,
251:10 , 2993-3002 , 1976
- 8 . BABALOLA, A.O.G., CANCEDDA, R., LUZZATO, L. : Genetic variants of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from human erythrocytes : Unique properties of the A⁻ variant isolated from "Deficient" cells . Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. ,
69:4 , 946-50 , 1972
- 9 . BAKAY, B., NYHAN, W.L., MONKUS, E.St. J. : Change in electrophoretic mobility of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase

- with aging erythrocytes . *Pediatr. Res.* 6 , 705-12 , 1972
- 10 . BASHAN, N., MAKOVER, O., et al : Effect of oxidant agents on normal and G6PD deficient erythrocytes . *Isr. J. Ped. Sci.* 16:351-6 , 1980
 - 11 . BAUER, J.D. : Enzymes of erythrocyte and their laboratory investigation . In *Gradwohl's Clinical Laboratory Medicine and Diagnosis* ed. by Sonnenwirth A.C., Jarett, L. The C.V. Mosby Company , 1980 , p:872-884
 - 12 . BENATTI, U., MORELLI, A., et al : Comparative patterns of "In vitro" oxidative hemolysis of normal and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD)-Deficient erythrocytes *FEBS Letters* 128:2 , 225-8 , 1981
 - 13 . BERKARDA, B., EYÜPOĞLU, H., : *Hematoloji Laboratuvar Yöntemleri*, Ar Basım Yayım ve Dağıtım A.Ş. , İstanbul 1983 s: 98-101
 - 14 . BERNINI, L., BATTE, B., et al : Survival of Cr-labelled red cells in subjects with Thalassaemia-Trait or G6PD deficiency or both abnormalities . *Brit. J. Haemat.* 10 , 171-80 , 1964
 - 15 . BEUTLER, E. : A series of new screening procedures for Pyruvate Kinase deficiency , Glucose-6-phosphate Dehydrogenase deficiency and Glutathione Reductase deficiency . *Blood* , 28:4 , 553-561 , 1966
 - 16 . BEUTLER, E., : Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency diagnosis , clinical and genetic implications . *Am. J. Clin. Pathol.* 47:3 , 303-11 , 1967
 - 17 . BEUTLER, E., : Genetic disorders of red cell metabolism . *Med. North. Am.* 53:4 , 813-25 , 1969
 - 18 . BEUTLER, E., : Screening for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency . *Prent* , 9:9 , 1350-2 , 1973
 - 19 . BEUTLER, E., BLUME, K.G., et al : Recommended methods for red-cell enzyme analysis . *Brit. J. Haematol.* 35 , 331-41 , 1977

- 20 . BEUTLER, E., BLUME, K.G., et al. : International Committee for Standardization in Haematology: Recommended screening test for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) deficiency . Brit. J. Haematol. 43 , 469-77 , 1979
- 21 . BEUTLER, E., MATHAI, C.K., SMITH, J.E. : Biochemical variants of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase giving rise to Congenital Nonspherocytic Hemolytic Disease . Blood , 31:2 , 131-50 , 1968
- 22 . BEUTLER, E., MITCHELL, M. : BRIEF REPORT : Special modifications of the fluorescent screening method for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency . Blood , 32:5 , 816-8 , 1968
- 23 . BIENZLE, V., AYENI, O., et al. : Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and Malaria . The Lancet , Jan 15 , 107-110 , 1972
- 24 . BIENZLE, V., EFFIONG, C.E., et al. : Erythrocyte enzymes in Neonatal Jaundice . Acta Haematol. 55:10-20 , 1976
- 25 . BIENZLE, V., EFFIONG, C.E., LUZZATO, L. : Erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency (G6PD Type A⁻) and Neonatal Jaundice . Acta. Ped. Scand. 65 , 701-3 , 1976
- 26 . BROWN, W.R., BOON, W.H. : Hyperbilirubinemia and Kernicterus in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficient infants in Singapore . Pediatrics , 41:6 , 1055-62 , 1968
- 27 . BUONOCERE, G., BERTI, D. et al. : Moderately increased hemolysis in newborn infants with hyperbilirubinemia of unknown etiology . Biol. Neonate. 44:251-6 , 1983
- 28 . CARSON, P.E., FRISCHER, H. : Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency and related disorders of the Penthose Phosphate Pathway . Am. J. Med. 41 , 744-61 , 1966
- 29 . CATALANO, E.W., JOHNSON, G.F., SOLOMON, H.M. : Measurement of erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase activity with a centrifugal analyzer . Clin. Chem. 21:1 , 134-8 , 1975
- 30 . CHAN, C.K. : Measurment of erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase activity using a centrifugal analyzer .

- Med. Lab. Sci. , 41 , 112-20 , 1984
- 31 . CHOCKKALINGAM, K., BOARD, P.G., NURSE, G.T. : Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency in Papua New Guinea . Human Genetics , 60:189-92 , 1982
 - 32 . COETZER, T., ZAIL, S. : Membrane protein complexes in GSH-depleted red cells . Blood , 56:2 , 159-67 , 1980
 - 33 . CORRONS, J.L.V., FELIV, E., et al. : Severe Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) deficiency associated with Chronic Hemolytic Anemia , granulocyte dysfunction and increased susceptibility to infections : Description of a new molecular variant (G6PD Barselona) Blood , 59:1 , 428-34 , 1982
 - 34 . CORRONS, J.L.V., PUJADES, A. : Heterogeneity of "Mediterranean Type" Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) deficiency in Spain and description of two new variants associated with Favism . Human Genetics , 60:216-21 , 1982
 - 35 . DENTON, M.J., SPENCER, N., ARNSTEIN, H.R.V. : Biochemical and enzymic changes during erythrocyte differentiation . Biochem. J. , 146 , 205-11 , 1975
 - 36 . DOW, P.A., PETTEWAY, M.B., ALPERIN, J.B. : Simplified method for G6PD screening using blood collected on filter paper . A.J.C.P. , 61 , 333-6 , 1974
 - 37 . FAIRBANKS, V.F., FERNANDEZ, M.N. : The identification of metabolic errors associated with Hemolytic Anemia . JAMA , 208:2 , 316-20 , 1969
 - 38 . FAIRBANKS, V.F., LAMPE, L.T. : A tetrazolium linked cytochemical method for estimation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase activity in individual erythrocytes : Applications in the study of heterozygotes for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency . Blood , 31 , 5:589-603 , 1968
 - 39 . FIALKOW, P.J., KLEIN, E., et al. : Immunoglobulin and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase as markers of cellular origin in Burkitt Lymphoma . J. Exp. Med. , 138 , 89-102 , 1973

- 40 . GAETANI, G.F., MARENI, C., et al. : Favizm : Erythrocyte metabolism during haemolysis and reticulocytosis .
Brit. J. Haematol. , 43 , 39-48 , 1979
- 41 . GAHR, M. : Isoelectric focusing of Hexokinase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase isoenzymes in erythrocytes of newborn infants and adults . Brit. J. Haematol. ,
46 , 529-35 , 1980
- 42 . GAHR, M., BORNHALM, D., SCHROTER, W. : Haemolytic Anemia due to Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) deficiency : Demonstration of two new biochemical variants G6PD Hamm and G6PD Tarsus . Brit. J. Haematol. ,
33 , 363-70 , 1976
- 43 . GAHR, M., MEVES, H., SCHROTER, W. : Fetal properties in red blood cells of newborn infants .
Pediatr. Res. , 13 , 1231-6 , 1979
- 44 . GELPI, A.P. : Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency the sickling trait and Malaria in Saudi Arab children .
Trop. Ped. , 71:1 , 138-46 , 1967
- 45 . GLADER, B.E. : Erythrocyte disorder in infancy in Schaffer's Disease of the newborn ed. by Avery M.E., Taeusch, W.H., W.B. Saunders Company . Philadelphia , 1984 , p:598-600
- 46 . GOLDBERG, B., STERN, A. : The role of superoxide anion as a toxic species in the erythrocyte .
Arch. Biochem. Biophys. , 178 , 218-25 , 1977
- 47 . GOLENSAR, J., MILLER, J., et al. : Inhibitory effect of a Fava Bean Component on the in vitro development of Plasmodium Falciparum in normal and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficient erythrocytes .
Blood , 61:3 , 507-10 , 1983
- 48 . GORDON-SMITH, E.C., WHITE, J.M. : ANNOTATION : Oxidative haemolysis and Heinz Body Haemolytic Anemia .
Brit. J. Haemat. , 26 , 513-7 , 1974
- 49 . GÖZÜKARA, E.M. : "Glukoz -6- Fosfat Dehidrogenaz " enzimin özellikleri , metabolik ve klinik açıdan önemi
Biyokimya Dergisi , yıl:2 , cilt:2 , sayı:3 , 217-40 , 1978

- 50 . GRIMES, A.J. : Annotation : The laboratory diagnosis of enzyme defects in the red cell . Brit. J. Haematol. , 17 , 129-35 , 1969
- 51 . GROSS, R.T., HURWITZ, R.E. : The Penthose Phosphate Pathway in human erythrocyte . Pediatrics , 22 , 453-9 , 1958
- 52 . GUPTA, S., GHAI, O.P., CHANDRA, R.K. : Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency in the newborn and its relation to serum bilirubin . Ind. J. Pediatr. , 37:268 , 169-76 , 1970
- 53 . HAMAMY, H.A., SAEED, T.K. : Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency in Iraq . Human Genet. , 58 , 434-5 1981
- 54 . HEDAYAT, S.H., FARHUD, D.D., et al. : The pattern of bean consumption laboratory findings in patients with Favism G6PD deficient and a control group . J. Trop. Ped. 27 , 110-2 , 1982
- 55 . HERZ, F., KAPLAN, E., SCHEYE, E.S. : Diagnosis of erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency in the Negro Male despite hemolytic crisis . Blood , 35:1 , 90-3 , 1970
- 56 . HOFFMAN, W.S. : Oxidation of glucose . In the Biochemistry of Clinical Medicine . Third edition , Year Book Medical Publishers . Inc , Chicago , p:70-75
- 57 . IKAWA, M., YOSHIDA, A. : Change of enzyme properties caused by cross linking treatment of erythrocytes . Am. J. Hematol. , 13:9-13 , 1982
- 58 . JAFFE, E.R. : CLINICAL PROFILE : Hereditary hemolytic disorders and enzymatic deficiencies of human erythrocytes . Blood , 35:1 , 116-34 , 1970
- 59 . JAFFE, E.R. : Oxidative hemolysis , or "What made the red cell break?" New. Eng. J. Med. , 286:3 , 156-7 , 1972
- 60 . JANSSON, S.E., HEKALI, R., et al. : Membrane characteristics and metabolic properties of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficient red cells . Brit. J. Haematol. , 46:1 , 79-87 , 1980
- 61 . KAHLER, S.G., KIRKMAN, H.N. : Intracellular Glucose-6-Phos-

- phate Dehydrogenase does not monomerize in human erythrocytes . *J. Biol. Chem.* , 258:2 , 717-8 , 1983
- 62 . KAHN, A., BOIVIN, P., et al. : Deficit en Glucose-6-Phosphate-Déshydrogenase erythrocytaire lié a la présence d'une variante lente dans une famille Française rapports avec la variante Gd (-) seattle . *Nouvelle Revue Française d'Hématologie* , 13:2 , 163-72 , 1973
- 63 . KANJI, M.I., TOEWS, M.L., CARPER, W.R. : Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase purification and partial characterization . *J. Biol. Chem.* , 251:8 , 2255-7 , 1976
- 64 . KATTAMIS, C.A., KYRIAZAKOU, M., CHAIDAS, S. : Favism : Clinical and biochemical data . *J. Med. Genet.* , 6:34 , 1969
- 65 . KIRKMAN, H.N., GAETANI, G.D., et al. : Red cell NADP⁺ and NADPH in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency . *J. Clin. Invest.* , 55 , 875-8 , 1975
- 66 . KITAO, T., ITO, K., et al. : G6PD Kanazawa : A new variant of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase associated with Congenital Nonspherocytic Hemolytic Anemia . *Acta. Haemat.* , 68 , 131-5 , 1982
- 67 . KOMAZAWA, M., OSKI, F.A. : Biochemical characteristics of "young " and "old" erythrocytes of the newborn infant *J. Pediatr.* , 87:1 , 102-6 , 1975
- 68 . KONRAD, P.N., VALETINE, W.N., PAGLIA, D.E. , : Enzymatic activities and Glutathione content of erythrocytes in the newborn : Comparison with red cells of older normal subjects and those with comparable reticulocytosis . *Acta. Haemat.* , 48:193-201 , 1972
- 69 . LATTANZIO, V., BIANCO, V.V., LAFIANDRA, D. : High-performance reversed-phase liquid chromatography (HPLC) of Favism-inducing factors in *Vicia faba* L . *Experientia* , 38 , 789-90 , 1982
- 70 . LEHNINGER , A.L. : Biochemistry , The Molecular Basis of the cell structure and function . Second edition . Worth Publishers , Inc . New York , Chap:17 , P:467-72

- 71 . LESTAS, A.N., RODECK, C.H., WHITE, J.M. : Normal activities of glycolytic enzymes in fetal erythrocytes .
Brit. J. Haematol. , 50 , 439-44 , 1982
- 72 . LEWIS, R.A. : Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase electrophoresis in Ghanaians with AA and SS Haemoglobin .
Acta. Haemat. , 50 , 105-11 , 1973
- 73 . LEWIS, R.A., HATHORN, M. : Correlation of S Haemoglobin with Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency and its significance . Blood, 26:2 , 176-80 , 1965
- 74 . LOWE, M.L., GIN, J.B., DEMETRIOV, J.A. : Stability of erythrocytic enzymes for screening tests . Clin. Chem. , 19:5 , 529-30 , 1973
- 75 . LOWE, M.L., STELLA, A.F., et al. : Microfluorometry of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase in red cells . Clin. Chem. , 18:5 , 441-5 , 1972
- 76 . LUZZATO, L. : New developments in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency . Prent , 9:9-10 , 1484-98 , 1973
- 77 . LUZZATO, L. : Annotation : Genetic heterogeneity and pathophysiology of G6PD deficiency . Brit. J. Haematol. , 28 , 151-55 , 1974
- 78 . MALAKA-ZAFIRIU, K., et al. : D-Glucaric acid excretion in newborns with severe jaundice unknown etiology and due to Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency in Greece . Helv. Paediat. Acta. , 30 , 201-7 , 1975
- 79 . MALAKA-ZAFIRIU, K., et al. : Salicylamide glucuronide formation in newborns with severe jaundice of unknown etiology and due to Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency in Greece . Helv. Paediat. Acta. , 28 , 323-9 , 1973
- 80 . MARKS, P.A., SZEINBERG, A., BANKS, J. : Erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase of normal and mutant human subjects . J. Biol. Chem. , 236:1 , 10-16 , 1961
- 81 . MARTIN, D.W., MAYES, P.A., RODWELL, V.W. : Harper's Review of Biochemistry , 18 th edition . Lange Medical Publication Los Altos . California .
P:173-7

- 82 . Mc CANN, S.R., SMITHWICK, A., et al. : G6PD (Dublin) :
Chronic Non-Spherocytic Haemolytic Anemia resulting from
Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency in an Irish
kindred . *J. Med. Genet.* , 17 , 191-3 , 1980
- 83 . Mc CURDY , P.R., MALDONADO, N., et al. : Variants of Glucose
-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) associated with G6PD
deficiency in Puerto Ricans . *J. Lab. Clin. Med.* ,
82:3 , 432-7 , 1973
- 84 . MELONI, T., CORTI, R. : Alfa-Thalassaemia and hyperbilirubin-
emia in G6PD deficient newborns . *Arch. Dis.Child.* ,
55:6 , 482-4 , 1980
- 85 . MELONI, T., FORTELONI, G. : Glucose-6-Phosphate Dehydro-
genase deficiency and Mediterranean fever in Northern
Sardinia . *J. Inf. Dis.* , 146:2 , 301-2 , 1982
- 86 . MELONI, T., FORTELONI, G., et al. : Favism and Hemolytic
Anemia in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficient
subject in North Sardinia . *Acta. Haemat.* 70 , 83-90 ,
1983
- 87 . MELONI, T., SINFAROSA, C., STEFANO, C. : Haptoglobin , Hb,
Hemopexin , Hematocrit in newborns with erythrocyte
Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency .
Acta. Haemat. , 54 , 284-8 , 1975
- 88 . MILBAVER, PELED, N., SVIRSKY, S. : Neonatal Hyperbilirubin-
emia and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency .
Israel. J. Med. Sci. , 9:11-12 , 1547-52 , 1973
- 89 . MORELLI, A., BENATTI, V., et al. : Biochemical mechanisms
of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency .
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. , 75:4 , 1979-83 , 1978
- 90 . MORELLI, A., BENATTI, V., et al. : In vitro correction
of erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD)
deficiency . *Arch. Biochem. Biophys.* , 197:2 ,
543-50 , 1979
- 91 . NICHOLSON, J.F., BODOURIAN, S.H., PESCE, M.A. : Measurement
of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and 6-Phosphogluco-
nate Dehydrogenase activities in erythrocytes by use of
a centrifugal analyzer . *Clin. Chem.* , 20:10 , 1349-52
1974

- 92 . PANIZON, F., ZACCHELLO, F., et al. : The ratio between normal and sensitive erythrocytes in heterozygous Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficient women .
Acta. Haemat. , 43 , 291-5 , 1970
- 93 . PEARSON, T.A., DILLMAN, J.M., et al. : Clonal markers in the study of the origin and growth of human Atherosclerotic lesions .
43:1 , 10-8 , 1978
- 94 . PETRAKIS, N.L., WIESENFELD, S.L., et al. : Prevalence of Sickle-Cell trait and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency . New Eng. J. Med. , 282:14 , 767-70 , 1970
- 95 . PIOMELLI, S., REINDORF, C.A., et al. : Clinical and biochemical interactions of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency and Sickle-Cell Anemia . New Eng. J. Med. , 287:5 , 213-7 , 1972
- 96 . PIOMELLI, S., SINISCALCO, M. : The haematological effect of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency and Thalassaemia trait : Interaction between the two genes at the phenotype level . Brit. J. Haemat. , 16 , 537-48 , 1969
- 97 . PIOMELLI, S., VORA, S. : G6PD deficiency and related disorders of the Pentose Pathway . In Hematology of Infancy and Childhood . Ed. by Nathan and Oski W.B. Saunders Company , 1981 , p:608-43
- 98 . RATAZZI, M.C. : Isolation and purification of human erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from small amounts of blood . Biochem. Biophys. Acta. , 181 , 1-11 , 1969
- 99 . RODGERS, G.P., LICHTMAN, H.C., SHEEF, M.F. : Red blood cell Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase activity in aged humans .
- 100 . ROTH, E.F., SUAREZ, C.R., et al. : The effect of X chromosome inactivation on the inhibition of Plasmodium Falciparum Malaria growth by Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficient red cells . Blood , 62:4 , 866-8 , 1983
- 101 . ROUX, P., KARABUS, C.D., HARTLEY, P.S. : The effect of

- Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency on the severity of Neonatal Jaundice in Cape Town .
S.A. Med. J. , 61 , 781-2 , 1982
- 102 . ROZENSZAJN, L.A., KOLMAN, s., et al. : Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase izoenzymes in blood cells .
Nature , 226 , 862-3 , 1970
- 103 . ROZENSZAJN, L.A., SHOHAM, D., MENASHI, T. : Evaluation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in single erythrocytes in human blood smears . Acta. Haemat. ,
47:303-10 , 1972
- 104 . SANNA, G., FRAU, F., et al. : Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase red blood cell phenotype in Gd^{Mediterranean} heterozygous females and hemizygous males at birth .
Pediatr. Res. , 15 , 1443-6 , 1981
- 105 . SANNA, G., FRAU, F., et al. : Interaction between the Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency and Thalassaemia genes at phenotype level .
Brit. J. Haematol. , 44 , 555-61 , 1980
- 106 . SAY, B., ÖZAND, P., et al. : Erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency in Turkey .
Acta. Pediatr. Scand. , 54:319 , 1965
- 107 . SCHILLIRO, G., RUSSO, A., et al. : Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency in Sicily . Incidence , biochemical characteristics and clinical implications .
Clin. Genet. , 15 , 183-8 , 1979
- 108 . SHARNON, K., BUCHANAN, G.R. : Severe Hemolytic Anemia in Black Children with Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency . Pediatrics , 70:3 , 364-70 , 1982
- 109 . SIGMA TECHNICAL BULLETIN : No . 525 , Revised August 1982
Sigma Chemical Company , P.O. Box 14508 , St. Louis ,
Missouri , 63178 , U.S.A.
- 110 . SİPAHİOĞLU, H. : Alanya Bölgesi Toros Selçuk Türk'lerinde Brewer testi ile eritrosit G6PD enzim eksikliği araştırması 19. Milli Tıp Kongresi , 25-29 Eylül , 1966 ,
İzmir

- 111 . SİPAHİOĞLU, H. : G6PD Venom and Hemolytic Anemia .
Lancet , 11 , 15 , 1967
- 112 . SİPAHİOĞLU, H. : Aynı aileden görülmüş 8 G6PD eksikliği ,
2 Favizm , 5 Pürivat Kinaz eksikliği , 4 Glutatyon
Redüktaz fazlalığı ve 4 Glutatyon Redüktaz eksikliği
münasebeti ile . Türk Tıp Derneği Dergisi . 40:7 ,
314-22 , 1974
- 113 . SİPAHİOĞLU, H. : G6PD eksikliği , Favizm ve eritrosit ve
serum kolinesteraz enzim seviyeleri arasındaki ilişki
üzerine bir araştırma . Türk Tıp Derneği Dergisi ,
41:8 , 392-6 , 1975
- 114 . SİPAHİOĞLU, H. : Akdeniz Bölgesinde eritrosit G6PD enzim
eksikliği . Türkiye Tıp Akademisi Mecmuası ,
10:15 , 1976
- 115 . SİPAHİOĞLU, H. : Yeni bir eritrosit G6PD enzim eksikliği
varyantı (G6PD Antalya) . Kayseri Üniv. Gevher
Nesibe Tıp Fak. Mec. , 1:1 , 101-19 , 1976
- 116 . SMITS, H.L., OSKI, R.A., BRODY, J.I. : The Hemolytic Crisis
of Sickle Cell Disease : The role of Glucose-6-Phosphate
Dehydrogenase deficiency . J. Pediatr. , 44:4 , 544-
51 , 1969
- 117 . SMITH, M.B., WHITESIDE, M.G. : The Detection of Glucose-6-
Phosphate Dehydrogenase deficiency in Mediterraneans
by comparative quantitative enzyme electrophoresis .
Med. J. Aust. , 1 , 558-9 , 1975
- 118 . SOYSAL, T. : Glukoz -6- Fosfat Dehidrogenaz enziminin
insan eritrositlerinden saflaştırılması ve kinetik
özelliklerinin araştırılması .
Doçentlik tezi , Erzurum , 1980
- 119 . SRIVASTAVA, S.K., BEUTLER, E. : Oxidized Glutathione
levels in erythrocytes of Glucose-6-Phosphate-Dehydro-
genase-Deficient subjects . The Lancet , July 6 ,
23-4 , 1968
- 120 . STAMATOYANNAPOULUS, G., FRASER, G.R., et al. : On the
familial predisposition to Favism . Am. J. Hum. Genet.
18:253-63 , 1966

- 121 . STEELE, M.W., MIGEON, B.R. : Sex differences in activity
Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from cultured Human
Fetal Lung Cells despite X-Inactivation .
Biochem. Genet. , 9:2 , 163-8 , 1973
- 122 . SÜMBÜLOĞLU, K. : Sağlık bilimlerinde araştırma teknikleri
ve istatistik . 1978 , Çağ Matbaası , Ankara
- 123 . SZEINBERG, A., PELED, N. : Detection of Glucose-6-Phosphate
Dehydrogenase deficiency in the newborn using blood
specimens dried on filter paper . Prent , 9:9 ,
1353-4 , 1973
- 124 . ŞAYLI, B.S. : Temel Medikal Genetik .
Ank. Üniv. Basımevi ,
1973 , s:223-7
- 125 . TAN. K.L. : Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase status and
Neonatal Jaundice . Arch. Dis. Childhood , 56 ,
874-7 , 1981
- 126 . TRAVIS, S.F. KUMAR, S.P., et al. : Red cell metabolic
alterations in postnatal life in term infants :
Glycolytic Enzymes and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase
Pediater. Res. , 14 , 1349-52 , 1980
- 127 . VALAES, T., KARAKLIS, A., et al. : Incidence and mechanism
of Neonatal Jaundice related to Glucose-6-Phosphate
Dehydrogenase deficiency . Ped. Res. , 3 , 448-58 ,
1969
- 128 . VETRELLA, M., BARTHELMAI, W. : Enzyme activities in the
erythrocytes of human fetuses .
I . Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase , 6-Phosphoglu-
conic Dehydrogenase and Glutathione Reductase .
Z. Kinderheilk . , 110 , 99-103 , 1971
- 129 . WHITE, A., HANDLER, P., et al. : The Phosphogluconate
Oxidative Pathway . In Principles of Biochemistry ,
; Second ed., Mc Graw-Hill Book Comp. Inc.,
New York , Toronto , London p:407-13
- 130 . WHO : Standardisation of procedures for the study of G6PD
Techn. Rep. Ser. , 366:5-53 , 1967

- 131 . WHO : Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency . Reports on a WHO Workshop , Adana , Turkey , 20-22 October 1981
- 132 . WILLOUGHBY, M.L.N. : Pediatrik Hematoloji . Çev : Ulukutlu , L. , Yıldız, İ. , İst. Üniv. Cerrahpaşa Tıp Fak. yayım. , 1982 , S:149-56
- 133 . WINTROBE, M.M., LEE, G.R., et al. : Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency and related deficiencies involving the Penthose Phosphate Pathway and Glutathione Metabolism In Clin. Hematol. , Lea-Febiger , 1981 , p:786-95
- 134 . YEUNG, C.Y., LAI, H.C., et al. : Flourescent spot test for screening erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency in newborn babies . J. Pediatr. , 76:6 , 931-4 , 1970
- 135 . YOSHIDA, A. : Enzyme purification by selective elution with substrate analog from Ion-Exchange Columns : Application to Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase , Pseudocholinesterase , Lactate Dehydrogenase and Alanine Dehydrogenase . Anal. Biochem. , 37 , 357-67 , 1970
- 136 . YOSHIDA, A. : Change of activity and substrate specivity of human Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase by oxidation . Arch. Biochem. Biophy. , 159 , 82-8 , 1973
- 137 . YOSHIDA, A. : Hemolytic Anemia and G6PD deficiency . Science , 179:9 Feb. , 532-7 , 1973
- 138 . YOSHIDA, A., BEUTLER, E., MOTULSKY, A.G. : Human G6PD variants . Bulletin of WHO , 45 , 243-53 , 1971
- 139 . YÜREĞİR, G.T., İSBİR, T. : Çukurova'da HbS ve G6PD Enzim eksikliği ve aralarındaki ilişki . Doğa Bilim Dergisi C , 8 , 2 , 232-44 , 1984
- 140 . YÜREĞİR, G., İSBİR, T., ÇINAR, M. : Assessment of the fluorescent spot test as a screening method for G6PD deficiency . Ç.Ü. Tıp Fak. Med. , 1 , 22-27 , 1982
- 141 . ZINKHAM, W.H. : An In-Vitro abnormality of Glutathione Metabolism in erythrocytes from normal newborns : Mechanism and clinical significance . Pediatrics , 23 , 18-32 , 1959