

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**GLİKOJEN DEPO TİP 1A VE GLİKOJEN DEPO TİP 1B
HASTALARINDA SIK GÖZLENEN GLUKOZ-6- FOSFATAZ
VE GLUKOZ-6- FOSFAT TAŞIYICI GEN
MUTASYONLARININ MİKROELEKTRONİK ARRAY
TEKNOLOJİSİ İLE ARAŞTIRILMASI**

**YANDAL UZMANLIK TEZİ
Dr. F. TUBA EMİNOĞLU**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. LEYLA TÜMER**

**ANKARA
AĞUSTOS 2009**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**GLİKOJEN DEPO TİP 1A VE GLİKOJEN DEPO TİP 1B
HASTALARINDA SIK GÖZLENEN GLUKOZ-6- FOSFATAZ
VE GLUKOZ-6- FOSFAT TAŞIYICI GEN
MUTASYONLARININ MİKROELEKTRONİK ARRAY
TEKNOLOJİSİ İLE ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. F. TUBA EMİNOĞLU**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. LEYLA TÜMER**

**Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
01/2007-33 proje numarası ile desteklenmiştir**

**ANKARA
AĞUSTOS 2009**

İÇİNDEKİLER

İçindekiler	i
Simgeler ve Kısaltmalar	iv
Şekiller Listesi	vi
Tablolar Listesi	vii
Resimler Listesi	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Glikojen Depo Hastalıkları	3
2.2. Glikojen Depo hastalığı Tip 1	7
2.2.1. Tarihçe	8
2.2.2. Epidemiyoloji.....	9
2.2.3. Patofizyoloji.....	10
2.2.4. Klinik ve Laboratuvar Bulgular	13
2.2.5. Komplikasyonlar.....	16
2.2.6. Tanısal yaklaşım	19
2.2.7. Tedavi.....	22
2.2.7.1. Diyet Tedavisi.....	22
2.2.7.2. Farmakolojik Tedavi.....	24
2.2.7.3 Cerrahi Uygulamalar ve Gen tedavisi.....	25

2.2.8. Glikojen Depo Hastalığı Tip 1 Moleküler genetik.....	27
2.2.8.1.G6Paz ve G6PT Gen Yapısı.....	27
2.2.8.2. G6Paz ve G6PT Genlerindeki Mutasyonlar.....	29
2.2.8.3. Genotip-Fenotip İlişkisi.....	34
2.2.9. Mikroelektronik array.....	37
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	42
3.1. Çalışma Grubu.....	42
3.2. Klinik Bilgi.....	42
3.3. Mikroarray ile G6Paz ve G6PT Gen Mutasyonlarının Tespiti	44
3.3.1. DNA İzolasyonu.....	45
3.3.2. PZR ile Amplifikasyon	46
3.3.3. Pürifikasyon	51
3.3.4. Yükleme.....	52
3.3.5. Hibridizasyon ve Okutma	54
3.3.6. Analiz	57
3.4. İstatistik.....	59
4. BULGULAR.....	60
5. TARTIŞMA.....	68
6. SONUÇ.....	80
7. KAYNAKLAR	83
8. ÖZET	95
9. SUMMARY	97
10. EKLER.....	99
EK-1	99

EK-2.....	101
EK-2.1.....	101
EK-2.2.....	102
EK-3.....	103
11. ÖZGEÇMİŞ.....	104

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE	Anjiotensin Dönüştürücü Enzim
AFP	Alfa Fötoprotein
ALP	Alkalen Fosfataz
ALT	Alanin Transaminaz
AMP	Adenozin Monofosfat
AST	Aspartat Transaminaz
BT	Bilgisayarlı Tomografi
Bw1-2	Yıkama Tamponu 1 ve 2
B3	Lizis Tampon
Ca	Kalsiyum
cDNA	Komplementer DNA
Cy3	Siyanin 3
Cy5	Siyanin 5
DEXA	Dual Enerji X-ray Absorpsiyometri
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Nükleotidtrifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EEG	Elektroensefalografi
ER	Endoplazmik Retikulum
ESGSD I	Glikojen Depo Hastalığı Tip 1 Avrupa Çalışma Grubu
GDH	Glikojen Depo Hastalıkları
GDH 1	Glikojen Depo Hastalığı Tip 1
GDH 1a	Glikojen Depo Hastalığı Tip 1a
GDH 1b	Glikojen Depo Hastalığı Tip 1b
G6Paz	Glikoz-6-Fosfataz
G6PC	Glikoz-6-Fosfataz Geni
G6PT	Glikoz-6-Fosfataz Transporter
G6PT1	Glikoz-6-Fosfataz Transporter Geni
GCSF	Granülosit Koloni Stimule Edici Faktör

HDL	Yüksek Dansiteli Kolesterol
HSB	Yüksek Tuz Tamponu
İBH	İnflamatuvar Barsak Hastalığı
kb	Kilobaz
KBY	Son Dönem Böbrek Yetmezliği
KMY	Kemik Mineral Yoğunluğu
LDL	Düşük Dansiteli Kolesterol
LSB	Düşük Tuz Tamponu
M	Molar
MgCl₂	Magnezyum Klorür
MRI	Manyetik Rezonans
mRNA	Elçi RNA
NaOH	Sodyum Hidroksit
nmol	Nanomol
nmol/L	Nanomol/Litre
OR	Otozomal Resesif
P	Fosfor
Pmix	Çoğaltılacak Bölgeye Özgü Primerler
PMNL	Polimorfonükleer lökosit
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SD	Ortadan Sapma
SDS	Ortadan Sapma Puanı
SNP	Single Nükleotid Polymorphism
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
STR	Short Tandem Repeats
q	Kromozom Uzun Kol
TaqMan-ASA	TaqMan-Allele-Specific Amplification
USG	Ultrasonografi
VLDL	Çok Düşük Dansiteli Kolesterol

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Glikojen metabolizması ve glikolizis yolağı.....	5
Şekil 2. Glukoz-6-fosfataz enzim sistemi.....	9
Şekil 3. GDH 1a'lı hastanın karaciğerinin histolojik görüntülemesi.....	11
Şekil 4. GDH 1a'lı hastanın böbreklerinin histolojik görüntülemesi.....	11
Şekil 5. GDH 1a ve GDH 1b tanı akış şeması.....	21
Şekil 6. İnsan G6PC geninin kromozomal yeri ve yapısı.....	28
Şekil 7. İnsan G6PT geninin kromozomal yeri ve yapısı.....	28
Şekil 8. GDH 1a'lı hastaların G6PC geninde saptanan mutasyonlar.....	30
Şekil 9. GDH 1b'lı hastaların G6PT geninde saptanan mutasyonlar.....	31
Şekil 10. Mikroarray kartuşunda PZR ürünlerinin adreslendiği test alanları.....	39
Şekil 11. Mikroarray yöntemi ile mutasyon analizleri için izlenmesi gereken basamaklar.....	45
Şekil 12. PZR ürünlerinin saflaştırılması.....	52
Şekil 13. Mikroarray çipi.....	53
Şekil 14. Yükleme haritası örneği.....	54
Şekil 15. DNA'nın elektronik olarak adreslenmesi.....	54
Şekil 16. DNA'nın denatürasyonu.....	55
Şekil 17. Hibridizasyon.....	57
Şekil 18. Uygun olmayan reporterların ayrılması ve sinyallerin ölçümü.....	57
Şekil 19. Verilerin grafikte değerlendirilmesi.....	57

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Glikojen depo hastalıklarının bulguları.....	6
Tablo 2. G6PC geninde en sık görülen 12 mutasyonun klasik adlandırılması.....	32
Tablo 3. G6PT geninde en sık görülen 3 mutasyonun klasik adlandırılması.....	32
Tablo 4. G6PC geninde saptanan mutasyonların etnik kökenlere göre sınıflandırılması.....	35
Tablo 5. G6PT geninde saptanan mutasyonların etnik kökenlere göre sınıflandırılması.....	35
Tablo 6. Mikroelektronik array teknolojisinin avantajları.....	41
Tablo 7. G6PC ve G6PT genlerinde çalışılan mutasyonlar ve bulundukları ekzonlar	48
Tablo 8. Bu çalışmada kullanılan G6PC geninin primer dizileri.....	49
Tablo 9. Bu çalışmada kullanılan G6PT geninin primer dizileri.....	49
Tablo 10. PZR karışımının içeriği.....	50
Tablo 11. Amplifikasyon döngü protokolünün tüm reaksiyonlar için ısı ve süreleri.....	50
Tablo 12. Reporter karışım miktarları.....	56
Tablo 13. Nanogen yazılımında sayısal değerlendirme.....	58
Tablo 14. Hastaların tanı anındaki tanımlayıcı özellikleri.....	61
Tablo 15. Tanı anındaki yakınma.....	61
Tablo 16. VA, boy ve boy SDS değerleri.....	62
Tablo 17. Tanı anındaki laboratuvar verileri.....	62
Tablo 18. İzlem sırasındaki laboratuvar verileri.....	63

Tablo 19. Hastaların izlem sırasındaki tanımlayıcı özellikleri.....	64
Tablo 20. KMY ile değerlendirme.....	64
Tablo 21. G6PC geninde saptanan mutasyonların allelik sıklığı.....	65
Tablo 22. GDH 1a’da genotip klinik tutulum ilişkisi.....	66
Tablo 23. GDH 1a’da genotip ile izlem sırasında saptanan patolojik laboratuvar değerleri arasındaki ilişki.....	66

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim A. GDH 1b tanılı hastada gövdesel tipte şişmanlık ve kas kitlesinde azalma.....	14
Resim B. GDH 1a tanılı hastada taş bebek yüz görünümü.....	14

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Glikojen depo hastalığı tip 1 (GDH 1); glukoz 6 fosfataz (G6Paz) sisteminde fonksiyon bozukluğu sonucu meydana gelen metabolik bir hastalıktır. Sıklığı 1/100.000 olup otozomal resesif kalıtılır. Glukoz 6 fosfat'ın (G6P) sitoplazmadan endoplazmik retikulum lümenine taşınmasını sağlayan glukoz 6 fosfat taşıyıcı protein (G6PT) eksikliği glikojen depo hastalığı tip 1b'ye (GDH 1b) neden olurken, endoplazmik retikulum lümeninde G6P'nin glukoz ve fosfata hidrolizini sağlayan G6Paz eksikliği ise glikojen depo hastalığı tip 1a'ya (GDH 1a) neden olmaktadır [1,2]. Hem G6Paz hem de G6PT'nin eksikliği glukoz hemostazında bozukluğa ve yetersiz hepatik glukoz üretimine yol açar.

GDH 1a'da G6Paz aktivitesinin karaciğer, böbrek, barsaklarda düşük olması sonucu hepatomegali, laktik asidoz ve hipoglisemi gözlenir. Diğer bulgular ise taşbebek yüzü, gövdesel tipte şişmanlık, kas kitlesinde azalma, böbrek büyüklüğü, puberte gecikmesi, büyüme geriliği, hiperlipidemi ve ürik asit yüksekliğidir [3]. GDH 1b'de, tip 1a'daki bulgulara ek olarak nötropeni, nötrofil ve monosit fonksiyon bozukluğu, tekrarlayan enfeksiyonlar ve inflamatuvar barsak hastalığı (İBH) gelişir [4,5].

GDH 1a ve GDH 1b'nin genetik temeli hakkında bilgilerin artması ve mutasyon tespit etme oranında yükseklik GDH1a ve GDH 1b tanısının klinik ve biyokimyasal anormalliklerle birlikte, invaziv bir işlem olan karaciğer biyopsisi ile enzimatik ölçüm yerine mutasyon analizi ile konulması fikrini doğurmuştur. Moleküler çalışmalar ile erken ve güvenilir tanı olanağı sağlanmakta, taşıyıcılar belirlenebilmekte ve genetik danışma verilebilmektedir [6].

Bu güne kadar G6Paz geninde 76, G6PT geninde ise 73 farklı mutasyon tanımlanmıştır [7,8]. Çoğu doğumsal metabolizma bozukluğunda olduğu gibi GDH 1'de etnik köken önemlidir. GDH 1a'da, özellikle bazı etnik grup ve coğrafik bölgelerde alelik homojenite saptanmıştır. Örneğin Yahudi hastalarda R83C (%93), Çinli hastalarda R83H (%70), Japon hastalarda 727G >T (%88), Güney Avrupalı hastalarda R83C ve Q347X (%48, %21) mutasyonları sık bulunmuştur [6,7]. Literatürde Türk hastalarda GDH 1a gen mutasyonlarını tespit etmek için yapılan iki çalışmaya rastlanmıştır [9,10]. Bu çalışmalarda mutasyon sıklığı, az sayıda hastada ve farklı yöntem ile taranmıştır. GDH 1b'de iki mutasyon G339C ve 1211delCT beyaz hastalarda sık olup, W118R Japon hastalarda daha sık görülmektedir [7,11]. Şimdiye kadar, GDH 1a ve 1b'de genotip ile klinik bulgular arasında kesin bir ilişki saptanamamıştır. Bununla beraber, birkaç mutasyonun bazı fenotipik özellikler ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Literatürde, GDH 1'de mikroarray yöntemi ile gen mutasyon analizine raslanmamıştır. Mikroelektronik array teknolojisi; hedefe yönelik mutasyon analizi ile sık görülen mutasyonların hızlı bir şekilde taranmasına olanak sağlamaktadır [12,13]. Bu çalışma ile GDH 1a tanımlı Türk hastalarda dünyada en sık rastlanan R83C, W77R, G270V, R170Q, Q347X, 158delC, 130X, D38V, W63X, G188R, G727T, 1057delTTC ve GDH 1b tanımlı Türk hastalarda ise dünyada en sık rastlanan 1211del CT, G339C, W118R mutasyonlarına yeni bir teknik olan mikroelektronik array yöntemi ile bakılması, bu mutasyonların alel sıklığının belirlenmesi ve bulunan mutasyonlar ile klinik ve laboratuvar bulgular arasındaki korelasyonların incelenmesi planlanmıştır.

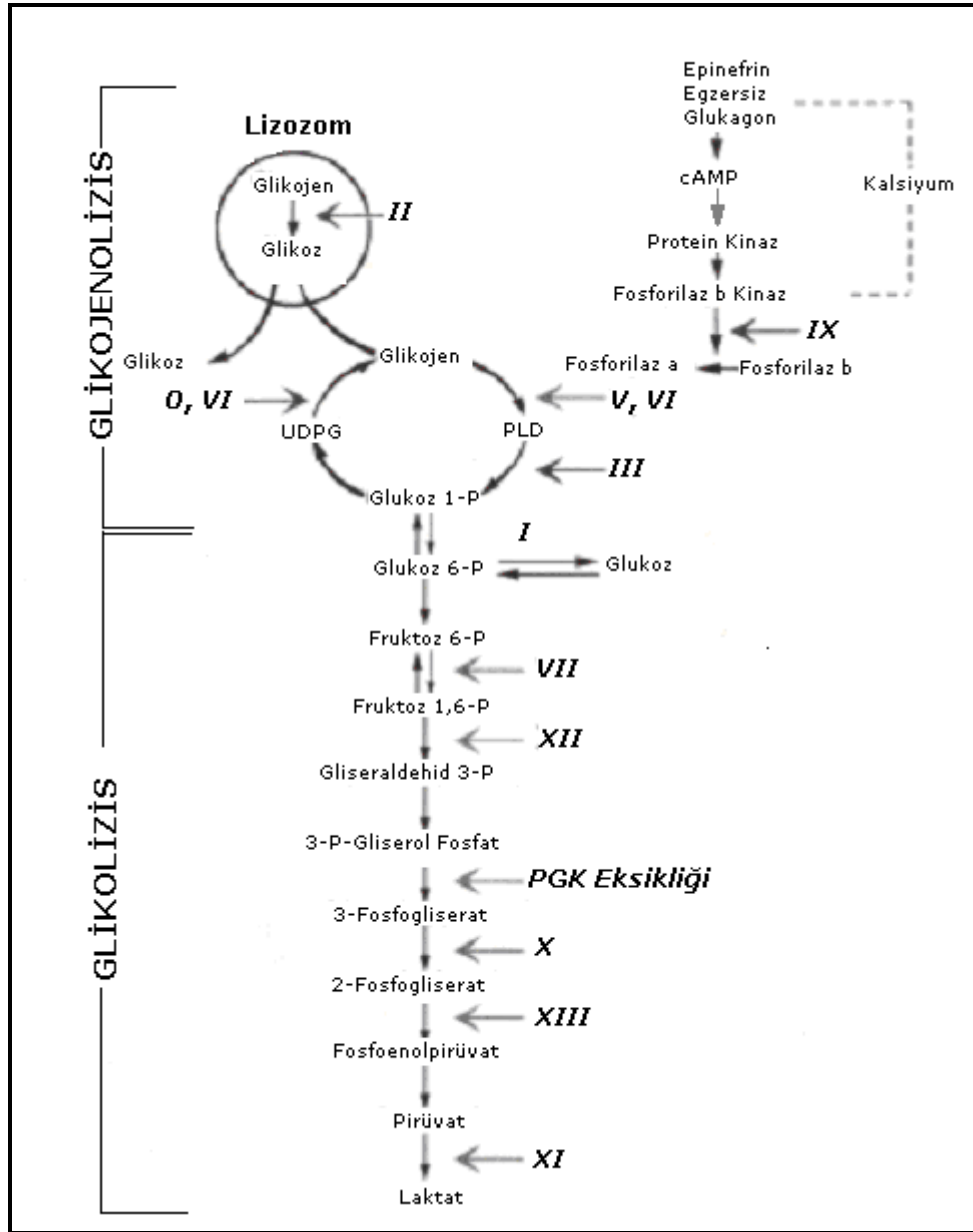
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glikojen Depo Hastalıkları

Glikojen depo hastalıkları (GDH) veya glikojenozis; karaciğerde glikojen sentez ve yıkımını kontrol eden enzimlerdeki bozuklukların neden olduğu bir grup kalıtsal metabolik hastalıktan oluşmaktadır [14,15]. Glikojen; α -1,4 glikozit bağlar ile birleşen ve α -1,6 glikozit bağlar ile dallanma sağlanan bir glikoz polimeridir. Karbohidratların karaciğer ve kaslarda depolanan formudur. Karaciğerde miktarı 5-7 g/100g (%1-5), kasta 2 g/100g'ın altındadır. Fetusun karaciğerinde glikojen depolanması gebeliğin son trimesterinde başlar, doğumdan sonraki ilk günlerde azalır, 2-3 haftalık iken erişkin değerlerine ulaşır. Besinlerle alınan glikoz normal koşullarda portal dolaşımdan karaciğere geçer. Glikoz, karaciğer hücresinin membranından geçtikten sonra glikokinaz ve/veya hekzokinaz enzimi ile glikoz-6-fosfata çevrilerek farklı metabolizma yollarına girer [16,17]. Çok sayıda hormon (insülin, glukagon, kortizol gibi) glikolizis, glikoneogenezis ve glikojen sentezini regüle eder [18] (Şekil 1).

Glikojen depo hastalıklarında; glikojen dokularda anormal tipte veya miktarlarda birikir. Şu ana kadar, enzim eksikliği ve etkilenen dokular göz önüne alınarak, 12 den fazla farklı GDH formu tanımlanmıştır (Tablo 1). Tip 1 glikojen depo hastalığı (von Gierke's) enzim eksikliği ilk olarak tanımlanan kalıtsal metabolik hastalıktır [19]. Glikojen depo hastalıklarında esas olarak karaciğer, kas veya her ikisi birlikte etkilenir. GDH; enzimatik bozukluğun tanımlandığı tarihsel gelişime göre belirlenmiş tip numarası ile sınıflandırılmaktadır. Bu rakamsal

sınıflama hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Diğer bir sınıflama ise; klinik ve karaciğer ve/veya kas tutulumuna göre yapılmaktadır [19]. Hipoglisemi; hepatik GDH'lerinin ana bulgusu iken, kas güçsüzlüğü ve kas krampları ise kas tutulumu yapan GDH'lerinin en belirgin bulgularındandır (Tablo 1). Tüm GDH'nın sıklığı; yaklaşık 20.000-43.000 canlı doğumda bir olarak bildirilmiştir [1,2]. Tip I, III ve IX hepatik GDH'lerinin % 80'ini oluşturmaktadır.



Şekil 1. Glikojen metabolizması ve glikolizis yolağı. Roma rakamları eksiklikleri karaciğer ve/veya kas glikojenozisine neden olan enzimleri işaret etmektedir: **0**; glikojen sentaz, **I**; glukoz-6-fosfataz, **II**; asit maltaz, **III**; dal kırıcı enzim, **IV**; dallandırıcı enzim, **V**; kas fosforilaz, **VI**; karaciğer fosforilaz, **VII**; fosfofruktokinaz, **IX**; fosforilaz-b-kinaz, **X**; fosfogliserat mutaz, **XI**; laktat dehidrogenaz, **XII**; frukto-1,6-bifosfat aldolaz A, **XII**; β-enolaz

Tablo 1.Glikojen depo hastalıklarının bulguları

Tip	Defektif Enzim/ Taşıyıcı	Tutulan Ana Organ	Klinik Semptomlar
Karaciğer			
Ia von Gierke	Glukoz -6-Fosfataz	Karaciğer, böbrek	Hepatomegali, kısa boy, hipoglisemi laktik asidemi, hiperlipidemi
Ib (non-a)	Glukoz-6-fosfat translokaz	Karaciğer, böbrek, Lökositler	Ia ile benzer, nötropeni, infeksiyonlar
III Cori Forbes	“Debranching” enzim ve alt tipleri	Karaciğer, kas	Hepatomegali, (kardiyomiyopati, myopati, hipoglisemi, kısa boy
IV Andersen	“Branching” enzim	Karaciğer	Hepatomegali, splenomegali, siroz, nadiren nöromusküler formlar
VI Hers	Karaciğer fosforilazı	Karaciğer	Hepatomegali, kısa boy, hipoglisemi
IX	Fosforilaz kinaz ve alt tipleri	Karaciğer ve/veya kas	Hepatomegali, miyopati, kısa boy, hipoglisemi
0	Glikojen sentaz	Karaciğer	Hipoglisemi
Kas			
V McArdle	Miyofosforilaz	Kas	Miyalji, egzersiz intoleransı, yorgunluk
VII Tarui	Fosfofruktokinaz ve varyantları	Kas, eritrositler	Miyopati, hemolitik anemi, multisistem tutulumu (konvülziyon, kardiyomiyopati)
-	Fosfogliserat kinaz	Kas, eritrositler, santral sinir sistemi	Egzersiz intoleransı, hemolitik anemi, konvülziyonlar
X	Fosfogliserat mutaz	Kas	Egzersiz intoleransı, kramplar
XI	Laktat dehidrogenaz	Kas	Egzersiz intoleransı, kramplar, deri lezyonları
XII	Aldolaz A	Kas	Egzersiz intoleransı, kramplar
XIII	β -enolaz	Kas	Egzersiz intoleransı, kramplar
Genel Tutulum			
II Pompe	Lizozomal α -glukosidaz	Lizozomlarda genel tutulum	Hipotoni, kardiyomiyopati İnfanıl, jüvenil, erişkin formlar
IIb Psödo Pompe Danon	Lizozomal ilişkili membran protein 2		Kardiyomiyopati
Lafora	Enzim defekti bilinmiyor	Tüm organlarda poliglukoza cisimler	Miyoklonik epilepsi, demans, konvülziyon

2.2. Glikojen Depo hastalığı Tip 1

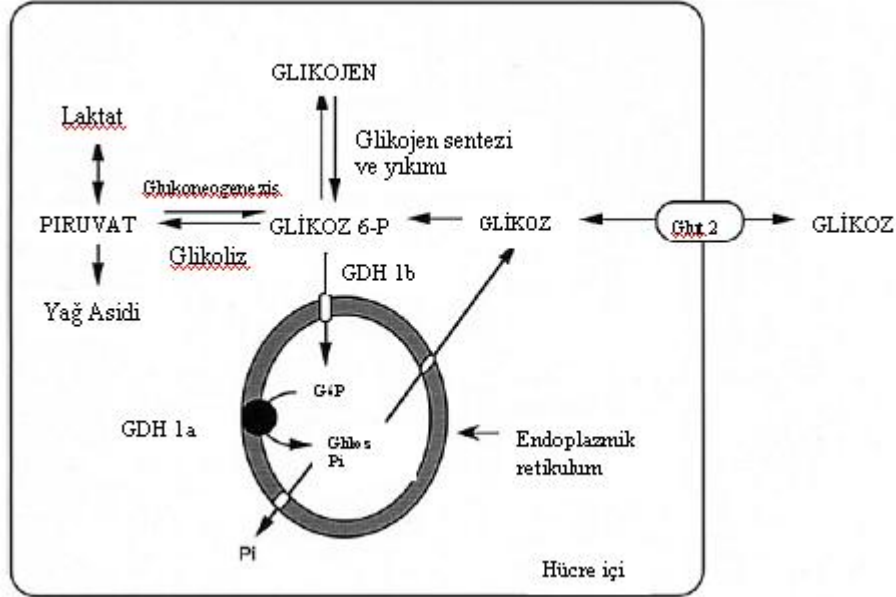
Glikojen depo tip 1 (GDH 1), kan şekeri regülasyonunda kilit rol oynayan G6Paz sisteminde fonksiyon bozukluğu sonucu meydana gelen bir hastalık grubudur. Sıklığı 1/100.000 olup otozomal resesif kalıtılır [1,2]. G6Paz sistemi; G6P translokasyon, G6P hidroliz, glukoz transport ve fosfat transport olmak üzere 4 işleve sahiptir. Bu işlevlerden herhangi birindeki fonksiyon bozukluğu GDH 1'in 4 subtiplerinden (GDH 1a, GDH 1b, GDH 1c, GDH 1d) biri ile sonuçlanır. G6Paz sistemindeki proteinlerden iki tanesinin, G6Paz ve G6PT, moleküler genetik seviyesi tanımlanmıştır. G6P'nin sitoplazmadan endoplazmik retikulum (ER) lümenine taşınmasını sağlayan G6PT eksikliği GDH 1b'ye neden olurken, endoplazmik retikulum lümeninde G6P'nin glukoz ve fosfata hidrolizini sağlayan G6Paz eksikliği ise GDH 1a'ya neden olur [1,2] (Şekil 2). GDH 1a tüm GDH 1 vakalarının %80'nından sorumludur [15].

GDH 1a'da karaciğer, böbrek, barsaklarda G6Paz aktivitesi düşük olması sonucu hepatomegali, laktik asidoz ve hipoglisemi gözlenir. Diğer bulgular ise taşbebek yüzü, gövdesel tipte şişmanlık, kas kitlesinde azalma, böbrek büyüklüğü, puberte gecikmesi, büyüme geriliği, hiperlipidemi ve ürik asit yüksekliğidir. GDH 1b'de ise; karaciğerde G6P'nin glukoz dönüşümü yetersiz olması nedeni ile tip 1a'daki bulgular gözlenirken, ek olarak nötropeni, nötrofil ve monosit fonksiyon bozukluğu, tekrarlayan enfeksiyonlar ve İBH gelişir [3,4].

2.2.1. Tarihçe

1929 yılında ilk olarak von Gierke [21], larenjite yakalanan 8 yaşında bir kız çocuğunda, karaciğerde glikojen depolanmasının; klinik, patolojik, mikroskopik ve kimyasal bulgularını "hepatonefromegaliya glikojenika" isimli makalesinde tanımlamıştır. Aynı yıl Schoenheimer [22] biyokimyasal deneyimleri ile hastaların karaciğerlerindeki glikojen depolanmasının bozulmuş glikojenezisin bir sonucu olduğunu açıklamıştır. 1952 yılında Cori [19], von Gierke hastalığının G6Paz enziminin eksikliği sonucu oluştuğunu göstermiştir. Von Gierke hastalığı, aynı zamanda tek enzim eksikliğinin saptandığı ilk kalıtsal metabolik hastalık olmuştur. 1993 yılında Lei ve ark. [23] insan G6Paz genini (G6PC) tanımlamış, klonlamış ve GDH 1a'ya neden olan mutasyonlardan bir kısmını bulmuşlardır.

1968 yılında Senior ve Loridan [24], von Gierke hastalığının klinik bulgularını sergileyen, G6Paz aktivitesi taze karaciğer doku örneklerinde tespit edilen ancak dondurulmuş karaciğer doku örneklerinde tespit edilemeyen hastalar tanımlamışlardır. Narisawa ve ark [25] ise 1978'de GDH 1b'ye G6P mikrozomal transport sistemindeki eksikliğin neden olduğunu bulmuşlardır. 1997 yılında, Gerin ve ark [26] G6PT genindeki mutasyonları tespit etmiştir. 1990'lı yılların sonlarından itibaren, GDH 1a ve 1b hastalıklarının moleküler temelleri ve hastalığa neden olan mutasyonların tanımlanması ile birlikte tanı invaziv bir girişim olan karaciğer biyopsisi yerine mutasyon analizleri ile konulmaya başlanmış ve ailelere prenatal tanı verilmeye başlanmıştır.



Şekil 2. Glukoz 6 Fosfataz Enzim Sistemi

2.2.2. Epidemiyoloji

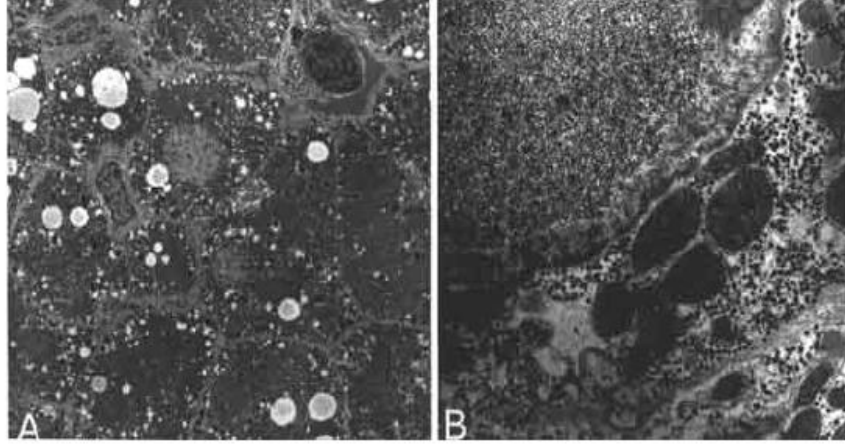
GDH 1 otozomal resesif geçişli kalıtsal metabolik bir hastalıktır. Akraba evliliğinin sonucu olarak aynı ailede birden fazla birey hasta olabilmektedir. Kız ve erkek cinsiyet arasında dağılımı hemen hemen eşittir [27-29]. Sıklığı beyaz ırkta 1/100.000-1/400000 olup, tip 1b ve tip 1c; tip 1'ya göre daha nadirdir. Aşkenazi Yahudilerinde ise sıklığı 1/20000'dir [30]. Hastalığın şiddetinde de etnik farklılık gözlemlenmektedir. Örneğin; Suriye ve Lübnanlı hastalar klinik olarak daha ağır bulgular sergilerken, Suudi Arabistanlı hastalar daha hafif klinik sergilemektedirler [31].

2.2.3. Patofizyoloji

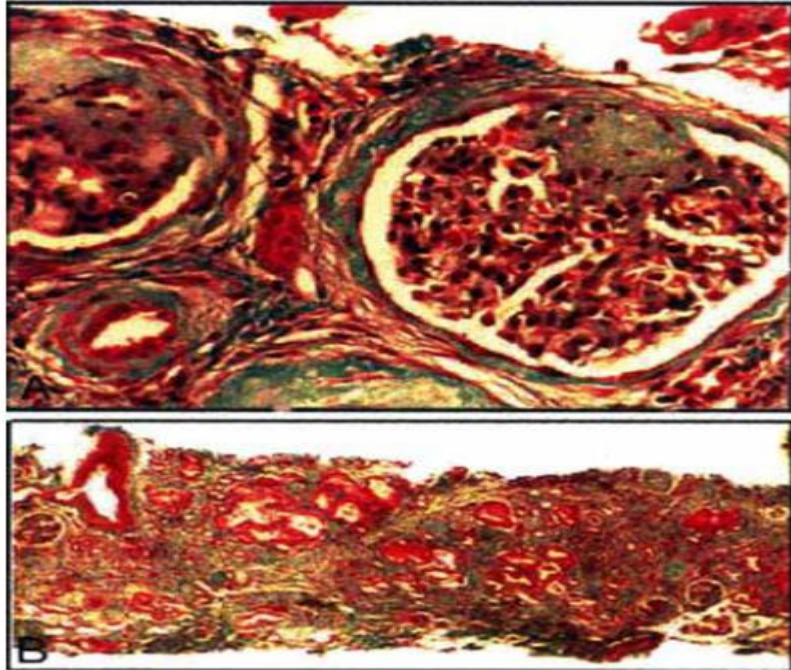
G6Paz; glukoneogenez ve glukojenolizin son basamağında G6P'ın glukoz ve fosfata hidrolizini katalizler (Şekil 2). Hem G6Paz hem de G6PT'in eksikliği glukoz hemoztazında bozukluğa ve yetersiz hepatik glukoz üretimine yol açar. Her iki enzim eksikliği de glikojenin esas olarak karaciğer ve böbreklerde aşırı miktarda birikimiyle birlikte ilerleyici hepatomegali ve nefromegali ile sonuçlanır. Karaciğer doku örnekleri incelendiği zaman; hepatosit sitoplazmasının glikojen partikülleri ve lipid vakuolleri ile şiştiği, hepatosit boyutlarının büyüdüğü ve nükleusta granüler glikojen birikimi olduğu gözlenir. Genellikle fibrozis gözlenmez (Şekil 3). Böbreklerde ise; glikojen birikimi hastalığın erken evrelerinde tübüler epitelyal hücrelerde gözlenir. Renal hastalığın ilerlemesi ile, fokal segmental glomeruloskleroz ve intersitisyel fibrozis tipik olarak gözlenen biyopsi bulgularıdır (Şekil. 4) [1].

Hipoglisemi; hem glukogenez hem de glukojenolizin son basamağınının bloke olması nedeni ile, glukozun ekzojen kaynakları biter bitmez gözlenmektedir. Ancak GDH 1'li hastalar, mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, bir miktar hepatik glukoz üretebilmektedirler [32]. Rezidüel G6Paz aktivitesi veya spesifik olmayan fosfatazların aktivitesi ile G6P'ın glukozu hidrolizi gerçekleşebilir; veya glikojen amilo-1,6-glukozidaz ile ya da lizozomal asit maltaz aktivitesi ile birlikte otofaji yolu ile glukozu yıkılabilir.

Hiperlaktatemi, fazla G6P'ın glukozu hidrolize olamayıp, başka glikolitik yolda piruvat ve laktata metabolize olması sonucu meydana gelir. Galaktoz, fruktoz gibi substratlarda karaciğerde glukozu metabolize olmak için G6Paz aktivitesine ihtiyaç göstermektedirler. Sonuç olarak; ekzojen olarak alınan sukroz ve



Şekil 3. GDH 1a'lı bir hastanın karaciğerinin histolojik incelemesi. Elektromikroskopik incelemede hepatositlerin sitoplazmasında glikojen partikülleri , lipid damlacıkları (A, X 3.000), nükleus içinde granüler glikojen birikimi (B, üst sol) ve bir hepatosit sitoplazmasında (X 12.000) glikojen rozetleri (B, sağ alt) gözlenmektedir [1]



Şekil 4. GDH 1a'lı hastanın böbreklerinin histolojik incelenmesi. Böbrekte fokal segmental glomeruler lezyonlar, intersitisyel fibrozis ve fokal tübüler atrofi gözlenmektedir (X30) [1]

laktozun sindirilmesi ile kan glukoz seviyesinde az miktarlarda artış ile beraber hiperlaktatemi gözlenmektedir [33].

Tedavi edilmemiş hastalarda serum özellikle hipertrigliseridemi nedeni ile süt görünümündedir. Hiperlipidemi diyet tedavisine kısmen yanıt vermektedir [34,35]. Triglicerit ve kolesterol yüksekliği, çok düşük dansiteli kolesterol (VLDL) ve düşük dansiteli kolesterol (LDL) partiküllerinin miktarının artışı yansıtırken, yüksek dansiteli kolesterol (HDL) partikülleri azalmaktadır [36]. Hiperlipidemi; hem malonil-CoA yolu ile asetil-CoA'nın artışından kaynaklanan artmış lipogenez, hem de serum lipoproteinlerinin temizlenmesinde ki gecikme sonucu oluşmaktadır [37]. Yüksek G6P seviyeleri, lipojenik genlerin transkripsiyonlarının aktivasyonunu sağlayarak hiperlipidemiye katkıda bulunabilir [38].

Hiperürisemi; hem artmış üretim, hem de azalmış renal klirens sonucu meydana gelmektedir. G6P birikiminin artması intrahepatik fosfat düzeylerinde azalma ile sonuçlanır ve adenozin monofosfat (AMP)-deaminazlar stimule olarak adenin nükleotidlerinin ürik asite yıkımına neden olur [39]. Böylelikle artmış üretim meydana gelir. Azalmış renal klirens ise ürik asit ile yüksek laktat arasında gerçekleşen rekabet sonucu meydana gelmektedir [40].

GDH- 1b'li hastalarda hem nötrojeni hemde monosit ve polimorfonükleer lökositlerdeki (PMNL) fonksiyon bozuklukları şiddetli enfeksiyöz komplikasyonlara ve İBH'na yatkınlığa yol açmaktadır [41].

G6PC geninden farklı olarak G6PT geninin aynı zamanda hemopoetik progenitör hücrelerde eksprese edilmesi; sık enfeksiyon ve nötrojeni gibi klinik bulguları açıklayabilir [42]. GDH 1b'de PMNL'in hücre membranı boyunca glukoz geçişi bozulmuştur. Mikrozomal G6P transportunun, nötrofilleri oksidanlara karşı

korumada etkili olduğu düşünölmektedir ve glukoz transportunun genetik bozuklukları, hücresele fonksiyonların bozulmasına ve apoptozise yol açmaktadır. Nötrofillerin fonksiyon bozukluğunda bu mekanizmanın rol oynadığı düşünölmektedir [43].

2.2.4. Klinik ve Laboratuvar Bulgular

Klasik GDH 1a'da semptomlar genellikle hayatın ilk aylarında, hatta doğum ile birlikte gözlenebilir. Hipoglisemik semptomlar genellikle süt çocukluğu döneminde, bebeğın gece boyunca uyuduğı 3-4. aydan sonra, veya araya giren hastalık nedeni ile normal beslenmenin bozulduğı durumlarda ortaya çıkar. Ancak doğumdan kısa bir süre sonra da semptomatik hipoglisemi gözlenebilmektedir. Hipoglisemi atakları glukagona yanıtızsızdır. Hastalarda kan şekerinin düşöklüğüne bağılı titreme, huzursuzluk, sık nefes alıp verme, siyanoz, apne, konvölziyon, solukluk, terleme, serebral ödem, koma ve hatta ölüm gözlenebilir. Hipoglisemik bulgular genellikle sabahları veya beslenme öncesi gözlenmektedir. Semptomlar beslenme ve glukoz verilmesi ile kaybolur ve sık beslenme hipoglisemik atakları önler. Daha büyük çocuklar da; taş bebek yüzü görünümü, sık tekrarlayan letarji atakları, uykudan uyanmada güçlükler, titreme, abartılı açlık hissi, büyüme geriliğı, karın şişliğı, gövdeye göre ince ekstremiteler görünümü gözlenebilir (Resim A,B).



Resim A



Resim B

Resim A: GDH 1b tanılı hastada gövdesel tipte şişmanlık ve kas kitlesinde azalma

Resim B: GDH 1a tanılı hastada taş bebek yüz görünümü

Özellikle yetersiz metabolik kontrol nedeni ile, trombosit fonksiyonlarında bozulma sonucu burun kanamasına eğilim mevcuttur. Enfeksiyöz hastalıklar sırasında , iştahın azalması nedeni ile ağır hipoglisemik semptomlar gözlenebilir. Oyun çocukluğu döneminde etkilenen hastalarda rikets ve anemi bulguları saptanabilir [44-46]. GDH 1b'li hastaların yanısıra tip1a'lı hastalarda da yaş ile birlikte artan, ishal atakları bildirilmiştir. İlk başta bu ataklara glukoz malabsorbsiyonunun neden olduğu düşünülse, çalışmalarda bu hastalarda monosakkarit, disakkarit ve yağ malabsorbsiyonu ait bulgular tespit edilememiştir. İntestinal biyopsilerde inflamasyona ait bulgulara rastlanmış ve fekal α -1 tripsin atılımında artış saptanmıştır [41,47]. İshalin nedeni tam olarak bilinmemektedir [5].

Fizik muayenede; hepatomegali sıklıkla doğumda mevcuttur ve kısa zaman içinde splenomegali olmaksızın karın şişliğine neden olan masif hepatomegali gelişir. Yaş ile birlikte hastalarda büyüme geriliği, kısa boy ve rikets bulguları gözlenebilir [44]. Çocukluk çağında büyüme geriliği hastaların çoğunda gözlenen bir bulgudur ve erişkin hastalar arasında da kısa boy yaygındır [44,48,49]. Nadiren, kandaki trigliserit düzeylerinin yüksekliği ile ilişkili olarak, diz, dirsek gibi ekstensör yüzeylerde kutanöz ksantomlar gözlenebilir [50].

En belirgin laboratuvar bulguları; hipoglisemiye ek olarak laktik asidoz, hiperlipidemi (özellikle hipertrigliseridemi) ve hiperürisemidir. Transaminaz seviyeleri genellikle hafifçe artmıştır ve siroz gelişmez. Ultrasonografik incelemede, böbreklerde orta derecede büyüme gözlenir. Serum biotinidaz aktivitesi artmıştır. Hiperkalsiüri gözlenebilir [44,45,51,52].

GDH-1b'li hastalarda GDH-1a'da gözlenen bulgu ve semptomlara ek olarak, tekrarlayan enfeksiyonlar, siklik veya sürekli nötropeni ve nötrofil fonksiyon bozukluğu GDH 1b nin ayırteci özellikleri olarak bilinmektedir. GDH -1b hastalarının çoğu İBH ve şiddetli enfeksiyonlara zemin hazırlayan nötropeni ve nötrofil fonksiyon bozukluğuna sahiptir. GDH- 1b'li çocuklar sık otit, gingivit atakları geçirebilirler. Aynı zamanda tekrarlayan oral ve intestinal mukozal ülserasyonlar sık olarak gözlenmektedir. GDH-1a'lı hastalar gibi tekrarlayan ishal atakları gözlenebilir [41,53,54].

2.2.5. Komplikasyonlar

Diyet tedavisi ile sağlanan metabolik ve endokrin kontrol mortalite ve morbiditede azalmaya ve yaşam kalitesinde düzelmeye yol açar [55]. Hipoglisemik hasar önlenabilirse serebral fonksiyonlarda bozukluk meydana gelmez. Fakat yaş ile birlikte farklı organ sistemlerinde komplikasyonlar gelişebilir [45,49,56].

Renal tutulumun ilk bulgusu glomeruler hiperfiltrasyondur ve mekanizması halen bilinmemektedir. Proksimal renal tübüler fonksiyon bozukluğu metabolik kontrolü kötü olan hastalarda gözlenir ve yoğun diyet tedavisinin başlanması ile düzelir [57]. Ancak distal renal tübüler fonksiyon bozukluğu metabolik kontrolü iyi olan hastalarda bile gözlenmektedir Proksimal ve distal tübüllerin etkilenmesi renal tübüler asidifikasyon defektlerinin oluşmasına neden olabilir. Nefrolitiyazis tanımlanmış en sık komplikasyondur. Fazla G6P, pentoz fosfat şantı ile metabolize edilip hiperürisemi oluşturmakta, bu nedenle de ürat taşlarının bu hastalarda nefrolitiyazisin en sık nedeni olduğu kabul edilmektedir [58-60]. GDH-1'de hiperkalsiüri ve hipositratri gözlenmektedir. Bunlar distal renal tübüler asidozun inkomplet bir formu ile birlikte bulunabilir [61,62]. İdrardaki sitrat, kalsiyumun tübüllerde presipite olup, taş oluşmasını engelleyen önemli bir endojen şelatördür [59]. Hiperkalsiüri ve hipositratri GDH 1'de nefrokalsinozis ve/veya ürolitiyazise neden olabilmektedir [63]. Renal tutulum için; düzenli ultrasonografik takip önerilmektedir. Mikroalbuminüri; renal hastalığın ilerlediğini işaret eden erken bir bulgudur ve 1. dekatın sonu veya 2. dekatta ortaya çıkabilir [62]. Takiben proteinüri, hipertansiyon, hematüri gelişebilir. En erken patolojik bulgu segmental glomerulosklerozdur. 3 ile 5. dekatlarda renal fonksiyonlardaki bozulma son dönem böbrek yetmezliğine (KBY) ilerleme gösterebilir. Tip 1 Diabetes mellitus ile

GDH 1’de gözlenen renal hastalığın doğal seyrindeki benzerlik göze çarpmaktadır. Diyabetik nefropati tedavisine benzer şekilde; mikroalbuminüri, protein ve sodyumun diyet ile kısıtlanmasına rağmen 3 ay süresince devam ederse anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri başlanabilir. Hemodiyaliz, periton diyalizi ve renal transplantasyon GDH 1 hastalarında gelişen KBY için tedavi seçeneklerindendir [49,64].

İkinci veya üçüncü dekatta tek veya birden fazla hepatik adenom gelişebilir ve diyet tedavisi ile yıllar boyunca değişmeden kalabilir. Ancak literatürde, hepatik adenom ve hepatoselüler kanser saptanan bir yaşımdan küçük çocuklar bildirilmiştir [65]. Çalışmalarda metabolik kontrolü iyi olan bazı hastaların takibinde, adenomların boyut ve sayılarında azalma gözlenmiş olmasına rağmen yol açabildiği mekanik problemler, akut hemoraji, maliyn transformasyon nedeni ile düzenli ultrasonografik (USG) incelemeler yapılmalıdır [66,67]. Hepatik lezyon gelişir gelişmez, maliyn transformasyonlu ve alfa fötöprotein seviyesi (AFP) normal veya maliyn transformasyon olmaksızın AFP seviyesi yüksek saptandığı durumlarda, her 3 ayda bir AFP ve karsinoembriyogenik antijen düzeyleri bakılması ve abdominal USG yapılması önerilmektedir [68]. Nodülün boyutlarında artış veya adenomun sınırlarında belirsizleşme saptandığı zaman abdominal bilgisayarlı tomografi (BT) veya manyetik rezonans (MRI) ile görüntüleme önerilmektedir [68]. Patogeneizde yüksek glukagon/insülin oranı, hücrelerdeki glikojen birikimi, protoonkogen/onkogen aktivasyonu ve mutasyonların rol aldığı düşünülmektedir. Karaciğer adenomlarının tedavisi konservatif veya cerrahidir. Adenomların sık tekrarlama veya maliyn transformasyondan şüpheniildiğinde ve metastaz yok ise karaciğer transplantasyonu yapılabilir. Karaciğer transplantasyonu aynı zamanda

glukoz hemostazını düzeltir ancak GDH 1b'de bulunan nötrofil fonksiyon bozukluğu ve nötropenide düzelme gözlenmez ve renal yetmezlik gelişimini önlemez [69,70].

Osteopeni hem kemik matriks formasyonunda azalma hem de mineralizasyonda azalma sonucu ortaya çıkar. Kronik laktatemi gibi metabolik ve hormonal bozukluklar normal kemik formasyonunu baskılar. Doruk kemik kütle yoğunluğundaki düşüklük hayatın ileri dönemlerinde kırık riskini artırır [71,72].

Polikistik overler adolesan ve erişkin kadın hastalarda gözlenmektedir. Patofizyolojisi ve üreme fonksiyonlarına etkisi bilinmemektedir [73].

Hiperürisemi süt çocukluğu döneminden itibaren bulunmakla beraber gut hastalığı genellikle adolesan dönemden sonra gözlenmektedir.

Anemi özellikle adolesan ve erişkin hastalarda gözlenebilmektedir. Anemi; makrofaj ve intestinal hücrelerden demirin salınmasını kontrol eden bir peptid olan hepsidin hepatic adenomlardan uygunsuz salınımı nedeni ile demir tedavisine dirençlidir [45,49].

GDH 1 hastalarında trigliserid, VLDL ve LDL düzeylerindeki yüksekliğe rağmen endotelial vasküler fonksiyon bozukluğu ve ateroskleroz nadirdir. Normal endotelial fonksiyonun sağlanması; azalmış platelet agregasyonu, apoprotein E düzeyindeki artış, LDL'nin okside olma eğilimindeki azalma, plazmada yağ asidi oksidasyonuna karşı koruyucu olan antioksidatif mekanizmalardaki artış ile ilişkilendirilebilir [74-78]. Hipertrigliseridemi nedeni ile pankreatit gözlenebilir [28,79].

Bir vasküler komplikasyon olan pulmoner hipertansiyonu takiben gelişen progresif kalp yetmezliği yaşlanmış hastalarda mortalite ve morbiditenin nedeni olabilir [80]. Genellikle 2-3. dekattan sonra gelişir. Spesifik bir tedavisi yoktur.

GDH 1 hastalarında gözlenebilen beyin hasarı tekrarlayan şiddetli hipoglisemi atakları ile ilişkilidir. Hem psikometrik testler hem de beyin sapı işitsel uyarılmış potansiyel anormallikleri hipoglisemi nedeni ile başvuru sıklığı ile ilişkili bulunurken, elektroensefalografi (EEG) bozuklukları diyet uyumu ile ilişkili bulunmuştur. Beyin hasarı saptanan hastalardaki MRI bulguları ise; oksipital boynuz dilatasyonu ve/veya oksipital loblardaki beyaz cevher alanlarında hiperintens lezyonlar ile karakterizedir [81,82].

GDH 1a'lı kadın hastalar problemsiz gebelik geçirerek, doğum yapabilirler [82].

GDH 1b li hastalarda bu komplikasyonlara ek olarak İBH ve splenomegali gelişebilir [43].

2.2.6. TANISAL YAKLAŞIM

Hastalığın tanısını, açlık kan tetkiklerinde hipoglisemi, hiperlaktikasidemi, hipertrigliseridemi, hiperkolesterolemi ve hiperürikasideminin bulunması desteklemekte ancak hastaların sadece yarısında tanisal değer taşımaktadır. Glikoz tolerans testinde diyabetik yanıt, açlık sonrası glikoz verildiğinde kan şekeri artışı ve yüksek bazal laktat düzeyi azalışının gösterilmesi gibi testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca tüm bu testlere rağmen tanının kesinleşmesi için G6P sisteminin aktivitesine bakılmasına izin verecek miktarda karaciğer biyopsi

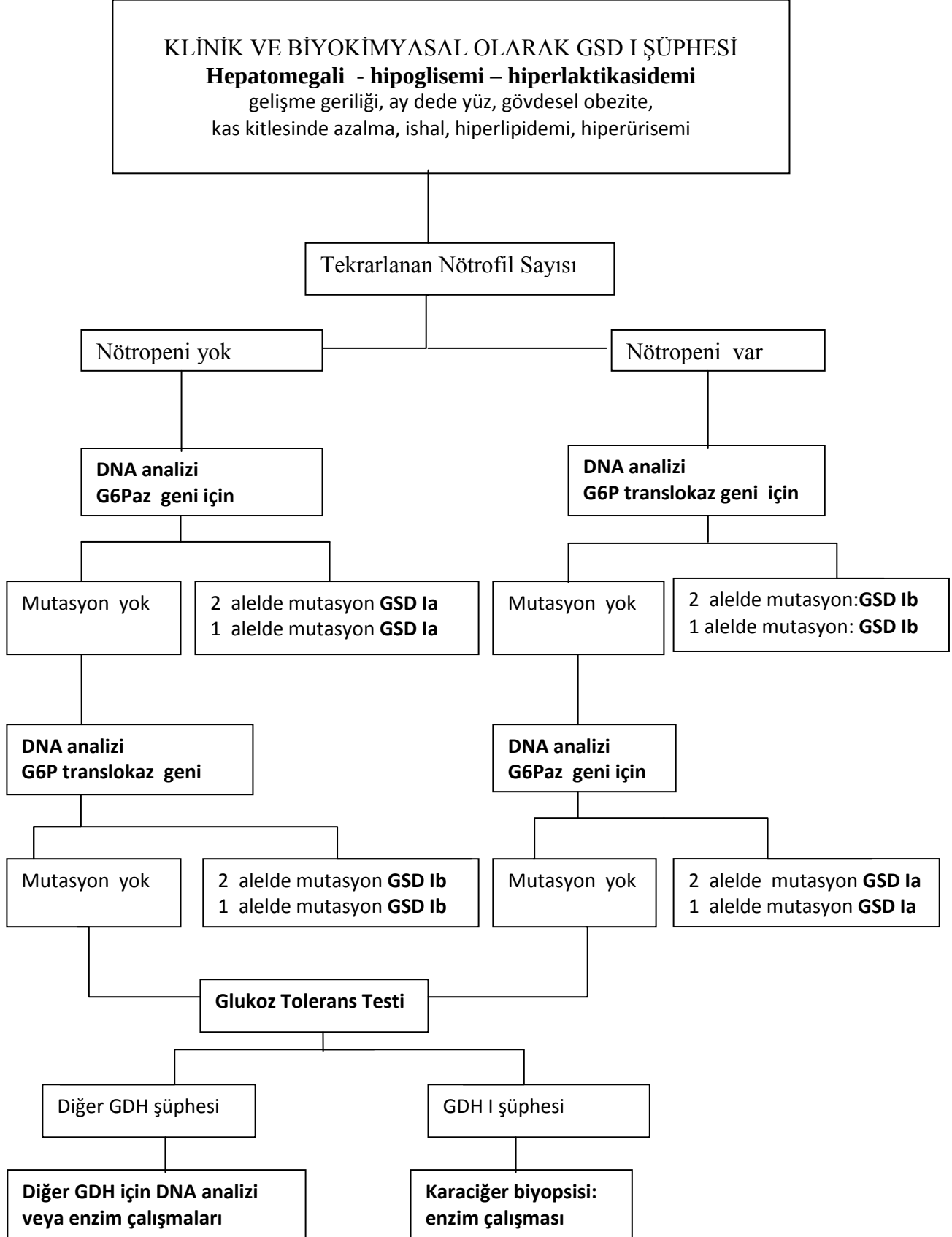
materyaline (taze veya dondurulmuş) ihtiyaç duyulmaktadır [3]. GDH 1a ve GDH 1b'nin genetik temeli hakkında bilgilerin artması ve mutasyon tespit etme oranında yükseklik GDH 1a ve GDH 1b tanısının klinik ve biyokimyasal anormalliklerle birlikte biyopsi ile karaciğer dokusundan enzim ölçümü yerine mutasyon analizi ile konulması fikrini doğurmuştur. Karaciğer biyopsisi invaziv bir işlem olup, sonuçların güvenilir olması için GDH 1a'da karaciğer örneği taze iken analiz edilmeli veya ileri dönemde enzimatik çalışma yapılmak üzere dondurularak saklanmalıdır. GDH 1b'de ise karaciğer örneği sadece taze iken analiz edilebilmektedir. Bu nedenle tanı sürecinde güçlük yaşanmaktadır. İnvaziv olmayan moleküler çalışmalar ise erken ve güvenilir tanı olanağı sağlamaktadır. Periferik kan lökositlerinde mutasyon analizi yapılması ile tanıya gidiş kolaylaşmakta ve hızlanmaktadır. Tanı almış hastaların ailelerinde mutasyon analizi yapılarak taşıyıcılar belirlenebilmektedir. Aynı zamanda prenatal tanıda enzimatik ölçüm için fetal karaciğer dokusuna gereksinim varken, mutasyon analizi koryonik villus örneklerinde veya amniyon sıvısında kolaylıkla yapılabilmektedir [6,83]. Şekil 5' de GDH 1a ve GDH 1b'nin tanısı için akış şeması gözlenmektedir.

Moleküler genetik analiz yöntemleri iki grup altında toplanabilir;

a-Hedefe yönelik mutasyon analizi:

Bu güne kadar G6PC geninde 76 farklı mutasyon, G6PT geninde ise 73 farklı mutasyon tanımlanmıştır [7,8,84]. Bu mutasyonların hepsinin tek tek taranması uzun ve pahalı yöntemler gerektirir. GDH 1a ve GDH 1b hastalarında; bazı etnik grup ve coğrafik bölgelerde alelik homojenite tanımlanmıştır [6,7]. En sık gözlenen mutasyonları taramayı amaçlayan RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), TaqMan-ASA (TaqMan-allele-specific amplification) gibi hedefe

Şekil 5. GDH 1a ve GDH 1b tanı akış şeması [6]



yönelik mutasyon analiz yöntemleri GDH 1 gibi alelik homojenite saptanan hastalıklarda başarıyla kullanılabilmektedir [85,86].

b-Sekans analizi

İstenen DNA fragmanında tüm nükleotid dizisinin taranabildiği bir yöntemdir. Maliyeti yüksek ve geç sonuç veren bir sistem olmasına karşın %99 oranında hastalığa sebep olan mutasyonları tespit etmektedir. Mutasyon tespit edilememiş hastalarda yeni mutasyonları bulmak veya tek bir mutasyonu saptanmış hastalarda mevcut olabilecek diğer mutasyonları taramak için kullanılmaktadır.

2.2.7. TEDAVİ

2.2.7.1. Diyet Tedavisi

Diyet tedavisinin amacı; hipoglisemi, mümkün olduğu kadar önlemek ve böylelikle hipoglisemi nedeniyle gözlenen diğer metabolik bozuklukları sınırlamaktır. İlk başlarda tedavi; karbohidrattan zengin besinlerin gündüz ve gece sürekli kullanılması şeklinde uygulanmıştır. 1974 yılında nazogastrik tüp ile gece boyunca sürekli beslenme kullanıma girmiştir [87]. Bu yöntem süt çocukluk döneminde uygulanabilmektedir. Glukoz-glukoz polimer solüsyonları, sukroz ve laktoz içermeyen veya çok az miktarda içeren özel formüller maltodekstrin ile zenginleştirilerek kullanılmıştır. 1984 yılında, pişmiş nişastadan daha yavaş glukoz salma özelliğine sahip pişmemiş çığ mısır nişastası kullanıma girmiştir [88]. Bu sayede gün içinde öğünler arasındaki sürenin uzaması ve metabolik kontrolde

iyileşme sağlanmıştır. Bir yaşın altında pankreatik amilaz aktivitesinin yetersiz olması bu yaş grubunda kullanımını kısıtlamaktadır. Ancak seçilmiş olgularda kullanılabilir ve etkili olduğu gösterilmiştir [56]. Başlangıç dozu 0,25g/kg olup yan etkilere göre doz yavaş yavaş artırılmalıdır. Karın şişkinliği, gaytada yumuşama en sık gözlenen yan etkiler olup genellikle geçicidir. GDH 1b hastalarda çığ mısır nişastasının kullanımı ile İBH alevlenebilir. Özellikle pişmemiş çığ mısır nişastası geceleyin kullanılır ve açlık periyodunun süresini saptamak için çığ mısır nişastası tolerans testi yapılması önerilmektedir. Teorik olarak glukoz ihtiyacı yaş ile birlikte azalmaktadır. Yenidoğanlarda 8-9mg/kg/dk iken, erişkinlerde 2-3mg/kg/ dk olduğu gösterilmiştir [46].

Diyete galaktoz ve fruktoz eklenmesi laktat üretimindeki artış nedeni ile halen tartışmalıdır. Laktat beyinde alternatif bir enerji kaynağı olarak kullanılabilir. Özellikle glukoz seviyelerinde azalmadan kaynaklanan serebral bulgulara karşı koruyucudur [89]. Aynı zamanda süt ürünleri, meyve ve sebzeler vitamin ve minerallerin önemli bir kaynağıdır. Diğer yandan laktoz ve fruktozun diyetten çıkarılması ile sağlanan normolaktatemi ile daha iyi metabolik kontrol sağlanabilmektedir [55].

Avrupa çalışma grubunun yayınladığı raporda, total enerjinin %60-65'inin karbohidratlardan, %10-15'inin proteinden ve geri kalanının yağlardan (tercihen yüksek miktarda linoleik asit içeren sıvı yağlardan) sağlandığı bir diyet planı oluşturulması, meyve, sebze ve az miktarda süt ürünleri dışında laktoz, fruktoz ve sukrozun kısıtlanması önerilmektedir [46].

2.2.7.2. Farmakolojik tedavi

Sodyum bikarbonat hiperlaktatemiye azaltmak için önerilmektedir. Bikarbonat aynı zamanda idrarın alkalizasyonunu sağlamakta, böylelikle nefrokalsinozis ve ürolitiyazis riskinde azalma meydana gelmektedir. Son zamanlarda GDH 1'li hastalarda yaş ile birlikte hipositraturide ilerleyici bir kötüleşmenin olduğunun bulunması ile birlikte sitrat ile alkalizasyon ürolitiyazis ve nefrokalsinozisin düzelmesi veya önlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır [46].

Ürik asitin aterosklerozun gelişimine karşı koruyucu bir faktör olması nedeni ile serum ürik asit düzeylerinin normal-yüksek değerler arasında tutulması önerilmektedir [77]. Eğer istenilen düzeylerin üzerinde ise, gut ve urat nefropatisini önlemek için, ksantin oksidaz inhibitörü (allopürinol) tedavisi uygulanmaktadır [46].

Mikroalbuminüri diyet tedavisine rağmen 3 aydan uzun süre gözleniyorsa renal fonksiyonlardaki bozulmanın ilerlemesini engellemek veya azaltmak için ACE inhibitörü başlanması önerilmektedir. Kan basıncının yaş için 95 persentil değerinin üzerinde seyretmesi durumunda ise ek olarak kan basıncını düşürücü ilaçlar önerilmektedir [46].

Hipertrigliseridemi diyet tedavisine rağmen oldukça yüksek değerlerde saptanıyor ise kolelitiyazis ve pankreatit riskini azaltmak için trigliserit düşürücü ilaçlar (nikotinik asit, fibratlar) kullanılmalıdır. Genç hastalarda kolesterol düşürücü ilaçlar kullanılması önerilmemektedir. Balık yağının serum kolesterol ve trigliserit seviyelerini düşürücü etkisi uzun süreli değildir. Aynı zamanda lipoprotein oksidasyonunu artırarak aterojeniteyi artırabilmektedir. Bu nedenle kullanılması önerilmemektedir [46,76].

Nötropenik GDH 1b'li hastalarda, oral antibiyotikler ile profilaksinin yararları henüz kesinlik kazanmamıştır. Ancak kotrimoksazol ile profilaksi, semptomatik veya nötrofil sayısı $< 500 \times 10^6 / L$ saptanan hastalarda önerilmektedir [41,90,91].

Nötropenili GDH'1b li hastalarda granülosit koloni stimule edici faktörün (GCSF) enfeksiyonun şiddeti ve İBH gerilemesinde etkili olduğu düşünülmektedir [92]. Ancak, nötrofil sayısının $200 \times 10^6 / L$ altında seyretmesi, intravenöz antibiyotik gerektiren hayatı tehdit edici tek enfeksiyon varlığı, kolonoskopi ve biyopsi ile tanı konulmuş ciddi İBH ve hastaneye yatış gerektiren veya hayatı etkileyen şiddetli ishal gibi belirli endikasyonlarda kullanılmalıdır [93].

2.2.7.3. Cerrahi Uygulamalar ve Gen tedavisi

GDH 1'in cerrahi tedavisinde portokaval şant işlemi uygulanmış ancak bu tedavi şekli komplikasyonlar ve prognoz üzerine olumsuz etkileri nedeni ile terkedilmiştir. GDH 1'de küratif tedavi için karaciğerde G6Paz enziminin üretilmesi ve fonksiyon görmesinin sağlanması gerekmektedir. Karaciğer nakli; tedaviye dirençli ve sık tekrarlayan hipoglisemi atakları, sık tekrarlayan hepatik adenomların varlığı veya maliyn transformasyondan şüpheniildiğinde, metastaz saptanmamış ise uygulanabilmektedir. KBY gelişen olgularda ise karaciğer ve böbrek nakli birlikte yapılabilmektedir [69,94,95].

Gen tedavisi; organ bulmada yaşanan güçlükler ve nakil olan organın reddedilmesi gibi problemler nedeni ile karaciğer transplantasyonuna alternatif bir tedavi seçeneğidir. Hepatomegalisi olan bir hastada G6Paz aktivitesinin %8'i hipoglisemiyi önlemektedir.

Normal G6Paz aktivitesinin %10'u GDH 1'li hastalarda tedavide başarı sağlamak için eşik değeri kabul edilmektedir [96]. İnsanlarda gözlenen GDH 1a ve GDH 1b hastalıklarının hayvan modellerinde elde edilmesi ile birlikte gen tedavisi üzerindeki çalışmalarda önemli başarılar elde edilmiştir. GDH 1a için hayvan modellerinde, adenovirus ve adeno-ilişkili virus ile gen tedavileri uygulanmıştır. Adenovirus ile tedavi yalnızca genin karaciğerdeki ekspresyonuna etkili ve klinik bulgulara kısa süreli düzeltilmeler sağlarken, adeno-ilişkili virus ile tedavi genin hem karaciğer hem de böbrekte ekspresyonunu sağlamaktadır ve bu sayede uzun dönem komplikasyonların önlenmesinde başarılı olmaktadır. GDH 1b için, hayvan modellerinde, gen tedavisi daha çok başlangıç evresindedir [97]. Bu çalışmalar gözönüne alındığında; GDH 1'de gen tedavisinin gelecekte insanlar üzerinde de başarılı sonuçlar vereceği düşünülmektedir.

Son zamanlarda GDH 1'in tedavisinde hepatosit transplantasyonu gündeme gelmiştir. Çalışmalarda bu tedavi yönteminin GDH 1'de metabolik kontrolü sağladığı ve hastaların yaşam kalitesini düzelttiği bildirilmiştir [98]. Ancak şu anda küratif bir tedavi şekli değildir. Hastanın immün sisteminin donör hepatositlerini reddetmesi durumunda veya zaman içinde enzim düzeyinde azalma nedeni ile tekrar hipoglisemi atakları gözlenebilmektedir [99].

Günümüzde, GDH 1 hastalarında hepatosit transplantasyonu ve viral vektör yardımı ile G6Paz aktivitesini sağlamaya yönelik tedavi seçenekleri üzerindeki araştırmalar devam etmektedir [96].

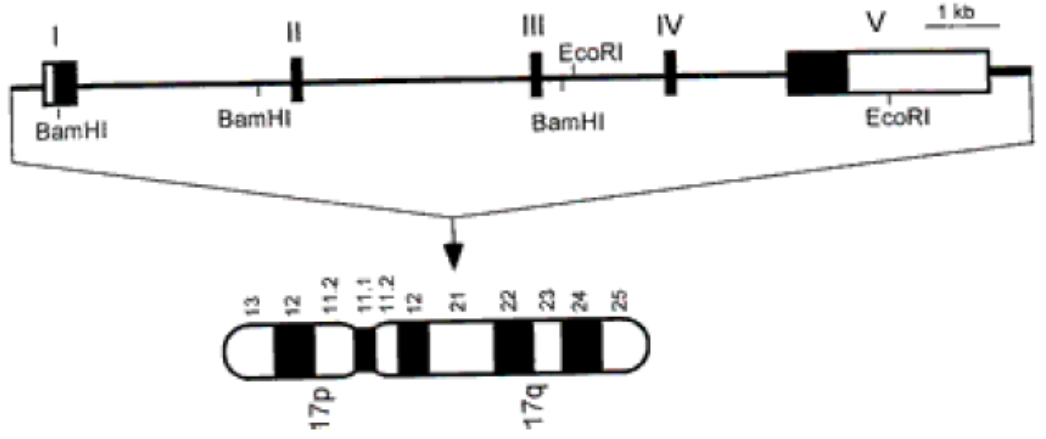
2.2.8. Glikojen Depo Hastalığı Tip 1 Moleküler genetik

2.2.8.1. Glukoz-6-Fosfataz ve Glukoz-6-Fosfat Translokaz gen yapısı

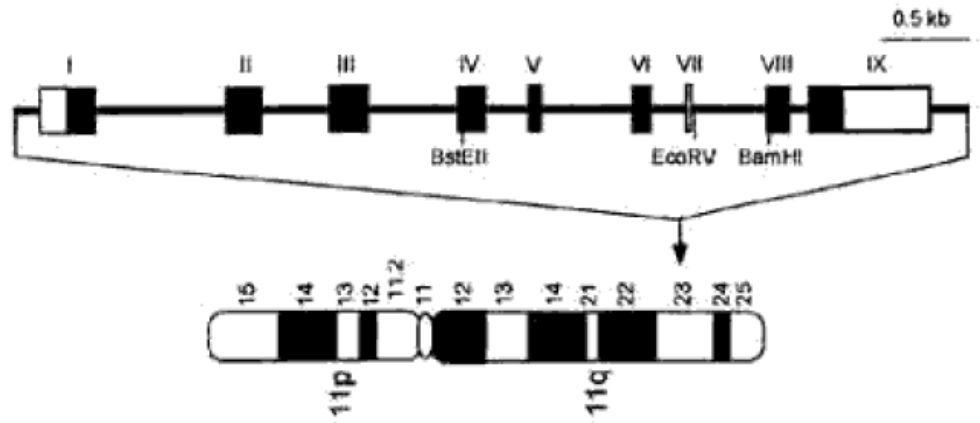
G6Paz kompleksinin katalitik alt birimi bir transmembran fosfohidrolaz olup aktif kısım, ER'ün lümenine bakar [100]. G6Paz; ER membranına 9 transmembran heliks ile gömülü rezidüden oluşmakta iken, G6PT 10 adet transmembran alt birimi içermektedir [2,26,101].

Genel olarak bakıldığında, G6Paz'tan sorumlu yapısal gen (G6PC, OMIM 232200) 17q21'de yerleşim göstermekte olup, uzunluğu 12,5 kb ve 5 ekzon içermektedir. 357 aminoasitten oluşan bir proteini kodlamaktadır. G6Paz mRNA karaciğer, böbrek ve barsakta eksprese olurken, testis, beyin, kas, akciğer, kalp, dalak, pankreas ve yağ dokusunda saptanmaz [100] (Şekil 6). Aynı zamanda insan monosit ve nötrofillerinde de ekspresyonu tespit edilememiştir [101]. Promoter bölgesinin bir kısmı ile tüm kodlama bölgesinin tamamının SSCP (single strand conformation polymorphism) analizi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) amplifikasyonu için primer sekansları yayınlanmıştır [102]. Gen bölgesinin boyutunun küçük olmasından dolayı G6PC deki mutasyon analizler SSCP veya PZR sekans analizi ile bir kaç günde yapılabilmektedir. Klinik olarak GDH 1a düşünülen hastalarda yapılan bazı çalışmalarda mutasyon tespit edilme oranı %100 olarak bildirilmiştir [23,102-107].

GDH 1b'den sorumlu yapısal gen (G6PT, OMIM 232220) 11q23 lokalizasyonunda, 5,1 kb uzunluğunda ve 9 ekzon içermekte olup, hem G6P hem de P translokaz aktivitesine sahip olan 429 aminoasitten oluşan bir proteini kodlamaktadır. Karaciğer, böbrek gibi organların yanısıra nötrofiller ve



Şekil 6. İnsan G6PC geninin kromozomal yeri ve yapısı. Ekzonların kodlandığı bölgeler koyu renkli kutucuklar ile gösterilmiştir



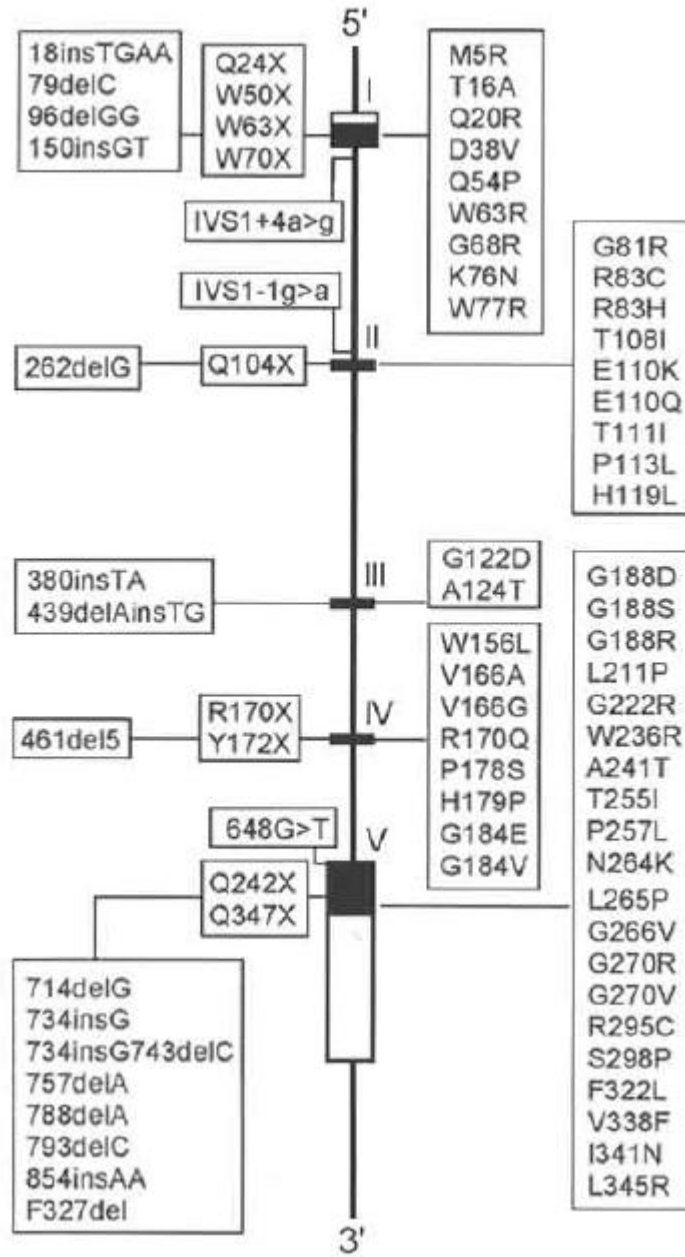
Şekil 7. İnsan G6PT geninin kromozomal yeri ve yapısı. Ekzonların kodlandığı bölgeler koyu renkli kutucuklar ile gösterilmiştir. Ekzon 7 yalnızca G6PT'nin farklı bir kopyasında eksprese olduğu için daha açık bir bant halinde gösterilmiştir

monositlerde de yaygın olarak eksprese edilmektedir (Şekil 7). G6PT 'nin farklı bir kopyası (ekzon 7) kalp, beyin ve iskelet kasında eksprese olmaktadır [108]. İnvitro çalışmalarda G6PT'nin G6P taşıyıcısı gibi fonksiyon gösterdiği ve G6PT'in "uptake" aktivitesinin G6Paz varlığı ile hızlandığı gösterilmiştir. G6PC geninin bulunmadığı veya düşük düzeyde eksprese olduğu hücrelerde G6PT'nin fonksiyonu bilinmemektedir [2]. G6PT'in Ca^{+2} sekestrasyonunu, glikoliz ve hekzos monofosfat şant aktivitesini düzenleyen bir G6P reseptör olarak fonksiyon gördüğü öne sürülmektedir. Tüm gen bölgesinin amplifikasyonu ve dizi analizi; PZR ve primer dizi analizleri ile yapılabilmektedir.

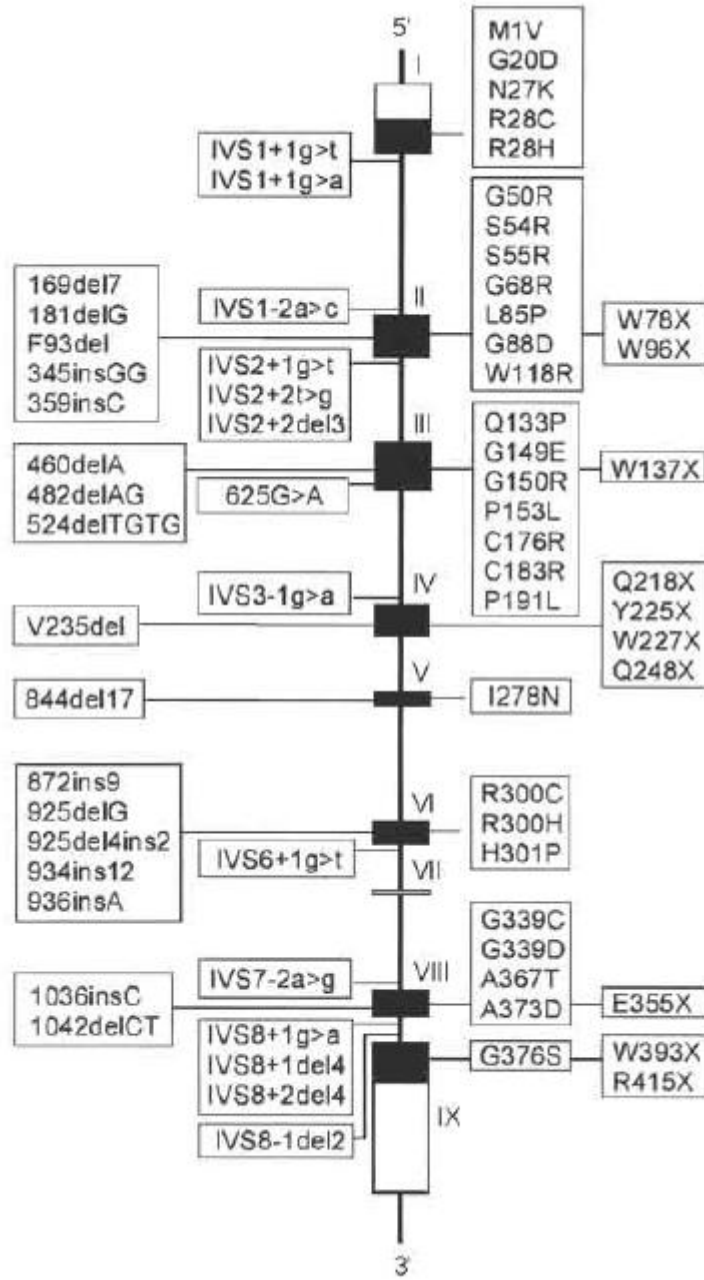
2.2.8.2. *Glukoz-6-Fosfataz ve Glukoz-6-Fosfat Translokaz Genlerindeki Mutasyonlar*

Bu güne kadar G6PC geninde 76 farklı mutasyon, G6PT geninde ise 73 farklı mutasyon tanımlanmıştır [7,8]. Her iki gende de tanımlanan mutasyonların büyük çoğunluğunu, bir bazdaki nokta mutasyona bağlı olarak sentezlenen aminoasitte (a.a) değişime neden olan 'missense' mutasyonların oluşturduğu bildirilmiştir. Tanımlanan diğer mutasyonları ise 'nonsense', 'splice' mutasyonlar, insersiyonlar, delesyonlar oluşturmaktadır [11,84,109] (Şekil 8,9).

Tablo 2 ve 3'de G6PC ve G6PT geninde en sık görülen ve bu çalışmada taranan 15 mutasyonun klasik adlandırılması ve cDNA ve proteindeki a.a değişiklikleri görülmektedir [7].



Şekil 8. GDH 1a'lı hastaların G6PC geninde saptanan mutasyonlar. G6PC geni 5 adet kutucuktan oluşan 5 ekzonlu bir çizgi olarak gösterilmiştir. Koyu renkli kutucuklar G6PC genindeki kodlanan bölgeleri göstermektedir. Bilinen mutasyonların tümü soldan sağa doğru insersiyon/delesyon, 'nonsense', 'splicing' ve 'missense' mutasyonlar olarak listelenmiştir



Şekil 9. GDH 1b'lı hastaların G6PT geninde saptanan mutasyonlar. G6PT geni 9 adet kutucuktan oluşan 9 ekzonlu bir çizgi olarak gösterilmiştir. Koyu renkli kutucuklar G6PT genindeki kodlanan bölgeleri göstermektedir. Bilinen mutasyonların tümü soldan sağa doğru insersiyon/delesyon, 'nonsense', 'splicing' ve 'missense' mutasyonlar olarak listelenmiştir

Tablo 2. G6PC geninde en sık görülen 12 mutasyonun klasik adlandırılması

Klasik Adlandırma	cDNA Nükleotid Değişikliği	Protein a.a Değişikliği
R83C	c.326C>T	p.Arg83Cys
W77R	c.308T>C	p.Trp77Arg
G270V	c.888G>T	p.Gly270Val
R170Q	c.588G>A	p.Arg170Gln
Q347X	c.1118C>T	p.Gln347Stop
35X	c.35Stop	p.158delC
130X	c.130Stop	p.459insTA
D38V	c.192A>T	p.Asp38Val
W63X	c.268G>A	p.Trp63Stop
G188R	c.641G>C	p.Gly188Arg
727>T	c.727G>T	p.Leu216Leu
DelF327	c.delPhe327	P.1058-1060delTTC

Tablo 3. G6PT geninde en sık görülen 3 mutasyonun klasik adlandırılması

Klasik	cDNA Nükleotid	Protein a.a Değişikliği
1211del CT		400X
G339C	c.1184G>T	p.Gly339Cys
W118R	c.521 T>C	p.Trp118Arg

Klasik olarak mutasyonların adlandırılması, alanin kodonunun (GCC) bir kabul edildiği proteinini kodlayan nükleotid sekansında meydana gelen değişimin pozisyonu ve değişen a.a adları esas alınarak yapılır. Örneğin; R83C mutasyonu 83. pozisyonda oluşan baz değişimi sonrası arginin (R) yerine sistein (C) oluşumunu ifade etmektedir. Klasik olan bu adlandırmanın yanı sıra daha geniş kapsamlı standart adlandırma sistemleri de kullanılmaktadır.

GDH 1a, bugüne kadar 424 farklı aileden, çoğunluğu ‘compound heterozigot’ olan hastalardan elde edilen 76 farklı mutasyondan oluşan genetik olarak heterojen bir bozukluktur. Tüm bu hastalar birlikte değerlendirildiğinde sık görülen bir mutasyon saptanamayıp, %50’den fazlası özel mutasyonlar olarak görülmektedir. En sık gözlenen mutasyonlar R83C (%29) Ekzon 2’de, 727G>T (%16,4) ve Q347X (%14,3) ekzon V’de, 35X (%4,2) ekzon I’de ve R83H (%3,9) ekzon II’dedir. Bu nedenle genel popülasyondaki mutasyonların en azından %70’e yakınını saptayabilmek için bu 5 ekzondan 3’ünün analiz edilmesi gerekmektedir. Bu da tanısal bir test olarak oldukça zahmetlidir. Fakat, bu 5 ekzonun boyutlarının küçük olduğu düşünüldüğünde tüm geni taramak yerine SSCP analizleri ile veya primer DNA dizi analizleri ile taranmanın daha uygun bir yöntem olduğu saptanmıştır [7]. Ancak Aşkenazi Yahudileri, Çinli, Japon, İspanyol ve Türk kökenli hastalarda olduğu gibi daha homojen popülasyonlarda kabul edilebilir mutasyon tespit edilme oranlarının yakalanması sık tekrarlayan bir kaç mutasyonun analiz edilmesine yönelik çalışmalarla sağlanabilir.

GDH 1b’de şimdiye kadar 73 farklı mutasyon tespit edilmiş olup, GDH 1a gibi genetik heterojeniteye sahip bir hastalıktır. Tüm mutasyonlardan en sık gözlenen 5 tanesi ekzon 8’de 1211delCT (%25,2 alellerin), G339C (%12), ekzon 2’de W118R

(%4,5), ekzon 3'te G149E (%2,9), ekzon 4'te Gln238X (%2,9) olup, toplam bu 5 mutasyonun görülme sıklığı %47,5 saptanmıştır. Etnik gruplarına göre ayrıldığında, hastaların büyük çoğunluğu beyaz ırk veya Japonların oluşturduğu gözlenmektedir. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda en sık görülen 5 mutasyonun araştırılması ile mutasyon tespit etme oranlarında belirgin artış saptanmamıştır (Beyaz ırk için %56,4 ve Japonlar için %66,8). Bu nedenle moleküler tanı bir kaç mutasyonun araştırmasına yönelik çalışmalar ile sınırlandırılmaması önerilmektedir [7].

2.2.8.3. Genotip-Fenotip İlişkisi

Çoğu doğumsal metabolizma bozukluğunda olduğu gibi GDH 1'de etnik köken önemlidir. Asya kökenli populasyonda R83C ve Q347X alelleri GDH 1a'da %55-63 oranında saptanmıştır. 130X ve R83C İspanyol kökenli olanlarda saptanmıştır. Özellikle bazı etnik grup ve coğrafik bölgelerde alelik homojenite tanımlanmıştır. Örneğin Aşkenazi Yahudi hastalarda R83C (%93), Çinli hastalarda R83H (%70), Japon hastalarda 727G>T (%88), Güney Avrupalı hastalarda R83C ve Q347X (%48, %21) bulunmuştur [6,7]. Türk hastalarda R83C mutasyon alel sıklığı bir çalışmada %63,3, diğer bir çalışmada ise %58,3, W77R mutasyonunun alel sıklığını ise %42 bulunmuştur ([9,10]. GDH 1b'de ise iki mutasyon G339C ve 1211delCT beyaz hastalarda sık olup, W118R Japon hastalarda daha sık görülmektedir [11]. GDH 1'de mutasyonların etnik farklılıklar göstermesi 'founder etkisi' ile açıklanmaktadır bu da spesifik bir allelin tek bir atadan köken alan mutasyon sonucu belli populasyonlarda görülmesi olarak tanımlanır [30].

Tablo 4 ve 5'de sırasıyla G6Paz geni ve G6PT geninde saptanan mutasyonların etnik kökenlere göre sınıflandırılması gözlenmektedir.

Tablo 4. Beyaz ırk, Japon, Çin, Yahudi, Latin Amerika, Müslüman Arap ve Hindistanlı GDH-1a hastalarında saptanan mutasyonlar

Beyaz ırk 560 alel	Japon 124 alel	Çin 58 alel	Yahudi 34 alel	Latin Amerika 18 alel	Müslüman Arap 8 alel	Hindistan 8 alel
R83C(180)	648G>T(109)	R83H(22)	R83C(32)	380insTA(9)	V166G(4)	150delGT(8)
Q347X(116)	R170X(6)	648G>T(21)	Q347X(2)	R83C(5)	R83C(2)	
79delC(32)	R83H(6)	262delG(4)		P1789(1)	G270V(2)	
G188R(21)	P257L(2)	H119L(2)		W236R(1)		
D38V(20)	G122D(1)	I341N(2)				
F327del(15)	H179P(1)	T16A(1)				
G270V(9)	IVS1-1 g>a(1)	R83C(1)				
R170X(9)		Q104X(1)				
V338F(8)		854ins AA(1)				
W63X(8)						
R83H(7)						

:

Tablo 5. Beyaz ırk, Japon, Arap (Bedevi Kökenli), Pakistan ve diğer GDH 1b hastalarında saptanan mutasyonlar

Beyaz ırk 216 alel	Japon 26 alel	Arap (Bedevi Kökenli) 18 alel	Pakistanlı 12 alel	Çinli 2 alel	Siyah ırk 2 alel
1042delCT(67)	W118R(11)	R28H(4)	169del7(4)	G149E(1)	G88D(2)
G339C(33)	IVS+1g>t (2)	G149E(4)	936insA(4)	P191L(1)	
IVS+1g>t (6)	625G>A(2)	1042delCT(4)	IVS8+2del4(4)		
359insC(6)	V235del(2)	W393X(4)			
G20D(5)	925del4ins2(2)	Q242X(2)			
C183R(5)	934ins12(2)				
Q248X(5)	IVS6+1g>t(2)				
R28C(4)	IVS1-2a>c(1)				
G149E(4)	G339D(1)				
W96X(3)	R415X(1)				
IVS2+1g>t(3)					
W137X(3)					
E365X(3)					

GDH 1a ve 1b hastalarının klinik bulguları oldukça geniş bir dağılım göstermektedir. Bu nedenle; genotip ve klinik bulgular arasında ilişki kurulmasının diyet ve farmakolojik tedavilerin düzenlenmesinde büyük fayda sağlayabileceği düşünülmüştür [110]. Ancak, şimdiye kadar, genotip ile klinik bulgular arasında kesin bir ilişki saptanamamıştır. Bununla beraber, birkaç mutasyonun bazı fenotipik özellikler ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Örneğin; Doğu Asya’da yaygın bir mutasyon olan 727G>T’nin hafif GDH 1a klinik bulguları sergilediği ancak ileri yaşlarda hepatoselüler kansere yatkınlığı artırabileceği bildirilmiştir [7,111,112]. G6PC geninde homozigot G188R mutasyonu taşıyan hastaların ise hafif kronik nötropeni, oksidatif metabolizmada azalma, bozulmuş kemotaksis gibi GDH 1b klinik bulgularını sergilediği saptanmıştır [113].

G6PC geninde diğer bir mutasyon olan P257L mutasyonunu homozigot olarak taşıyan bir Japon hastanın çok hafif klinik bulgular sergilediği; hiç hipoglisemi atakları geçirmediği ve diyet tedavisine gereksinimi olmadığı saptanmıştır. Bu durum bu mutasyona sahip kişilerde saptanan rezidüel G6Paz aktivitesine bağlanmıştır [114]. Benzer durum G6PT geninde homozigot 625G>A veya heterozigot G339D ve R415X mutasyonlarını taşıyan GDH 1b’li hastalarda gözlenmiştir. Bu mutasyonları taşıyan hastalarda; sahip oldukları rezidüel G6PT aktivitesine bağlı olarak nötropeni gözlenmediği ve tekrarlayan bakteriyel enfeksiyon geçirmediği bildirilmiştir [115,116].

GDH 1 hastalarının retrospektif olarak kayıtlarının incelenmesine dayalı çok merkezli çalışmaların yapılması, yeni saptanan mutasyonlar ile klinik bulgular arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesi ve saptanan mutasyonların G6Paz ve G6PT enzimlerinin yapısı ve fonksiyonları üzerindeki etkilerinin araştırılmasına yönelik

Çalışmaların artması, gelecekte genotip ile fenotip arasında ilişkiyi tanımlamada kolaylık sağlayabilir.

2.2.9. Mikroelektronik array

Moleküler taramalar bireylerin hastalık yatkınlığının önceden belirlenmesi, erken teşhis, hastalığın seyrinin tahmin edilebilmesi ve en uygun tedavi seçeneğine yol gösterme açısından önemlidir. Genomik bilgilerin elde edilebilirliğinin önemi gün geçtikçe artmaktadır. İnsan genomunda yaklaşık 30,000 gen bulunduğu varsayılmaktadır. Bu kadar çok genin tek tek analizi mümkün değildir. Günümüzde, geliştirilen otomasyona dayalı sistemler ile çok fazla sayıdaki genin aynı anda analizi mümkün hale gelmiştir. Hızla artan DNA dizilim bilgilerinden en yüksek kapasitede faydalanabilmek için yeni teknolojilere gereksinim duyulmuştur. Bu yeni teknolojiler arasında en güçlü olanlardan biri mikroelektronik array (mikroarray, mikroçip) teknolojisidir [117]. DNA mikroarray kavramı 1995 yılında Brown [12] tarafından tanımlanmış olup oldukça yüksek verimde nükleik asit analizi sağlama kapasitesinden dolayı bu konuda birçok araştırma yapılmıştır.

Önceden tanımlanmış tekli nükleotid değişimlerinin (SNP: Single nükleotid polymorphism) güvenilir, kısa ve verimli bir yöntem ile teşhisi özellikle rutin tanı ve genetik epidemiyoloji çalışmaları açısından büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla bu gününe kadar geliştirilen yöntemler PZR teknolojisinin sunduğu olanaklardan yararlanmışlardır. SNP'lerin teşhisinde yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında RFLP, allel spesifik PZR sayılabilir. Bu yöntemler arasında RFLP her SNP için uygulanamaz oluşu, allel spesifik PZR'nin ise kesin güvenilirlikle optimizasyonun,

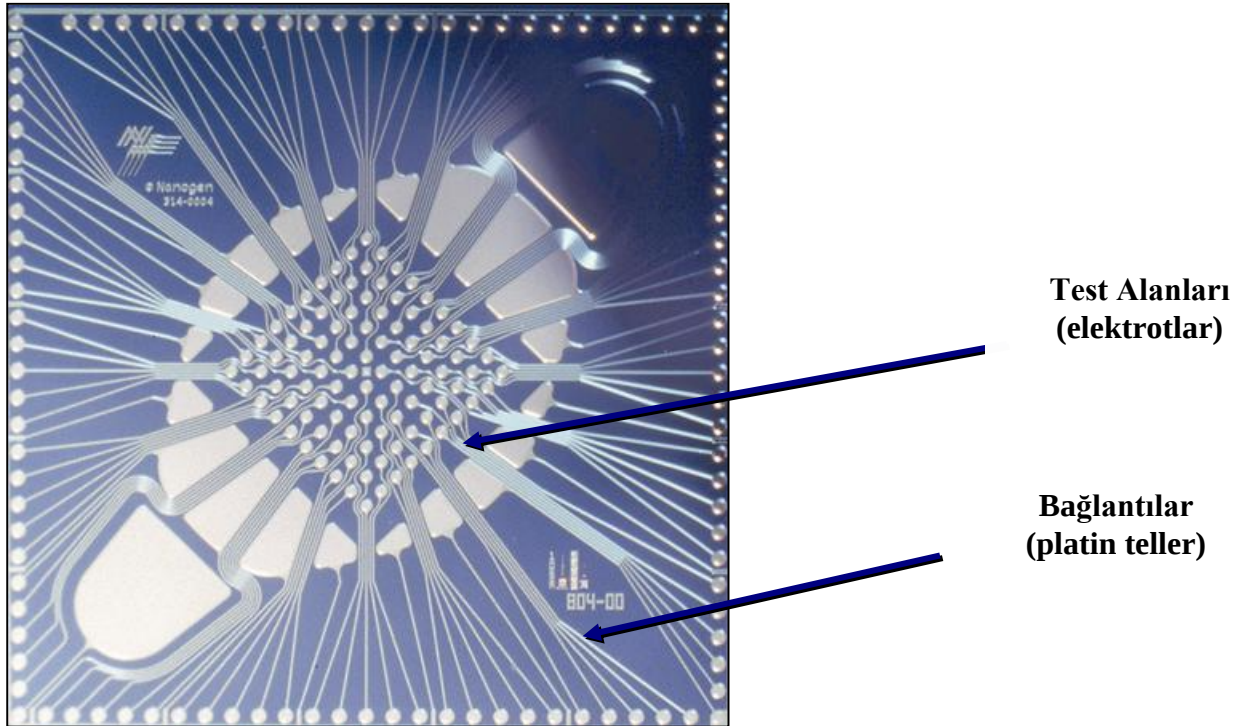
özellikle bazı SNP'lerin bulunduğu bölgeler için ciddi zorluklar çıkarması, yaygın uygulamalarında güçlükler yaşanmasına neden olmaktadır. Mikroarray platformu cam bazlı array'lerden farklı olarak kullanıcı tasarımına açık, elektronik array teknolojisine sahip olan ve rutin SNP analizlerinde yüksek güvenilirlik arz eden bir sistemdir. Mikroarray; SNP analizlerin yanı sıra STR (Short tandem repeats), gen ifadenmesi analizlerinde ve bilinmeyen mutasyonların saptanmasında da güvenilirlikle kullanılabilmektedir [13].

Tektaş Üniversitesi Southwestern Tıp Merkezindeki tetkiklerde, mikroarray yöntemi ile yapılan SNP analizlerinde, örnekler %97 oranında tanımlanmış ve %100 oranında doğru sonuç alınmış, Mayo Klinikte yapılan benzeri bir karşılaştırmalı araştırmada ise, mikroarray ile örnekler %95 oranında tanımlanmış ve %100 oranında doğru sonuç elde edilmiş, RFLP'de ise %94 doğru ve %6 hatalı sonuç alınmıştır ve mikroarray yönteminin hatalı sonuç vermediği ve güvenilir olduğu bildirilmiştir [118-120].

DNA tanımlaması yapan yöntemlerin çoğu, DNA'nın çift sarmala şekillenme yeteneği olan hibridizasyon esasına dayanır. Geleneksel hibridizasyon yöntemlerinde nitrosetüloz ve naylon gibi esnek membranlardan yararlanılmıştır. Bunun aksine mikroarray yönteminde katı yüzeyler kullanılmaktadır. Mikroarray yönteminde kullanılan çip formatının avantajı katı yüzeyin gözeneksiz olması ve böylece belirlenen bölgede biyokimyasal materyalin küçük miktarlarda depolanabilir olmasıdır. Mikroarray yöntemlerinde kullanılan substratlar, geleneksel filtre yöntemlerinde kullanılan hacimden (5-50 mL) daha küçük tepkime hacimlerinin (5-200 µL) kullanılmasını sağlamaktadır. Küçük tepkime hacimleri; çözelti tüketimi ve maliyetini azaltır. Bugün 10,000'ler ile ifade edilen cDNA, 1cm²

lik alana sığdırılarak 24- 48 saat gibi kısa sürelerde analiz edilebilmektedir [121-122].

DNA mikroarray çipi (Nanochip®) yapısında bulunan kanal sistemi (Şekil 10) örneklerin test alanlarına gönderilmesine, hibridizasyon ve yıkama işlemlerinin yapılmasına olanak sağlamaktadır.



Şekil 10. Mikroarray kartuşunda PZR ürünlerinin adreslendiği test alanları

Mikroarray çalışmasında çip yüzeyine gönderilen özgül DNA parçalarının, floresan işaretli moleküller varlığında enzimatik bir reaksiyon ile test edilecek numunesi hazır hale getirildikten sonra array yüzeyinde özgül hibridizasyon-bağlanma gerçekleştirilmektedir. Bu basamak tamamlandıktan sonra kullanılan

floresanların ışımlarını ölçebilecek okuyucu bir cihaz yardımı ile array üzerindeki sinyallerin ölçümü yapılmaktadır. Elde edilen sinyaller bilgisayara aktarılarak özel bir yazılım programı aracılığı ile hesaplanıp elde edilen veri dijital bir görüntüye çevrilmiştir. Floresanların yoğunluğuna göre array üzerinde her nokta da özgül hibridizasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği bu şekilde anlaşılmaktadır.

Mikroelektronik array teknolojinin avantajları tablo 6’da özetlenmiştir. Mikroelektronik teknolojinin kullanım alanları her geçen gün artmaktadır. Hangi genlerin ifade edilerek proteinlere dönüştürüldüğünün belirlenmesi, mutasyon taranması ve analizi, farmokogenetik, onkogenetik, toksikolojik çalışmalar, genotipleme, genlerin ve klonların haritalanması, mikrodelsyon ve kromozomal abresyonların tespiti olarak sıralanabilir [13].

Bu çalışmada, GDH 1a hastalarında dünyada en sık rastlanan 12 mutasyona ve GDH1b hastalarında dünyada en sık rastlanan 3 mutasyona mikroelektronik array tekniği ile bakılması; bu mutasyonların alel sıklığının belirlenmesi ve literatür ile karşılaştırılması, tespit edilen mutasyonlarla klinik ve laboratuvar bulgular arasındaki korelasyonun incelenmesi planlanmıştır.

Tablo 6. Mikroelektronik Array Teknolojisinin Avantajları

- Çok sayıda örneğin aynı anda çalışılabildiği yüksek kapasiteli bir teknolojidir
- Yüksek güvenilirliktir
 - Eşik değeri yüksektir
 - Kantitatif bir yöntemdir
 - Kontaminasyona hassas değildir
- Otomatik bir sisteme sahiptir
- Kullanıcı tarafından farklı dizaynlar yapılabilmektedir (Aynı çip üzerinde farklı hastalıklara ait farklı mutasyonlar çalışılabilmektedir)
- Diğer yöntemlere göre belirgin olarak ucuzdur
- Çok hızlı mutasyon analizine olanak sağlamaktadır
- Tüm dünyada kullanımı büyük hızla artmaktadır

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma, Türkiyenin farklı bölgelerinden Glikojen Depo Hastalığı tip 1 tanısı alan 30 hastada (16 erkek, 14 kız, 5ay-20 yaş) yapılmıştır. Çalışmaya katılan hastaların 22'si Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi beslenme ve çocuk metabolizma bilim dalında, diğer 8 hasta ise farklı hastanelerde takip ve tedavi edilmektedir. Moleküler genetik analiz öncesi; hastalardan 26'sı karaciğer biyopsisinde GDH ile uyumlu biyopsi bulguları ile, bu hastaların 14'ü ek olarak enzimatik inceleme yapılması ile, diğer 4 hasta ise klinik ve biyokimyasal bulgular ile GDH 1 tanısı almıştır.

3.2. Klinik Bilgi

Hastalar, Ek-1'de belirtilen klinik bilgi formunda bulunan klinik, laboratuvar, patolojik ve radyolojik özellikler için retrospektif olarak incelenmiş ve bu bulgular eşliğinde GDH 1'in tiplendirilmesi yapılmıştır.

Demografik veriler: Cinsiyet, yaş, vücut ağırlığı (VA), boy, tanı yaşı, ailede akrabalık, ailede benzer hastalık varlığı incelenmiştir (Ek-3).

Öykü ve fizik muayene: Tanı anındaki ilk yakınmaları ve detaylı öyküleri incelenmiştir. Fizik muayenede; karaciğer, dalak büyüklüğü, mental-motor gelişim ve sistem muayenesindeki patolojik bulgular belirlenmiştir. Çocukluk yaş grubundaki hastaların boy, VA ve ortadan sapma değerleri Neyzi ve ark.'nın [123]

Türk çocuklar için oluşturulmuş standartları kullanılarak değerlendirilmiştir. Büyüme durumunun yaş ve cinsten bağımsız olarak ifade edilebilmesi ve küçük değişikliklerin de gösterilebilmesi açısından, özellikle boy uzaması sorunu olan çocukların değerlendirilmesinde ortadan sapma puanı (SDS) kullanılmaktadır [124]. Bu nedenle hastaların ortadan standart sapma puanları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. +2 SDS ve -2 SDS arası değerler normal alt ve üst sınırlar, -2 SDS'den düşük değerler boy kısalığı olarak kabul edilmiştir.

$$\text{Boy SDS} = \frac{\text{Bireyin boyu (cm)} - \text{cinse göre toplum için normal ortalama değer}}{\text{Yaş ve cinse göre toplum için ortadan sapma (SD)}}$$

Laboratuvar Verileri: Hastaların tanı anındaki ve son kontrollerindeki aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), kalsiyum (Ca), fosfor (P), alkalin fosfataz (ALP), laktik asit, alfa ftoprotein, trigliserit, kolesterol, ürik asit, kan şekeri, 24 saatlik idrarda mikroalbuminüri ve proteinüri değerleri Ek-2.1 ve Ek-2.2'de verilmiştir. Bu değerler yaş ve cinsiyete göre normal değerler ile karşılaştırılarak glikojen depo hastalığı tip 1a ve tip 1b'de beklenen, karaciğer fonksiyon testlerinde yükseklik, hipertrigliseridemi, hiperkolesterolemi, laktik asit yüksekliği, takip sırasında alfa ftoprotein yüksekliği, proteinüri ve mikroalbuminüri açısından taranmıştır [125,126].

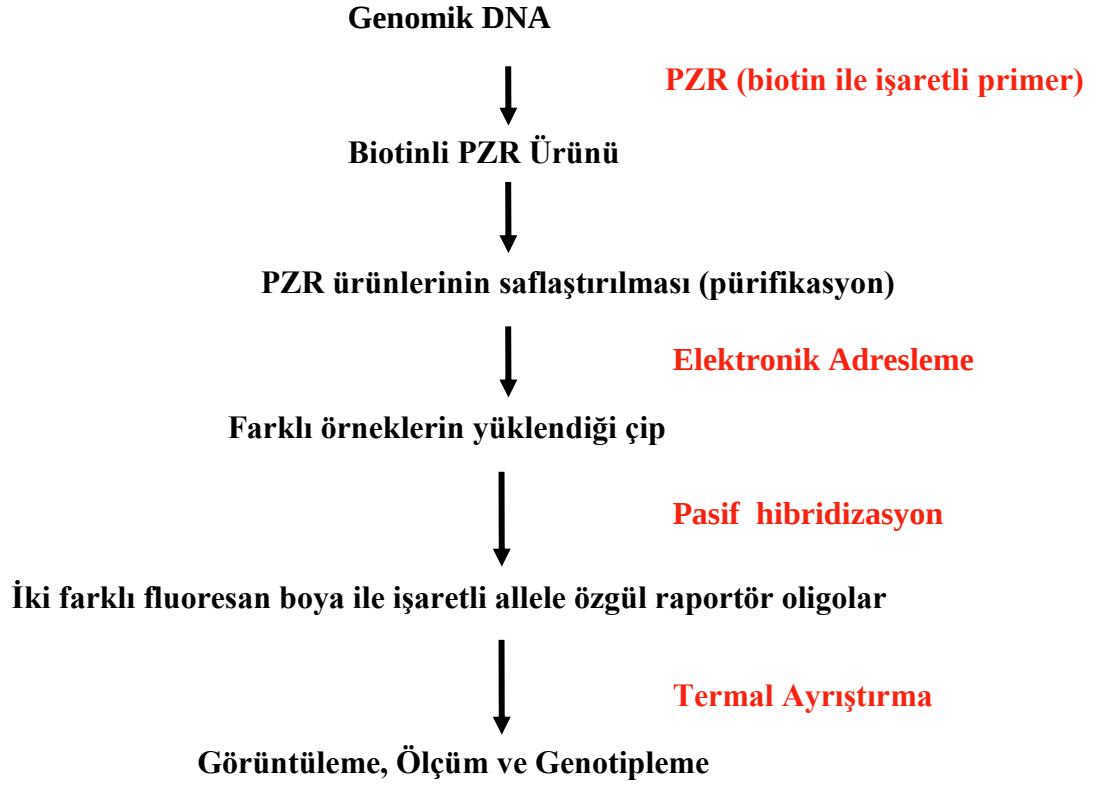
Visseral organ tutulumu: Karaciğer ve renal incelemeler için abdominal USG yapılmıştır.

Kemik Tutulumu: GDH 1'in bir komplikasyonu olan osteopeni ve osteoporoz açısından hastaların kemik mineral yoğunluğu (KMY) ölçülmüştür. KMY, L2-L4 vertebra aralığından Dual enerji X-ray absorpsiyometri (DEXA) yöntemi ile erişkin yaş grubu 'T skor', çocukluk yaş grubu 'Z skor' bakılarak değerlendirilmiştir. 'T ve Z skoru' için -1'den büyük SD değerler normal kemik dansitesi, -1 ile -2 arası SD değerler osteopeni, -2 veya altındaki SD değerler osteoporoz olarak kabul edilmiştir.

3.3. Mikroarray ile Glikoz-6-Fosfataz ve Glikoz-6-Fosfat Translokaz Genlerindeki Mutasyonlarının Tespiti

Olgulardan EDTA'lı tüplere 5 cc periferik tam kan örneği alınarak, 27 GDH 1a'lı hastada, en sık rastlanan sekiz nokta mutasyonu (R83C, W77R, G270V, R170Q, D38V, W63X, G188R, Q347X), iki delesyon (158delC, 1057delTTC), bir insersiyon (130X) ve bir 'splice' mutasyon (727>T) olmak üzere toplam 12 mutasyon ve 3 GDH 1b tanılı hastada en sık rastlanan iki nokta mutasyonu (G339C, W118R) ve bir delesyon (1211del CT) olmak üzere toplam 3 mutasyon taranmıştır.

Mutasyonel inceleme Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Metabolizma Laboratuvar'ında yükleme ve okutma bölümleri bulunan Nanochip® moleküler biyoloji istasyonunda gerçekleştirilmiştir. Mikroarray yöntemi ile mutasyon analizi şekil 11'deki akış şemasında gözlendiği üzere; DNA izolasyonu, PZR ile amplifikasyon, pürifikasyon, yükleme, hibridizasyon –okutma ve analiz olmak üzere altı basamakta çalışılmıştır.



Şekil 11. Mikroarray yöntemi ile mutasyon analizleri için izlenmesi gereken basamaklar

3.3.1. DNA İzolasyonu

Genomik DNA örnekleri olgulardan alınmış periferik kan örneklerinden NucleoSpin (Macherey–Nagel) ayırıştırma kiti kullanılarak lökositlerden izole edildi. Bu kitte; Proteinaz K, Yıkama tamponu 1- 2 (Wash Buffer - Bw 1-2), Lizis tampon (B 3), Elüsyon tamponu, filtreli ve filtresiz tüpler bulunmaktadır. Yöntemin hedefi, kanın lökositler dışındaki şekilli elemanlarından ayırıp lökosit içindeki DNA'yı ayırt edebilmektir. Bu amaçla EDTA'lı tüplerdeki periferik kan örneklerinden 200 µL alınarak üzerine 25 µL proteinaz K konulup, 15 saniye vorteksde çevrildi. Oluşan bu karışım 70°C'de 15 dakika bekletildikten sonra üzerine 210 µL mutlak etanol konularak tekrar vorteksde çevrildi ve tüm preparat filtreli tüplere aktarıldı. Bir

dakika 11,000 g'de santrifüjlenme sonrası alttaki solvent olan tüp atıldı. DNA bağlı filtreler 2 ml'lik kapaksız boş tüplere alınarak yıkama işlemi için 500 µL Bw1 eklenerek 1 dakika 11,000 g'de santrifüj edildi. Alttaki solvent atılarak filtreler tekrar 2 ml kapaksız boş tüpe aktarıldı. 600 µL Bw2 eklenerek 11,000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. En son olarak filtreler 1,5 ml'lik eppendof tüplere alınarak daha önceden 70°C'de ısıtılmış elüsyon tamponundan 100 µL eklendi. Birkaç dakika oda ısısında bekletildikten sonra 1 dakika 11,000 g'de santrifüj edildi. Üsteki filtreler atıldıktan sonra kalan kısım olan DNA'lar – 20°C'de çalışma dönemine kadar muhafaza edildi.

3.3.2. PZR ile Amplifikasyon

PZR; laboratuvar ortamında spesifik DNA dizilerinin, primer denilen sentetik oligonükleotid diziler yardımıyla çoğaltılması işlemidir. PZR belirli sıcaklık, zaman ve döngü sayısında tekrarlanan üç basamaktan oluşur;

1. *Denatürasyon*: Bu basamakta DNA molekülünün çift zincirli yapısının yüksek ısı yardımıyla birbirinden ayrılması sağlanır. Genellikle 94°C- 97°C arasında 15-60 sn süresince uygulanır.

2. *Bağlanma (Annealing)*: Denatürasyonu takiben, oligonükleotid primerler daha düşük ısılarda, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendi eşlenikleri olan bölgelere bağlanırlar. Bu olay çoğunlukla 47°C- 60°C arasında 30-60 sn 'de gerçekleşir (G/C oranı yüksek olan bölgelerde bağlanma ısısı 68°C'ye kadar arttırılabilir).

3. *Zincir uzaması-polimerizasyon*: Bu son aşamada ısı 72°C'ye kadar arttırılarak DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır.

Bu basamağının süresi kullanılan polimerazın cinsine ve amplifiye edilecek DNA'nın uzunluğuna göre 30sn ile 3 dakika arasında değişir.

Bu üç basamağı her tekrarında DNA miktarı teorik olarak iki katına çıkar. Oluşan ürün; ilk koyulan DNA miktarı ve döngü sayısına bağlıdır. Yaklaşık 25-40 döngü uygulanır.

Bu çalışmada izole edilen DNA'dan, taranacak mutasyonların olduğu G6PC gen bölgesi, III reaksiyona ayrılarak PZR ile amplifikasyonu gerçekleştirildi. Bunlardan reaksiyon I; D38V, W63X, 158delC, W77R, R170X, R170Q; reaksiyon II; 130insTA, G188R, G727T, G270V, 1057delTTC, Q347X ve reaksiyon III R83C, R83H mutasyonlarını içermektedir.

G6PT gen bölgesinin ise, tek reaksiyon ile PZR ile amplifikasyonu gerçekleştirildi. Bu reaksiyon ise; W118R, G339C, 1211delCT mutasyonlarını içermektedir. Bu PZR reaksiyon karışımlarının eldesi amacıyla hazırlanan karışımda; çoğaltılacak bölgeye özgü primerler (Pmix), yeni zincirin yapımında kullanılacak olan nükleotidtrifosfatlar (dNTP), çoğaltılacak bölgeyi kopyalayacak olan DNA polimeraz (Tag polimeraz) ile kofaktörü (MgCl₂) ve enzim için gerekli kimyasal ortamı sağlayacak olan tampon sistemi (10X PZR Buffer) bulunmaktadır. Tablo 7'de bu çalışmada G6PC ve G6PT genlerinde çalışılan mutasyonlar ve mutasyonların bulundukları ekzonlar gösterilmektedir.

Tablo 7. G6PC ve G6PT genlerinde çalışılan mutasyonlar ve bulundukları ekzonlar

G6PD					G6PT	
Ekzon 1					Ex 2	
D38V	W63X	158delC	W77R		W118R	
Ekzon 2					Ex 8	
R83C	R83H				G339C	1211delCT
Ekzon 3						
130insTA						
Ekzon 4						
R170X	R170Q					
Ekzon 5						
G188R	G727T	G270V	1057delTTC	Q347X		

Tablo 10 ve 11’de sırasıyla çoğaltılacak reaksiyonlar için gerekli karışım hacimleri ile amplifikasyon döngü protokolünün ısıları ve süreleri görülmektedir. Çalışılacak olgu sayısı ile Tablo 10’da ki hacimler çarpılarak karışımın totali belirlendi, buz içerisinde hazırlanan ve numaralandırılmış PZR tüplerine karışım eşit miktarlarda konuldu ve üzerine hasta DNA’sı ile işaretlemede kullanılacak biotin eklendi. ‘Termal Cycler’ cihazına Tablo 11’ deki sıcaklık ve süreler girilerek programlandı ve PZR işlemi başlatıldı. PZR sonrası elde edilen ürünlerden 5 µL alınarak 2,5 µL yükleme solüsyonu ile birleştirilerek etidyum bromür ile boyanmış %2’lik agaroz jel kuyucuklarına yükleme yapıldı. 180 voltta yaklaşık 20-25 dakika yürütüldü. Elektroforez işlemi sonrası ultraviyole ile görünür hale getirilip, bantlara göre PZR değerlendirmesi yapıldı. DNA merdiveni ile karşılaştırılarak uygun yerde ve uygun bantta görüntülenen örneklerle çalışmaya devam edildi.

Tablo 8. Bu çalışmada kullanılan G6PC geninin primer dizileri

Reaksiyon I
Ex1 forward 5'-TTGGGATCCAGTCAACACATTACCT-3'
Ex 1 reverse 5'-CAGACATTGCGAGAGCGAATGC-3'
Ex4 forward 5'-CCAAAGTATTGGGATTACAGGTCTGAG-3'
Ex4 reverse 5'-ACACAGGATGTGGCTGGAATGC-3'
Reaksiyon II
Ex2 forward 5'-AATCCTTCTCAGGCTACACTCTTCTTG-3'
Ex2 reverse 5'-ACGCTTACCTGGTCCAGTCTCACA-3'
Ex3 forward 5'-GATGATGCACTGTCTCCCAGATGA-3'
Ex3 reverse 5'-TTATCCCTATCCAAAGTGCCACAAC-3'
Ex5 forward 5'-ATCTCTCACAGTCATGCTTTCTTCCAC-3'
Ex5 reverse 5'-GACTCCACATCTCTTACAACGACTTCTT-3'
Reaksiyon III
Ex2 forward 5'-AATCCTTCTCAGGCTACACTCTTCTTG-3'
Ex2 reverse 5'-ACGCTTACCTGGTCCAGTCTCACA-3'

Tablo 9. Bu çalışmada kullanılan G6PT geninin primer dizileri

Reaksiyon I
Ex2 forward 5'-TGCTCGCTGGCTCTTCTTTCT-3'
Ex2 reverse 5'-CCTCTATGACAATCCAAACAGGCTC-3'
Ex8 forward 5'-AATGCCACTCCACTCTGCCCT-3'
Ex8 reverse 5'-GCTTCTCACTGGTCTATATGCAAAGC-3'

Tablo 10. PZR karışımının içeriği

Çözeltiler	Miktar	Miktar	Miktar	Miktar
	G6PC	G6PC	G6PC	G6PT1
dH ₂ O	11 µl	13 µl	17 µl	12 µl
10X Buffer	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	3 µl
dNTP's	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Primer mix	2 µl ekzon 1	2 µl ekzon 2	2 µl ekzon 2	1 µl ekzon 2
	2 µl ekzon 4	2 µl ekzon 3		1µl ekzon 8
DMSO	2,5 µl	–	–	2,5 µl
Tag polimeraz (5 u/µl)	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl
Hacim	23,8 µl	25,3 µl	25,3 µl	23,3 µl
DNA (hasta ve kontrol)	3 µl	4 µl	4 µl	3 µl
Total Hacim	26,8 µl	29,3 µl	29,3 µl	26,3 µl

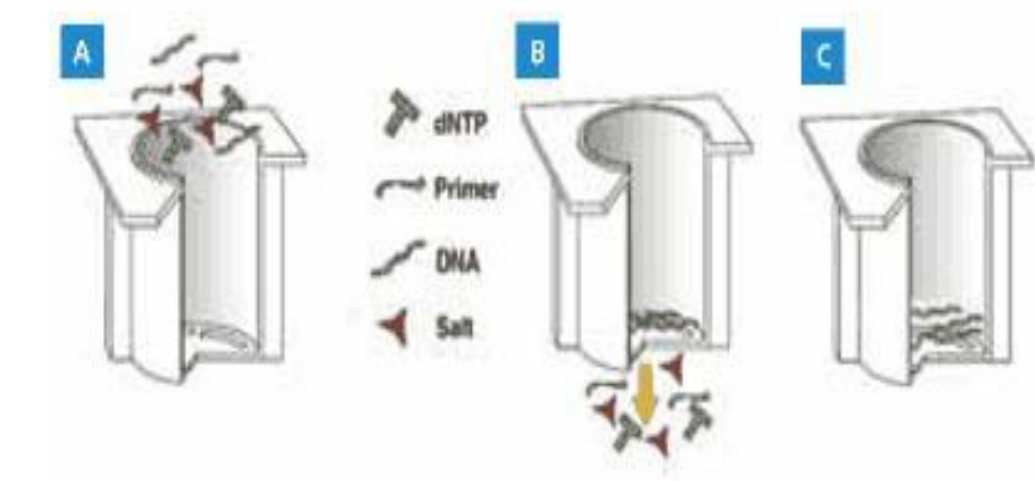
Tablo 11. Amplifikasyon döngü protokolünün tüm reaksiyonlar için ısı ve süreleri

	Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
1	İlk denatürasyon	95°C	5 dk	1
	Denatürasyon	95°C	1 dk	–
2	Annealing	57°C	1 dk	35
	Polimerizasyon	72°C	1 dk	–
3	Final polimerizasyonu	72°C	10 dk	1

3.3.3. Pürifikasyon

Yükleme işlemi elektriksel bir alanda gerçekleştirileceği için, PZR ile çoğaltılan DNA parçacıklarının (PZR ürünleri) iletkenliklerinin düşük olması gerekmektedir. PZR reaksiyonuna girmemiş; fazla primerlerin, tuzların ve DNA artıklarının ortamdan uzaklaştırılması için PZR ürünlerinin **NanoChip®** yüklenmesi yapılmadan önce milipor kolondan geçirilerek saflaştırılması gerekmektedir. Pürifikasyon işleminde bu amaçla, molekülleri boyut ve biçimlerine göre ayırt edebilen pürifikasyon plate'leri kullanıldı. PZR ile çoğaltılmış ürünlerin (20-25µl) yükleme sonrası kalan 20 µl üzerine 80 µl distile su konarak 100 µl'ye tamamlandı. Pürifikasyon plate'ine yüklenen bu örnekler millipore pompa yardımıyla (8-10 mbar) negatif dış basınç uygulanarak filitreden süzülme işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem sırasında pürifikasyon plate kuyucuklarının kurumamasına özen gösterildi. İşlem sırasında kuyucuklardaki sıvı miktarı eşit olacak şekilde distile su ilavesi yapıldı ve yaklaşık 5µl sıvı kaldığı düşünüldüğünde aspiratör kapatıldı. PZR ürünleri, diğer primer ve DNA artıklarına nazaran daha büyük oldukları için zardan geçemeyerek plate'in dibinde kaldı, üzerine 60- 65 µl distile su eklenerek yatay çalkalayıcıda 10-15 dk çalkalanarak suya karışması sağlandıktan sonrasında plate'den alındı (Şekil 12).

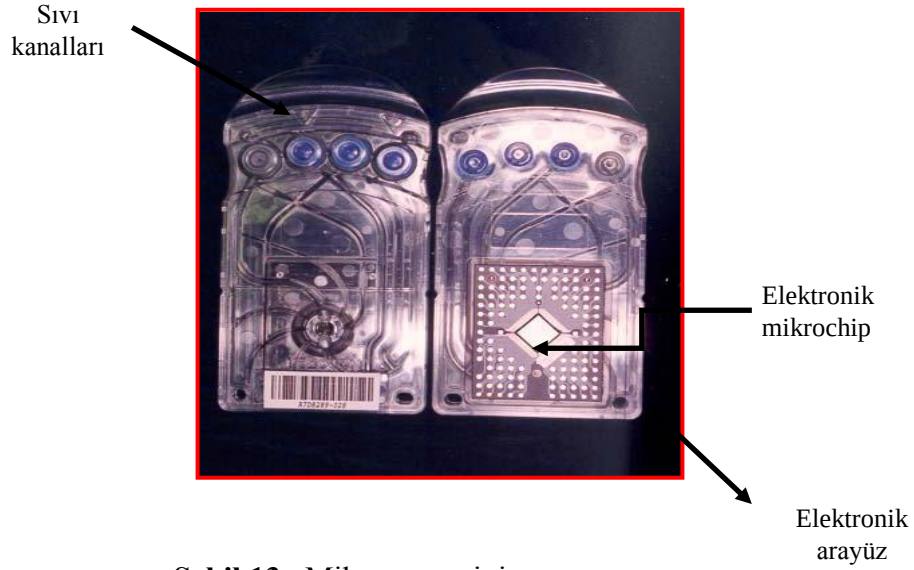
Şekil 12. PZR ürünlerinin saflaştırılması



3.3.4. Yükleme

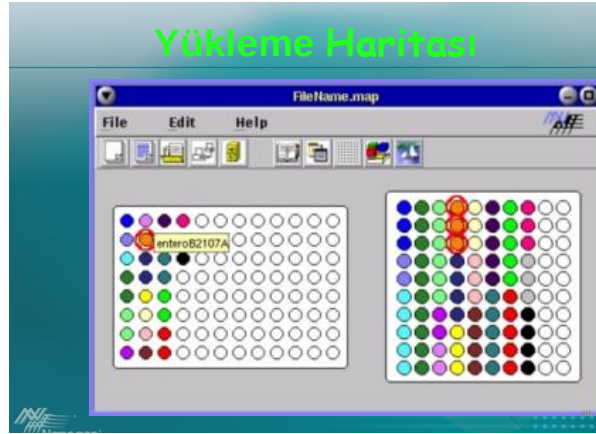
Nanochip® 100 tane test alanına sahip olan elektronik bir mikrodizin platformudur (Şekil 13). Çip yapısında DNA test alanlarına ek olarak bulunan kanal sistemi örneklerin test alanlarına gönderilmesi, hibridizasyon ve yıkama işlemlerinin yapılmasına el verir. Çip yüzeyindeki DNA test alanları pozitif yüklü streptavidin molekülleri ile kaplıdır. DNA molekülleri sahip oldukları negatif elektrik yükü sayesinde adreslenirken ulaştıkları test alanlarına sabitlenmeleri için 5' uçlarında bulunan biotin molekülünden yararlanılır. Biotin molekülleri streptavidin ile özgül ve güçlü kovalent bağ kurma özelliğine sahiptir. Test alanlarına gönderilecek DNA molekülleri 5' uçlarından PZR işlemi sırasında biotin ile işaretlenmiştir (Biyotinlenmiş PZR ürünü).

Yükleme işlemin için ilk basamakta yükleme cihazı açılarak, yeni bir yükleme haritası oluşturuldu (Şekil 14). Yükleme işleminde 96'lı plate'in bir kuyucuğa 30µl 100 mM'lık histidin ve 30µl distile su, diğer kuyucuklara 30µl PZR

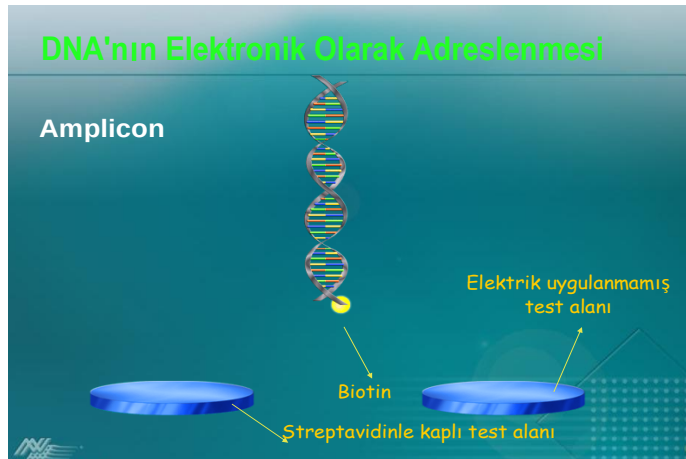


Şekil 13. Mikroarray çipi

ürünü ve 30 µl 100 mM'lık histidin pipetlendi. Nanochip® kartuşu, 0,3M NaOH ile 3 dakika bekletildikten sonra distile su ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Yüklemede histidin kullanılacağı için, nanochip kartuşu yüzeyinde histidin kalacak şekilde bırakılarak 5-10 dk bekletildi. Histidin ortamın elektriksel dengesini sağlamak amacıyla tampon olarak kullanıldı. Plate'e pipetlenen PZR ürünlerinin ve histidinin çip üzerinde hangi kuyucuğa gideceği belirlendi. Daha önceden oluşturduğumuz yükleme haritasına göre yükleme protokolü başlatıldı. DNA'nın gideceği yüzey aktifleşip, streptavidin ve biotinin bağlanmasıyla DNA'nın çipin yüzeyine sabitlenmesi gerçekleşti (Şekil 15). Her test alanının adresleme işlemi sonrası tutunamamış biyotinlenmiş PZR ürünlerinin uzaklaştırılması için test alanı 50 mM'lık histidin tamponu ile yıkandı. DNA içermeyen bir PZR ürünü boş kontrol, daha önceden tespit edilmiş en az bir heterozigot bireyin ürünü ise gerçek kontrol olarak her testte kullanıldı.



Şekil 14. Yüklem haritası örneği



Şekil 15. DNA'nın Elektronik Olarak Adreslenmesi

3.3.5. Hibridizasyon ve Okutma

Cihazın yükleme bölümünden çıkartılan çip hibridizasyon ve okutma işlemine geçmeden önce DNA'ların denatüre olması amacı ile 0,3 M NaOH ile yıkandı (Şekil 16). Okuyucu bölümü çalışma öncesi en az 45 dk önce açıldı ve cihaza yüksek ve düşük tuz oranına sahip tampon (high salt buffer HSB, low salt buffer LSB) şişeleri yerleştirildi. NaOH ile bekletilen çip yüzeyi 3 kez distile su ile yıkandı ve yaklaşık 10-15 dakika HSB'de bekletildi.



Şekil 16. DNA'nın denatürasyonu

Bekleme işlemi sonrası HSB çip üzerinden pipetle uzaklaştırıldıktan sonra yerine her mutasyona özgü reporter karışımı hazırlandı. 'Reporter' karışımını;

1. Analizlerde tanımlanmak istenen mutasyon bölgesine özgül 10-12 baz çiftlik bir yabanıl (wild), bir de mutant tip işaretleyici oligonükleotid
2. Bu oligonükleotidlerin 5¹ ucuna okuyucunun lazer tarama ile tanıyacağı floresans işaretlerle renklendirilmiş kırmızı sinyal veren Siyanin 5 (Cy5) ile işaretli mutant ve yeşil sinyal veren Siyanin 3 (Cy3) ile işaretli yabanıl tip evrensel 'reporter'
3. Hibridizasyon aşamasında stabilizer olarak görev yapan diziye özgül 'reporter' prob'un 5¹ ucunun hemen bitiminden başlayan, 25-30 nükleotidlik ikinci oligonükleotid dizisi oluşturmaktaydı.

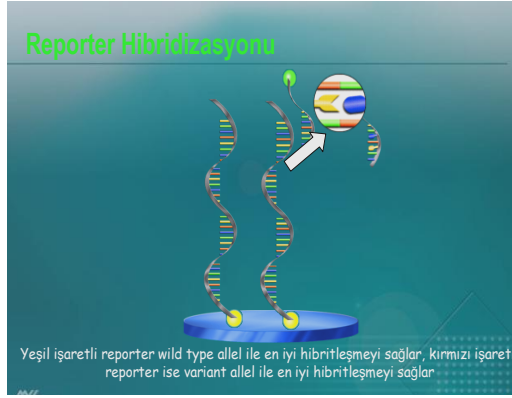
Bu 'reporter' karışımı Tablo 12' deki miktarlarda konularak hazırlandı.

Tablo 12. ‘Reporter’ karışım miktarları

İçerik	Miktar
Yabanıl Reporter	1 µl
Mutant Reporter	1 µl
Stabilizör	1 µl
Yabanıl Evrensel Reporter	1 µl
Mutant Evrensel Reporter	1 µl
Yüksek Tuz Tamponu	95 µl
Toplam Hacim	100 µl

Hedef DNA’lar floresanla işaretlenmiş özgül oligonükleotid ‘reporter’lerin bağlanmasıyla, belirlenmiş sıcaklık ve sürelerde mutant, heterozigot ve yabanıl tiplerin ayrılabilmesi için hibridize edildi (Şekil 17). Reporter ile hedef hibrid bağlanmasından uygun olmayanların, uygun sıcaklıklarla ayrılması sağlandı (Şekil 18).

Hibridizasyon aşaması sonrası cihaz, lazer teknolojisiyle tek tek her bir alanı kontrol ederek Cy3 ve Cy5’in yaydığı floresan ışımaları tesbit etti ve bu ışımlar heterozigot kontrollerle karşılaştırmalı olarak analiz edildi (Şekil 18).



Şekil 17. Hibridizasyon

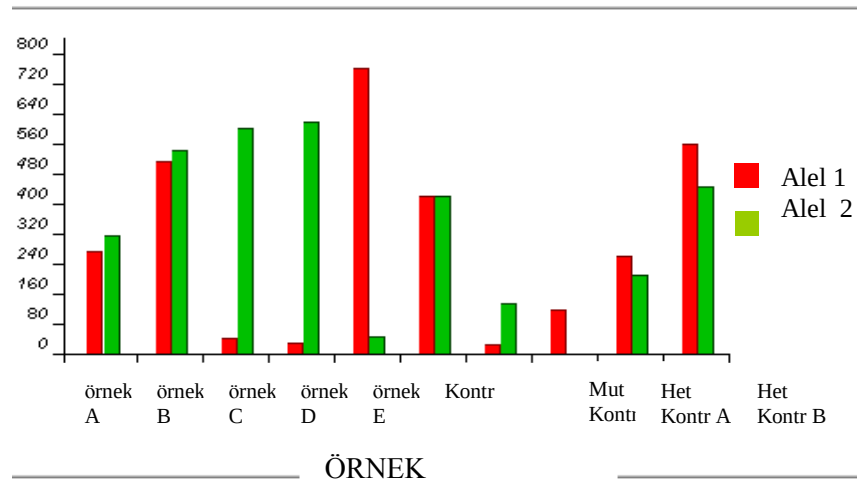


Şekil 18. Uygun olmayan reporterların ayrılması ve sinyallerin ölçümü

3.3.6. Analiz

Mutant floresan miktarı kırmızı piklerle, yabanıl floresan miktarı da yeşil piklerle ifade edilir. Cihaz yazılımı bu miktarları hem sayısal olarak, hem de grafiklerle değerlendirir (Şekil 19, Tablo 13).

Şekil 19. Verilerin grafiklerle değerlendirilmesi



Tablo 13. Nanogen yazılımında sayısal değerlendirme

Örnek	Kırmızı	Yeşil	Oran (K:Y)	Allellerin gösterimi
Örnek A	286.63	330.32	1:1.15	mut/yt
Örnek B	537.63	567.48	1:1.06	mut/yt
Örnek C	46.63	630.5	1:13.52	yt/yt
Örnek D	34.13	649.85	1:19.04	yt/yt
Örnek E	799.13	50.1	15.95:1	mut/mut
Kontrol Deneme	440.63	439.78	1:1	mut/yt
Yabanıl Tip Kontrol	27.63	141.26	1:5.11	yt/yt
Mutasyon Kontrol	123.13	2.01	61.3:1	mut/mut
Heterozigot Kontrol A	273.63	223.08	1.23:1	mut/yt
Heterozigot Kontrol B	586.63	467.42	1.26:1	mut/yt

Örneklerden alınan kırmızı ve yeşil sinyallerin en az 50 düzeyinde olup olmadığı kontrol edildi. Sinyallerden en az biri bu düzeyi aşmıyorsa söz konusu örnek değerlendirmeye alınmadı. Şekil 19’da görüldüğü gibi sadece yeşil pik varlığında; homozigot yabanıl tip, sadece kırmızı pik varlığında; homozigot mutant tip, yeşil ve kırmızı piklerin birlikte varlığında; heterozigot mutant tip olarak değerlendirildi.

Floresanla ölçülen yeşil yabanıl ve kırmızı mutant sinyallerin birbirine oranı ile genotip belirlendi;

MUTANT/ YABANIL < 1/5 ise homozigot yabanıl tip (sağlam)

MUTANT / YABANIL 1/ 2– 2 ise heterozigot mutant tip

MUTANT/YABANIL > 5 ise; homozigot mutant tip olarak değerlendirildi.

MUTANT/YABANIL ve YABANIL/MUTANT oranları 2/1 ile 5/1 arasında ise homozigot ve heterozigotluk açısından uygun bir değerlendirme yapılamayacağından dolayı testin tekrarı yapıldı.

3.4 İstatistik

Çalışmada veriler, “SPSS for Windows versiyon 12” istatistiksel paket programına girilerek değerlendirildi. Verilere ilişkin ortalama $\pm$ standart sapma ve yüzde dağılımlar verildi.

4. BULGULAR

Çalışma, Türkiye'nin farklı bölgelerinden, tanı anında ortalama yaş 12 ± 24 ay (5ay-10 yaş) olan 16'sı erkek, 14'ü kız 30 Glikojen Depo Hastalığı tip 1 tanılı hastada yapılmıştır. Hastaların 22'sinde (% 73,3) anne baba arasında akrabalık ve 9'unda (%30) ailede GDH 1 hastalığı öyküsü mevcuttur (Tablo 14).

Çalışmaya katılan hastaların; 27'si tanı anında ortalama yaş $9 \pm 13,4$ ay (1ay-6yaş) olan 14'ü erkek, 13'ü kız GDH 1a, ve 3'ü tanı anında ortalama yaş $44 \pm 66,8$ ay (6ay-10 yaş) olan 2'si erkek, 1'i kız GDH 1b hastalarından oluşmaktadır.

GDH 1 olgularının tanı anındaki tanımlayıcı özellikleri Tablo 14'de gözlenmektedir.

Hastalarının tanı anındaki yakınmaları ve görülme sıklığı Tablo 15'de gösterilmiştir. Sık soluk alıp verme ve karın şişliği nedeniyle başvurunun en yüksek sıklıkta olduğu saptanmıştır.

Hastaların tanı anındaki fizik muayene bulguları incelendiğinde; olguların tümünde hepatomegali, GDH 1a'lı hastaların 17'inde (%63) ve GDH 1b'li hastaların 2'sinde (%66,7) olmak üzere GDH 1 tanılı hastaların 19'unda (%63,3) taş bebek yüz görünümü ve GDH 1a'lı hastaların 13'ünde (%48,1), GDH 1b'li hastaların 1'inde (%33,3) olmak üzere GDH 1 tanılı hastaların 14'ünde (%46,7) bilinç bulanıklığı saptanmıştır.

Tanı anında hastaların 28'inde (%93,3) kan gazı değerlerinin metabolik asidoz ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Tablo 14. Hastaların tanı anındaki tanımlayıcı özellikleri

Tanımlayıcı Değişken	GDH 1a		GDH 1b		GDH 1	
	n	%	n	%	n	%
Tanı Yaşı						
0 - 3 ay	4	14,8			4	13,3
3 ay - 12 ay	19	70,4	2	66,7	21	70
1 -3 yaş	3	11,1			3	10
3-12 yaş	1	3,7	1	33,3	2	6,7
Cinsiyet						
Kız	13	48.1	1	33.3	14	46,7
Erkek	14	51.9	2	66.7	16	53,3
Anne-Baba Akrabalık						
Var	20	74.1	2	66.7	22	73,3
Yok	7	25.9	1	33.3	8	26,7
Ailede GDH 1 Hastalığı						
Var	9	33.3	-	-	9	30
Yok	18	66.7	3	100	21	70

Tablo 15. Tanı anındaki yakınma

Şikayet	GDH 1a		GDH 1b		GDH 1	
	n	%	n	%	n	%
Sık soluk alıp verme	26	96.3	2	66.7	28	93,3
Karın şişliği	22	81.5	3	100	25	83,3
Nöbet geçirme	11	40.7	1	33.3	12	40
İshal atakları	3	11.1	2	66,7	5	16,7

Hastaların izlem süresi $4,5 \pm 3,8$ yıl (5ay- 16,5 yıl) arasında değişmektedir.

Hastaların vücut ağırlığı, boy ve boy SDS değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 16’da görülmektedir.

Tablo 16. VA, boy ve boy SDS değerleri

Parametreler	GDH 1a Ortalama $\pm$ SD	GDH 1b Ortalama $\pm$ SD	GDH 1 Ortalama $\pm$ SD
VA (Kg)	21,7 $\pm$ 14,9	35,7 $\pm$ 18,8	20,2 $\pm$ 13,9
Boy (cm)	100,0 $\pm$ 26,3	125 $\pm$ 34,6	97,2 $\pm$ 24,5
Boy SDS	-1,88 $\pm$ 1,17	-1,86 $\pm$ 0,45	-1,88 $\pm$ 1,1

Hastaların tanı anındaki ve izlem sırasındaki laboratuvar verileri ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 17 ve18’de görülmektedir.

Tablo 17. Tanı anındaki laboratuvar verileri

Parametreler	GDH 1a Ortalama $\pm$ SD	GDH 1b Ortalama $\pm$ SD	GDH 1 Ortalama $\pm$ SD
Kan Şekeri (mg/dl)	48.3 $\pm$ 23.9	46.7 $\pm$ 27.2	48,2 $\pm$ 23,7
AST (U/L)	158.2 $\pm$ 119.2	58.7 $\pm$ 61.3	148.3 $\pm$ 118
ALT (U/L)	126.4 $\pm$ 118.4	60 $\pm$ 47.8	119.8 $\pm$ 114,6
Ürik asit mg/dl	6.2 $\pm$ 3.2	6.7 $\pm$ 2.8	6.3 $\pm$ 3,1
Ca (mg/dl)	10.7 $\pm$ 0.9	9.9 $\pm$ 0.6	10,6 $\pm$ 0,9
Trigliserit (mg/dl)	711 $\pm$ 393	784.7 $\pm$ 445	718.3 $\pm$ 390,7
Kolesterol (mg/dl)	185.6 $\pm$ 77.3	204.7 $\pm$ 305	187,5 $\pm$ 77,1
Laktik asit (mmol/L)	4.5 $\pm$ 1.6	1.9 $\pm$ 5.3	4,8 $\pm$ 2,7

Tablo 18. İzlem sırasındaki laboratuvar verileri

Parametreler	GDH 1a Ortalama ± SD	GDH 1b Ortalama ± SD	GDH 1 Ortalama ± SD
Kan şekeri (mg/dl)	77 ±22.3	68.3±15	76.1±21,7
AST (U/L)	132.9±173.3	59.3±70.0	125.6±166,7
ALT (U/L)	103.4±115.7	57.7±63.5	98,9±111,7
Ürik asit (mg/dl)	5.3±2.3	5.8±0.9	5.3±2,2
Trigliserit (mg/dl)	575.4±373.7	639.3±364.2	581,8±367,1
Kolesterol (mg/dl)	190.6±51.5	214.0±82	193±53,7
Laktik asit (mmol/L)	4.5±1.6	7.9±5.3	4,8±2,3
Ca (mg/dl)	10.4±0.6	10.4±0.2	10,4±0,6
P (mg/dl)	4.7±0.8	5.2±0.2	4,7±0,8
ALP (U/L)	245.6±65.9	151.3±30.6	236,2±105,43
AFP ng/ml	3.9±3.5	2.9±2.5	3,8±3,3
*Mikroalbuminüri (mg/gün)	4.4 ±2.5		4,4±2,5
*Proteinüri (mg/kg/st)	6.3±10.9	72.6±119.9	14,3±42,3

*24 saatlik idrarda bakılan değerler

Hastalar izlemleri sırasında sık tekrarlayan burun kanaması şikayeti, boy kısalığı ve psikomotor gerilik açısından incelenmiş olup bulgular Tablo 19’da gösterilmiştir.

Hastalar geç dönem komplikasyonlar açısından değerlendirildiğinde GDH 1a tanılı hastalardan 1’inde (%3,7) ve GDH 1b tanılı hastaların 1’inde olmak üzere GDH 1 tanılı 2 hastada karaciğerde adenom saptanmıştır. GDH 1a tanılı hastalardan 5’inde (% 18,5) ve GDH 1b tanılı hastaların 1’inde olmak üzere GDH 1 tanılı hastaların 6’sında (%20) mikroalbuminüri ve GDH 1a tanılı hastalardan 4’ünde (%)

14,8) ve GDH 1b tanılı hastaların 1'inde (%33,3) olmak üzere GDH 1 tanılı hastaların 5'inde ise (%16,7) proteinüri tespit edilmiştir (Tablo 18).

Tablo 19. Hastaların izlem sırasındaki tanımlayıcı özellikleri

Tanımlayıcı Değişken	GDH 1a		GDH 1b		GDH 1	
	n	%	n	%	n	%
Burun Kanaması						
Var	8	29.6	1	33.3	9	30
Yok	19	70.4	2	66.7	21	70
Boy Kısaldığı						
Var	13	48.1	2	66,7	15	50
Yok	14	51.9	1	33,3	15	50
Psikomotor Gelişim						
Normal	24	88.9	3	100	27	90
Geri	3	11.1	-	-	3	10

Hastaların kemik mineral yoğunluğunun değerlendirmesi Tablo 20'de gösterilmektedir.

Tablo 20. KMY ile değerlendirme

KMY	GDH 1a		GDH 1b		GDH 1	
	n	%	n	%	n	%
Normal	6	25	-	-	6	22,2
Osteopeni	5	20,8	1	33,3	6	22,2
Osteoporoz	13	54,2	2	66,7	15	55,6

GDH 1a hastalarında moleküler genetik analiz öncesi tanı; 23 hastaya (%85,2) laboratuvar ve klinik bulgular ile birlikte karaciğer biyopsisi yapıp GDH ile uyumlu biyopsi bulguları saptanması ve biyopsi yapılan hastalardan 11'inde (%40,7) G6Paz aktivitesinin düşük bulunması ($3,3 \pm 2,9$ nmol/ Pi / saat/ mg protein; normal değer, 7-25 nmol/ Pi/ saat/ mg protein) ile, diğer 4 hastada (%14,8) ise yalnızca klinik ve laboratuvar bulgular ile konulmuştur.

İncelenen 27 GDH 1a'lı hastanın 25'sinin (%92,6) en az bir allelinde mutasyon saptanırken, 20'sinin (%74) her iki allelde mutasyon tespit edilmiştir. Kardeş olan iki hastada ise (%7,4) bakılan 12 mutasyondan hiç biri saptanmamıştır. Taranan 54 allelin 45'inde (%83,3) hastalığa sebep olan mutasyon tespit edilmiştir. Bakılan 12 mutasyondan 8'ine (R170Q, Q347X ,35X, 130X, D38V W63X , 727>T, DelF327) hiçbir hastada rastlanılmamıştır. R83C mutasyonu 54 allelin 37'sinde saptanarak birinci sıklıkta tespit edilen mutasyon olmuştur. Mutasyonların allelik sıklığı Tablo 21'de görülmektedir.

Tablo 21. G6PC geninde saptanan mutasyonların allelik sıklığı

Mutasyon	Allel Sayısı	Yüzde
R83C	37	68,5
G270V	4	7,4
G188R	2	3,7
W77R	2	3,7
Mutasyon Bulunmayan	9	16,7

GDH 1a'lı hastaların 16'sının R83C mutasyonu için homozigot, 5'inin R83C mutasyonu için heterozigot, 2'sinin G270V mutasyonu için homozigot, 1'inin G188R mutasyonu ve 1'ininde W77R mutasyonu için homozigot olduğu saptanmıştır. Hastaların mutasyonlara göre dağılımının uygun olmaması nedeni ile, genotip ile fenotip arasında ilişkiyi saptayabilmek için istatistiksel testler uygulanamamıştır. Hastaların izlemleri sırasında saptanan klinik ve patolojik laboratuvar bulguları genotipler ile karşılaştırılmıştır (Tablo 22, 23).

Tablo 22. GDH 1a'da genotip klinik tutulum ilişkisi

Genotip	Hasta Sayısı	yüzde				
		Boy Kısaldığı	Psikomotor gerilik	Burun kanaması	Nöbet geçirme	İshal atakları
R83C / R83C	16	56	12,5	37,5	50	12,5
R83C / ?	5	40	—	—	20	—
G270V /G270V	2	100	—	50	50	—
G188 R/ G188R	1	—	—	100	100	—
W77R/ W77R	1	100	—	—	—	—
Mutasyon bulunmayan	2	—	—	—	—	50

Tablo 23. GDH 1a'da genotip ile izlem sırasında saptanan patolojik laboratuvar değerleri arasındaki ilişki

Genotip	Hasta Sayısı	yüzde			
		Hiperkalsemi	Laktik asit yüksekliği	Mikroalbuminüri	Proteinüri
R83C / R83C	16	31,3	100	20	18,8
R83C / ?	5	20	100	20	—
G270V /G270V	2	50	100	50	50
G188 R/ G188R	1	—	—	100	—
W77R/ W77R	1	—	100	—	—
Mutasyon bulunmayan	2	—	50	—	—

Yukarıda tanımlanan klinik ve laboratuvar bulgulara ek olarak GDH 1b'li 3 hastanın 2'sinde (%66,7) tanı anında ve izlemlerinde nötropeni olduğu, hastaların 1'inde izlemlerde (%33,3) İBH ve 1'inde (%33,3) ise tekrarlayan artrit ataklarının geliştiği gözlenmiştir. Moleküler tanı öncesi, 3 hastaya klinik ve laboratuvar bulgular ile birlikte karaciğer biyopsisi yapılarak G6Paz enzim aktivitesinin normal tespit edilmesi ($49,3 \pm 17,9$ nmol/ Pi / saat/ mg protein; normal değer, 7-25 nmol/ Pi / saat/ mg protein) ile tanı konulmuştur.

Yapılan moleküler genetik analizlerde ise 3 GDH 1b'li hastanın 2' sinin tek alelinde G339C mutasyonu tespit edilmiştir. G339C mutasyonunun alel sıklığı %33,3 saptanmıştır. Bakılan diğer iki mutasyona (1211del CT ve W118R) ise hastaların 3'ünde de rastlanılmamıştır.

.

5. TARTIŞMA

GDH tip 1; lipid, karbohidrat ve pürin metabolizmasını etkileyen, OR geçişli, ağır bir metabolik hastalıktır. Sıklığı beyaz ırkta 1/100.000 canlı doğumda bir iken Aşkenazi Yahudilerinde 1/20.000 dir [30]. Türkiye’de hepatik glikojenozislerin sıklığı bilinmemektedir. Ancak ülkemizde yüksek akraba evlilik oranları (yaklaşık %21,1), diğer OR geçiş gösteren metabolik hastalıklar gibi, GDH 1 görülme sıklığının da yüksek olduğunu düşündürmektedir [127]. Saltık ve ark.’nın [44], 2000 yılında 45 Türk GDH 1a tanılı hastada yaptıkları çalışmada, anne baba arasında akrabalık % 77,8 saptanmıştır. Benzer şekilde, çalışmamıza katılan GDH 1 tanılı hastaların anne babası arasında %73,3 gibi yüksek bir oranda akrabalık ve %30 oranında ailede GDH 1 tanısı almış birey olduğu saptanmıştır. Soy ağaçları incelendiğinde ise %16,7 oranında, doğum ile 20 ay arasında, nedeni bilinmeyen bebek ölümü olduğu gözlenmiştir. Bu hastaların çoğunun tanı almamış GDH 1 hastası olduğu düşünülmektedir. GDH 1’de kız ve erkek cinsiyet arasında dağılım hemen hemen eşittir [27-29]. Çalışmamız da 30 GDH 1’li hastanın % 46,7 si kız ve %53,3’ü erkektir. Ülkemizde; GDH 1 ve diğer kalıtsal metabolik hastalıklar hakkında epidemiyolojik veriler elde edebilmek için ulusal, çok merkezli çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Genel olarak GDH 1 tanılı hastalarda erken çocukluk döneminde klinik bulgular ortaya çıkmaktadır. Hem GDH 1a hem de GDH 1b hastalarının yaklaşık %50’sinde beslenme aralıklarının uzadığı ve ilk viral enfeksiyonların görüldüğü yaşamın 1-6 ay arasındaki döneminde klinik bulgular gözlenmektedir [42,45,104]. Literatürdeki çalışmalara benzer olarak bu çalışmada da GDH 1a’lı hastaların %70,4’ünde ve GDH 1b’li hastaların %66,7’sinde ilk 6 ayda klinik bulgular ortaya

çıkıştır. Bu çalışmada GDH 1a ve 1b’li hastaların en belirgin klinik bulgularını; akut metabolik bozukluk semptomları (%93,3), karın şişliği (%83,3), nöbet geçirme (%40), ishal atakları (%16,7) ve özellikle GDH 1b’li hastalarda daha sık gözlenmekte olan sık tekrarlayan enfeksiyonlar oluşturmaktadır. (Tablo 15). GDH 1’in uzun dönemdeki klinik seyrini incelemek, tanısı ve izlemi için protokol oluşturmak ve tedavi stratejilerini geliştirmek amacıyla 12 Avrupa ülkesinden 288 GDH 1 (231 GDH 1a’lı ve 57 GDH 1b’li) hastası üzerinde yapılan (ESGSD I) çalışmada hastaların başvuru yakınma ve bulgularının yaptığımız çalışmayla benzer olduğu gözlenmiştir [45]. GDH 1’de hepatomegali; özellikle erken yaşlarda belirgindir ve yaş ile birlikte boyutunda bir miktar azalma gözlenmekle beraber genellikle hayatın ilk dekatında normal boyuta gerilemez. Bu çalışmada tanı anında tüm hastalarda hepatomegali mevcuttu ve hepatomegali nedeni ile gözlenen karın şişliği hastaların %88,3’ünde tanı anında saptanan şikayet nedeniydi. Taş bebek yüz görünümü, fizik muayenede yaygın olarak saptanan diğer bir patolojik bulgudur. Çalışmamızda da hastaların %63,3’ünde saptanmıştır.

GDH 1’li hastalarda yaş ile kötüleşen ishal atakları gözlenebilmektedir [5,128]. Bu çalışmada GDH 1a’lı hastalarının %11,1’inde ishal atakları olduğu saptanmıştır. ESGSD I çalışmasında ise bu oran % 35’dir [45]. Ancak ESGSD çalışmasındaki bu yüksek oran hastaların yaş ortalamasının çalışmamızdaki hastaların yaş ortalamasından yüksek olması ile açıklanabilir. GDH 1a’da ishal ataklarının nedeni halen bulunamamıştır [5,47,129,130]. Bununla birlikte G6Paz aktivitesindeki azalmanın neden olduğu enterosit fonksiyonlarındaki bozulma ile ishal atakları arasındaki ilişki araştırılmaktadır. Bu çalışmada GDH 1b’li hastaların ise %66,7’sinde ishal atakları saptanmıştır. ESGSD I çalışmasında bu oran

%55'dir [45]. GDH 1b'de inflamasyonun neden olduğu mukozal bariyer fonksiyonlarının kaybının ishal ataklarının ana nedeni olduğu düşünülmektedir [5].

GDH 1; karbohidrat metabolizması yanısıra lipid, ve pürin metabolizmasını da etkileyen bir hastalık olması laboratuvar analizlerine; hiperlipidemi, hiperürisemi, hiperlaktatemi, karaciğer fonksiyon testlerinde yükseklik olarak yansımaktadır. Bu çalışmada hem GDH 1a hem de GDH 1b tanılı hastaların tanı ve izlem sırasındaki laboratuvar değerlerinde yukarıda bahsedilen parametrelerde yükseklikler saptanmıştır (Tablo 17, 18). Hastalara diyet tedavisi başladıktan sonra sekonder biyokimyasal bozukluklarda bir miktar düzelme gözlenmektedir. Ancak hiperlipidemi diyet tedavisine rağmen GDH 1 hastalarında sık gözlenen bir durumdur. Bu çalışmada da diyet tedavisi sonrası GDH 1a ve 1b tanılı hastalarda özellikle hipertrigliseridemi belirgindir. ESGSD 1 çalışmasında GDH 1a tanılı hastalarda GDH 1b hastalarına göre; hiperlipidemili hasta sayısının daha fazla olduğu ve hiperlipideminin daha şiddetli olduğu gösterilmiştir [45]. GDH 1'de hiperlipideminin; asetil-CoA'nın artışından kaynaklanan artmış lipogenez ve serum lipoproteinlerinin temizlenmesindeki gecikme sonucu olduğu düşünülmektedir [35,36,76,131]. ESGSD çalışmasında GDH 1a ve GDH 1b arasında hiperlipidemide gözlenen farklılığın nedeni bilinmemektedir. Bu çalışmada GDH 1a ve 1b tanılı hastalar arasında hiperlipidemi açısından bir fark göze çarpmamıştır. Çalışmamızda GDH 1b hasta sayısı çok azdır. Çalışmamızda hiperlipidemi gözlenen hastaların takiplerinde hiperlipidemiye ikincil bir komplikasyona rastlanmamıştır. GDH 1'de trombosit fonksiyonlarında bozulma nedeni ile kanamaya yatkınlıkta artış gözlenmektedir [74,132]. Bu çalışmada hastaların %30'unda şiddetli ve/veya sık tekrarlayan burun kanama şikayeti saptanmıştır.

GDH 1’de özellikle okul çağında dikkati çeken orta derecede büyüme geriliği hastaların çoğunda gözlenen önemli bir bulgudur ve erişkin hastalar arasında kısa boy yaygındır [44,48,49]. Parscau ve ark. [133], yaptıkları longitudinal bir çalışmada prepubertal yaş grubundaki 22 GDH 1 hastasında büyüme geriliği olduğunu bildirmişlerdir. Talente ve ark. [49] ise 18 yaş ve üzerinde olan 37 GDH 1a ve 5 GDH 1b hastasını değerlendirdikleri bir çalışmada; hastaların %90’ında kısa boy, %100’ünde hepatomegali, %100’ünde hipertrigliseridemi ve % 76’sında hiperkolesterolemi olduğunu saptamışlardır. Diğer bir çalışmada ise Wolfsdorf ve ark. [134]; 23 GDH 1’li hastasının boylarının kronolojik yaş için uygun olan boy değerlerinin altında olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda; hastaların %50’sinin boyunun -2 SDS’nin altında olduğu, tüm hastaların %73,3’ünün boy ölçümünün ise kronolojik yaş için uygun olan boy değerinin altında olduğu saptanmıştır. Büyüme geriliğinin nedeni halen tam olarak açıklanamamıştır. Büyüme hormonu eksikliğinin kesin kanıtı yoktur. Ancak , metabolik kontrol ile büyüme arasındaki pozitif ilişki; kronik metabolik (laktik) asidozun büyüme hormonu aktivitesini engelleyebileceğini düşündürmektedir [135].

Bu çalışmada hastaların % 10’unda psikomotor gelişimde gerilik olduğu saptanmıştır. GDH 1’de uzun dönem serebral fonksiyonlar hipoglisemik hasar önlenebilirse normaldir [45]. Psikomotor gelişiminde gerilik saptadığımız hastalar GDH 1a tanılı, metabolik kontrolü iyi olmayan ve sık hipoglisemik atak geçiren hastalardır.

GDH 1’in uzun dönem komplikasyonlarından biri olan karaciğer adenomu bu çalışmada 17 yaşında GDH 1a’lı ve 20 yaşında GDH 1b’li iki erkek hastada saptanmıştır. Çalışmamızda adenom görülme sıklığı %6,92’dir ve önceki

çalışmalarda gözlemlendiği gibi erkek cinsiyette baskınlık vardır [66]. Önceki çalışmalarda adenom sıklığının; çalışılan popülasyonun yaş grubuna göre %16-75 arasında olduğu ve özellikle 25 yaş üzeri hastaların %75-80'inde saptandığı bildirilmiştir [45,48,49,133,136]. Bu çalışmada sıklığın diğer çalışmalara göre düşük bulunması; çalışmanın yaş ortalaması $6,2 \pm 5,1$ (0,5-20yaş) olan oldukça genç bir popülasyonda yapılmasına bağlanabilir.

GDH 1'li hastalarda osteopeni sık gözlenen diğer bir komplikasyondur. GDH 1'de gözlenen bir çok metabolik ve endokrin bozukluklar normal kemik formasyonunu baskılayabilir ve mineralizasyon değişikliklerine neden olabilir [137]. Çalışmalarda hem çocuk hem erişkin GDH 1 hastalarında azalmış kemik mineralizasyonu bildirilmiştir [71,138]. Bu çalışmada hastaların %22,2 sinde osteopeni, %55,6'sında osteoporoz saptanmıştır. GDH 1 nedeni ile takip edilen hastalarda KMY değerlendirilmeli ve düşüklük saptanan hastalarda erken dönemde tedaviye başlanmalıdır.

Yaş ile birlikte gelişen ciddi bir komplikasyon da glomerüler ve tübüler fonksiyonların etkilendiği renal hastalıktır [61,62]. Glomerüler hastalığın ilk bulgusu hiperfiltrasyondur. Hiperfiltrasyonu takiben mikroalbuminüri ve sonrasında proteinüri gelişmektedir [15,59,62,64]. Hasta sayısının en fazla olduğu ESGSD I kohort çalışmasında proteinüri sıklığı %13, mikroalbuminüri sıklığı ise %31 bulunmuştur [45]. Aynı çalışma da proteinüri ve mikroalbuminüri sıklığının yaş ile birlikte arttığı; proteinürinin ortalama 16 yaş, mikroalbuminürinin ise ortalama 13 yaşında tespit edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada; mikroalbuminüri hastaların %20'sinde, proteinüri ise %16,7'sinde saptanmıştır. Çalışmamıza katılan 15

yaşından büyük iki hastaya diyetle rağmen proteinürinin devam etmesi üzerine ACE inhibitör tedavisi başlanmıştır.

GDH 1a ve GDH 1b'nin genetik temeli hakkında bilgilerin artması ve mutasyon tespit etme oranında yükseklik GDH1a ve GDH 1b tanısının klinik ve biyokimyasal bulgularla birlikte biyopsi ile karaciğer dokusundan enzim ölçümü yerine mutasyon analizi ile konulması fikrini doğurmuştur. Karaciğer biyopsisi invaziv bir işlem olup, sonuçların güvenilir olması için GDH 1a'da karaciğer örneği taze iken analiz edilmeli veya ileri dönemde enzimatik çalışma yapılmak üzere dondurularak saklanmalıdır. GDH 1b'de ise karaciğer örneği sadece taze iken analiz edilebilmektedir. Bu nedenle tanı sürecinde güçlük yaşanmaktadır. Moleküler çalışmalar ise daha az invaziv, erken ve güvenilir tanı olanağı sağlamaktadır. Periferik kan lökositlerinde mutasyon analizi yapılması ile tanıya gidiş kolaylaşmakta ve hızlanmaktadır. Tanı almış hastaların ailelerinde mutasyon analizi yapılarak taşıyıcılar belirlenebilmektedir. Aynı zamanda prenatal tanıda enzimatik ölçüm için fetal karaciğer dokusuna gereksinim varken, mutasyon analizi koryonik villus örneklerinde veya amniyon sıvısında kolaylıkla yapılabilmektedir [6,7,83]. Seydewitz ve ark. [106], 40 GDH tip 1a hastasında yaptıkları mutasyon analizinde %100'e varan oranda mutasyon varlığını saptayarak moleküler genetik tanının güvenilirliğini gündeme getirmişlerdir. Diğer çalışmalarda da GDH 1'de mutasyon tespit etme oranının yüksek olduğu görülmüştür [104,109,112,139,140].

Bu güne kadar G6PC geninde 76 farklı mutasyon, G6PT geninde ise 73 farklı mutasyon tanımlanmıştır [7,8]. GDH 1a ve GDH 1b de bugüne kadar tanımlanan mutasyonların tümünün taranması pahalı ve uzun zaman gerektiren yöntemler ile gerçekleştirilmektedir. Genel olarak bakıldığında, GDH 1a'da üç mutasyon (R83C,

Q347X, 727>T) hastalığın bilinen alellerinin %60'ından sorumludur. GDH 1b'de iki mutasyon G339C ve 1211delCT beyaz hastalarda sık olup, W118R Japon hastalarda daha sık görülmektedir [6,7]. Bu çalışmada da GDH 1a hastalarında dünyada en sık görülen 12 mutasyon ve GDH 1b hastalarında en sık görülen 3 mutasyon mikroelektronik array yöntemi ile taranmıştır. Mikroelektronik array teknolojisi; 100 mikron çaplı pedler üzerine genomik DNA parçalarının elektriksel adresleme ile gönderilerek bu DNA parçalarının floresan işaretli problemlerle hibridizasyonu sonucu elde edilen verilerin lazer ile okutulması esasına dayalı bir tekniktir. Çok sayıda örneğin aynı anda çalışılabilirdiği, yüksek kapasiteli, otomatik, diğer yöntemlere göre daha ucuz bir sistemdir. Sonuçlar niceliksel olarak alınır, çok hızlı mutasyon analizine olanak sağlar ve kullanıcı tarafından farklı tasarımlar yapılabilir [12,13,122]. Literatürde GDH 1'de array yöntemi ile mutasyon analizine raslanmamıştır. Çalışmamızda, GDH 1a için taranan 54 allelin 45'inde (%83,3) hastalığa sebep olan mutasyon tespit edilmiştir. Türk hastalarında saptadığımız mutasyonlar sırasıyla R83C (%68,5) ve G270V (%7,4), G188R (%3,7) W77R (%3,7) dir. Diğer bakılan 8 mutasyona ise rastlanılmamıştır.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda; Asya kökenli popülasyonda R83C ve Q347X alelleri GDH 1a'da %55-63 oranında bulunmuştur. 130X ve R83C mutasyonları ise İspanyol kökenli hastalarda saptanmıştır. Özellikle bazı etnik grup ve coğrafik bölgelerde alelik homojenite tanımlanmıştır. Örneğin Yahudi hastalarda R83C (%93), Çinli hastalarda R83H (%70), Japon hastalarda 7727>T(%88), Güney Avrupalı hastalarda R83C ve Q347X (%48, %21) mutasyonları sık bulunmuştur [6,7].

Literatürde Türk hastalarda GDH 1a gen mutasyonlarını tespit etmek için yapılan iki çalışmaya rastlanmıştır. Hüner ve ark. [9], 1998’de 11 GDH 1a hastasında PZR yöntemi ile R83C mutasyon alel sıklığını %63,3 tespit etmiş ve bir hastada, R170Q, yeni homozigot bir mutasyon bulmuştur. Ancak mutasyon tespit oranı (%75) diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında düşüktür. Terzioğlu ve ark [10] ise 2001’de aynı yöntemle 12 GDH 1a hastasında 2 farklı mutasyon tespit etmiştir. Tüm hastalar bu iki mutasyondan biri veya diğeri için homozigottur. R83C mutasyon alel sıklığı %58,3 ve ilk kez Fransız hastalarda tanımlanmış olan W77R mutasyonunun alel sıklığını ise %42 bulunmuştur (10). Çalışmamız, Türkiye’den yayınlanan diğer çalışmalara göre daha fazla sayıda hastayı kapsamaktadır ve mutasyon tespit oranı %83,3 gibi yüksek bir orandadır. R83C (%68,5) mutasyonu daha öncede Türkiye’de yapılan çalışmalara benzer şekilde en sık saptanan mutasyondur. İkinci sıklıkla tespit edilen bir nokta mutasyonu olan G270V ise özellikle İsrail’de yaşayan müslüman Arap ırkında sık tespit edilen bir mutasyon olup, önceki çalışmalarda sadece bir Türk hasta bu mutasyon için ‘compound heterozigot’ bulunmuştur [10,141]. Alel sıklığını %3, 7 saptadığımız mutasyonlardan G188R özellikle beyaz ırkta gözlenen bir mutasyondur. W77R mutasyonunun alel sıklığı ise Terzioğlu ve ark.’nın Türk hastalarda yaptığı çalışmada %42 gibi oldukça yüksek oranda bulunmuştur. Bu çalışmada ve Türkiye’den bildiren diğer çalışmalarda özellikle beyaz ırkta sık rastlanan ve G6PC geninde en sık tespit edilen mutasyonlardan biri olan Q347X mutasyonuna rastlanmamıştır [7].

G6PC geninin yapısı hakkında artan bilgi birikimi ve moleküler genetikteki ilerlemeye karşın şimdiye kadar, genotip ile klinik bulgular arasında kesin bir ilişki

saptanamamıştır. Bununla beraber, birkaç mutasyonun bazı fenotipik özellikler ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada saptanan mutasyonların çok büyük bir kısmını (%68,5) R83C mutasyonu oluşturmaktadır. Diğer saptanan 3 mutasyon (%14,8) ise toplam 4 hastada tespit edilmiştir. Verilerin uygun dağılım göstermemesi nedeni ile genotip ve fenotipik arasındaki ilişkiyi değerlendirebilmek için istatistiksel testler uygulanamamıştır. Tablo 22 ve 23’de hastaların genotiplerine göre takipleri sırasında saptanan klinik bulgular ve patolojik laboratuvar bulguları gözlenmektedir. Literatürde özellikle 727G>T mutasyonu ve G188R mutasyonu ile fenotip arasında ilişki olabileceğinden bahsedilmiştir. Doğu Asya’da yaygın bir mutasyon olan 727G>T’nin hafif GDH 1a klinik bulguları sergilediği ancak ileri yaşlarda hepatoselüler kansere yatkınlığı artırabileceği bildirilmiştir [7,111,112]. Bizim çalışmamızda hastaların hiç birinde bu mutasyona rastlanmamıştır. Diğer bir ilişki de G6PC geninde homozigot G188R mutasyonu taşıyan 2’si kardeş 4 hastada bildirilmiştir. Bu hastaların hafif kronik nötropeni, sık tekrarlayan enfeksiyonlar ile GDH 1b klinik bulgularını sergilediği saptanmıştır [113]. Ancak bu alışılmadık fenotipe G188R mutasyonu için ‘compound heterozigot’ olan bir bireyde rastlanmamıştır. Aynı zamanda; bu hastaların hiçbirinde G6PT geninde mutasyon tespit edilmemiştir. Bu çalışmada ise bir hastada G188R mutasyonu homozigot olarak tespit edilmiştir. Ancak hastanın dosyası incelendiğinde nötropeni ve GDH 1b klinik bulgularına rastlanmamıştır. Bu gözlemlere dayanarak ileride bu mutasyonu taşıyan hastaların fenotipik özelliklerinin bildirilmesi ile daha kesin sonuçlara ulaşılabileceğini düşünmekteyiz.

Terzioğlu ve ark [10]; Türk GSD 1a’lı hastalarda yaptıkları çalışmada R83C mutasyonu saptanan hastaların W77R mutasyonu saptanan bireylere göre daha ağır

klirik bulgular sergilediklerini yayınlamışlardır. W77R mutasyonu literatürde diğer mutasyonlara göre az saptanan bir mutasyon olup, diğer çalışmalarda hastalara ait klinik bulgulara rastlanılmamıştır. Bu çalışma da sadece bir hasta bu mutasyon için homozigottur ve diğer hastalara göre daha hafif klinik ve laboratuvar bulgular sergilemektedir (Tablo 22,23).

Bu çalışmada homozigot olarak G270V mutasyonu saptanan 2 hastadan biri erken yaşta tanı alması ve tedaviye başlanmasına rağmen masif hepatomegali, sık tekrarlayan hipoglisemik ataklar, şiddetli hiperkolesterolemi ve hipertrigliseridemi, yüksek laktik asit değerleri ile oldukça şiddetli fenotipik bulgular sergilerken, diğer hastada daha hafif fenotipik bulgular gözlenmektedir. Parvari ve ark. [141] aynı mutasyon için homozigot olan müslüman Arap kökenli 3 kardeşin benzer şekilde farklı fenotipik bulgular sergilediklerini bildirmişlerdir. Aynı ailede ve aynı genotipe sahip olan hastalar arasında bile belirgin fenotipik heterojenite tespit edilmesi fenotip üzerinde çevresel, biyokimyasal ve genetik gibi birçok faktörün etkili olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmada dikkati çeken diğer bir nokta, tanı anında GDH 1a'lı hastaların bazılarında hiperkalsemi saptanmasıdır. Bu konuda literatürde az sayıda yayına rastlanmış olup, hiperkalsemi ile genotip arasında kesin bir ilişki kurulamamıştır [142]. Bu çalışmada; R83C mutasyonu homozigot tespit edilen hastaların %31,3'ünde, R83C mutasyonu için heterozigot olan diğer alelde ise mutasyon saptanmayan hastaların %20'sinde ve G270V mutasyonu homozigot tespit edilen bir hastada tanı anında hiperkalsemi saptanmıştır. Hiperkalsemiye yönelik tedavi ile birlikte diyet tedavisinin başlanması ile hiperkalsemi de dramatik düzelme

gözlenmiştir. GDH 1’de hiperkalsemiye tanı gecikmesinin neden olduğu uzun süreli laktik asidozun neden olabileceği düşünülmektedir [142] .

Bu çalışmada GDH 1b hastalarında dünyada en sık rastlanan 3 mutasyon mikroyarray teknoloji ile tarandığında bakılan 6 alelin yalnızca 2’sinde G339C (%33,3) mutasyonu tespit edilmiştir. Bakılan mutasyonlardan 1211del CT ve W118R’e ise rastlanılmamıştır. Bu çalışma GDH 1b tanılı hastalarda Türkiye’den yapılan ilk moleküler çalışma olmasına rağmen hasta sayısı ve bakılan mutasyon sayısı azdır. GDH 1b’de G339C ve 1211delCT beyaz hastalarda sık olup, W118R Japon hastalarda daha sık görülmektedir [7,11]. Şimdiye kadar GDH 1b’de genotip ve fenotip arasında kesin bir ilişki saptanamamıştır. Genetik analizleri ile GDH 1a tanısı konan bazı hastalarda nötrofil fonksiyon bozukluğu saptanmasına benzer şekilde, G6PT geninde mutasyon saptanan GDH 1b’li hastalarda da her zaman nötropeni ve tekrarlayan enfeksiyonlara rastlanmamaktadır. Bu nedenle karaciğer biyopsisi yapılmadan önce GDH 1’in diğer tipleri için de genetik analiz yapılması önerilmektedir [6,109]. Çalışmamızda tek alelde G339C mutasyonu tespit edilen bir hastanın tekrarlayan kan sayımlarında nötropeni saptanamamıştır. Literatürdeki bu bilgiler ışığında, bu çalışmada GDH 1b hastalarında G6PC geninde baktığımız 12 mutasyon ve GDH 1a hastalarında da G6PT geninde baktığımız 3 mutasyon taranmış olup bu mutasyonlara rastlanmamıştır

Sonuç olarak; GDH 1’in genetik temeli hakkında artan bilgiler tanının biyopsi ile karaciğer dokusundan enzim ölçümü yerine mutasyon analizi ile konulmasına olanak sağlamaktadır. Bu çalışmada Türk GDH 1a’da hastalığa neden olan 4 mutasyonun alel sıklığı; mikroyarray teknoloji kullanılarak %83,3 gibi yüksek bir oranda tespit edilmiştir. Daha önce Türk hastalarda yapılan çalışmalara benzer

şekilde bu çalışmada da R83C en sık gözlenen mutasyon olup, G188R mutasyonu ise ilk defa Türk kökenli bir hastada saptanmıştır. GDH 1a'nın tanısında; Türk kökenli hastalar gibi alelik homojenite tespit edilen toplumlarda tüm geni taramak yerine, sık saptanan mutasyonların hızlı bir şekilde analiz edilmesine olanak veren, diğer yöntemlere göre maliyeti oldukça düşük olan mikroarray teknolojisinin başarıyla kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Bu güne kadar G6PT geninde 73 farklı mutasyon tanımlanmıştır [7,8]. En son İtalya'da yapılan bir çalışmada 25 GDH 1b hastasında 16 farklı mutasyon tespit edilmiştir [11]. Çalışmamızın sonuçları GDH 1b hastalarında ülkemize özgü mutasyonların olabileceğini düşündürmektedir. Daha çok sayıda Türk GDH 1b hastasında, çipteki mutasyonel paneli genişleterek ve komplike genetik analiz yöntemlerini kullanarak mutasyon bulma sıklığımızı artırabiliriz.

6. SONUÇ

Bu çalışmada; klinik, laboratuvar ve/ veya enzimatik ölçümler ile GDH 1a ve GDH 1b tanılı hastalarda, dünyada en sık rastlanan mutasyonlar yeni bir yöntem olan mikroarray teknoloji ile araştırılmıştır. Saptanan mutasyonların alel sıklığı ve fenotip ile genotip arasındaki ilişki belirlenmeye çalışılmış, aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. Çalışma yaşları 5ay-20 yaş arasında 16'sı erkek, 14'ü kız 30 GDH 1 tanılı hastada yapılmıştır.
2. Hastaların % 73,3'ünde anne baba arasında akrabalık ve %30'unda ailede GDH 1 hastalığı öyküsü mevcuttur
3. Çalışmaya katılan hastaların; 27'si tanı anı ortalama yaş $9 \pm 13,4$ ay olan 14'ü erkek, 13'ü kız GDH 1a tanılı hastalardan ve 3'ü tanı anı ortalama yaş $44 \pm 66,8$ ay olan 2'si erkek, 1'i kız GDH 1b tanılı hastalardan oluşmaktadır.
4. Hastaların tanı anındaki şikayetleri incelendiğinde sık soluk alıp verme (%96,3) ve karın şişliği (%81,5) nedeniyle başvurunun en yüksek sıklıkta olduğu saptanmıştır.
5. Hastaların tanı anındaki fizik muayene bulguları incelendiğinde patolojik bulgu olarak; olguların tümünde hepatomegali, %63,3'ünde taş bebek yüz görünümü ve %46,7'sinde bilinç bulanıklığı saptanmıştır.
6. Tanı anında hastaların %93,3'ünün kan gazı değerlerinin metabolik asidoz ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

7. Hastaların izlemlerinde %50'sinde boy kısalığı, %10'unda psikomotor gelişimde gerilik saptanmıştır.
8. Hastaların kemik mineral yoğunluğunun değerlendirmesi %22,2'sinde osteopeni, %55,6'sında osteoporoz saptanmıştır.
9. Hastalar geç dönem komplikasyonlar açısından değerlendirildiğinde %6,9'unda karaciğerde adenom, %20'sinde mikroalbuminüri ve %16,7'sinde proteinüri tespit edilmiştir.
10. İncelenen 27 GDH 1a'lı hastanın 25'inin (%92,6) en az bir allelinde mutasyon saptanırken, 20'sinin (%74) her iki allelde mutasyon tespit edilmiştir. Kardeş olan iki hastada ise (%7,4) bakılan 12 mutasyondan hiçbirisi saptanmamıştır.
11. GDH 1a'lı hastaların taranan 54 allelin 45'inde (%83,3) hastalığa sebep olan mutasyon tespit edilmiştir.
12. G6PC geninde bakılan 12 mutasyondan 8'ine (R170Q, Q347X ,35X, 130X, D38V W63X , 727>T, DelF327) hiçbir hastada rastlanılmamıştır.
13. G6PC geninde, R83C mutasyonu 54 allelin 37'sinde saptanarak birinci sıklıkta tespit edilen mutasyon olmuştur.
14. G6PC geninde, bakılan mutasyonların allelik sıklığı; R83C (%68,5), G270V (%7,4), G188R (%3,7) ve W77R (%3,7) olarak saptanmıştır.
15. G188R mutasyonu ilk defa Türk kökenli bir hastada saptanmıştır.
16. W77R mutasyonu homozigot saptanan hastanın diğer hastalara göre daha hafif klinik ve laboratuvar bulgular sergilediği gözlenmiştir.

17. GDH 1b'li 3 hastanın 2'sinde (%66,7) tanı anında ve takiplerinde n tropenisinin olduğu, hastaların 1'inde takiplerde (%33,3) İBH ve 1'inde (%33,3) ise tekrarlayan artr t ataklarının geliştiği g zlenmiştir.
18.    GDH 1b'li hastanın 2' sinin tek alelinde G339C mutasyonu tespit edilmiştir.
19. GDH 1b'de G339C mutasyonunun alel sıklığı %33,3 saptanmıştır. Bakılan diğer iki mutasyona (1211del CT ve W118R) ise hastaların 3' nde de rastlanılmamıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Chou JY, Matern D, Mansfield BC, Chen YT. Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase complex. *Curr Mol Med* 2002;2(2):121-43.
2. Hiraiwa H, Pan CJ, Lin B, Moses SW, Chou JY. Inactivation of the glucose 6 phosphate transporter causes glycogen storage disease type 1b. *J Biol Chem* 1999;274(9):5532-6.
3. R.Froissart, I Maire, J-M Saudubray. Glycogenosis type 1 or von Gierke's disease. *Orphanet Encyclopedia* 2002;1-8.
4. Gitzelmann R, Bosshard NU. Defective neutrophil and monocyte functions in glycogen storage disease type 1b: a literature review. *Eur J Pediatr* 1993;152 (1): 33-8.
5. Visser G, Rake JP, Kokke FT, Nikkels PG, Sauer PJ, Smit GP. Intestinal function in glycogen storage disease type I. *J Inherit Metab Dis* 2002;25(4):261-7.
6. Rake JP, ten Berge AM, Visser G, Verlind E, Niezen-Koning KE, Buys CH, et al. Glycogen storage disease type Ia: recent experience with mutation analysis, a summary of mutations reported in the literature and a newly developed diagnostic flow chart. *Eur J Pediatr* 2000;159(5):322-30.
7. Matern D, Seydewitz HH, Bali D, Lang C, Chen YT. Glycogen storage disease type I: diagnosis and phenotype/genotype correlation. *Eur J Pediatr* 2002;161 (1):10-9.
8. Angaroni CJ, Labrune P, Petit F, Sastre D, Capra AE, Dodelson de Kremer R, et al. Glycogen storage disease type 1b without neutropenia generated by a novel splice-site mutation in the glucose-6-phosphate translocase gene. *Mol Genet Metab* 2006;88(1):96-9.
9. Hüner G, Podskarbi T, Schutz M, Baykal T, Sarbat G, Shin YS, et al. Molecular aspects of glycogen storage disease type Ia in Turkish patients: a novel mutation in the glucose-6-phosphatase gene. *J Inherit Metab Dis* 1998;21(4):445-6.
10. Terzioğlu M, Emre S, Ozen H, Saltik IN, Kocak N, Ciliv G, et al. Glucose-6-phosphatase gene mutations in Turkish patients with glycogen storage disease type Ia. *J Inherit Metab Dis* 2001;24(8):881-2.

11. Melis D, Fulceri R, Parenti G, Marcolongo P, Gatti R, Parini R, et al. Genotype/phenotype correlation in glycogen storage disease type 1b: a multicentre study and review of the literature. *Eur J Pediatr* 2005;164(8):501-8.
12. Fadiel A, Naftolin F. Microarray applications and challenges: a vast array of possibilities. *Int Arch Biosci* 2003;1111–21.
13. Santacroce R, Ratti A, Caroli F, Foglieni B, Ferraris A, Cremonesi L, et al. Analysis of clinically relevant single-nucleotide polymorphisms by use of microelectronic array technology. *Clin Chem* 2002;48(12):2124-30.
14. Wolfsdorf JJ, Holm IA, Weinstein DA. Glycogen storage diseases. Phenotypic, genetic, and biochemical characteristics, and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999;28(4):801–23.
15. Chen YT. Glycogen storage diseases. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 2001;1521–55.
16. Illingworth B, Cori GT. Structure of glycogen and amylopectins. III. Normal and abnormal human glycogen. *J Biol Chem* 1952 ;199(2):653-60.
17. Cori GT. Biochemical aspects of glycogen deposition disease. *Bibl Paediatr* 1958;14(66):344-58.
18. Kishnani PS, Chen YT. Glycogen storage diseases. In: Kliegman MR, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF, editors. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 18th ed. Philadelphia: Saunders, 2007;601-9.
19. Cori, GT, Cori CF. Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease. *J. Biol. Chem* 1952;199(2):661–7.
20. Applegarth DA, Toone JR, Lowry RB. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. *Pediatrics* 2000;105 (1):e10.
21. VonGierke E. Hepato-nephro-megalia-glycogenica (Glykogenspeicherkrankheit der Leber und Nieren). *Beitr Pathol Anat* 1929; 82: 497–513.
22. Schoenheimer RU ber eine eigenartige Sto" rung des Kohlenhydratstoffwechsels. *Z. Physiol Chem* 1929;182: 149–51.
23. Lei KJ, Chen YT, Chen H, Wong LJC, Liu JL, McConkie-Rosell A et al. Genetic basis of glycogen storage disease type 1a: prevalent mutations at the glucose-6-phosphatase locus. *Am J Hum Genet* 1995;57(4):766–71.

24. Senior B, Loridan L. Studies of liver glycogenosis, with particular reference to the metabolism of intravenously administered glycerol. *N Engl J med* 1968;279(18): 958–65.
25. Narisawa K, Igarashi Y, Otomo H, Tada K. A new variant of glycogen storage disease type 1 probably due to a defect in the glucose-6-phosphate transport system. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;83(4): 1360–4.
26. Gerin I, Veiga-da-Cunha M, Achoury Y, Collet JF, Van Schaftingen E. Sequence of a putative glucose-6-phosphate translocase mutated in glycogen storage disease type 1b. *FEBS Lett* 1997;419 (2-3): 235–8.
27. Van Creveld S. Glycogen storage disease. *Medicine* 1939;18:1-128.
28. Kikuchi M, Hasegawa K, Honda I, Watabe M, Narisawa K, Tada K. Chronic pancreatitis in a child with glycogen storage disease type 1 . *Eur J Pediatr* 1991;150(12):852-3.
29. Traisman AS Traisman HS. Glycogen storage disease of the liver in siblings. *J.Pediatr* 1953;(6):654-6.
30. Ekstein J, Rubin BY, Anderson SL, Weinstein DA, Bach G, Abeliovich D, et al. Mutation frequencies for glycogen storage disease Ia in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Med Genet A* 2004;129:(2)162-4.
31. Field, JB, Drash AL. Studies in glycogen storage disease. II. Heterogeneity in the inheritance of glycogen storage diseases. *Trans Assoc Am Physicians* 1967;80:284-96.
32. Collins JE, Bartlett K, Leonard JV, Aynsley-Green A. Glucose production rates in type 1 glycogen storage disease. *J Inherit Metab Dis* 1990;13(2):195-206.
33. Fernandes J. The effect of disaccharides on the hyperlactacidaemia of glucose-6-phosphatase-deficient children. *Acta Paediatr Scand* 1974;63(5):695-8.
34. Fernandes J, Alaupovic P, Wit JM. Gastric drip feeding in patients with glycogen storage disease type I: its effects on growth and plasma lipids and apolipoproteins. *Pediatr Res* 1989;25(4):327-31.
35. Greene HL, Swift LL, Knapp HR. Hyperlipidemia and fatty acid composition in patients treated for type IA glycogen storage disease. *J Pediatr* 1991;119(3):398-403.
36. Alaupovic P, Fernandes J. The serum apolipoprotein profile of patients with glucose-6-phosphatase deficiency. *Pediatr Res* 1985;19(4):380-4.

37. Bandsma RH, Smit GP, Kuipers F. Disturbed lipid metabolism in glycogen storage disease type 1. *Eur J Pediatr* 2002;161(1):65-9.
38. Fernandes J, Pikaar NA. Ketosis in hepatic glycogenosis. *Arch Dis Child.* 1972;47(251):41-6.
39. Greene HL, Wilson FA, Hefferan P, Terry AB, Moran JR, Slonim AE, et al. ATP depletion, a possible role in the pathogenesis of hyperuricemia in glycogen storage disease type I. *J Clin Invest.* 1978;62(2):321-8.
40. Cohen JL, Vinik A, Faller J, Fox IH. Hyperuricemia in glycogen storage disease type I. Contributions by hypoglycemia and hyperglucagonemia to increased urate production. *J Clin Invest* 1985;75(1):251-7.
41. Visser G, Rake JP, Fernandes J, Labrune P, Leonard JV, Moses S, et al. Neutropenia, neutrophil dysfunction, and inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib: results of the European Study on Glycogen Storage Disease type I. *J Pediatr* 2000;137(2):187-91.
42. Ihara K, Nomura A, Hikino S, Takada H, Hara T. Quantitative analysis of glucose-6-phosphate translocase gene expression in various human tissues and haematopoietic progenitor cells. *J Inherit Metab Dis* 2000;23(6):583-92.
43. Dieckgraefe BK, Korzenik JR, Husain A, et al. Association of glycogen storage disease 1b and Crohn disease: results of a North American survey. *Eur J Pediatr* 2002;161(1):88–92.
44. Saltik IN, Ozen H, Ciliv G, Kocak N, Yuce A, Gurakan F et al. Glycogen storage disease type Ia: frequency and clinical course in Turkish children. *Indian J Pediatr* 2000(7); 67: 497-501.
45. Rake JP, Visser G, Labrune P, Leonard JV, Ullrich K, Smit GP. Glycogen storage disease type I: diagnosis, management, clinical course and outcome. Results of the European Study on Glycogen Storage Disease Type I (ESGSD I). *Eur J Pediatr* 2002;161(1):20-34.
46. Rake JP, Visser G, Labrune P, Leonard JV, Ullrich K, Smit GP. Guidelines for management of glycogen storage disease type I- European Study on Glycogen Storage Disease Type I (ESGSDI). *Eur J Pediatr* 2002;161(1):112-9.
47. Milla PJ, Atherton DA, Leonard JV, Wolff OH, Lake BD. Disordered intestinal function in glycogen storage disease. *J Inherit Metab Dis* 1978;1(4):155-7.
48. Smit GP. The long-term outcome of patients with glycogen storage disease type Ia. *Eur J Pediatr* 1993; 152(1):52-5.

49. Talente GM, Coleman RA, Alter C, Baker L, Brown BI, Cannon RA, et al. Glycogen storage disease in adults. *Ann Intern Med* 1994;120(3):218-26.
50. Zakon SJ, Oyamada A, Rosenthal IH. Eruptive xanthoma and hyperlipemia in glycogen storage disease (von Gierke's disease). *AMA Arch Derm Syphilol.* 1953;67(2):146-51.
51. Saltik IN, Ozen H, Kocak N, Yuce A, Gurakan F. High biotinidase activity in type Ia glycogen storage disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95(8): 2144.
52. Burlina AB, Dermikol M, Mantau A, Piovan S, Grazian L, Zacchello F, Shin Y. Increased plasma biotinidase activity in patients with glycogen storage disease type Ia: effect of biotin supplementation. *J Inherit Metab Dis* 1996;19(2):209-12.
53. Roe TF, Thomas DW, Gilsanz V, Isaacs H Jr, Atkinson JB. Inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib. *J Pediatr* 1986;109(1):55-9.
54. Saltik-Temizel IN, Kocak N, Ozen H, Yuce A, Gurakan F, Demir H. Inflammatory bowel disease-like colitis in a young Turkish child with glycogen storage disease type 1b and elevated platelet count. *Turk J Pediatr* 2005;47(2):180-2.
55. Däublin G, Schwahn B, Wendel U. Type I glycogen storage disease: favourable outcome on a strict management regimen avoiding increased lactate production during childhood and adolescence. *Eur J Pediatr* 2002;161(1):40-5.
56. Wolfsdorf JI, Crigler JF. Effect of continuous glucose therapy begun in Infancy on the long-term clinical course of patients with type I glycogen storage disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;29(2):136–43.
57. Chen YT, Scheinman JI, Park HK, Coleman RA, Roe CR. Amelioration of proximal renal tubular dysfunction in type I glycogen storage disease with dietary therapy. *N Engl J Med* 1990;323(9): 590–3.
58. Iida S, Matsuoka K, Inoue M, Tomiyasu K, Noda S. Calcium nephrolithiasis and distal tubular acidosis in type 1 glycogen storage disease. *Int J Urol* 2003 Jan;10(1):56-8.
59. Restaino I, Kaplan BS, Stanley C, Baker L. Nephrolithiasis, hypocitraturia, and a distal renal tubular acidification defect in type 1 glycogen storage disease. *J Pediatr* 1993; 122(3):392-6.
60. Simões A, Domingos F, Fortes A, Prata MM. Type 1 glycogen storage disease and recurrent calcium urolithiasis. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(6):1277-9.

61. Lee PJ, Dalton RN, Shah V, Hindmarsh PC, Leonard JV. Glomerular and tubular function in glycogen storage disease. *Pediatr Nephrol* 1995;9(6):705-10.
62. Chen YT, Coleman RA, Scheinman JI, Kolbeck PC, Sidbury JB. Renal disease in type I glycogen storage disease. *N Engl J Med* 1988;318(1): 7-11.
63. Lin CC, Tsai JD, Lin SP, Lee HC. Renal sonographic findings of type I glycogen storage disease in infancy and early childhood. *Pediatr Radiol* 2005;35(8): 786-91.
64. Reitsma-Bierens WC. Renal complications in glycogen storage disease type I. *Eur J Pediatr* 1993; 152(1):60-2.
65. Bianchi L. Glycogen storage disease I and hepatocellular tumours. *Eur J Pediatr* 1993; 152(1):63-70.
66. Labrune P, Trioche P, Duvaltier I, Chevalier P, Odièvre M. Hepatocellular adenomas in glycogen storage disease type I and III: a series of 43 patients and review of the literature. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;24(3):276-9.
67. Lee PJ. Glycogen storage disease type I: pathophysiology of liver adenomas. *J Pediatr* 2002;161(1):46-9.
68. Franco LM, Krishnamurthy V, Bali D, Weinstein DA, Arn P, Clary B et al. Hepatocellular carcinoma in glycogen storage disease type Ia: a case series. *J Inherit Metab Dis* 2005; 28(2):153-62.
69. Labrune P. Glycogen storage disease type I: indications for liver and/or kidney transplantation. *Eur J Pediatr* 2002;161(1):53–5.
70. Matern D, Starzl TE, Arnaout W, Barnard J, Bynon JS, Dhawan A, et al. Liver transplantation for glycogen storage disease types I, III, and IV. *Eur J Pediatr*. 1999;158(2):43-8.
71. Lee PJ, Patel JS, Fewtrell M, Leonard JV, Bishop NJ. Bone mineralisation in type 1 glycogen storage disease. *Eur J Pediatr* 1995;154(6):483-7.
72. Rake JP, Visser G, Huismans D, Huitema S, van der Veer E, Piers DA, et al. Bone mineral density in children, adolescents and adults with glycogen storage disease type Ia: a cross-sectional and longitudinal study. *Inherit Metab Dis*. 2003;26(4):371-84.
73. Lee PJ, Patel A, Hindmarsh PC, Mowat AP, Leonard JV. The prevalence of polycystic ovaries in the hepatic glycogen storage diseases: its association with hyperinsulinism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1995;42(6):601-6.

74. Corby DG, Putnam CW, Greene HL. Impaired platelet function in glucose-6-phosphatase deficiency. *J Pediatr*. 1974;85(1):71-6.
75. Trioche P, Francoual J, Capel L, Odievre M, Lindenbaum A, Labrune P. Apolipoprotein E polymorphism and serum concentrations in patients with glycogen storage disease type Ia. *J Inherit Metab Dis* 2000; 23(2): 107-12.
76. Bandsma RHJ, Rake JP, Visser G, Neese RA, Hellerstein MK, van Duyvenvoorde W, et al. Increased lipogenesis and resistance of lipoproteins to oxidative modification in two patients with glycogen storage disease type Ia. *J Pediatr* 2002;140(2): 256–60.
77. Wittenstein B, Klein M, Finckh B, Ullrich K, Kohlschutter A. Radical trapping in glycogen storage disease Ia. *Eur J Pediatr* 2002;161(1):70-4.
78. Wittenstein B, Klein M, Finckh B, Ullrich K, Kohlschutter A. Plasma antioxidants in pediatric patients with glycogen storage disease, diabetes mellitus, and hypercholesterolemia. *Free Radic Biol Med* 2002;33(1):103-10.
79. Michels VV, Beaudet AL. Hemorrhagic pancreatitis in a patient with glycogen storage disease type I. *Clin Genet*. 1980;17(3):220-2.
80. Humbert M, Labrune P, Simonneau G. Severe pulmonary arterial hypertension in type 1 glycogen storage disease. *Eur J Pediatr*. 2002;161(1):93-6.
81. Melis D, Parenti G, Della Casa R, Sibilio M, Romano A, Di Salle F, et al. Brain damage in glycogen storage disease type I. *J Pediatr* 2004;144(5):637-42.
82. Ryan IP, Havel RJ, Laros RK Jr. Three consecutive pregnancies in a patient with glycogen storage disease type IA (von Gierke's disease). *Am J Obstet Gynecol* 1994;170(6): 1687-90.
83. Chen YT, Bali D, Sullivan J. Prenatal diagnosis in glycogen storage diseases. *Prenat Diagn* 2002;22(5):357-9.
84. Shieh JJ, Terzioglu M, Hiraiwa H, Marsh J, Pan CJ, Chen LY, et al. The molecular basis of glycogen storage disease type Ia: structure and function analysis of mutations in glucose-6-phosphatase. 2002;15;277(7):5047-53.
85. Kojima K, Kure S, Kamada F, Hao K, Ichinohe A, Sato K, et al. Genetic testing of glycogen storage disease type Ib in Japan: five novel G6PT1 mutations and a rapid detection method for a prevalent mutation W118R. *Mol Genet Metab* 2004 ;81(4):343-6.

86. Barkaoui E, Cherif W, Tebib N, Charfeddine C, Ben Rhouma F, Azzouz H, et al. Mutation spectrum of glycogen storage disease type Ia in Tunisia: implication for molecular diagnosis. *J Inherit Metab Dis*. 2007;30(6):989.
87. Burr IM, O'Neill JA, Karzon DT, Howard LJ, Greene HL. Comparison of the effects of total parenteral nutrition, continuous intragastric feeding, and portacaval shunt on a patient with type I glycogen storage disease. *J Pediatr*. 1974;85(6):792-5.
88. Chen YT, Cornblath M, Sidbury JB. Cornstarch therapy in type I glycogen-storage disease. *N Engl J Med* 1984; 310(3):171-5.
89. Fernandes J, Berger R, Smit GPA. Lactate as a cerebral metabolic fuel for glucose-6-phosphatase deficient children. *Pediatr Res* 1984;18(4):335–9.
90. Kerr K. The prophylaxis of bacterial infections in neutropenic patients. *J Antimicrob Chemother* 1999;44(5):587–91.
91. Mangiarotti P, Pizzini C, Fanos V. Antibiotic prophylaxis in children with relapsing urinary tract infections: a review. *J Chemother* 2000;12(2):115–23.
92. Visser G, Rake JP, Labrune P, Leonard JV, Moses S, Ullrich K, et al. Granulocyte colony-stimulating factor in glycogen storage disease type 1b. Results of the European Study on Glycogen Storage Disease Type 1. *Eur J Pediatr* 2002;161(1):83-7.
93. Visser G, Rake JP, Labrune P, Leonard JV, Moses S, Ullrich K, et al. Consensus guidelines for management of glycogen storage disease type 1b – European Study on Glycogen Storage Disease Type 1. *Eur J Pediatr* 2002;161(1):120-3.
94. Martin AP, Bartels M, Schreiber S, Buehrdel P, Hauss J, Fangmann J. Successful staged kidney and liver transplantation for glycogen storage disease type 1b: a case report. *Transplant Proc* 2006;38(10):3615-9.
95. Iyer SG, Chen CL, Wang CC, Wang SH, Concejero AM, Liu YW, et al. Long-term results of living donor liver transplantation for glycogen storage disorders in children. *Liver Transpl* 2007;13(6):848–52.
96. Koeberl DD, Kishnani PS, Chen YT. Glycogen storage disease types I and II: treatment updates. *J Inherit Metab Dis* 2007;30(2):159-64.
97. Chou JY, Mansfield BC. Gene therapy for type I glycogen storage diseases. *Curr Gene Ther*. 2007;7(2):79-88.

98. Lee KW, Lee JH, Shin SW, Kim SJ, Joh JW, Lee DH, et al. Hepatocyte transplantation for glycogen storage disease type Ib. *Cell Transplant*. 2007;16(6):629-37.
99. Muraca M, Burlina AB Liver and liver cell transplantation for glycogen storage disease type IA. *Acta Gastroenterol Belg* 2005;68(4):469-72.
100. Shelly LL, Lei KJ, Pan CJ, Sakata SF, Ruppert S, Schutz G, et al. Isolation of the gene for murine glucose 6-phosphatase, the enzyme deficient in glycogen storage disease type 1A. *J Biol Chem* 1993;268(29):21482-5.
101. Lin B, Annabi B, Hiraiwa H, Pan CJ, Chou JY. Cloning and characterization of cDNAs encoding a candidate glycogen storage disease type 1b protein in rodents. *J Biol Chem* 1998;273(48):31656-60.
102. Lei KJ, Shelly LL, Pan CJ, Sidbury JB, Chou JY. Mutations in the glucose 6-phosphatase gene that cause glycogen storage disease type 1a. *Science* 1993;262(5133):580-3.
103. Chevalier-Porst F, Bozon D, Bonardot AM, Bruni N, Mithieux G, Mathieu M, et al. Mutation analysis in 24 French patients with glycogen storage disease type 1a. *J Med Genet* 1996;33(5):358-60.
104. Parvari R, Lei KJ, Bashan N, HersHKovitz E, Korman SH, Barash V, et al. Glycogen storage disease type 1a in Israel: Biochemical, clinical, and mutational studies. *Am J Med Genet* 1997;72(3):286-90.
105. Matern D, Lang C, Beck S, Brandis M, Seydewitz HH. Diagnostik der Glykogenose Typ Ia: DNA-Analyse aus Leukozyten als Alternative zum Enzymassay aus einem frischen Leberbiopsat. *Monatsschr Kinderheilkd* 1998;146:660-4.
106. Seydewitz HH, Matern D. Molecular genetic analysis of 40 patients with glycogen storage disease type Ia: 100% mutation detection rate and 5 novel mutations. *Hum Mutat* 2000;15(1):115-6.
107. Chiang SC, Lee YM, Chang MH, Wang TR, Ko TM, Hwu WL. Glucose 6-phosphatase gene mutations in Taiwan Chinese patients with glycogen storage disease type Ia. *J Hum Genet* 2000;45(4):197-9.
108. Veiga-da-Cunha M, Gerin I, Chen YT, de Barsy T, de Lonlay P, Dionisi-Vici C, et al. A gene on chromosome 11q23 coding for a putative glucose 6-phosphate translocase is mutated in glycogen storage disease types Ib and Ic. *Am J Hum Genet* 1998;63(4):976-83.
109. Janecke AR, Mayatepek E, Utermann G. Molecular genetics of type 1 glycogen storage disease. *Mol Genet Metab*. 2001;73(2):117-25.

110. Fernandes J, Leonard JV, Moses SW, OdieÁvre M, di Rocco M, Schaub J, et al. Glycogen storage disease: recommendations for treatment. *Eur J Pediatr* 1988 ;147(3): 226-8.
111. Nakamura T, Ozawa T, Kawasaki T, Yasumi K, Wang DY, Kitagawa M, et al. Case report: Hepatocellular carcinoma in type 1a glycogen storage disease with identification of a glucose-6-phosphatase gene mutation in one family. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1999;14(6), 553-8.
112. Akanuma J, Nishigaki T, Fujii K, Matsubara Y, Inui K, Takahashi K, Am J Med Genet. Glycogen storage disease type 1a: molecular diagnosis of 51 Japanese patients and characterization of splicing mutations by analysis of ectopically transcribed mRNA from lymphoblastoid cells. 2000;13;91(2):107-12.
113. Weston BW, Lin JL, Muenzer J, Cameron HS, Arnold RR, Seydewitz HH, et al. Glucose-6-phosphatase mutation G188R confers an atypical glycogen storage disease type 1b phenotype. *Pediatr Res.* 2000;48(3):329-34.
114. Takahashi K, Akanuma J, Matsubara Y, Fujii K, Kure S, Suzuki Y, et al. Heterogeneous mutations in the glucose-6-phosphatase gene in Japanese patients with glycogen storage disease type 1a. *Am J Med Genet.* 2000;15;92(2):90-4.
115. Kure S, Hou DC, Suzuki Y, Yamagishi A, Hiratsuka M, Fukuda T, et al. Glycogen storage disease type 1b without neutropenia. *J Pediatr.* 2000;137(2):253-6.
116. Chen LY, Lin B, Pan CJ, Hiraiwa H, Chou JY. Structural requirements for the stability and microsomal transport activity of the human glucose 6-phosphate transporter *J Biol Chem.* 2000;275(44):34280-6.
117. <http://www.gene-chip.com> Eriřim Tarihi: 12/02/2009.
118. Nanogen. 1999 Annual Report.
119. Thistlethwaite WA, Moses LM, Hoffbuhr KC, Devaney JM, Hoffman EP. Rapid genotyping of common MeCP2 mutations with an electronic DNA microchip using serial differential hybridization. *J Mol Diagn* 2003;5(2):121-6.
120. Edman CF, Mehta P, Press R, Spargo CA, Walker GT, Nerenberg M. Pathogen analysis and genetic predisposition testing using microelectronic arrays and isothermal amplification. *J Investig Med* 2000;48(2):93-101.

121. Eickhoff H, Schneider U, Nordhoff E, Nyarsik L, Zehetner G, Nietfeld W, et al. Technology development for DNA chips. In: Grigorenko EV, editor. DNA arrays: technologies and experimental strategies. Boca Raton: CRC Press, 2002;1-9.
122. Schena M, Davis RW. Genes, genomes, and chips. In: Schena M, editor. DNA microarrays: a practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1999:1-15.
123. Neyzi O, Binyıldız P, Alp H. Türk çocuklarının persantil büyüme eğrileri. İst. Tıp Fak. Mecm. 1978; 41(74):3-22.
124. Bundak R. Normal büyüme. In: Günöz H, Öcal G, Yordam N, Kurtoglu S (eds). Pediatrik Endokrinoloji. Ankara: Kalkan Matbaacılık. 2003:39-64.
125. Pesce MA. Laboratory testing in infants and children. In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF, editors. Nelson Textbook of Pediatrics. 18th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007;2939-42.
126. Nechyba C. Blood chemistries and body fluids. In: Gunn VL, Nechyba C, editors. The Harriet Lane Handbook. Philadelphia: Mosby, 2002;549-67.
127. Tunçbilek E, Koc I. Consanguineous marriage in Turkey and its impact on fertility and mortality. Ann Hum Genet 1994;58(Pt 4):321-9.
128. Fine RN, Kogut MD, Donnell GN. Intestinal absorption in type I glycogen storage disease. J Pediatr 1969;75(4):632-5.
129. Field JB, Epstein S, Egan T. Studies in glycogen storage disease I. Intestinal glucose-6-phosphatase activity in patients with von Gierke's disease and their parents. J Clin Invest 1965;7:1240-7.
130. Gitzelmann R, Spycher MA. Oral cornstarch therapy: is persorption harmless? Eur J Pediatr 1993;152(7):592-4.
131. Levy E, Thibault LA, Roy CC, Bendayan M, Lepage G, Letarte J. Circulating lipids and lipoproteins in glycogen storage disease type I with nocturnal intragastric feeding. J Lipid Res 1988;29(2): 215-26.
132. Faivre L, Houssin D, Valayer J, Brouard J, Hadchouel M, Bernard O. Long-term outcome of liver transplantation in patients with glycogen storage disease type Ia. J Inher Metab Dis 1999;22(6):723-32.
133. de Parscau L, Guibaud P, Labrune P, Odievre M. Long-term course of hepatic glycogenosis. A retrospective study of 76 cases. Arch Fr Pediatr 1988;45(9):641-5.

134. Wolfsdorf JI, La.el LM, Crigler JF Jr. Metabolic control and renal dysfunction in type I glycogen storage disease. *J Inher Metab Dis* 1997;20(4):559-68.
135. Moses SW. Historical highlights and unsolved problems in glycogen storage disease type 1. *Eur J Pediatr*. 2002;161(1):2-9.
136. Lee P, Mather S; Owens C, Leonard J, Dicks-Mireaux C. Hepaticultrasound findings in the glycogen storage diseases. *Br J Radiol* 1994;67(83):1062-6.
137. Frost HM, Schonau E The “muscle-bone unit” in children and adolescents: a 2000 overview. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13(6): 571-90.
138. Rake JP, Huismans D, Visser G, Piers DA, Smit GPA. Osteopenia in glycogen storage disease type I. *BIG Newsletter Spring* 1999:27-31.
139. Kozák L, Francová H, Hrabincová E, Stastná S, Pesková K, Elleder M. Identification of mutations in the glucose-6-phosphatase gene in Czech and Slovak patients with glycogen storage disease type Ia, including novel mutations K76N, V166A and 540del5. *Hum Mutat* 2000;16(1):89.
140. Stroppiano M, Regis S, DiRocco M, Caroli F, Gandullia P, Gatti R. Mutations in the glucose-6-phosphatase gene of 53 Italian patients with glycogen storage disease type Ia. *J Inherit Metab Dis* 1999;22(1):43-9.
141. Parvari R, Isam J, Moses SW. Glycogen storage disease type 1a in three siblings with the G270V mutation. *J Inherit Metab Dis* 1999;22(2):149-54.
142. Hwu WL, Chiang SC, Huang SF, Chang MH, Wen WH, Wang TR. Hypercalcaemia in glycogen storage disease type Ia: a case with R83H and 341delG mutations. *J Inherit Metab Dis* 1999;22(8):937-8.

8. ÖZET

GLİKOJEN DEPO TİP 1A VE GLİKOJEN DEPO TİP 1B HASTALARINDA SIK GÖZLENEN GLİKOZ-6- FOSFATAZ VE GLUKOZ-6- FOSFAT TAŞIYICI GEN MUTASYONLARININ MİKROELEKTRONİK ARRAY TEKNOLOJİSİ İLE ARAŞTIRILMASI

Glikojen depo hastalığı tip 1 (GDH 1), kan şekeri regülasyonunda kilit rol oynayan Glikoz-6- Fosfataz (G6Paz) sisteminde fonksiyon bozukluğu sonucu meydana gelen otozomal resesif geçişli bir hastalık grubudur. G6Paz sistemindeki, G6P'ın sitoplazmadan endoplazmik retikulum lümenine taşınmasını sağlayan G6PT eksikliği glikojen depo hastalığı tip 1b'ye neden olurken, endoplazmik retikulum lümeninde G6P'ın glukoz ve fosfata hidrolizini sağlayan G6Paz eksikliği ise glikojen depo hastalığı tip 1a' ya neden olmaktadır. G6Paz sistemindeki G6Paz ve G6P transporter proteinlerinin moleküler genetik seviyesi tanımlanmıştır. Bu güne kadar G6Paz geninde 76 farklı mutasyon, G6PT geninde ise 73 farklı mutasyon tanımlanmıştır. GDH 1'de, özellikle bazı etnik grup ve coğrafik bölgelerde alelik homojenite saptanmıştır.

Bu çalışmada 27 GDH 1a ve 3 GDH 1b tanılı Türk hastada yeni bir yöntem olan mikroelektronik array teknoloji ile dünyada en sık rastlanan mutasyonlar araştırılmış ve saptanan mutasyonlar ile klinik ve laboratuvar bulgular arasındaki ilişki incelenmiştir. GDH 1a'lı olgularda taranan 54 allelin 45'inde (%83,3) hastalığa sebep olan mutasyon tespit edilmiştir. Bakılan mutasyonların alelik sıklığı; R83C (%68,5), G270V (%7,4), G188R (%3,7) ve W77R (%3,7) olarak bulunmuştur. G188R mutasyonu ilk defa Türk kökenli bir hastada saptanmıştır.

Bakılan 12 mutasyondan 8'ine (R170Q, Q347X ,35X, 130X, D38V W63X , 727>T, DelF327) hiçbir hastada rastlanılmamıştır. W77R mutasyonu homozigot saptanan hastanın diğer hastalara göre daha hafif klinik ve laboratuvar bulgular sergilediği gözlenmiştir. GDH 1b tanılı üç hastanın ikisinin tek alelinde G339C mutasyonu tespit edilmiştir. G339C mutasyonunun alel sıklığı %33,3 olarak bulunmuştur. Bakılan diğer iki mutasyona (1211delCT ve W118R) ise hastaların 3'ünde de rastlanmamıştır.

Sonuç olarak; GDH 1a'nın tanısında; Türk kökenli hastalar gibi alelik homojenite tespit edilen toplumlarda tüm geni taramak yerine, sık saptanan mutasyonların hızlı bir şekilde analiz edilmesine olanak veren ve diğer yöntemlere göre maliyeti oldukça düşük olan Mikroarray teknolojisinin başarıyla kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Daha çok sayıda Türk GSD1b hastasında, çipteki mutasyonel paneli genişleterek ve komplike genetik analiz yöntemlerini kullanarak mutasyon bulma sıklığımızı artırabiliriz.

Anahtar Kelimeler: Glikojen Depo hastalığı Tip 1a, Glikojen Depo hastalığı Tip 1b, mutasyonlar, mikroarray

9. SUMMARY

THE SCANNING OF COMMONLY SEEN MUTATIONS OF GLUCOSE-6-PHOSPHATASE AND GLUCOSE-6-PHOSPHATASE TRANSLOCASE GENES IN GLYCOGEN STORAGE TYPE 1A AND TYPE 1B DISEASE PATIENTS BY THE MICROELECTRONIC ARRAY TECHNOLOGY

Glycogen storage disease type 1 (GSD 1) is a group of conditions with autosomal recessive inheritance resulting in disfunction of Glucose-6-Phosphatase (G6Pase) system which plays a key role in the regulation of blood sugar. In the G6Pase system, deficiency of G6Pase which hydrolyzes G6P to glucose and phosphate in the lumen of endoplasmic reticulum leads to glycogen storage disease type 1a, while deficiency of G6P transporter which transports G6P from cytoplasm to the lumen of endoplasmic reticulum causes glycogen storage disease type 1b. Molecular genetic levels of the proteins, G6Pase and G6PT, were described in G6Pase system. Up to the present, 76 distinct mutations were defined in G6Pase gene, and 73 different mutations were defined in G6PT gene. Particularly in some ethnic groups and geographic regions, allelic homogeneity was detected in GSD 1.

In the present study, the most prevalent mutations in the world were searched by microelectronic array technology, a new method, in 27 Turkish patients diagnosed for GSD 1a and 3 with GSD 1b, and the relation between detected mutations and clinical and laboratory findings was investigated. Mutations causing the disease were detected in 45 (83.3%) of 54 alleles screened in the cases with GSD

1a. Allelic frequency of mutations (R83C, G270V, G188R, W77R) looked for were found as 68.5%, 7.4%, 3.7%, and 3.7%, respectively. G188R mutation was detected for the first time in a patient of Turkish origin. Eight (R170Q, Q347X, 35X, 130X, D38V W63X, 727>T, DelF327) of 12 mutations looked for were coincided in none of the patients. The patient with homozygous W77R mutation seemed to present milder clinical and laboratory findings, compared to other patients. G339C mutation was detected only in a single allele of two of three patients with the diagnosis of GSD 1b. Allelic frequency of G339C mutation was determined as 33.3%. Two other mutations (1211delCT ve W118R) looked for were coincided in none of three patients.

In conclusion, we suggest that microarray technology, which allows rapid analysis of frequently detected mutations and has considerably lower costs than other methods, can be successfully used in diagnosis of GSD 1a in populations with allelic homogeneity, such as patients of Turkish origin, instead of screening the whole gene. By expanding the mutational panel in the chip and using complex genetic analysis methods, we may increase the frequency of detecting mutations in much more Turkish GSD1b patients.

Keywords: Glycogen Storage Disease Type 1a, Glycogen Storage Disease Type 1b, mutations, microarray

EK-1:

GLİKOJEN DEPO 1 HASTALARI KLİNİK BİLGİ FORMU		
Adı-Soyadı	:	
Tanı Zamanı	:	
Doğum Tarihi	:	
Karaciğer Biyopsisi:		
Enzim Düzeyi	:	
Gönderen Kurum	:	
Adres, Telefon:		
Yakınması:		
Öyküsü:		
Ailede benzer hastalık/akrabalık:		
Sık tekrarlayan burun kanaması :		
Fizik Muayene:		
VA ()	Boy ()	BÇ ()
Taş bebek yüz görünümü →		
KC ve Dalak Boyutu →		
Kardiyak muayenede patolojik bulgu→.....		
Nörolojik muayenede patolojik bulgu →.....		
Solunum sistemi muayenesinde patolojik bulgu →.....		
Diğer→.....		

**EK-1: GLİKOJEN DEPO 1 HASTALARI KLİNİK BİLGİ FORMU
(DEVAM)**

Labaratuvar Bulguları:			
AKŞ	AST/ALT:	Kolesterol	Trigliserit:
Laktik Asit:	ALP:	Ürik asit:	
Serum Kalsiyum:	Serum Fosfor:		
24 saatlik idrar tetkikinde;			
Mikroalbuminüri:	Proteinüri:		
Patolojik Diğer Laboratuvar Bulguları:			
Beyaz küre, mutlak nötrofil sayısı:			
Görüntüleme Bulguları:			
ABD USG ile KC Volümü/Boyutu ve adenom varlığı:			
Renal inceleme			
KMY (Z skor):			

EK-2.1: GLİKOJEN DEPO TİP 1a VE TİP 1b HASTALARININ TANI ANINDAKİ LABORATUVAR VERİLERİ

Hasta No	Kan Şekeri (mg/dl)	AST (U/L)	ALT (U/L)	TG (mg/dl)	Kol (mg/dl)	Ürik Asit (mg/dl)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	ALP (U/L)	Laktik Asit (mmol/)	Mikro Albüminüri (mg/gün)	Proteinüri (mg/m ² /st)	AFP (ng/ml)	G6Paz* aktivitesi
1	56.0	30.0	28.0	731.0	175.0	9.4	10.6	5.1	118.0	5.7		211.0	1.72	70.0
2	14.0	316.0	83.0	987.0	252.0	8.2	10.5	6.6	316.0	4.1	0.2	3.2	3.82	
3	69.0	51.0	41.0	326.0	115.0	5.2	12.6	4.2	168.0	4.5	5.2	55.0	1.2	0.0
4	56.0	71.0	61.0	505.0	120.0	5.9	10.3	4.2	319.0	5.29	10.95	5.37	1.01	
5	100.0	264.0	230.0	936.0	235.0	6.5	10.5	5.3	200.0	5.73	3.39	5.83	1.16	
6	55.0	293.0	92.0	1448.0	207.0	6.9	9.5	3.9	298.0	6.2	4.63	3.92	1.81	
7	18.0	46.0	96.0	581.0	138.0	3.6	10.6	4.3	150.0	3.45	1.2	2.3		
8	49.0	171.0	36.0	914.0	136.0	6.1	10.2	4.0	326.0	3.8				
9	28.0	32.0	34.0	368.0	136.0	2.3	10.3	4.4	119.0	1.64	4.43	4.0	2.01	3.0
10	38.0	240.0	200.0	420.0	487.0	10.2	10.6	2.4	229.0	10.4	6.85	5.0	1.52	2.0
11	32.0	181.0	159.0	1020.0	186.0	5.5	11.6	3.4	202.0	13.74	4.2	4.0	2.5	
12	83.0	183.0	148.0	1063.0	225.0	9.8	10.3	5.4	212.0	6.18	4.05	7.3	4.94	0.0
13	83.0	30.0	38.0	525.0	218.0	3.9	9.9	4.7	434.0	1.87	6.8	1.9	1.38	6.0
14	72.0	32.0	34.0	252.0	138.0	2.1	10.6	3.8	270.0	1.17	2.3	3.1		8.0
15	64.0	166.0	296.0	292.0	204.0	4.1	10.4	4.8	230.0	3.2				0.0
16	44.0	206.0	492.0	1850.0	193.0	4.3	12.2	5.3	235.0	3.71			3.71	8.0
17	32.0	374.0	53.0	1056.0	186.0	13.8	13.3	5.2	229.0	7.55			12.0	3.0
18	25.0	0.57	36.0	934.0	177.0	7.8	10.5	4.4	265.0	3.0	3.4	3.2	4.5	
19	13.0	51.0	33.0	554.0	91.0	2.3	10.4	4.3	241.0	3.1				
20	45.0	194.0	192.0	316.0	206.0	3.5	9.2	4.9	165.0	1.94	4.0	3.6	5.2	
21	22.0	50.0	53.0	387.0	171.0	3.6	10.6	5.3	214.0	4.4	4.8	5.7	2.5	
22	44.0	111.0	47.0	377.0	107.0	5.7	11.4	5.4	252.0	4.22		2.9	2.3	
23	48.0	481.0	359.0	761.0	277.0	4.8	10.1	5.1	350.0	3.8		3.7	4.2	
24	94.0	92.0	47.0	773.0	92.0	6.13	10.8	5.4	215.0	8.7		4.0		3.39
25	16.0	17.0	37.0	1255.0	305.0	3.9	9.8	5.4	158.0	3.1		3.9	1.2	38.0
26	34.0	99.0	57.0	1114.0	185.0	7.2	9.9	4.6	234.0	7.2		3.6	13.97	
27	45.0	273.0	299.0	355.0	180.0	15.0	9.8	4.8	250.0	3.4		3.8	4.7	
28	68.0	129.0	115.0	368.0	134.0	6.8	9.4	5.0	178.0	2.9		2.9	5.7	40.0
29	64.0	120.0	78.0	405.0	140.0	5.8	10.0	5.6	250.0	3.8		3.0		2.56
30	34.0	145.0	120.0	677.0	210.0	7.8	11.8	4.4	258.0	5.8		4.2		

* nmol/ Pi / saat/ mg protein

EK-2.2: GLİKOJEN DEPO TİP 1a VE TİP 1b HASTALARININ SON KONTROLLERİNDEKİ LABORATUVAR VERİLERİ

Hasta No	Kan Şekeri (mg/dl)	AST (U/L)	ALT (U/L)	TG (mg/dl)	Kol (mg/dl)	Ürik Asit (mg/dl)	Ca (mg/dl)	Laktik Asit (mmol/L)
1	76.0	16.0	20.0	745.0	191.0	6.5	10.5	6,05
2	105.0	358.0	221.0	542.0	135.0	7.2	10.6	5,72
3	79.0	53.0	54.0	324.0	212.0	7.8	10.7	4,80
4	57.0	92.0	72.0	768.0	203.0	3.0	10.0	5,40
5	71.0	31.0	37.0	190.0	201.0	3.6	10.4	1,60
6	86.0	44.0	33.0	204.0	160.0	3.0	10.4	3,52
7	105.0	45.0	46.0	532.0	168.0	4.4	10.3	5,34
8	140.0	107.0	108.0	567.0	165.0	7.0	10.2	4,70
9	57.0	108.0	121.0	748.0	284.0	3.9	10.5	4,07
10	116.0	62.0	60.0	985.0	281.0	5.0	10.7	5,15
11	76.0	239.0	178.0	1388.0	261.0	8.6	12.2	8,60
12	44.0	43.0	40.0	238.0	172.0	2.6	10.5	3,70
13	88.0	25.0	27.0	156.0	198.0	2.5	9.2	2,41
14	54.0	59.0	96.0	120.0	124.0	3.2	9.6	1,42
15	76.0	136.0	212.0	292.0	204.0	4.1	10.4	3,20
16	53.0	316.0	255.0	525.0	133.0	6.7	11.3	3,75
17	65.0	299.0	110.0	1300.0	167.0	4.2	11.4	6,70
18	61.0	129.0	64.0	1420.0	255.0	8.6	10.7	6,20
19	63.0	78.0	52.0	277.0	108.0	4.8	10.6	4,69
20	67.0	98.0	82.0	500.0	187.0	2.6	9.4	4,85
21	97.0	37.0	37.0	341.0	172.0	2.6	10.2	3,65
22	60.0	100.0	55.0	376.0	109.0	3.9	10.9	4,22
23	89.0	868.0	591.0	259.0	179.0	5.2	9.7	5,20
24	65.0	9.0	65.0	854.0	301.0	10.5	10.6	4,80
25	51.0	21.0	22.0	939.0	305.0	6.24	10.4	13,90
26	58.0	76.0	28.0	850.0	165.0	6.8	10.2	6,50
27	68.0	44.0	38.0	436.0	220.0	6.8	9.7	4,00
28	78.0	141.0	131.0	234.0	146.0	4.8	10.2	3,80
29	90.0	35.0	46.0	466.0	205.0	5.6	10.4	2,80
30	78.0	98.0	65.0	877.0	178.0	8.3	11.0	4,60

EK-3: GLİKOJEN DEPO TİP 1 HASTALARININ TANIMLAYICI ÖZELLİKLERİ

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	VA (kg)	Boy (cm)	Tanı Yaşı	Tip	Akrabalık	Benzer Hastalık	Mutasyon
1	Erkek	20,00	56,00	165,00	10 yaş	1b	Yok	Yok	Mutasyon saptanmadı
2	Kız	4,00	13,50	84,00	5 ay	1a	Var	Yok	R83C/R83C
3	Kız	3,00	15,00	91,00	4 ay	1a	Var	Yok	R83C/R83C
4	Kız	11,00	34,00	130,00	4 ay	1a	Var	Yok	R83C/R83C
5	Erkek	9,00	33,00	122,00	6 ay	1a	Var	Yok	G188R/G188R
6	Erkek	5,50	28,00	118,00	3 ay	1a	Var	Yok	R83C/R83C
7	Erkek	3,00	21,00	92,00	6 ay	1a	Yok	Yok	R83C/R83C
8	Erkek	2,50	11,00	80,00	3 ay	1a	Var	Yok	R83C/R83C
9	Erkek	6,00	28,50	114,00	7 ay	1a	Var	Yok	R83C/R83C
10	Erkek	17,00	78,00	166,00	5 ay	1a	Var	Yok	R83C/R83C
11	Kız	6,00	17,60	98,00	6 ay	1a	Var	Var	G270V/G170V
12	Erkek	5,00	17,60	101,00	14 ay	1a	Yok	Var	R83C/?
13	Erkek	13,00	33,80	141,00	15 ay	1a	Yok	Yok	Mutasyon saptanmadı
14	Kız	5,00	17,10	105,50	8 ay	1a	Yok	Var	Mutasyon saptanmadı
15	Kız	7,00	25,00	113,00	24 ay	1a	Var	Yok	R83C/?
16	Erkek	2,00	11,10	76,00	5 ay	1a	Yok	Yok	R83C/R83C
17	Kız	1,50	11,00	73,00	3 ay	1a	Yok	Yok	R83C/?
18	Kız	4,00	14,00	90,00	4 ay	1a	Var	Var	R83C/R83C
19	Kız	18,00	12,00	80,00	4 ay	1a	Var	Yok	R83C/R83C
20	Erkek	8,00	18,00	103,00	6 yaş	1a	Var	Yok	R83C/?
21	Erkek	7,50	24,70	112,00	6 ay	1a	Var	Var	G270V/G270V
22	Kız	1,00	10,50	66,00	5 ay	1a	Var	Var	R83C/R83C
23	Kız	5,00	17,00	98,00	7 ay	1a	Var	Var	R83C/?
24	Erkek	,50	6,50	60,00	6 ay	1a	Yok	Yok	R83C/R83C
25	Erkek	6,00	32,00	105,00	6 ay	1b	Var	Yok	G339C/?
26	Kız	1,00	9,80	68,00	5 ay	1a	Var	Yok	R83C/R83C
27	Kız	2,50	13,00	81,00	10 ay	1a	Var	Var	W77R/W77R
28	Kız	6,50	19,00	105,00	6 ay	1b	Var	Yok	G339C/?
29	Erkek	2,50	12,50	86,00	1 ay	1a	Var	Var	R83C/R83C
30	Erkek	1,50	12,00	77,00	6 ay	1a	Var	Yok	R83C HOM

ÖZGEÇMİŞ

1. Ad Soyad: F. Tuba Eminoğlu

2. Doğum Tarihi: 02. 09.1976

3. Doğum Yeri: Adana

4. Öğrenim Durumu:

İlköğrenim : Mimar Kemal İlköğretim Okulu-Adana 1982-1987

Ortaöğrenim: 24 Kasım Ortaokulu -Adana 1987-1990

Özel Adana Fen Lisesi- Adana 1990-1993

Üniversite : Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi 1994-2000

Uzmanlık : Gazi Üniversitesi Çocuk Sağ.ve Hast. 2001-2005

5. Uzmanlık Tezi

Obez Çocuklarda Alkole Bağlı Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığında Leptin Ve
İnsülin Direncinin Rolü

6. Yayınlar

1. Sari S, Eminoğlu FT, Belen FB, Dalgıç B, Hasanoğlu A, Boyunağa OL, Köybaşıoğlu A. Congenital cricopharyngeal achalasia: a rare cause of dysphagia in an infant. Turk J Pediatr. 2007;49(2):193-5.
2. Eminoğlu TF, Camurdan OM, Oktar SO, Bideci A, Dalgıç B. Factors related to non-alcoholic fatty liver disease in obese children. Turk J Pediatr. 2007 Apr-Jun;49(2):193-5.
3. Eminoglu FT, Ozcelik AA, Okur I, Tumer L, Biberoglu G, Demir E, Hasanoglu A, Baumgartner MR. Methylocrotonyl-CoA carboxylase deficiency: phenotypic variability in a family. J Child Neurol. 2009;24(4):478-81.
4. Eminoglu TF, Tumer L, Okur I, Olgunturk R, Hasanoglu A, Gonul I, Dalgic B. Multisystem involvement in a patient due to accumulation of amylopectin-like material with diminished branching enzyme activity. J Inherit Metab Dis. 2008 Apr 4.
5. Eminoglu TF, Yenicesu I, Tumer L, Okur I, Dilsiz G, Hasanoglu A. Lipid apheresis applications in childhood: experience in the University Hospital of Gazi. Transfus Apher Sci. 2008 Dec;39(3):235-40.
6. Okur I, Tumer L, Crisponi L, Eminoglu FT, Chiappe F, Cinaz P, Yenicesu I, Hasanoglu A. Crisponi syndrome: a new case with additional features and new mutation in CRLF1. Am J Med Genet A. 2008 Dec 15;146A(24):3237-9.
7. Ezgu F, Hasanoglu A, Okur I, Biberoglu G, Tumer L, Eminoglu T, Dogan H. Rapid screening of 10 common mutations in Turkish Gaucher patients using electronic DNA microarray. Blood Cells Mol Dis. 2008 Mar-Apr;40(2):246-7.
8. F. Tuba Eminoğlu. Alev Hasanoğlu. Fenilketonüri Hastalarında Beslenme ve Diyet Tedavisi. Clinic Pediatri 2009;4(3):6-16.
9. Dr. Fatma Tuba Eminoğlu, Dr. Aysel Ünlüsoy, Dr. İlyas Okur, Dr. Leyla Tümer, Dr. Alev Hasanoğlu. Kreatin Eksikliği Sendromları. Türkiye Klinikleri J Pediatr 2008;17(2):110-4.
10. Dr. Fatma Tuba Eminoğlu, Dr. Aynur Küçükçongar, Dr. Fatma Burcu Yılmaz, Dr. Anıl Aktaş, Dr. Alev Hasanoğlu. D. Dokuz yaşında kız hastada Listeria Menenjitisi. Türkiye Klinikleri J Pediatr 2008;17(3):183-5.
11. Dr. Alev Hasanoğlu, Dr. F. Tuba Eminoğlu. Doruk Kemik Kütlesi ve Etkileyen Faktörler. Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci 2008;4(5):21-5.

12. Dr. İlyas Okur, Dr. Fatma Tuba Eminoğlu. Kalıtsal Metabolik Myopatiler. Türkiye Klinikleri J Pediatr 2009;18(2):95-104.
13. Aysel Ünlüsoy, Tuba Eminoğlu, Dr.İlyas Okur, Dr.Fatih S. Ezgü, Dr.Leyla Tümer, Dr.Gürsel Biberoğlu, Dr.Alev Hasanoğlu. Lizozomal Depo Hastalıklarında Prenatal tanı. The Journal of LSD 2008;1(1):77-8.
14. AG. Tayfun, A. Hasanoğlu, SF. Ezgü, L. Tümer, İ Okur, T. Eminoğlu, D. Yalçınkaya. Gaucher Hastalarında Genotipik ve Fenotipik Özelliklerin Araştırılması. The Journal of LSD 2008;1(1):74-6.
15. İ. Okur, K. Fidan, F.T. Eminoğlu, G. Biberoğlu, L. Tümer, O. Söylemezoğlu, A Hasanoğlu. Kronik Böbrek Yetmezliği Gelişen Fukosidozlu Bir Olgu Sunumu. The Journal of LSD 2008;1(1):72-3.
16. Serhat Koca, İlyas Okur, F. Tuba Eminoğlu, Fatih Ezgü, Leyla Tümer, Gürsel Biberoğlu, Alev Hasanoğlu. Mukopolisakkaridozlu Hastaların Klinik ve Laboratuvar Özellikleri. The Journal of LSD 2008;1(1):81-3.
17. F.B. Belen, A. Küçükçongar, S. Koca, İ. Okur, F.T. Eminoğlu, F.S. Ezgü. Tip 1 Gaucher Hastalarında Enzim Replasman Tedavisinin Hastaların Klinik ve Labotatuvar Bulguları ile Kemik Mineral Yoğunluğu Üzerine Etkisi. The Journal of LSD 2008;1(1):65-8.
18. F. Tuba Eminoğlu, Çiğdem Kasapkara, Gürsel Biberoğlu, İlyas Okur, Fatih Ezgü, Leyla Tümer, Alev Hasanoğlu. Fabry Hastalığında Renal Tutulum ve Aile Taramasının Önemi. The Journal of LSD 2008;1(1):69-71.