

T.C
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

**AKUT İNTERMITAN PORFİRİYALİ HASTALARDA
HİDROKSİMETİLBİLAN SENTAZ GEN MUTASYON ANALİZİ**

Metin UYANIK

Hv. Tbp. Bnb.

**TIBBİ BİYOKİMYA
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

ANKARA-2014

T.C
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

**AKUT İNTERMITAN PORFİRİYALİ HASTALARDA
HİDROKSİMETİLBİLAN SENTAZ GEN MUTASYON ANALİZİ**

Metin UYANIK
Hv.Tbp.Bnb.

Gühane Askeri Tıp Akademisi
Askeri Tıp Fakültesi'nin
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı
İçin Öngördüğü
TIPTA UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
İsmail KURT
Prof.Ecz.Alb

ANKARA-2014

Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi Dekanlığına:

'AKUT İNTERMİTAN PORFİRİYALİ HASTALARDA
HİDROKSİMETİLBİLAN SENTAZ GEN MUTASYON ANALİZİ' konulu bu
çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Uzmanlık Tezi
olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof.Ecz.Alb. İsmail KURT

Üye : Prof.Ecz.Alb. İsmail KURT (Bşk.)

Üye : Prof. Tbp.Alb. Taner ÖZGÜRTAŞ

Üye : Doç.Tbp.Alb. Osman Metin İPÇİOĞLU

Üye : Prof.Dz.Tbp.Alb. Halil YAMAN(Yedek Üye)

Hv.Tbp. Bnb. Metin UYANIK'ın 16 / Haziran / 2014 tarihinde
savunduğu bu tez Akademi Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri
tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Mustafa BAŞBOZKURT
Prof.Tbp.Tuğgeneral
GATA K.Bil.Yrd.,
Askeri Tıp Fakültesi Dekanı ve
Eğitim Hastanesi Baştabibi

TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyokimya A.D.uzmanlık eğitimim süresince eğitim ve öğretimimde büyük emeği olan, tez çalışmamda etkin bilgi ve deneyimini aktaran, her türlü konuda yol gösteren, yardımını esirgemeyen, desteğini her zaman hissettiğim eşsiz hocam ve tez danışmanım, Tıbbi Biyokimya A.D. Başkanı Prof. Ecz. Alb. İsmail KURT'a şükran ve saygılarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde büyük katkıları bulunan, diğer değerli hocalarım Em.Prof.Ecz.Alb. Şerif AKMAN'a, Em.Prof.Ecz.Alb. Cumhur BİLGİ'ye, Prof.Tbp.Alb.Taner ÖZGÜRTAŞ'a, Em.Doç.Dz.Tbp.Alb. MuhittinA. SERDAR'a, Prof.Dz.Tbp.Alb. Halil YAMAN'a, Doç.Tbp.Alb.Erdinç ÇAKIR'a, Doç.J.Tbp.Alb.Serkan TAPAN'a, Doç.Dz.Bnb.Emin Özgür AKGÜL'e, Doç.Tbp.Yb. Tuncer ÇAYCI'ya, Doç.Tbp.Bnb.Yasemin GÜLCAN KURT'a minnet ve şükranlarımı sunarım. Tıbbi Biyokimya uzmanları, Uzm.Tbp.Alb. Enver TURAN, Uzm.Ecz.J.Alb. Zafer AKSU, Uzm.Hv.Tbp.Yzb. Özlem ÖZTÜRK, Uzm.J.Tbp.Yzb. Fevzi Nuri AYDIN, Uzm.J.Tbp.Yzb. Erdim SERTOĞLU ve Uzm.Tbp.Yzb.Mehmet AĞILLI'ya yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Birlikte çalışmaktan zevk duyduğum asistan arkadaşlarım Tbp.Yzb.İrfan ŞENER, Tbp.Ütğm. Fatih YEŞİLDAL, Tbp.Bnb.Tevfik HONCA, Tbp. Ütğm.Ahmet TAŞ'a ve Tbp.Ütğm.Reşad AZİZOV'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen Prof.Dr.Fatih Süheyl EZGÜ ve Tbp.Yzb.Deniz TORUN'a çok teşekkür ederim. Beraber çalışmaktan her zaman zevk duyduğum Tıbbi Biyokimya Laboratuvarları'nda çalışan tüm personele ilgi ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde hiçbir fedakarlıktan kaçınmayarak yanımda olan annem, babam ve desteğini benden esirgemeyen sevgili eşim Cemile UYANIK ve canım oğullarım Oğuz Efe ve Metehan'a sonsuz sevgilerimi sunarım.

Dr. Metin UYANIK

ÖZET

Akut İntermitan Porfiriyalı Hastalarda Hidroksimetilbilan Sentaz Gen Mutasyon Analizi

Porfirin bozuklukları(porfiriyalar), “hem” biyosentez yolundaki enzimlerin kalıtsal eksikliklerinden(primer) veya edinsel inhibisyonundan (sekonder) kaynaklanan bir hastalık grubudur. Akut İntermitan Porfiriya(AİP), hidroksimetilbilan sentaz(HMBS) gen mutasyonlarının yol açtığı, otozomal dominant kalıtım gösteren, dünyada en sık görülen akut hepatik porfiriya tipidir. Nadir rastlanan bir hastalık olsa da, atak sırasında kimi zaman ölümcül olabilmektedir. Bu hastalıktaki anahtar nokta, atak gelişmemesi için önlem almaktır. Bu çalışmada ülkemizde, bugüne değin klinik ve biyokimyasal olarak tanı konmuş, ulaşabildiğimiz tüm AİP hastalarında HMBS gen mutasyon analizini yaparak tanılarının kesinleştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bu hastaların ulaşılabilen birinci dereceden akrabalarında mutasyon taraması yapılarak presemptomatik AİP taşıyıcı bireylerin saptanması ve etkilenen bireylere yaşamı tehdit edebilen akut ataklara karşı presipitan faktörlerden uzak kalmaları konusunda danışmanlık verilmesi hedeflenmiştir.

13’i AİP hastası ve semptomu olmayan 15 akraba olmak üzere toplamda 28 birey çalışmaya dahil edildi.

13 AİP hastasının HMBS gen mutasyon analizi sonucu daha önceden rapor edilmiş 4 adet mutasyonla(c.89T>G, c.517C>T, c.1028T>C, c.913-2A>G) karşılaştırıldı. Hasta akrabalarından 15 bireyin taranması sonucu 4 aileden 5 latent AİP taşıyıcısı saptanmıştır.

Bu çalışma, ülkemizdeki AİP hastalarının mutasyon tiplerinin belirlenmesine yönelik ilk çalışmadır. Bu çalışmadan elde edilen deneyimler, Gülhane Porfirin Laboratuvarı’nda biyokimyasal tanı testleri yanında moleküler tanı testleri hizmetinin verilmesi açısından altyapı oluşturacaktır.

Anahtar Kelimeler : Akut İntermitan Porfiriya, Hidroksimetilbilan sentaz, DNA mutasyon analizi, Porfirin, Porfobilinojen

Yazar adı: Hv.Tbp.Bnb.Metin UYANIK

Danışman:Prof.Ecz.Alb.İsmail KURT

ABSTRACT

Hydroxymethylbilane Synthase Gene Mutation Analysis in Acute Intermittent Porphyria Patients

Porphyrin disorders (porphyrias), are a group of diseases, each caused by inherited deficiencies (primary) or acquired inhibition (secondary) of enzymes in the heme biosynthesis process. Acute intermittent porphyria (AIP) is an autosomal dominant inherited disease caused by a decreased activity of hydroxymethylbilane synthase (HMBS), which is a result of mutation in HMBS gene. It is the most common type of acute hepatic porphyria in the world. Although it's a rare disease, if the attack goes untreated or unrecognized, it may be fatal. The key point for AIP is to avoid precipitating factors to prevent attacks. We aimed to identify HMBS gene mutations in all clinically and biochemically diagnosed AIP patients which we could detect to date in this study and scan their first-degree relatives to provide an early diagnosis of presymptomatic AIP carriers.

A total of 28 individuals, 13 diagnosed with AIP and 15 symptom-free relatives were included in the current study.

Molecular analyses of the HMBS gene in 13 AIP patients revealed 4 previously reported mutations (c.89T>G, c.517C>T, c.1028T>C, c.913-2A>G). Molecular genetic examination of 15 relatives of AIP patients from 4 families revealed 5 latent carriers of the disease.

This is the first study to determine the types of mutations of AIP patients in Turkey. Besides the biochemical diagnostic tests, this will be starting point for the molecular diagnostic tests in Gulhane Porphyrin Laboratory.

Keywords : Acute Intermittent Porphyria, Hydroxymethylbilane synthase, DNA mutation analysis, Porphyrin, Porphobilinogen

Author : Metin UYANIK, MD

Counselor : Ismail Kurt, Professor of Biochemistry

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Porfirinlerin Yapısı ve Özellikleri.....	2
2.2 Porfirinlerin Biyolojik Fonksiyonları.....	4
2.3. Porfirin ve Hem Biyosentezi.....	4
2.4. Porfirin Bozuklukları.....	11
2.4.1. Akut Hepatik Porfiriya.....	15
2.4.1.1. Genel Bilgiler.....	15
2.4.1.2. Akut Atakların Patogenezi.....	15
2.4.1.3. Klinik Bulgular.....	17
2.4.1.4. Atağı Tetikleyen Faktörler.....	19
2.4.1.5. Ne Zaman Akut Porfirik Ataktan Şüphelenmeliyiz?....	21
2.4.1.6. Akut Atak Tanısı.....	22
2.4.1.6.1. Biyokimyasal Başlangıç Testleri.....	22
2.4.1.6.2. Akut Porfiriya Tipinin Biyokimyasal Doğrulanması.....	26
2.4.1.6.3. Enzim Aktivite ve DNA Testleri.....	27
2.4.1.7. Akut Atakların Tedavisi.....	31
2.4.1.8. Takip ve Korunma Önerileri.....	32
2.4.1.9. Akut İntermitant Porfiriya, HMBS Geni ve Moleküler Analiz Teknikleri.....	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	38

3.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler.....	38
3.3. Hastaların Seçimi ve Örnek Toplanması.....	40
3.4. Kullanılan Biyokimyasal Testler	41
3.4.1. İdrar ALA/PBG Tayini.....	41
3.4.2. İdrar Total Porfirin(İTP) Analizi	42
3.4.3. Plazma Emisyon Tarama ve Plazma Total Porfirin(PTP) Analizi.....	42
3.4.4. Tam Kan Total Porfirin Analizi.....	43
3.4.5. Porfirin Fraksiyonasyon Testleri.....	43
3.4.6. Eritrosit HMBS Enzim Aktivite Analizi.....	44
3.4.7. İdrar Kreatinin Seviyelerinin Ölçümü	44
3.5. Moleküler Testler (HMBS Gen Mutasyon Analizi)	44
3.5.1. DNA Ekstraksiyonu	44
3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR) ve DNA Dizi analizi ...	45
4. BULGULAR	48
4.1. Biyokimyasal Porfirin Test Sonuçları.....	48
4.2. HMBS Gen Mutasyon Analiz Sonuçları	54
5. TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
7. KAYNAKLAR	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP	ALA-Dehidrataz Eksik Porfiriya
AİP	Akut İntermitan Porfiriya
ALA	5-Aminolevulinik asit
ALAD	ALA dehidrataz
ALAS1 ve ALAS2	Aminolevulinik asit sentaz 1 ve 2
CEP	Konjenital Eritropoetik Porfiriya
CPOX	Koproporfirinojen Oksidaz
HMB	Hidroksimetilbilan
HMBS	Hidroksimetilbilan Sentaz (PBG Deaminaz)
EPP	Eritropoetik Protoporfiriya
FDA	Food and Drug Administration
HCP	Hereditör Koproporfiriya
kp	Kilo baz çifti (kilo base pairs)
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
PBG	Porfobilinojen
PBS	Fosfat Buffer Salın
PCR	Polimeraz Chain Reaction(Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PCT	Porfiriya Kutanea Tarda
PGC1- α	Peroksizom proliferatör-aktive reseptör- γ koaktivatör 1 α
UROS	Üroporfirinojen Sentaz
VP	Variegate Porfiriya
ZPP	Çinko-protoporfirin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 Porfirin yapısı.....	2
Şekil 2 “Hem” biyosentezi.....	7
Şekil 3 Karaciğer ve kemik iliğinde “hem” biyosentezinin regülasyonu	9
Şekil 4 Porfiriya'nın genel klinik özellikleri	13
Şekil 5 Akut Porfiriya düşünülen hasta için önerilen tanı algoritması.	25
Şekil 6 Otozomal dominant kalıtım	30
Şekil 7 HMBS geni	36
Şekil 8 ALA/PBG çift kolon spektrofotometrik test kiti.....	42
Şekil 9 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	43
Şekil 10 Invitrogen Iprep® izolasyon sistemi ve NanoDrop® 1000 spektrofotometre	45
Şekil 11 Geneamp®9700 PCR cihazı ve Applied Biosystems® 3500xl genetik analizörü.....	47
Şekil 12 Trace PBG kitine ait örnek sonuçlar.	48
Şekil 13 10 numaralı hastaya ait plazma floresan emisyon tarama sonucu	51
Şekil 14 1 numaralı hastaya ait plazma floresan emisyon tarama sonucu	51
Şekil 15 3 numaralı hastaya ait idrar porfirin fraksiyonasyon sonucu	53
Şekil 16 Sağlıklı kontrol örneğine ait idrar porfirin fraksiyonasyon sonucu	53
Şekil 17 1,2,3 numaralı hastalar(sırasıyla anne, kızı ve yeğeni) ve 4,5 numaralı hastaları(sırasıyla kızı ve babası) içeren ilk iki aileye ait pedigrî tablosu	55
Şekil 18 Sekans analizöründen elde edilen piklere ait bir örnek.....	56
Şekil 19 5 numaralı hastanın elektroferogramı:c.517C>T (p. R173W)	57

Tablo 5 Akut porfiriyalarda kullanımı güvenli ve güvenli kabul edilmeyen ilaçlardan bazıları

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1 “Hem” içeren proteinler ve işlevleri	4
Tablo 2 İnsan “hem” biyosentez yolağı enzim ve genleri	6
Tablo 3 Porfiriya: Majör klinik ve laboratuvar karakteristikleri	14
Tablo 4 Akut Porfiriya'nın sık görülen belirti ve bulguları	18
Tablo 5 Akut porfiriyalarda kullanımı güvenli ve güvenli kabul edilmeyen ilaçlardan bazıları	20
Tablo 6 Artmış idrar PBG saptanmasında kullanılan kalitatif metodlar*	23
Tablo 7 HMBS geni egzon ve egzon-intron komşuluklarının amplifikasyonu ve dizi analizi için kullanılan ve bu çalışma için özel olarak düzenlenen primer çiftleri	46
Tablo 8 Biyokimyasal olarak tanısı konmuş 13 hastaya ait porfirin test sonuçları	50
Tablo 9 AİP hastalarına ait HMBS gen mutasyon analiz sonuçları	54

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Porfirin bozuklukları(porfiriyalar), “hem” biyosentez yolundaki enzimlerin kalıtsal eksikliklerinden (primer) veya edinsel inhibisyonundan (sekonder) kaynaklanan bir hastalık grubudur. “Hem” biyosentez yolundaki enzimlerden birinin aktivitesindeki azalma özgün porfirinlerin ve/veya ön maddelerinin aşırı üretilmesi, dokularda birikmesi ve atılımı ile karakterizedir.

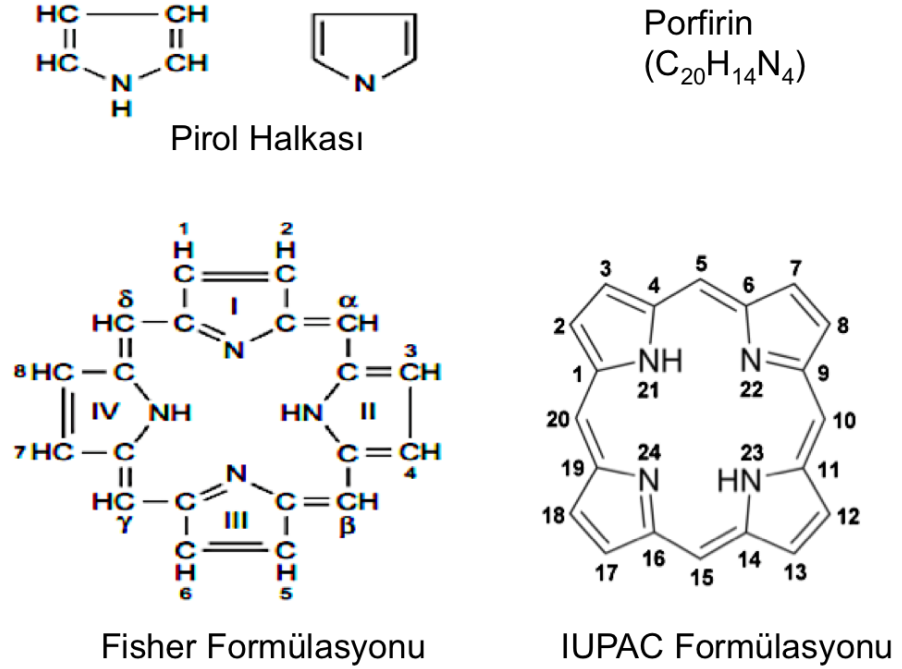
Akut İntermitan Porfiriya(AİP), hidroksimetilbilan sentaz(HMBS) gen mutasyonlarının yol açtığı, dünyada en sık görülen akut hepatik porfiriya tipidir. Nadir rastlanan bir hastalık olsa da, atak sırasında kimi zaman ölümcül olabilmektedir. Hastaların mutasyonu taşıyan asemptomatik akrabalarının da atak geçirmeden tanınması, bunlara klinik ve genetik danışmanlık verilmesi önem arz etmektedir. Bu hastalıktaki anahtar nokta, atak gelişmemesi için önlem almaktır. Zira bu hastalarda atağı tetikleyen faktörlerden kaçınılarak (güvenli olarak tanımlanan ilaçların kullanması, uygun seviyelerde oral karbohidrat alınması, güvenilir olmadığı kanıtlanan ilaçlar, açlık, stres, sigara ve alkolden uzak durulması gibi önlemlerle) akut atak önlenabilir. Enzim ölçümlerinin belirsiz sonuçlar verdiği taşıyıcı bireylerin saptanması ve hastaların ailelerinde tarama yapılması için en güvenilir yöntem, spesifik HMBS gen mutasyonunun tanımlanmasıdır. Her ne kadar mutasyon varlığı o bireyde %100 akut atağın gelişeceğini işaret etmese de, çalışmamız sayesinde asemptomatik olup da mutasyon taşıyan risk altındaki aile üyeleri tespit edilebilecektir.

Bu çalışmada ülkemizde ilk kez, bugüne değin klinik ve biyokimyasal olarak tanı konmuş, ulaşabildiğimiz tüm AİP hastalarında HMBS gen mutasyon analizini yaparak tanılarının kesinleştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bu hastaların ulaşılabilen birinci dereceden akrabalarında mutasyon taraması yapılarak presemptomatik AİP taşıyıcılarının saptanması ve etkilenen bireylere akut ataklara karşı presipitan faktörlerden uzak kalmaları konusunda danışmanlık verilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca bu çalışma, Gülhane Porfirin laboratuvarında biyokimyasal tanı testleri yanında moleküler tanı hizmeti verilmesi çalışmaları için bir başlangıç olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Porfirinlerin Yapısı ve Özellikleri

Porfirinler, birbirlerine metenil (=CH-) köprüleri ile bağlı 4 pirol (tetra pirol) halkasından oluşan siklik yapılardır. Porfirin ifadesi yunanca mor anlamına gelen porphyrā kökünden gelmektedir.



Şekil 1 Porfirin yapısı

Porfirin halka sistemi iki ayrı formülasyonla gösterilmektedir. Fisher formülasyonu adı verilen formülasyonda; pirol halkaları romen rakamları (I,II,III,IV) veya harflerle (A,B,C,D) gösterilirken, pirol halkalarını birbirine bağlayan metenil köprülerindeki karbon atomları ise α , β , λ , δ şeklinde gösterilmektedir. Bu formülasyondaki temel yapı porfindir. IUPAC (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği) formülasyonunda ise temel yapı porfirindir ve 1'den 24'e kadar numaralandırılmıştır (Şekil 1).

Porfirin halka sistemindeki pirol halkalarına çeşitli yan zincirlerin eklenmesiyle farklı porfirin halka sistemleri oluşur. Porfirin halka sisteminde bulunabilen yan zincirler veya takılar şunlardır:

A=Asetat	(-CH ₂ -COOH)
P =Propiyonat	(-CH ₂ -CH ₂ -COOH)
H= Hidrojen	(-H)
M= Metil	(-CH ₃)
E= Etil	(-CH ₂ -CH ₃)
V=Vinil	(-CH =CH ₂)

Bu yan zincirler, pirol halkalarının köşelerinde yer alırlar ve yan zincirlerin diziliş sırasına göre 4 farklı porfirin izomeri oluşur ki, doğada en çok tip I ve tip III izomerleri bulunur. Porfirinlerdeki yan grupların dizilimi simetrik olduğu takdirde Tip I; asimetrik olduğu takdirde Tip III izomerleri oluşur. Tip III izomerler metabolizmanın doğal ürünü iken, tip I izomerler enzim eksikliklerinde oluşurlar ve genelde fonksiyonları yoktur. Porfirinler, porfirin halka sistemini oluşturan pirol halkalarına bağlı yan grupların türüne göre isimlendirilir ve sınıflandırılırlar. Bu sınıflandırmaya göre 3 ana porfirin türü ve taşıdıkları yan gruplar;

Uroporfirin	(URO)	: 4 propiyonat + 4 asetat
Koproporfirin	(KOPRO)	: 4 propiyonat
Protoporfirin	(PROTO)	: 2 propiyonat

Porfirinlerin tetrapirrol halkasındaki çok sayıda konjuge çift bağdan dolayı kristal formları ve derişik çözeltileri koyu kırmızı ve mor renklidir. Porfirinlerin karakteristik absorpsiyon spektrumu vardır ve %5'lik hidroklorik asitteki bir porfirin çözeltisi 400 nm civarında keskin absorpsiyon bandı verir. Bu, porfirin halkasına has bir özelliktir ve taşınan yan zincire bakılmaksızın bütün porfirinler için karakteristiktir. Bu banda, bulucusunun adından dolayı Soret bandı adı verilir.

Porfirinler aynı zamanda floresans veren moleküllerdir. Kuvvetli mineral asit veya organik çözücüler içinde çözümlenip ultraviyole ışıkla

aydınlatıldığında kuvvetli kırmızı floresans verirler. Porfirinlerde pirol halkalarını birbirine bağlayan çift bağlar, bu bileşiklerin karakteristik floresansından sorumludur ve bu çift bağlar porfirinojenlerde bulunmaz.

2.2 Porfirinlerin Biyolojik Fonksiyonları

Porfirin halkasının ortasında 4 azot atomunun bulunması, metal iyonlarının buraya bağlanmasını sağlar. Fe, Mg, Co, Zn, Ni, Cu gibi metal iyonlarının bağlanmasıyla metalporfirinler olarak tanımlanan porfirin bileşikleri oluşur. “Hem” Fe içeren metalporfirindir ve birçok proteine bağlı prostetik grup olarak görev yapar (Tablo 1).

Tablo 1 “Hem” içeren proteinler ve işlevleri

Protein	İşlevi
Hemoglobin	Kanda oksijen taşınması
Miyoglobin	Kasta oksijen depolanması
Sitokrom c	Elektron taşıma zincirine katılım
Sitokrom P450	Ksenobiyotiklerin hidrosillenmesi
Katalaz	Hidrojen peroksit yıkımı
Triptofan pirolaz	Triptofanın oksidasyonu

2.3. Porfirin ve Hem Biosentezi

“Hem” biosentezinde glisin ve süksinil Ko-A'dan “hem” oluşumuna kadar 8 enzimatik basamak yer alır[1]. İlk basamak ve son üç basamak hücre mitokondrisinde, kalan dördü ise sitozolde gerçekleşir ve bütün enzimatik basamaklar tek yönlüdür (Şekil 2). Bu basamaklarda yer alan sekiz enzim 9 gen tarafından kodlanır. Yolağın ilk enzimi olan 5-Aminolevulinik asit (ALA) sentaz, non-spesifik (non-eritroid) ve eritroid-spesifik izoenzimleri kodlayan ve sırasıyla aminolevulinik asit sentaz 1(ALAS1) ve 2(ALAS2) olarak adlandırılan 2 farklı gen bölgesine sahiptir. İki, üç ve dördüncü enzimlerde(ALA dehidrataz(ALAD), hidrosimetilbilan sentaz(HMBS),

üroporfirinojen sentaz(UROS)) de benzer formlar olmasına rağmen, bu bölgeler aynı genler üzerindedir, yani çift promotor bölgeye sahiptirler(Tablo 2). Bu, karaciğer ve eritrositlerde farklı “hem” ihtiyacına göre sentez hızının regülasyonunu sağlar.

Enzimleri kodlayan 9 genin hepsi klonlanmış, yapıları belirlenmiş ve porfiriyaya yol açan birçok mutasyon tanımlanmıştır[2].Ayrıca, hastalığın hayvan modelleri de üretilmiştir.

Şekil 2’de görüldüğü gibi “hem” biyosentez yolunun ara metabolitleri olan 5-Aminolevulinik asit(ALA) ve porfobilinojen (PBG) ve çoğunlukla indirgenmiş formda olan diğer porfirinler (porfirinojenler), porfirin ön maddeleri (prekürsörleri) olarak da tanımlanırlar. Fizyolojik koşullarda düzenleyici sıkı kontrol mekanizmaları sayesinde bu moleküller önemli oranlarda birikmezler.

“Hem” biyosentezinde temel ön madde, glisin amino asididir. Sentez için kullanılan ikinci başlangıç ham maddesi ise, mitokondrideki sitrik asit döngüsünde oluşan süksinil-KoA’dır. Bu tepkime piridoksal fosfata ihtiyaç duyar. Süksinil-KoA ile glisin arasındaki kondansasyon tepkimesinin ürünü, ALA vermek üzere hızla dekarboksile edilen α -amino- β -ketoadipik asittir. Bu tepkime, hız kısıtlayıcı ve ilk enzim olan ALA sentaz tarafından katalizlenir.

Tablo 2 İnsan “hem” biyosentez yolağı enzim ve genleri
(Tablo Balwani ve Desnick'in derlemesinden modifiye edilmiştir [3].)

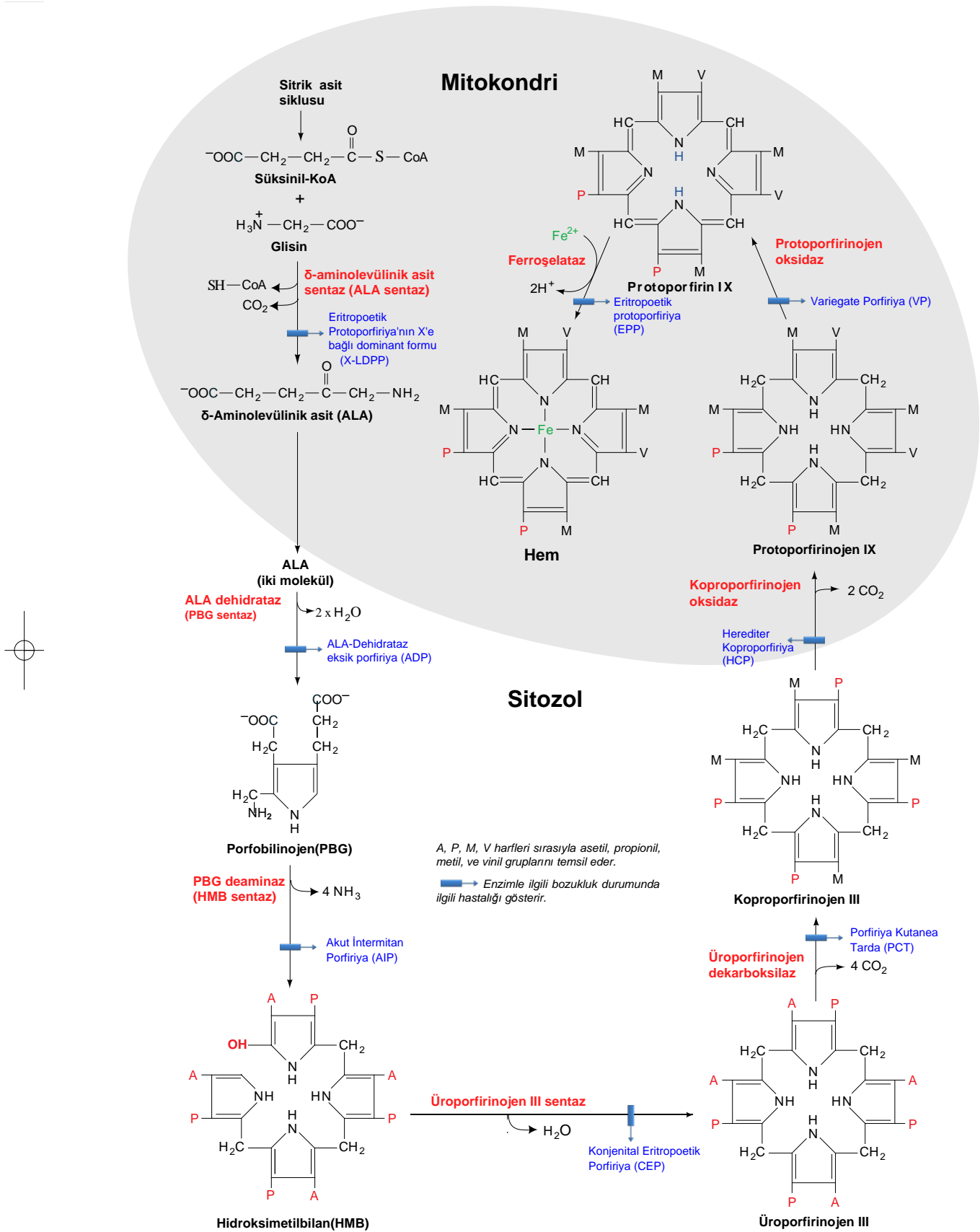
Enzim	Gen sembolü	Kromozomal yerleşim	cDNA, baz çifti	Gen		Protein, amino asit	Subsellüler yerleşim†	Bilinen mutasyonlar‡
				Boyut, kb	Ekzonlar*			
ALA sentaz								
Non-spesifik	<i>ALAS1</i>	3p21.1	2199	17	11	640	M	0
Eritroid-spesifik	<i>ALAS2</i>	Xp11.2	1937	22	11	587	M	62
ALA dehidrataz								
Non-spesifik	<i>ALAD</i>	9q32	1149	15.9	12 (1A + 2-12)	330	S	12
Eritroid-spesifik	<i>ALAD</i>	9q32	1154	15.9	12 (1B + 2-12)	330	S	0
HMB Sentaz								
Non-spesifik	<i>HMBS</i>	11q23.3	1086	11	15 (1 + 3-15)	361	S	374
Eritroid-spesifik	<i>HMBS</i>	11q23.3	1035	11	15 (2-15)	344	S	2
Üroporfirinojen sentaz								
Non-spesifik	<i>UROS</i>	10q26.2	1296	34	10 (1 + 2B-10)	265	S	35
Eritroid-spesifik	<i>UROS</i>	10q26.2	1216	34	10 (2A + 2B-10)	265	S	4
Üroporfirinojen dekarboksilaz								
	<i>UROD</i>	1p34.1	1104	3	10	367	S	109
Koproporfirinojen oksidaz								
	<i>CPOX</i>	3q12.1	1062	14	7	354	M	64
Protoporfirinojen Oksidaz								
	<i>PPOX</i>	1q23.3	1431	5.5	13	477	M	166
Ferroşelataz								
	<i>FECH</i>	18q21.31	1269	45	11	423	M	138

ALAS2: Ekzon 1-11'de X-bağımlı sideroblastik anemiye yol açan 60 adet fonksiyon kaybı mutasyonu ve X-LDPP yol açan 2 fonksiyon kazanım mutasyonu tanımlanmıştır.

*Ekzon sayıları (ayrı olarak non-spesifikve eritroid spesifik izoformlar parantez içinde belirtilmiştir)

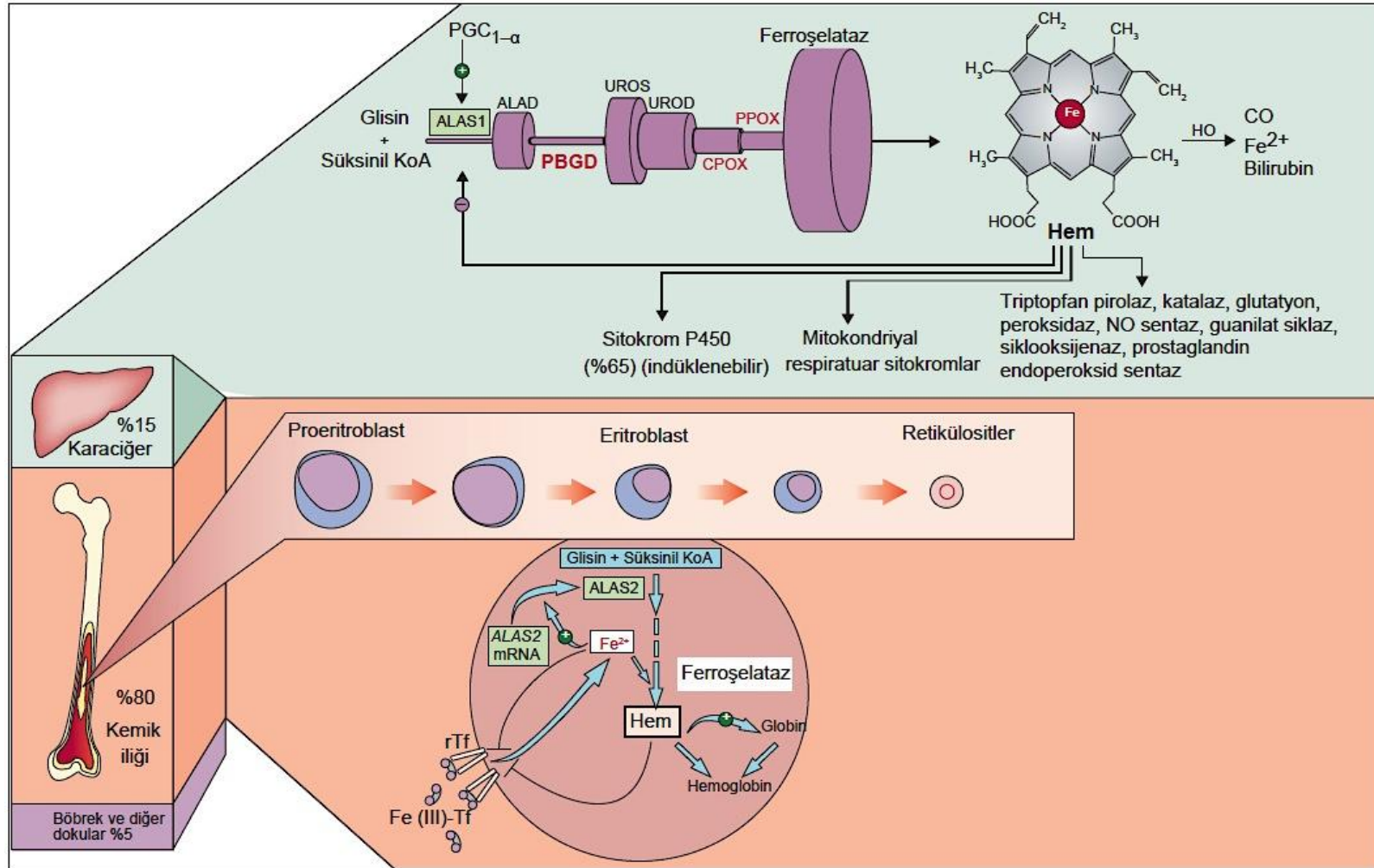
†M mitokondriyi; S ise sitoplazmayı işaret eder.

‡İnsan Gen Mutasyon Veritabanı'nda (Human Gene Mutation Database (www.hgmd.org)) 1 Mayıs 2012 itibari ile bilinen mutasyon sayısı.



Şekil 2 "Hem" biyosentezi

İkincisi (ALAS2) ise eritroid-spesifik izoformudur ve eritroid hücrelerde eksprese edilir. Eritroid izoform olan ALAS2'nin "hem" tarafından regülasyonu yoktur. Eritroid "hem" biyosentezi vücuttaki demir durumuna göre düzenlenir. Demir varlığı, eritroid-spesifik ALAS2 mRNA translasyonunu düzenleyerek eritroid "hem" biyosentezini regüle eder. Böylece ALAS2, demirin ferroşelataz katalizörlüğünde protoporfirin içine bağlanmasına yardımcı olur[4]. ALAS2 mRNA translasyonu, ALAS2 mRNA'nın 5' bölgesindeki "demir cevap elementine" demir düzenleyici proteinlerin bağlanması ile düzenlenir. Bağlanma gerçekleştiğinde translasyon inhibe olur ve bağlanma aktivitesi demir tarafından regüle edilir. Kısaca demir eksikliğinde translasyon down-regüle, demir fazlalığında ise up-regüle olur. Hemoglobin sentezi için çok fazla "hem" ihtiyacı nedeniyle, eritroid-spesifik ALAS2 geni (hepatik veya non-spesifik enzime oranla) 30 kat daha fazla eksprese edilir. Eritroid farklılaşma sırasında yolaktaki diğer enzim aktiviteleri artabilir. Eritroid ALAS2'deki fonksiyon kaybına yol açan mutasyonlar X-bağımlı sideroblastik anemiye[5], ALAS2'nin son ekzonunda fonksiyon artırıcı mutasyonlar ise X-bağımlı eritropoetik protoporfiriya'ya (X-LDPP) neden olur[6]. "Hem" biyosentez yolunun regülasyonu Şekil 3'de özetlenmiştir.



Şekil 3 Karaciğer ve kemik iliğinde “hem” biyosentezinin regülasyonu

(Şekil Puy ve arkadaşlarının derlemesinden modifiye edilmiştir[1]. PGC1-α:peroksizom proliferatör-aktif reseptör-γ koaktivatör 1α. ALA: 5-aminolevülinik asit. ALAS1:ALA sentaz 1. ALAD:ALA dehidrataz. PBGD:porfobilinojen deaminaz. UROS:Üroporfirinojen sentaz. UROD:Üroporfirinojen dekarboksilaz. CPOX:koproporfirinojen oksidaz. PPOX:protoporfirinojen oksidaz. NO:nitrik oksit. HO:hem oksijenaz. CO:karbon monoksit. Fe²⁺:ferröz demir. Tf:transferrin. rTf:transferrin reseptör. mRNA:messenger RNA.

Mitokondride oluşan ALA, sitozole geçerek diğer bir ALA molekülü ile ALA dehidrataz (ALAD) enzimi tarafından kondanse edilir. İki molekül su çıkışı ile birlikte PBG oluşur. PBG monopirrol yapıdadır. ALA-dehidrataz 8 özdeş subünite sahip, çinko ve sülfidril grupları içeren bir enzimdir ve kurşun tarafından inhibisyona duyarlıdır.

Porfirin oluşumu 4 molekül PBG'nin kondensasyonu ile meydana gelir. Oluşan molekül çizgisel bir tetrapirrol olan hidroksimetilbilandır. Bu tepkime diğer adları üroporfirinojen I sentaz, PBG deaminaz olan hidroksimetilbilan sentaz (HMBS) enzimi tarafından katalizlenir. Hidroksimetilbilanın büyük bir kısmı, üroporfirinojen III kosentazın katalizlediği bir enzimatik yolla üroporfirinojen III'e çevrilirken az bir kısmı, üroporfirinojen I vermek üzere kendiliğinden halka oluşturur. Üroporfirinojen I daha sonra kısmi dekarboksilasyona uğrayarak koproporfirinojen I'e dönüşür ve idrar veya hepatobiliyer yolla atılır.

Normal koşullarda, oluşan üroporfirinojenin tamamı tip III izomerdir. Fakat bazı porfiriyalarda porfirinojenlerin tip I izomerleri aşırı miktarda üretilir. Bu bileşikler, bütün porfirinojenler gibi renksizdirler ve renkli porfirinlere kolayca otookside olurlar. Üroporfirinojen III, asetat gruplarının tümünü, metil yan zincirlerine dönüştüren dekarboksilasyon sonucu, koproporfirinojen III'e çevrilir. Bu tepkime, üroporfirinojen I'i de koproporfirinojen I'e çevirebilen üroporfirinojen dekarboksilaz tarafından katalizlenir.

Koproporfirinojen III daha sonra mitokondriye geçerek burada koproporfirinojen oksidaz ile protoporfirinojen III (protoporfirinojen-IX)'e dönüşür. Bu tepkime ile koproporfirinojenin birinci ve ikinci pirol halkalarındaki propiyonat CO₂ kaybederek vinil yan grubuna dönüşür. Protoporfirinojen-IX ise mitokondri içinde bulunan protoporfirinojen oksidaz enzimi ile 6H⁺ iyonunu kaybederek protoporfirin-IX (PPIX)'a çevrilir. "Hem" sentezinde son basamak ise Fe⁺²'nin bir diğer mitokondriyal enzim olan ferroşelataz enzimi tarafından katalizlenen bir tepkime ile, protoporfirin yapısı içine sokulmasıdır. Ortamda yeterince Fe⁺² bulunmazsa yerine başka bir +2

değerlikli metal olan Zn^{+2} girebilmekte ve Zn-protoporfirin (ZPP) oluşmaktadır.

“Hem” biyosentezi mitokondri içermeyen olgun alyuvarlar dışında tüm memeli hücrelerinde görülmektedir. İnsandaki günlük biyosentezin yaklaşık %80’i, kemik iliğinde eritroid öncül hücrelerinde; kalanının büyük kısmı ise hepatositlerde, çoğunlukla sitokrom p450 enzim sentezi için gerçekleşir.

2.4. Porfirin Bozuklukları

Porfiriya olarak bilinen porfirin bozuklukları, hem biyosentez yolundaki spesifik enzimlerin bozukluğu sonucu bazı ara ürünlerin kan ve dokularda aşırı birikimine yol açan, doğumsal bir grup hastalıktır[7].

İlk defa 1889 yılında Hollandalı Dr.Stokvis tarafından akut porfiriya tanımlaması yapılmıştır. 1930 senesinde Alman kimyager Hans Fischer “hem”, klorofil, safra pigmentleri ve bunların türediği pirol kimyası üzerine yaptığı çalışmalar nedeniyle Nobel Kimya Ödülü almıştır. Bunları kanı kırmızı, çimeni yeşil yapan şifre olarak tanımlamıştır. 1937 yılında, İsveçli Waldenström belirli bir tip porfiriya üzerine, esas olarak akut intermitan porfiriya (AIP) üzerine bulgularını yayınlamıştır. 1960’larda bilinen tüm porfiriya tipleri tanımlanmış ve çevresel faktörlerin hastalığı etkilediği gösterilmiştir[8].

Dünya üzerinde en sık rastlanan porfiriya olan ve genellikle sporadik gözlenen Porfiriya Kutanea Tarda(PCT) dışındaki tüm porfirin bozuklukları otozomal dominant, otozomal resesif, veya X’e bağlı Mendeliyan kalıtım paterni gösterirler. Porfiriyalarda özellikle çevresel, fizyolojik ve genetik faktörler normalde sıkı bir şekilde kontrol altında tutulan hem biyosentezini değiştirmek için etkileşim içine girerek hastalığa neden olabilmektedirler.

Çoğu hekim tarafından porfiriya kafa karıştırıcı, kompleks ve tanı koyması zor bulunduğundan, dahiliye, hematoloji, dermatoloji, gastroentoloji

endokrin/metabolizma, pediatri, genetik ve biyokimya gibi uzmanlık dalları sıklıkla tanı ve tedavi sürecine katılırlar.

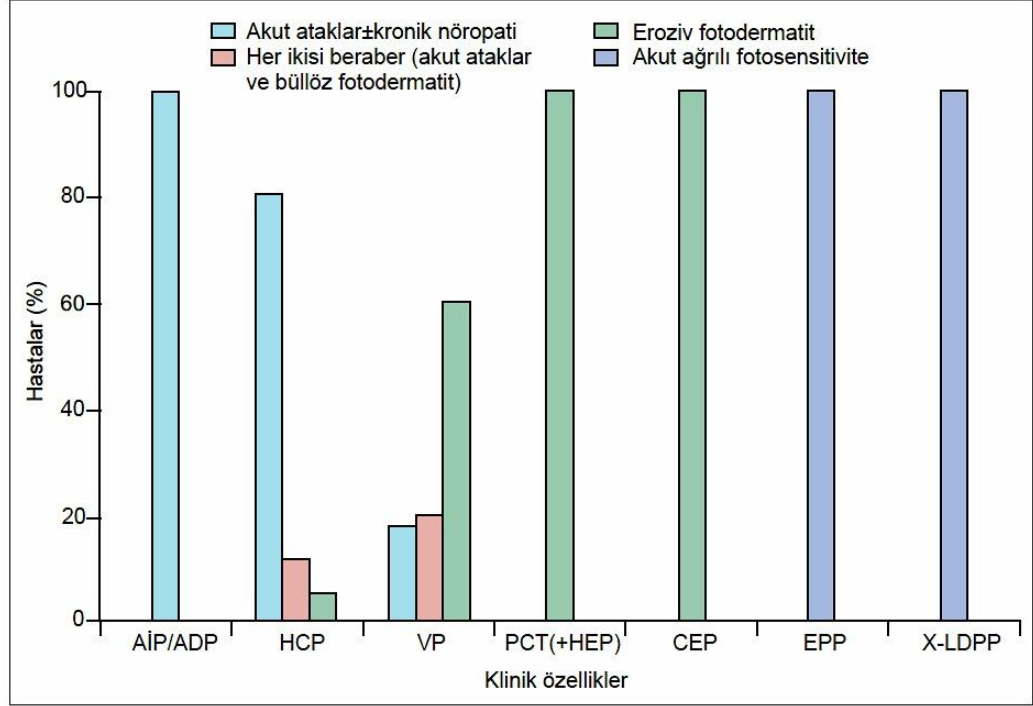
Porfiriya ile ilgili çalışmalar oldukça eskiye dayanır. İngiltere kralı III.George'un porfiriya variegata hastası olduğu, bu yüzden şatoda ara ara inzivaya çekildiği bilinmektedir.

Porfirin bozukluklarının ülkemizdeki önemi 1955'den itibaren artmıştır. Bu tarihlerde "Türk porfiriya" olarak anılan epidemik sekonder porfiriya kutanea tarda vakaları ortaya çıkmıştır. Bu vakalar Diyarbakır ve çevresinde "Tilitia tirici" isimli zararlı bir mantarın buğdaylara zarar vermesinin önlenmesi amacıyla, heksaklorobenzen ile ilaçlanması sonrası, bu buğdaylarla yapılan ekmeklerin tüketilmesi sonucu ortaya çıkmıştır. Bu buğdaylarla üretilen ekmekleri tüketen çocuklarda yüzde kararma ve kılınma ile kendini gösteren PCT semptomları ortaya çıkmıştır. Bu çocukların idrarları UV ışık altında incelendiğinde kırmızı ve parlak görülmüştür. Yaklaşık 3000 çocuk bu durumdan etkilenmiş ve bu çocukların %10'u kaybedilmiştir. Yapılan araştırmalar heksaklorobenzen ile porfiriya arasında ilişki olduğunu göstermiştir[9].

Hepatik porfiriya ALA ve PBG gibi porfirin prekürsörlerinin aşırı üretimi ve primer olarak karaciğerde birikimiyle karakterizeyken, eritropoetik bozukluklarda bu anormallik kemik iliği eritroid hücrelerinde olur. Her ne kadar bazı porfiriyanın klinik olarak örtüşen özellikleri olsa da porfirin bozuklukları temelde porfirin ve prekürsörlerinin aşırı üretildiği ve birikim yaptığı yere göre hepatik ve eritropoetik porfiriya olarak sınıflandırılırlar[10]. Örnek vermek gerekirse Akut Hepatik Porfiriya'lardan Hereditör Koproporfiriya(HCP) ve Variegat Porfiriya'da(VP) cilt lezyonları görülebilir[11](Şekil 4).

Basitleştirmek istersek porfiriya, 4 adet Akut hepatik Porfiriya (AİP, HCP, VP, ADP), 1 adet hepatik kutanöz Porfiriya(PCT) ve 3 adet eritropoetik kutanöz Porfiriya'dan(EPP, CEP, X-LDPP) oluşur(Tablo 3). Ayrıca, primer ve

sekonder olarak da iki gruba ayrılabilir. Primer olanlar kalıtsal, sekonder olanlar ise edinseldir.



Şekil 4 Porfiriyanın genel klinik özellikleri

(Şekil Puy ve arkadaşlarının derlemesinden modifiye edilmiştir[1].)

X-LDPP: Eritropoetik protoporfiya'nın X'e bağlı dominant formu.

Tablo 3 Porfiriya lar: Majör klinik ve laboratuvar karakteristikleri
(Tablo, Balwani ve Desnick'in derlemesinden modifiye edilmiştir[3].)

Porfiriya türü (Kısaltması)	Defektif Enzim (Sinonim; yoldaki sırası)	Hücre içi Yerleşim	OMIM Numarası	Kalıtım	Primer Semptomlar (NV veya KF)	Enzim aktivitesi, normalin %'si	Artmış porfirin öncülleri ve/veya porfirinler			
							Eritrositler	İdrar	Gaita	Plazma piki(nm)
Akut hepatik porfiriya lar										
ALA-Dehidrataz eksik porfiriya (ADP)	ALA-dehidrataz (PBG sentaz; 2)	S	125270	OR	NV	~5	Zn(çinko)-protoporfirin	ALA, koproporfirin-III	—	—
Akut İntermitan Porfiriya (AİP)	HMB sentaz (PBG deaminaz; 3)	S	176000	OD	NV	~50	—	ALA, PBG, üroporfirin	—	618-620
Hereditör Koproporfiriya (HCP)	Koproporfirinojen oksidaz (6)	M	121300	OD	NV ve KF	~50	—	ALA, PBG, koproporfirin-III	Koproporfirin III İzomer III/I>2.0	618-620
Variagate Porfiriya (VP)	Protoporfirinojen Oksidaz (7)	M	176200	OD	NV ve KF	~50	—	ALA, PBG, koproporfirin-III	Protoporfirin IX> Koproporfirin-III,	624-627
Hepatik kutanöz porfiriya lar										
Porfiriya Kutanea Tarda (PCT)	Üroporfirinojen Dekarboksilaz (5)	S	176100	Sporadik veya %25 OD	KF	< 20	—	Üroporfirin, 7-karboksilat porfirin	Izokoproporfirin	618-620
Eritropoetik kutanöz porfiriya lar										
Konjenital Eritropoetik Porfiriya(CEP)	Üroporfirinojen-sentaz (4)	S	263700	OR	KF	1-5	Üroporfirin I, koproporfirin I	Üroporfirin-I, koproporfirin-I	Koproporfirin I	615-618
Eritropoetik Protoporfiriya (EPP)	Ferroşelataz (8)	M	177000	OR†	KF	~20-30	Primer olarak serbest protoporfirin	—	Protoporfirin	626-634
Eritropoetik Protoporfiriya'nın X'e bağlı dominant formu (X-LDPP)	ALA-sentaz 2 (1)	M	300752	X'e bağımlı geçiş	KF	>100‡	Serbest ve çinko protoporfirin	—	Protoporfirin	626-634

OD:otozomal dominant; OR:otozomal resesif; NV: nörovisseral; KF: kutanöz fotosensitivite; ve —: uygulanabilir değil.

†Wild-tip allelin intron 3 bölgesindeki polimorfizm enzim aktivitesi ve hastalığın klinik ifadesini etkiler.

‡ALAS-2 ekzon 11'deki fonksiyon kazanım mutasyonları artmış aktiviteyle sonuçlanır.

ŞOMIM: Online Mendelian Inheritance in Man (hastalık ve genetiği hakkında ek bilgi için) (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM).

2.4.1. Akut Hepatik Porfiriyalar

2.4.1.1. Genel Bilgiler

Akut hepatik porfiriyalar non-spesifik nörolojik semptomlar beraberinde hayatı tehdit eden akut ataklarla karakterize “hem” biyosentezinin iyi tanımlanmış genetik bozukluklarıdır. Bu grup AİP, HCP ve VP'nin dahil olduğu 3 otozomal dominant porfiriya ve otozomal resesif olan ADP'yi (ALA-dehidrataz eksik porfiriya) kapsar. Bunlardan AİP en sık görülen, ADP ise en nadir görülen akut hepatik porfiriya'dır. Günümüzde 10'dan az bildirilmiş ADP vakası vardır. Toplam prevalansları yaklaşık olarak %0.005 kadardır[7]. Genellikle erişkin yaşta ve bayanlarda daha sık rastlanırlar. Her ne kadar spesifik enzim ve gen defektleri ortaya konmuş olsa da, semptom ve bulguları sık görülen diğer hastalıkları taklit edebildiğinden, tanı ve tedavileri zorlu bir süreçtir. Akut porfirik ataklarda tanı ve tedavi gecikmesi ölümcül olabilir veya uzun süreli ya da kalıcı nörolojik hasara neden olabilir.

2.4.1.2. Akut Atakların Patogenezi

Genellikle sık görülen 3 akut porfiriya (AİP, HCP, VP) enzim aktivitesi normalin %50'si kadardır ve kalan enzim aktivitesi de genellikle “hem” homeostazı için yeterlidir. ALA dehidrataz aktivitesi yolağın diğer enzimlerine nazaran daha fazla olduğundan, bu enzimin çok ciddi eksiklikleri (normalin %5'i ve daha azı) ancak klinik bulgulara yol açabilmektedir. Etkilenmiş bireylerdeki enzimatik defektler, presipitan faktörlerin indükleyici etkilerine karşı yolağın ilk enzimi olan ALAS1'i yatkın hale getirmektedir. Bu presipitan faktörler arasında hastalık, birçok ilaç (barbitüratlar, antikonvülsanlar, rifampin ve progesterinler vb.), endojen steroid hormonlar (özellikle progesteron), açlık, diyet (düşük karbohidratlı beslenme), sigara ve stres gibi hepatik “hem” ihtiyacını arttıran nedenler yer almaktadır. Hepatik ALAS(ALAS1) hız kısıtlayıcı enzim olduğu için, yolağın ara ürünleri enzim eksikliğinin sınırlayıcı olduğu noktaya kadar artar ve karaciğerde birikir. Akut semptomları olan tüm hastalarda ve bazı asemptomatik hastalarda idrar PBG ve ALA düzeyleri artar.

Nörolojik hasar mekanizması ise daha az anlaşılabilmiştir. Atak patogenezi senelerce yoğun bir şekilde tartışılmıştır[12]. Bu konuda yüksek ALA ve/veya PBG'nin nörotoksik olabileceği, ya da sinir sisteminde “hem” eksikliği ya da bu sebeplerin kombinasyonları irdelenmiştir. Son zamanlarda akut atak etyolojisine yeni yaklaşım, kronik atakları olan ve karaciğer transplantasyonu sonrası bu atakları sonlanan AİP ve VP hastaları sayesinde oluşmuştur[13]. Semptomların sinir dokusundaki “hem” eksikliğinden ziyade artan porfirin prekürsörleri nedeniyle oluşması muhtemeldir. Heterozigot AİP hastasına yapılan karaciğer nakli sonrasında ALA ve PBG seviyeleri normale dönmesi ve nörolojik atakların ortadan kalkması, nörolojik semptomlara hepatik porfirin prekürsörlerinin aşırı üretiminin yol açtığı teorisini desteklemiştir[14]. Benzer olarak alkolik siroz nedeniyle VP hastasına yapılan karaciğer transplantasyonu sonrasında biyokimyasal bulgularda iyileşme gözlenmiştir[15]. Bu sınırlı vaka tecrübeleri karaciğerdeki aşırı üretimin hastalık patogenezindeki rolünü gösterse de, porfiriya hastalarında karaciğer naklinin rutin bir şekilde kullanımı her zaman küratif değildir. Ciddi ADP'sı olan çocuk hastaya yapılan karaciğer transplantasyonu, klinik ve biyokimyasal olarak fayda sağlamamıştır[16]. Ayrıca, yapılan nakiller sonrasında artmış hepatik arter tromboz oranı (%40) gözlenmiştir[17].

Akut hepatik porfiriya için gen mutasyonu taşıyıcılarının yaklaşık olarak %80'i asemptomatik olarak kalmaktadır. Diğerleri, ömürleri boyunca bir veya birkaç kez akut atak geçirirler. İdrar, serum ve gaita ALA, PBG ve diğer porfirin seviyeleri çoğu asemptomatik taşıyıcıda normaldir. Diğer yandan, enzim aktivitesi %5'e eşit veya daha az olan ADP hastalarının çoğu da asemptomatik kalmaktadır[18].

Kronik semptomlar önceki nörolojik hasarları işaret ederler. Homozigot AİP[19], VP[20] ve HCP[21] gibi nadir durumlarda ciddi nörolojik olaylar çocukluk döneminde başlar. Açıkçası akut atak indüksiyonu, ALA ve PBG aşırı üretimiyle sonuçlanan ve ALAS1 stimülasyonuna neden ilaçlar, diyet ve steroid hormonlar gibi çevresel veya hormonal faktörler ile ilgilidir.

2.4.1.3. Klinik Bulgular

Bu bozuklukların majör klinik bulguları, genellikle puberte sonrası görülen, hayatı tehdit eden ciddi akut nörolojik ataklardır. Daha çok genç erişkin bayanlarda görülmekle beraber, puberte öncesi nadirdir[22]. Hastalar ataklar arasında iyidirler. En sık rastlanan semptom olan abdominal ağrı, genellikle sürekli ve tam olarak lokalize edilemeyen, kimi zaman kramp tarzı olabilen bir ağrıdır. Konstipasyon, abdominal distansiyon, azalmış barsak sesleri sıklıkla görülen bulgulardır. Artmış barsak sesi ve diyareye daha az rastlanır. İnflamasyon olmadığından abdominal hassasiyet, ateş ve lökositoz genellikle belirgin değildir. Bulantı, kusma, çarpıntı, taşikardi, hipertansiyon, mental semptomlar(halüsinasyonlar, akut psikiyatrik semptomlar), nöbetler(bazen hiponatremiye bağlı) ekstremiteler, boyun veya göğüs ağrısı, baş ağrısı, kas zayıflığı, duyu kaybı, tremor, terleme, dizüri ve mesane distansiyonu ve insomnia(genellikle erken bulgudur) gibi diğer belirti ve bulgular da görülebilmektedir. Hiponatremi, hipotalamik tutulum veya uygunsuz antidiüretik hormon sekresyon sendromu ya da gastrointestinal/renal sodyum kaybı sonucunda gelişebilir[23]. Taşikardi ve sistemik arteriyel hipertansiyon artmış katekolamin üretimi ile ilişkili olabilir. Muhtemelen kardiyak aritimi sonucu oluşan ani ölüm, akut atak sırasında ortaya çıkabilir[24].

Öncelikle motor tutulum yapan periferik nöropati, genellikle karın ağrısı ve şiddetli akut atak ortamında gözlenir. Ekstremitelerde ve başka bir yerde ağrı; duyu sinir tutulumu gösterir. Parezi genellikle simetriktir ve üst ekstremiteler proksimalinde başlar, ancak fokal olabilir ve kranial sinirleri içerebilir. Özellikle geç tanı konulduğunda kas zayıflığı, solunum kaslarına ve bulber felce ve ölüme kadar ilerleyebilir. Gelişmiş paralizi uygun tedavi ile geri dönüşümlüdür ancak aylar süren rehabilitasyon gerekebilir.

Kronik arteriyel hipertansiyon, renal yetmezlik[25], kronik karaciğer hasarı ve hepatoselüler karsinom[26] uzun dönem komplikasyonları arasındadır. Kronik nöropatik ağrı sebebiyle depresyon ve intihar eğiliminde

risk artışı olabilir[27].Tablo 4'de AİP'daki en sık bildirilen klinik özellikler listelenmiştir.

Tablo 4 Akut Porfiriyanın sık görülen belirti ve bulguları

(Tablo Anderson ve arkadaşlarının derlemesinden modifiye edilmiştir[18].)

Belirti ve bulgular	Tahmini İnsidansı, %	Yorum
Gastrointestinal		
Karın Ağrısı	85–95	Genellikle aralıksız (remittan olmayan), saatlerce veya daha uzun sürebilen, tam lokalize edilemeyen ama kramp tarzında olabilen bir ağrıdır. Nörolojik kökenli olup, nadiren periton irritasyon bulguları, ateş veya lökositöz eşlik edebilir.
Kusma	43–88	Bulantı ve kusma sıklıkla karın ağrısına eşlik eder.
Konstipasyon	48–84	Mesane parezisi eşlik edebilir.
Diyare	5–12	
Nörolojik		
Ekstremitte, sırt, göğüs ve boyun ağrısı veya baş ağrısı	50–70	Ağrı, göğüs veya sırtta başlar ve karına doğru yayılabilir. Ekstremitte ağrısı duysal sinir tutulumunu işaret eder. Olguların %10-40'ında objektif duyu kaybı rapor edilmiştir.
Parezi	42–68	Özetli atak sırasında erken veya geç dönemde ortaya çıkabilir. Kas güçsüzlüğü daha çok proksimalden başlar ve üst ekstremitelerde daha sıktır.
Respiratuar paralizi	9–20	Öncesinde periferik motor nöropati ve parezi mevcuttur.
Mental semptomlar	40–58	Küçük davranış değişikliklerinden ajitasyon, konfüzyon, halüsinasyonlar ve depresyona kadar değişebilir.
Konvülsiyonlar	10–20	Hiponatremi nedeniyle oluşan porfiriyanın santral nörolojik belirtisidir.
Kardiovasküler		
Taşikardi	28, 64–85	Semptomatikse kalp hızını kontrol altında tutabilmek için tedavi gerektirebilir.
Sistemik arteriyel hipertansiyon	36–55	Akut ataklar sırasında tedavi gerektirebilir ve bazen kronik hale gelebilir.

VP ve HCP'da güneşe maruziyet sonucu PCT benzeri kronik bülloz cilt lezyonları görülebilir. Fotosensitif cilt lezyonları nöropatik bulgular olmadan da görülebilir.

2.4.1.4. Atağı Tetikleyen Faktörler

Akut porfiriyalarda Tablo 5'deki birçok ilacı da içeren çoğu tetikleyici faktör (özellikle sitokrom p450 enzimleri başta olmak üzere) artmış hepatik "hem" ihtiyacı doğurur ve ALA sentazı indüklerler. Eldeki bilgilerin yetersiz olması sebebiyle birçok ilaç, zararlı veya güvenli olarak ayırımı tabi tutulamaz. Uzun süreli açlık ve sıkı diyet(veya aşırı kalori kısıtlaması) atakları sık tetiklen faktörlerdir. Endojen hormonlardan özellikle progesteron önemlidir. Bayanlarda menstruel siklusun luteal fazında sık atak oluşumunu kısmen açıklayabilir[28]. Gebelik sıklıkla iyi tolere edilir, ancak bazı bayanlarda ataklar artmaktadır. Hepatik sitokrom p450 enzimini ve muhtemel "hem" sentezini artıran sigara içimi, sık ataklarla alakalıdır[29]. Cerrahi veya enfeksiyonlarla indüklenen metabolik ve fizyolojik stresin de muhtemelen tetikleyici rolü olabilir. Ataklar sadece bir değil, bazıları henüz tanımlanmamış birkaç tetikleyici faktörün additif etkisi nedeniyle oluşabilir.

Akut porfiriya hastaları asemptomatik dönemde olsalar dahi, elektif ameliyatlarda öncesinde dikkatli bir perioperatif bakım gerektiriler. Çünkü, anestezi sırasında verilecek ilaçlardan, komplikasyon olarak gelişebilecek enfeksiyonlara kadar dikkatli bir planlamaya ihtiyaç duyarlar[30].

Tablo 5 Akut porfiriyalarda kullanımı güvenli ve güvenli kabul edilmeyen ilaçlardan bazıları

(Tablo Anderson ve arkadaşlarının derlemesinden modifiye edilmiştir [18].)

Kullanımı güvenli olmayan ilaçlar	Kullanımı güvenli ilaçlar
Alkol	Asetaminofen
Barbituratlar†	Aspirin
Karbamazepin†	Atropin
Karisoprodol†	Bromidler
Klonazepam (yüksek dozları)	Simetidin
Danazol†	Eritropoetin§
Diklofenak ve muhtemel diğer NSAID'ler†	Gabapentin
Ergo alkaloidleri	Glukokortikoidler
Östrojenler†‡	İnsulin
Etiklorvinol†	Narkotik analjezikler
Glutetimid†	Penisilin ve türevleri
Griseofulvin†	Fenotiyazinler
Mefenitoin	Ranitidin†§
Meprobamat (ayrıca mebutamat ve tibutamat)†	Streptomisin
Metipirilon	
Metoklopramid†	
Fenitoin†	
Primidon†	
Progesteron ve sentetik progestinler†	
Pirazinamid†	
Pirazolonlar (aminopirin ve antipirin)	
Rifampin†	
Süksinimidler (etosüksimid ve metsüksimid)	
Sülfonamid antibiyotikler†	
Valproik asit†	

İlaçlar ve güvenlik durumları hakkında daha detaylı liste literatürlerde[7] ve Web sayfalarında mevcuttur: (www.porphyriaofoundation.com ve www.porphyria-europe.com gibi).

NSAID'ler = nonsteroid anti-inflamatuar ilaçlar.

† ABD sınıflamasında bu ilaçlar için porfiriya açısından kontraendikasyon, uyarı, dikkatli kullanım, veya yan etki ibareleri yer almaktadır. Güvenli olmayan ilaçlarda, bu tarz bir ikaz ifadesinin bulunmaması güvenle kullanılacakları anlamına gelmez.

‡ Çoğunlukla östrojen-progestin kombinasyonları ile elde edilen deneyimler sonucu PCT alevlenmesine yol açmaları sebebiyle östrojenler zararlı olarak kabul edilmiştir. Akut porfiriya ataklarını tetiklediklerine dair kanıtlar zayıf olmasına rağmen dikkatle kullanılmalıdır. Düşük doz östrojen (örn. transdermal), siklik atakları olan kadınlarda gonadotropin salıverici hormon analoglarının yan etkileri önlemek için güvenli bir şekilde kullanılmıştır.

§ ABD etiketleme sisteminde ilaçlarda porfiriya için dikkatli kullanım sınıflamasında listelenmesine rağmen, diğer kaynaklar tarafından güvenli olarak kabul edilmektedirler.

2.4.1.5. Ne Zaman Akut Porfirik Ataktan Şüphelenmeliyiz?

Özellikle karın ağrısı gibi önde gelen semptomu olan herhangi bir hastada ilk klinik değerlendirme başka bir nedeni desteklemiyorsa(bkz. Tablo 4) “akut porfiriya ön tanısı” göz önünde bulundurulmalıdır. Genellikle pratikte yapılan, diğer karın ağrısı etiyolojileri için görüntüleme çalışmalarını da içeren pahalı, zaman alıcı ve verimsiz araştırmalar ve hatta gereksiz cerrahi girişimlerden sonra akut porfiriya ön tanısı düşünülmesidir. Hastanın hastaneye yattığı saat içinde basit, hızlı bir laboratuvar testi ile idrar PBG ölçülerek tanının konması veya dışlanması ana hedef olmalıdır.

Her ne kadar tek bir karakteristik semptom tanıya yol gösterse de, karın ağrısı olan bir hastada ek bulgular (örneğin, koyu veya kırmızımsı idrar, yeni başlangıçlı hipertansiyon, hiponatremi, proksimal kas güçsüzlüğü, menstrual siklusun luteal fazı ile ilişkili ağrı; son günlerde atağı tetikleyen ilaçların kullanımı; ya da düşük kalorili, düşük karbonhidratlı diyetler) akut porfiriya şüphesini artırabilir. Tek başına hiç bir belirti ve bulgu, tanı koydurucu değildir, ve hatta hastaların %5-10’unda en sık görülen bulgular olan karın ağrısı ve taşikardi olmayabilir. Etkilenen ailelerdeki mutasyon taşıyıcılarının çoğu asemptomatik olduğu için, sadece aile hikayesinin alınarak akut porfiriya tanısının dışlanması, klinisyeni yanıltabilir. Ancak karın ağrısı veya akut porfiriya destekleyen diğer bulgular beraberinde aile hikayesi pozitif olan hastalar hemen test edilmelidir.

Porfiriya hastalarının yanlış tanı alması çok yaygın olduğu için, negatif aile hikayesi klinisyeni bu şüpheden uzaklaştırmamalıdır. Tanı için temel olan laboratuvar sonuçları tekrar gözden geçirilmelidir. Eğer önceki sonuçları mevcut değil ise, “hemin” uygulaması öncesinde şüpheli hasta tekrar test edilmelidir. Akut porfiriya tanısı konulan hastalara, tıbbi uyarı bilekliği takmaları, tıbbi uyarı kartları taşımaları ve müracat edilen sağlık kuruluşunun personelini bilgilendirmek için önceki laboratuvar sonuç, rapor ve kayıtlarını beraberlerinde tutmaları önerilir.

Akut porfiriya hastası olduğu kanıtlanan hastanın tekrarlayan atakları zaman içinde sıklıkla birbirine benzer ve çoğunlukla klinik olarak tanı konur. Tekrarlayan ataklarda artık biyokimyasal teyit gerekli değildir. Semptomların diğer nedenlerinin (örneğin, pankreatit ve apandisit gibi) dışlanmasının ardından tedavi hemen başlanmalıdır.

2.4.1.6. Akut Atak Tanısı

Gecikmiş tedavi nörolojik hasar ve hatta ölümlerle sonlanabildiği için akut porfirik atak tanısının hızlı ve doğru konması büyük önem taşımaktadır. Akut porfiriya tiplerinin hızla dışlanması, aynı zamanda alternatif tanı konulması aşamasındaki gecikmeyi önler.

2.4.1.6.1. Biyokimyasal Başlangıç Testleri

Belirtiler sırasında veya akut atak esnasında akut porfiriya tanısı için idrar PBG ölçüm testi biyokimyasal olarak ilk yapılacak olan testtir. AİP, HCP ve VP akut atakları sırasında porfirin prekürsörü olan PBG hemen her zaman idrarda artmıştır (>1.5 µmol/mmol kreatinin). Bu bulgu sadece bu hastalıklara has olup, diğer hiçbir tıbbi durumda karşılaşılmaz. Ancak başlangıç testi olarak yapılan bu testte idrar PBG seviyeleri “hemin” alan hastalarda (“hemin”, ALA ve PBG seviyelerini hızlıca düşürür), nadir ADP hastalarında (ALA seviyesi yüksektir, ancak PBG seviyeleri artmamıştır) ve bazı VP ve HCP hastalarında (AİP’ya göre VP ve HCP’da ALA ve PBG artışları kalıcı değildir.) yüksek bulunamayabilir.

Renksiz pirol olan PBG için Tablo 6’da özetlenmiş olan çoğu test Ehrlich reaktifiyle (p-dimethylaminobenzaldehyde) menekşe renkli pigment oluşumuna dayanır [31]. PBG, Ehrlich aldehiti ile reaksiyona giren özellikle ürobilinojen başta olmak üzere idrardaki diğer maddelerden ayrılmalıdır. Mauzerall-Granick metodu [32] ve ilişkili benzer yöntemler, ALA ve PBG seviyelerinin güvenilir ve kantitatif ölçümü için kullanılır. Trace PBG Kiti (Thermo Scientific Trace/DMA, Arlington, Texas) yüksek idrar PBG düzeyini tespit etmek için hızlı bir tanı yöntemidir. >25 µmol/L’den yüksek (>6mg/L)

PBG seviyelerini tespit edebilen ve yüksek seviyelerin semi-kantitatif tahmini için renk skalası olan bir kittir. Semi-kantitatif PBG ölçümü yapan bu kit başlangıç testi olarak yeterli sensitivite ve spesifiteye sahip olup acil analiz için uygun bir seçenektir[33].

Tablo 6 Artmış idrar PBG saptanmasında kullanılan kalitatif metodlar*

(Tablo Anderson ve arkadaşlarının derlemesinden modifiye edilmiştir[18].)

Metod (Kaynak)	Özellik	Test Prensipleri	Avantajları	Dezavantajları
Watson–Schwartz [34]	Kalitatif	Organik solvent ekstraksiyonu ile diğer maddelerden PBG-Ehrlich reaktif pigmentinin seperasyonu	Hızlı; reaktifler hazır	Sensitivite eksikliği; referans standardı yok; Birkaç ekstraksiyon basamağına gereksinim duyar; yanlış-pozitif sonuçlar sık†; ALA seviyesini ölçmez.
Hoesch [35]	Kalitatif	Ters Ehrlich reaksiyonu olarak da adlandırılabilir.	Hızlı; reaktifler hazır	Sensitivite eksikliği; referans standardı yok; yanlış-pozitif sonuçlar sık†; ALA seviyesini ölçmez.
Mauzerall–Granick [32]	Kantitatif	Anyon ve katyon değiştirici resinler, interfere eden maddelerden PBG ve ALA'yı sırasıyla ayırır. Ehrlich reaktif kullanımından önce, ALA pirol oluşturmak üzere reaksiyona sokulur.	Rutin olarak yapılırsa hızlı; spesifik; ALA ve PBG seviyelerinin her ikisini de ölçer; tek kullanımlık kolonları mevcut.	Arada bir yapılırsa (rutin uygulama olmadan) biraz kompleks.
Trace PBG Kit‡ [33]	Semi-Kantitatif	Mauzerall–Granick metodundaki gibi anyon değiştirici resin kullanılır.	Hızlı;; spesifik; ticari kiti mevcut	ALA seviyesini ölçmez.

ALA = 5-aminolevülinik asit; PBG = porfobilinojen.

† Yanlış-pozitif sonuçlar özellikle tecrübe eksikliğinden kaynaklanır.

‡ Thermo Trace/DMA, Arlington, Texas.

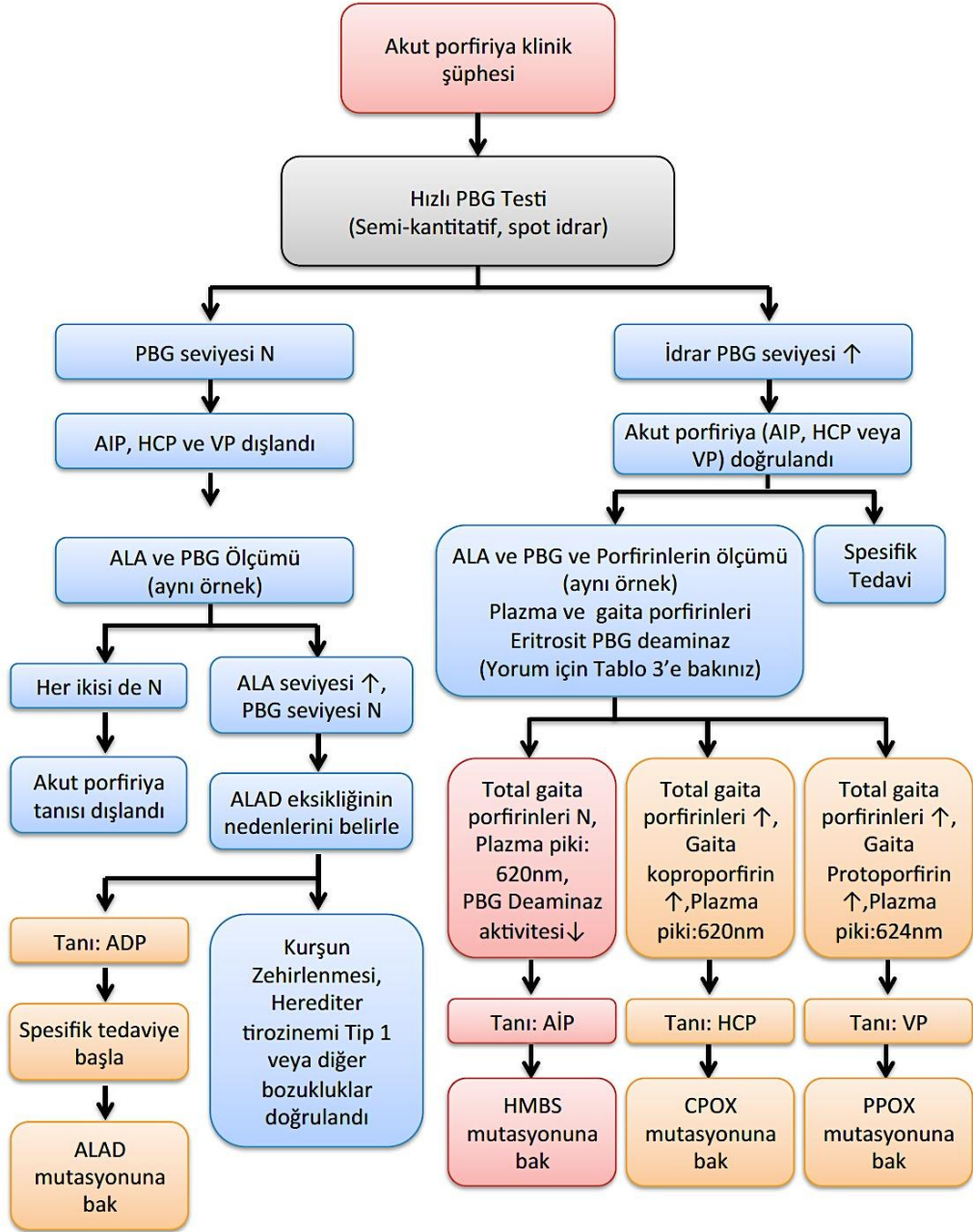
Akut atak sırasında idrar PBG yaklaşık 30-100 kat artar. İdrar ALA atımının üst sınırı 3.8 µmol/mmol kreatinin, PBG ekskresyon üst sınırı ise 1.5 µmol/mmol kreatinin kadardır.

Atak sırasında porfirin prekürsörlerinin idrarla atımı çok yüksektir. Bu nedenle, değişik laboratuvarlara ait referans aralıklarının farklı olması, akut atak tanısını koymada çok az etkilidir. 24 saatlik idrar toplanması ise akut atak tanısı için gerekli değildir ve tanıyı geciktirmektedir. 24 saatlik idrar

sonuçlarından farklı olarak, spot idrar sonuçları mmol kreatinin başınaµmol PBG olarak ifade edilir. “Hemin” tedavisi sonrasındaki klinik iyileşmeyle beraber test sonuçlarında dramatik bir düşüş gözlenir. Uzamış latent dönem ve “hemin” tedavisi sonrası haricinde, atağı izleyen iyileşme döneminde ALA ve PBG düzeyleri genellikle yüksek kalır. HCP ve VP hastalarında ALA ve PBG seviyeleri AİP’ya göre daha az artmıştır ve atak sonrası dönemde daha hızlı düşer. ADP hastalarında PBG seviyelerinde önemli bir artış olmadığından bu hastalığın tanısında, idrar ALA ve porfirin seviyelerinin ikisinin de ölçümü gerekir.

Geciken tanı hayatı tehdit edebileceğinden, özellikle büyük sağlık tesisleri hızlı PBG tayini yapan bir yöntemi her zaman kullanıma hazır bulundurmalarıdır. Aynı spot idrar örneği ışıktan korunarak ve katkı maddesi eklenmeden buzdolabında veya dondurarak saklanmalıdır. Saklanan bu örnek, semikantitatif PBG sonucunu doğrulamaya, kantitatif ALA ve PBG düzeylerini belirlemeye, ALA ve PBG seviyeleri çoktan normale dönmüş olan VP ve HCP hastalarının tespiti için yapılan total porfirin ölçümüne ve çok nadir olan ADP’lı hastalardaki yüksek ALA düzeylerinin ölçümüne olanak sağlar. Renal disfonksiyonu olan hastalar için ALA ve PBG ölçümleri serumda yapılabilir.

Şayet PBG seviyeleri yüksek ise, Şekil 5’de gösterilen ikinci seviye testlerle porfirin metabolizmasındaki bozukluk kesin olarak tespit edilir[36]. Tedavi açısından bakıldığında atak döneminde ikinci basamak test sonuçlarının çıkması beklenmez, tedavi geciktirilmez. Sadece ALA düzeyinde bir artış varsa, ADP ve ALA-dehidrataz aktivitesinde azalmaya neden olan diğer nedenleri (örn, herediter tirozinemi tip I) tedavi öncesi ayırt edilmelidir.



Şekil 5 Akut Porfiriya düşünülen hasta için önerilen tanı algoritması

(Tablo, Foran ve arkadaşları ile Anderson ve arkadaşlarının derlemelerinden modifiye edilmiştir [8, 18].) N:normal, ↑:artmış, ↓:azalmış sonuçları ifade etmektedir.

2.4.1.6.2. Akut Porfiriya Tipinin Biyokimyasal Doğrulanması

“Hemin” tedavisi başlamadan önce alınan örneklerde eritrosit PBG deaminaz aktivite ölçümü, idrar, plazma ve gaita porfirin seviyelerini de içeren ikinci basamak testleriyle AİP, VP ve HCP (özellikle klinik olarak aktif olduklarında) kolayca ayırt edilebilirler(Şekil 5). Bu testlerle yolaktaki iki enzim eksikliğinin aynı anda bulunduğu nadir dual-porfiriya bozuklukları da saptanabilir.

İdrar ve gaita total porfirin düzeylerindeki artışlar ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi veya ince tabaka kromatografisi ile seperasyon sonrası her bir porfirindeki göreceli artışlar, tanı için büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, spot idrar ve gaita örnekleri ikinci basamak test için uygundur. Total plazma porfirin seviyelerinin en iyi ölçüm yöntemi asidifikasyon ve solvent ekstraksiyonu ile ya da nötral pH'daki dilüe plazmada florometrik olarak ölçümüdür[37].

İdrar porfirin analizi tek başına bu ayırım için yeterli değildir. VP'da total gaita porfirin konsantrasyonu artmışken, protoporfirin konsantrasyonları (protoporfirin IX) koproporfirinden daha yüksektir. AİP'da ise genellikle bu değerler normaldir. HCP'da ise total gaita porfirin konsantrasyonu yine artmıştır, ancak artan ana komponent koproporfirindir ve izomer III/I oranı 2'den büyüktür[38].

Remisyon sırasında idrar, gaita ve plazma porfirin konsantrasyonları, her üç akut porfiriya'da da genellikle normaldir[39]. Remisyon veya presemptomatik dönemdeki VP hastaları için en sensitif metod plazma floresan emisyon spektroskopisidir (Eğer hasta 15 yaşından büyük ise %60 sensitif ve %100 spesifiktir). HCP için gaita koproporfirin izomer III/I oranının 2'nin üstünde olması erişkinlerde sensitifken, çocuklardan bu oranın sensitivitesi gösterilememiştir[40].

VP'nın 624-628nm'de pik verdiği göz önünde bulundurulduğunda[37], plazma floresan emisyon spektroskopisi tiplendirmede yapılacak ilk

testlerdendir[41]. Ancak her iki tip içinde 620nm'de emisyon piki gözlemlendiğinden, bu test AİP ve HCP ayırımında kullanılamaz[42].

Duyarlılık, özgüllük, ya da her ikisinin eksikliği nedeniyle sadece ikinci basamak testlerine dayanarak akut hastaya başlangıç tanısı konulmamalıdır. Çünkü birçok non-porfirik koşul idrar porfirin seviyelerini arttırılabilir. Örneğin normalde idrarın baskın porfirini olan koproporfin, kısmen safra yoluyla da atılır. Hafif şiddette karaciğer disfonksiyonlarında bile safra koproporfin ekskresyonu azalır, idrar atılımı artabilir. Bu nedenle, artan idrar koproporfinini her zaman “hem” sentezinde bozukluğun göstergesi değildir.

Normal PBG düzeyiyle beraber, ALA düzeyindeki önemli artış ALA-dehidrataz eksik porfiriya'yı (ADP) göstermektedir. Bununla beraber bu eksikliğin diğer nedenlerini ekarte edebilmek için ileri değerlendirme yapılmalıdır. Bahsedilen diğer nedenler arasında, akut porfiriya benzeri semptomları olan herediter tirozinemi tip 1 ve kurşun zehirlenmesi yer alır. Herediter tirozinemi tip 1 ve kurşun zehirlenmesinde de ADP gibi, idrar koproporfin III ve eritrosit çinko protoporfirin (ZPP) düzeyleri de artabilir. ADP ve AİP'de görülen artmış porfirin seviyeleri, karaciğer dışındaki dokularda aşırı ALA metabolizmasından kaynaklanabilir. Klinisyenler hem enzimatik hem de moleküler yöntemler kullanarak ADP'yi teyit etmelidirler.

2.4.1.6.3. Enzim Aktivite ve DNA Testleri

Aslında porfiriya tanısı genellikle basittir ve sadece biyokimyasal inceleme gerektirir. Belirtileri olan hastanın uygun örneklerindeki uygun analit ölçülür. Gerçekte, semptomların non-spesifik olması dolayısıyla “hem” prekürsör konsantrasyonlarının arttığı gösterilmediği sürece porfiriya, atakların nedeni olarak kabul edilemez. Genetik test, nadiren porfiriya tanısı için gereklidir ve hatta bazen bir mutasyonun bulunmadığı veya sınıflandırılmamış varyantlar tanımlandığında kafa karıştırıcı ve yanıltıcı dahi olabilir.

Ancak akut porfiriya türünü doğrulamak ve risk altındaki asemptomatik akrabaları belirlemek için PBGD enzim aktivite ölçümü ve DNA mutasyon analizi testi gereklidir.

DNA analizi yapılamadığı veya bireyin mutasyonu tespit edilemediği durumlarda, eritrosit PBG deaminaz aktivite ölçümü yararlıdır. Enzim aktivitesinde, %50'den fazla bir düşme olması ve artmış PBG konsantrasyonları AİP tanısı lehinedir. Bu test, AİP saptanan hastanın aile bireylerinin taramasında kullanışlıdır. Bununla beraber, normal olarak sonuçlanan eritrosit PBG deaminaz aktivite testi, AİP'yi dışlamaz. Çünkü, PBG deaminaz geninin bazı mutasyonları eritrositler haricindeki karaciğer ve diğer organlarda enzimin eksikliğine yol açabilmektedir[43]. Enzim aktivitesi ile kesin tanı konulamamasının sebepleri vardır: 1) Eritrosit PBG deaminaz aktivitesinin normal aralığı 3 kat yüksekliğe kadar değişebilmektedir ve düşük-normal ve yüksek-taşıyıcı değerleriyle üst üste binebilir (overlapping). 2) Enzim aktivitesi genç eritrositlerde, yaşlı olanlara nazaran çok daha yüksektir ve bu nedenle eritropoezin uyarıldığı durumlarda enzim aktivitesi artabilmektedir. 3) Kan örneklerinin hatalı test edilmesi, yanlış depolanması, ve uygunsuz transportu enzim aktivitesini azaltabilir.

HCP ve VP'da enzim eksikliğini gösteren testler, teknik olarak zordur ve lenfosit veya fibroblast kültürleri gibi mitokondrisi olan hücre ekstraktlarında gerçekleştirilmelidir.

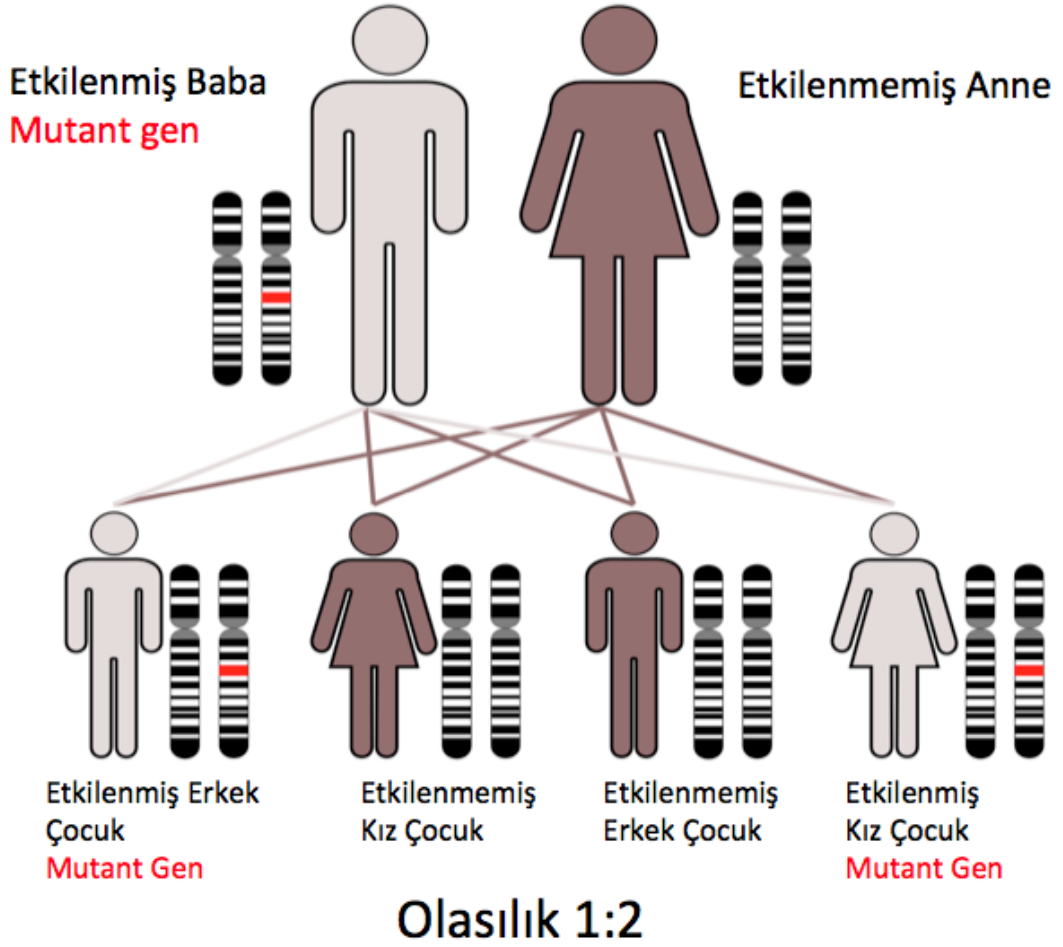
Akut ataklardan korunabilmek için latent hastalığı olanlarda aile taraması zorunludur. DNA analizi, mutasyonun tespit edilmesinde gold standart yöntemdir[44]. Biyokimyasal olarak akut porfiriya tipi tanımlandıktan sonra AİP (HMBS)[45], HCP (CPOX)[46]., VP (PPOX)[47]., ve ADP (ALAD) için gen mutasyon analizi gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı bireylerde DNA analizi için, kesin olarak etkilenmiş bir aile bireyindeki (biyokimyasal olarak tanı konmuş indeks vakadaki) mutasyonun öncelikle tespiti gereklidir. Tüm porfiriyanın genleri tanımlanmış ve birçok mutasyon yayınlanmıştır. Düzenli olarak güncellenen mutasyon listesi İnsan Gen Mutasyon Veritabanı'nda(HGMD: <http://www.hgmd.org/>) yer almaktadır.

DNA alışmaları, atakları olan hastaların tanısının kesinleştirilmesine ve risk altındaki asemptomatik aile üyelerinin hızlı ve doğru şekilde test edilmesine olanak sağlar. Çoğu mutasyon aileye özęü olmakla beraber Güney Afrika'daki VP[48], kuzey İsvet'deki AİP[49] gibi tek bir hastadan nesiller boyunca aktarılan belirli mutasyonlar gibi istisnalar olabilir. Günümüze kadar AİP için 390, HCP için 64, VP için 174 tane mutasyon tanımlanmıştır. Oldukça nadir olan ADP için sadece 12 ALAD mutasyonu bildirilmiştir[50] (The Human Gene Mutation Database, online erişim: <http://www.hgmd.org> , erişim tarihi: 01.06.2014).

Hasta bireydeki nedensel mutasyon tanımlandıktan sonra risk altındaki asemptomatik akrabaların belirlenmesi ve bu kişilere akut atağı tetikleyebilecek ilaçlar, açlık, hormonlar ve diğer presipitan faktörler hakkında danışmanlık verilmesi önemlidir[51].Tercihen akut bir atak gelişiminden önce genetik durum hakkında edinilen bilgi, aile üyelerinin yaşam tarzı konusunda bilinçli kararlar verebilmesine ve bazı ilaçların potansiyel risklerini bilmesine olanak sağlar.Ancak latent porfiriya, sağlığı veya hayat sigortasını sınırlayan bir sağlık riski olarak yorumlanmamalıdır. Akut hepatik porfiriya için mutant gen taşıyan fetüse enzimatik ve moleküler çalışmalar ile prenatal tanı konabilir, ancak çoğu taşıyıcının asemptomatik olması nedeniyle bu durum çok nadirdir.

Akut hepatik porfiriyanın çoğu otozomal dominant kalıtımla seyrettiği (Otozomal dominant kalıtım için Bkz. şekil 6) ve puberte öncesi biyokimyasal testlerin çoğunun normal sonuçlandığı düşünöldüğünde aile taramasının gerekliliği daha net anlaşılacaktır.

Otozomal dominant



Şekil 6 Otozomal dominant kalıtım

Bugüne kadar akut hepatik porfiryalarda hiçbir genotip/fenotip korelasyonu bulunmamıştır. Ancak istisnalar da mevcuttur: Homozigot dominant AİP[19], VP[52], HCP ve ciddi etkilenmiş mutasyon-spesifik varyant form olan harderoporfiyaya hastası çocuklarda bu korelasyon saptanmıştır[11]. Buna ek olarak, kronik atağı olan veya sık atak geçiren hastalarda modifiye edici veya predispozan genleri tanımlamak için ekzomik/genomik sekans çabaları ya da genom çapında ilişki çalışmaları henüz yeterli değildir.

2.4.1.7. Akut Atakların Tedavisi

Akut hepatik porfiriya tiplerinden akut atakların tedavisi için üzerinde fikir birliği sağlanmış rehberler mevcuttur[18]. Kısaca akut atak sırasında, genellikle abdominal ağrı için narkotik analjezikler gereklidir ve bulantı, kusma, anksiyete için fenotiyazinler etkilidir. Uykusuzluk ve huzursuzluk kloralhidrat veya bazı düşük doz kısa etkili benzodiazepinlerle tedavi edilir. Nöbetleri tedavi etmek zordur, çünkü hemen hemen tüm antiepileptik ilaçlar atakları tetikleyebilirler. Gabapentin ve muhtemelen vigabatrin, güvenli bir şekilde verilebilir, benzodiazepinler ise rölatif olarak güvenlidirler. Nöbetlerle ilişkili hiponatremi ve hipomagnezeminin dikkatle düzeltilmesi önemlidir. Taşikardi ve sistemik arteriyel hipertansiyon β -adrenerjik bloke edici ajanlar kullanılarak tedavi edilebilir. Ancak bu durum, hipovolemik hastalarda tehlikeli olabilir. Çünkü, bu hastalarda katekolamin salgılanması önemli bir kompensatuvar mekanizma olabilir. Genellikle %10'luk intravenöz glukoz (en az 300 g/gün) ile yapılan karbohidrat yüklemesi, parezi ve hiponatremi gibi bulguları barındırmayan hafif ataklarda etkili olabilir. Karbohidrat alımının akut atakları düzelttiği gerçeği yapılan son çalışmalarla desteklenmiştir. Yapılan bir çalışmada, hız kısıtlayıcı olan hepatik ALAS1'in, peroksizom proliferatör-aktive reseptör-koaktivatör 1 α (PCG-1 α) ile düzenlendiği saptanmıştır ve bu sayede, beslenme durumu ve akut ataklar arasında önemli bir bağlantı tespit edilmiştir[53].

İntravenöz "hemin" ise porfirin prekürsörlerinin atılımının azaltılmasında iv. glukozu göre daha etkilidir[54]. Bu tedavi ilk olarak 1971'de tanımlanmış[55] ve sonrasında 1983 yılında FDA onayı almıştır. İntravenöz "hemin" altta yatan patofizyolojiye yönelik tedavi sağlar. Hepatik ALA sentaz aktivitesini azaltarak, ALA ve PBG aşırı üretimini baskılar. Oral alınan "hemin", intestinal absorpsiyon sırasında "hem oksijenaz" tarafından katabolize edileceğinden oral olarak kullanılamaz. Birçok klinik çalışma "hemin"e biyokimyasal ve klinik olarak olumlu bir cevap verildiğini göstermiştir[56]. Hafif ataklar için 1-2 günlük karbohidrat yüklemesine cevap alınmadığında "hemin" tedavisi önerilir. Orta ve şiddetli ataklarda, ilk tercih

olarak “hemin” tedavisine başlanılabilir. Tedavi geciktiğinde yanıt daha yavaş olduğundan çoğu akut atak için tedaviye erkenden başlanması önerilmektedir[57]. Genel olarak intravenöz “hemin”in erken uygulanması daha iyi sonuçlar doğurmuştur[58]. Ancak her ne kadar ürün etiketinde intravenöz glukozun ilk olarak denenmesi gerektiği yazsa da, “hemin” tercih edilen tedavi seçeneğidir[59]. Standart tedavi rejimi “hem arginat” (Orphan Europe), “hem” albümini (insan albümini ile sulandırılmış hematin) veya liyofilize hematin formundaki “hem”in(Panhematin, Lundbeck Pharmaceuticals) 4 gün boyunca günde bir kez 3-4 mg/kg dozunda yapılan intravenöz infüzyonudur.

Allojenik karaciğer nakli, kronik veya sık akut atak geçiren ve tedaviye yanıt vermeyen AİP ve VP hastalarında gerçekleştirilmiştir[13]. Transplantasyon sonrası önceden yüksek olan idrar ALA ve PBG seviyeleri 24 saat içinde normale dönmüştür. Alıcılar transplantasyon sonrasında yıllarca atak geçirmemişlerdir. Ancak karaciğer nakli yüksek riskli bir işlemdir ve sadece ciddi atakları olan hastalarda son çare olarak düşünülmelidir[17]. Enzim replasman tedavisi konusunda daha önceleri çok merkezli çalışmalar yapılmış, ancak başarısızlıkla sonuçlanması üzerine denemelere son verilmiştir. Son dönemlerde, karaciğere hedeflenmiş gen tedavisi, insan AİP’sının fare modelindeki ilaçla indüklenmiş biyokimyasal ataklardan korunmada başarılı bulunmuştur[60].

2.4.1.8. Takip ve Korunma Önerileri

Gelecekteki atakların önlenmesi, tetikleyici faktörlerin belirlenmesi ve hasta eğitimini gerektirir. Alkol, sigara ve atağı tetikleyebilecek ilaçlardan uzak durmak ve uygun beslenme önemlidir. Medikal uyarı bileklikleri ve cüzdan içi bilgi kartları, müdahale eden tıbbi personelin bilgilenmesini sağlayacak, bu sayede güvenli olmayan ilaçları kullanılma riskini azaltacaktır. Muhtemelen tanımlanamayan modifiye edici genler veya çevresel/endojen tetikleyici faktörler nedeniyle, tetikleyici olduğu bilinen faktörlerin uzaklaştırılmasına rağmen bazı hastalar sık atak geçirmektedirler. Bu

hastalar diyetisyen tarafından değerlendirilmeli ve uygun, dengeli diyet önerilerine uymalıdır.

Akut porfiriya atağı nedeniyle rapor edilmiş ölüm oranları 1970 senesi öncesinde %10-52 civarındadır[61]. 1971 yılında tanımlanan hemin tedavisi, tanı, tedavi ve koruma prosedürlerinin gelişmesi, risk altındaki gen taşıyıcıların belirlenmesi, barbitürat ve sulfonamid gibi atağı presipite edebilecek antibiyotiklerin kullanımının azalması nedeniyle 1970 yılından bu yana prognozda iyileşmeler sağlanmıştır. 1996'da Amerika'da yapılan bir çalışmada ve 1971'den sonra tanı almış 86 hastadan 12'sinin (%14) akut atak nedeniyle hastaneye yatırıldıktan sonra öldüğü tespit edilmiştir. Bu hastalardan 11'i atak ileri evreye ilerledikten sonra (10'u mekanik ventilasyona alındıktan sonra) "hemin" tedavisi almıştır[27]. Aynı çalışmada, akut atak geçiren hastalardaki mortalite oranının genel popülasyona göre 3 kat fazla olduğu ve gecikmiş tanı ve tedavinin hala önemli bir sorun olduğu tespit edilmiştir.

2.4.1.9. Akut İntermitant Porfiriya, HMBS Geni ve Moleküler Analiz Teknikleri

Akut intermitan porfiriya (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM#176000), hidrosimetilbilan sentaz genindeki mutasyonlar sonucu HMBS enzim (EC 2.5.1.61 , OMIM#609806) aktivitesinde kısmi bir defektle seyreden, nadir rastlanılan, az hatırlanan ve ölümcül olabilen bir hastalıktır.[62]. "Hem" metabolizmasının doğumsal bozukluğu olan bu hastalık, özellikle ALA ve PBG gibi nörotoksik ara ürün birikimi ile karakterizedir[1].

AİP, birçok ülkede akut porfiriyanın en sık görülen tipidir. Tüm dünyada görülmeyle birlikte İskandinav ülkeleri, İngiltere ve İrlanda'da daha sık rastlanır. Genel prevalansı 100.000'de 1-10 arasında değişmektedir[63]. Avrupa genelinde ise 75000 AİP hastası olduğu tahmin edilmektedir[1]. Otozomal dominant olarak geçer, fakat klinik penetrasyonu değişkendir. Çoğunlukla latent seyreder[64]. Ülkemizde prevalans ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Akut ataklar hastalığın en korkulan belirtisi olup ölümcül olabilir. Merkezi, periferik ve otonom sinir sistemi hasarının bir sonucu olarak oluşmaktadır. En sık görülen belirti ve semptomlar sırasıyla karın ağrısı (%80), kabızlık (%50), bulantı ve kusma (%50), taşikardi (%40), hipertansiyon (%31), idrar renginde değişim (%25), ateş (%16), nöbetler (10-16%), solunum felcidir (9-14%)[8].

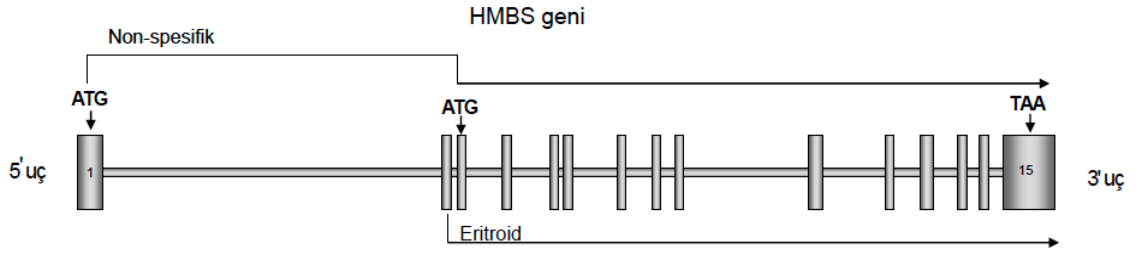
Semptomlarının şüpheli olması ve diğer hastalıkların semptomlarıyla örtüşmesi sebebiyle klinisyenler tarafından sıklıkla göz ardı edilebilir ve dolayısıyla yanlış teşhis konulabilir[65]. Hatta bazı araştırmacılar AİP için küçük taklitçi[66] veya simülatör[67] lakabını uygun görmüşlerdir . Ancak akut ataklar yaşamı tehdit eden özellikte olabilir, bu yüzden doğru tanı ve tedavi çok önemlidir[62].

Semptomatik hastalarda AİP tanısı, ALA ve PBG gibi porfirin öncüllerinin idrardaki yüksekliği ve enzim aktivitesi ile kolaylıkla tespit edilebilir[68]. 2002'de yayınlanan 196 vakalık bir çalışmada, asemptomatik ve remisyondaki semptomatik AİP hastalarının %88'i idrar PBG ölçümü kullanılarak saptanabilmiştir. Ayrıca, sağlıklı akrabalarda da porfirinler ve bunların öncülerinin idrar ve gaita atılımı seviyeleri genellikle yüksek saptanmıştır[69]. PBG ve ALA'nın konsantrasyonları ile klinik semptomların şiddeti korele değildir. Asemptomatik hastalarda ALA ve PBG'nin aşırı miktarda atılımı sürekli görülmez. ALA ve PBG'nin normal olduğu latent dönemlerde eritrosit PBG deaminaz enzim analizi tanı koydurucu olabilir[70]. Ancak normal ve hasta değerleri arasındaki anlamlı örtüşme nedeniyle, bu enzimatik test de her zaman sonuç vermeyebilir[71]. Gaita ve idrar porfirinleri genelde akut ataklar harici normal değerlerde olabilir. Diğer taraftan, AİP hastalığının non-eritroid formuna (non-eritroid varyant AİP) sahip asemptomatik kişiler konvansiyonel biyokimyasal yöntemlerle tespit edilemeyebilirler. Zira bu kişilerin idrar ALA ve PBG atılımları ve eritrosit PBGD aktiviteleri normal sınırlar içerisinde olabilir[72].

İlaç, alkol ve açlık gibi presipite edici faktörlerden kaçınılarak AİP taşıyıcılarında akut atak önlenabilir. Bu hastalar için semptomatik dönem

öncesi tanı konulması zorunludur[73]. Bu hastalıktaki anahtar nokta önlem almaktır. Güvenli olarak tanımlanan ilaçların kullanılması, oral karbonhidrat alımının uygun seviyelerde yapılması, stres, sigara, alkol, deneysel ve klinik çalışmalarla güvenilir olmadığı kanıtlanan ilaçlar ve açlıktan uzak durulması ancak AİP riski altındaki asemptomatik akrabaların da atak geçirmeden tanınması ve genetik danışmanlık verilmesi sayesinde gerçekleşebilir[62]. Bununla birlikte, AİP taraması için en güvenilir yöntem spesifik HMBS gen mutasyonunun tanımlanmasıdır. DNA analizi, enzim ölçümlerinin belirsiz sonuçlar verdiği taşıyıcı bireyler için, eşsiz ve güvenilir bir yöntem olarak gözükmemektedir[74]. Her ne kadar akut porfiriya atağı önceden tahmin edilemese de, moleküler tanıdaki ilerlemelerle mutasyonu taşıyan diğer asemptomatik aile üyeleri tespit edilebilir[75]. Ayrıca AİP gen taşıyıcılarının saptanarak 50 yaş üzerinelere hepatoselüler karsinoma açısından yıllık karaciğer taraması yapılması önerilmektedir.

Hastalıktan sorumlu gen olan HMBS geni, “hem” biyosentez yoluna ait aynı isimdeki üçüncü enzimi kodlamaktadır. Enzim değişik kaynaklarda porfobilinojen deaminaz (PBGD), pre-üroporfirinojen sentaz, üroporfirinojen 1 sentaz ve üroporfirinojen I sentetaz gibi farklı isimlerle de anılmaktadır. 10 kb’lık HMBS geni, kromozom 11q24.1– q24.2’de (bazı kaynaklarda 11q23.3–q23.3 geçmektedir) lokalizedir[76] ve boyutları 39 ile 438 bp arasında değişen 15 ekzon içermektedir[77]. İki promotörden kaynaklanan iki primer transkriptin “alternatif splicing”i ile iki farklı mRNA üretilir[78]. Eritroid promotör, intron 1’in 3 kb akış aşağı(downstream: 3’ uca doğru) yönünde lokalizedir ve sadece eritroid hücrelerde aktiftir. Non-spesifik promotör ise 5’ uç bölgesinde, ekzon 1’in akış yukarısında(upstream: 5’ uca doğru) lokalizedir ve tüm dokularda aktiftir. Akış yukarı(upstream) promotör, ekzon 1 ve ekzon 3-15 ile “transkript” sentezini yönlendirirken, akış aşağı(downstream) promotör ekzon 2-15 ile “transkript” üretir.(Bkz. Şekil 7) İki mRNA PBGD’ın sırasıyla 42-kDa(kilodalton)’luk (361 aminoasit)non-spesifik, 40-kDa(kilodalton)’luk (344 aminoasit) eritroid spesifik izoformlarını kodlar. Bu izoformlar sadece aminoasit diziliminin -NH₂ terminalinde farklılık gösterir[79].



Şekil 7 HMBS geni

(Şekil, Whatley ve Badminton'ın derlemesinden modifiye edilmiştir[80].)

Farklı dokularca non-espesifik (eritrosit hariç çoğu dokuda bulunur, non-eritroid veya housekeeping olarak da adlandırılır) ve eritroid enzim izoformlarını oluşturmak için iki farklı promotör tarafından transkripsiyon yönlendirilmektedir.

ATG: Translasyon başlangıç kodunu(metionini kodlar)TAA: Translasyon sonlanma kodunu

Dik kolonlar ekzonları, yatay kolonlar ise intronları ifade etmektedir.

Klasik form ve 'non-eritroid variant' olmak üzere AİP hastalığının iki ana alt tipi mevcuttur[81]. Hastaların %97'sini içeren klasik AİP'da hem non-espesifik hem de eritroid PBGD defektiftir. Moleküler kusurlar ekzon 3'ten ekzon 15'e kadar HMBS geninin ortak bölgelerini içerir. Vakaların %3'ünü oluşturan hastalığın non-eritroid varyantında ise nonspesifik PBGD izoformu için spesifik olan ekzon 1 içerisinde veya ekzon 1'in kodlayıcı bölgesi yakınında mutasyonlar mevcuttur. Şu ana kadar ekzon 2 veya eritroid promotör'da herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. AİP'nin her iki formu da klinik olarak birbirinden farksızdır. Her ikisi de epizodik karın ağrısı, gastrointestinal disfonksiyon ve nöropsikiyatrik rahatsızlık triadı ile karakterizedir. Klasik AİP'nin moleküler epidemiyolojisi hakkında (01 Haziran 2014 tarihi itibariyle) günümüze kadar yaklaşık 390 farklı mutasyon rapor edilmiştir (Human Gene Mutation Database (HGMD) <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=HMBS>)

Saptanan çoğu mutasyon nokta mutasyonu olup[51], birkaç delesyon vakası[82] mevcuttur. Mutasyonlar tüm dokulardaki enzim aktivitesini düşürmektedir. Hastalığın non-eritroid varyantında ise HMBS mutasyonları non-espesifik izoformun amino terminalini değiştirir. Bu hastalarda istisna olarak eritroid hücrelerdeki enzim aktivitesi düşmez[83].

Porfiriya hastalarındaki çoğu mutasyon protein kodlayan ekzonlarda saptandığından, mutasyon analizlerinin hedef aldığı bölge bu ekzonlardır. 5' uçtaki promoter bölge ve geniş delesyonların saptandığı bölgeler analiz dahilinde kalırken, intron bölgeleri genellikle analiz harici tutulurlar.

HMBS geni moleküler analizinde, önce ilgilenilen gen bölgeleri PCR yöntemiyle genomik DNA'dan amplifiye (kopyalanarak çoğaltılma) edilir.

Sadece mutant bölgelerin taranması veya direkt genin tümünün sekans analizi yapılarak mutasyon analizi yapılabilir. Bazen, tarama metodları, genin sekans analizinden önce farklı olan bölgelerinin tespiti için kullanılabilir. HMBS geni için denature edici HPLC (denaturing HPLC)[84], yüksek rezolüsyon erime (high resolution melting analysis)[63], tek iplikli konformasyon polimorfizm (SSCP) analizi, heterodupleks analiz veya denatüre edici gradiyent jel elektroforez (denaturing gradient gel electrophoresis - DGGE)[44] gibi mutasyon tarama metodları geçmişte kullanılmıştır. Maliyet artışı ve sekans analizinin hızlanması nedeniyle günümüzde tarama metodlarının kullanımı azalmıştır[80]. Tüm bölgelerin direkt sekans analizinin yapılması şu anda tercih edilen seçenektir.

Hastada patojenik mutasyon saptandığında ailenin taranması kolaylaşmaktadır. Bunun için en sık kullanılan yöntem, mutasyonu taşıyan gen bölgesinin dizi analizinin yapılmasıdır.

Bu çalışmada ülkemizde ilk kez, bugüne kadar klinik ve biyokimyasal olarak tanı konmuş, ulaşabildiğimiz tüm AİP hastalarında HMBS gen mutasyon analizini yaparak tanılarının kesinleştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bu hastaların ulaşılabilen birinci dereceden akrabalarında gen mutasyon analizi yapılarak presemptomatik AİP taşıyıcı bireylerin saptanması ve etkilenen bireylere yaşamı tehdit edebilen akut ataklara karşı presipitan faktörlerden uzak kalmaları konusunda danışmanlık verilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca bu çalışma, Gülhane Porfirin laboratuvarında biyokimyasal tanı testleri yanında moleküler tanı testleri hizmeti verilmesi çalışmaları için bir başlangıç oluşturacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Phosphate Buffered Saline tablets (PBS)

Konsantre Hidroklorik asit(HCL)

Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan (Merck 8387.2500)

Citric acid monohydrate (Merck 1.00244.1000)

Triton X-100 (Sigma-Aldrich, ABD)

Trichloroacetic acid (Serva 36910)

Uroporphyrin Fluorescence Standard UFS-1-1 (Frontier Scientific
CAS-No:27860-55-5,,ABD)

10X TBE(Tris-Borat-EDTA) Tamponu (Thermo Scientific)

Agaroz (, Sigma-Aldrich A9539-100gr, ABD)

Etidyum Bromid Solüsyonu (Sigma-Aldrich, E1510-10mL, ABD,)

Qiagen PCR kiti (Qiagen)

6X DNA Loading Dye 1mL, (Thermo Scientific)

POP-7 Performance Optimiser Polymer 7mL, (Applied Biosystems)

Genetic Analyser 10X Running Buffer with EDTA,25mL(Applied
Biosystems)

3.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Porphobilinogen (PBG) test kiti (Thermo Scientific, ABD)

ALA/PBG çift kolon spektrofotometrik test kiti (Bio-Rad)

Benmari (Nüve, Türkiye)

Distile su cihazı (Direct Q, Millipore, Fransa)

Derin dondurucu -80 (UF401, Elektrolux Medical Refrigerator,
Lüksemburg ve Medical Freezer, Sanyo)

Derin Dondurucu -20 °C (Beko, Türkiye)

Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

pH Metre (Mettler Toledo MP220,İsviçre)

Etüv (Heraeus)

Mikrosantrifüj 1 (Sigma Aldrich; Nüve NF 048, Türkiye ve Eppendorf 5403, Almanya)
Santrifüj NF1215 (Nüve, Türkiye)
Soğutmalı Santrifüj (Eppendorf Centrifuge S-403)
Terazi (Ohaus Adventurer ProAU264, ABD; Mark 420 EIB, İtalya, ve Precisa, İsviçre)
Vortex (Thermolyne Maximix ve NM 110, Türkiye)
Eppendorf tüpleri (1.5 ml)
Muhtelif otomatik pipet (Eppendorf Research Almanya)
Mixer (Coulter, A.B.D.)
Ultrasonik karıştırıcı (Bandelin Sonorex, Almanya)
ABX Pentra XL 80 (Horiba Medical, Fransa)
Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) (Thermo Scientific Ultimate3000, ABD)
Spektrofotometre (GBC Cintra 303)
Floresan Spektroflorimetre LS55 (Perkin Elmer, İngiltere)
Otomatik Analizör (Olympus AU 2700, Olympus Optical Co.Ltd, Japonya)
Laminar akım kabini (Sistem Teknik, Türkiye)
Kern 440-43 laboratuvar terazisi, (KERN, Almanya)
Polipropilen 0.2mL PCR tüpü (Corning Life Sciences, ABD)
Primer (Applied Biosystems, ABD)
Invitrogen Iprep® izolasyon sistemi (iPrep™ Purification Instrument, Invitrogen Corporation)
NanoDrop® spektrofotometre (NanoDrop products, Delaware, ABD)
Geneamp®9700 PCR cihazı (Applied Biosystems®, Foster City, CA)
Bosch HMG762B Mikrodalga fırın (BOSCH, Almanya)
Elektroforez tankı (Clever Scientific Ltd, İngiltere)
ExoSAP-IT® For PCR Product Cleanup (Affymetrix, ABD)
Sephadex® G 50 Fine (Sigma-Aldrich)
MicroAmp Optical 96-well reaction plate, (Applied Biosystems®, ABD)
Plate septa 96-well, (Applied Biosystems®, ABD)

ABI Prism BigDye™ Terminator v3.1 Sekans kiti, (Applied Biosystems®, ABD)

3500xl Genetik analizörü (Applied Biosystems®, ABD)

3.3. Hastaların Seçimi ve Örnek Toplanması

Çalışma başlangıcında Keçiören Eğitim Araştırma Hastanesi Baştabipliği Klinik Araştırma Etik Kurulu'ndan 09.01.2013 tarih ve B.10.4.İSM.4.06.68.49/ numaralı etik kurul raporu alındı.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıbbi Biyokimya Anabilimdalı Porfirin Laboratuvarı'na 2007 yılından bu yana başvuran ve AİP tanısı alan 13 hastanın kayıtları kullanılarak AİP hastalarına ve hastaların birinci dereceden 15 yakınına ulaşıldı. Toplamda 28 birey çalışmaya dahil edildi.

Hastalardan bir numaralı hastaya daha önceden laboratuvarımızca biyokimyasal AİP tanısı konmuş, yurtdışında genetik testleri tamamlanmıştır. Kontrol hastası olarak çalışmamıza dahil ettiğimiz hastanın mutasyonu, yazarları arasında hocam ve tez danışmanım Prof.Ecz.Alb.İsmail KURT'un da bulunduğu yayın ile yeni mutasyonlar listesinde yerini almıştır[85]. Bu hastanın dört akrabası da iki kızı ve iki yeğeni (sonradan merkezimizde biyokimyasal tanı alarak kızlarından biri ve yeğenlerinden biri sırasıyla 2 ve 3 numaralı hastalarımız olmuşlardır) çalışmaya dahil edildi.

Tüm bireylerin yazılı onamları alındıktan sonra örnekleri toplandı. Hastaların anamnezleri, medikal geçmişleri ve klinik verileri kaydedildi.

Gülhane Porfirin Laboratuvarı'na bizzat başvuran tüm hastalardan GATA Tıbbi Biyokimya Kan Alım Ünitesi'nde antekübital bölgeden 2mL'lik EDTA'lı 4 tüp venöz tam kan örneği ve 10 mL taze spot idrar toplandı. DNA izolasyonu yapılacak kan örnekleri bekletilmeden Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Metabolizma Laboratuvarı Moleküler Analiz Ünitesi'ne transfer edildi. Diğer örnekler çalışılacak teste göre, ön hazırlığı yapılarak Gülhane Gülhane Porfirin Laboratuvarı'nda bekletilmeden test edildi.

Farklı şehirlerdeki hastalardan alınan örnekler soğuk zincir altında (+4°C'de köpük kutular içerisinde), kargo ile 24 saat içerisinde laboratuvara ulaşması sağlandı. Örnek alımından çalışma yapılana değin, numunelerin alüminyum folyoya sarılarak direk gün ışığından korunması ve soğuk zincir kurallarına uyulmasına titizlik gösterildi. Uygunsuz numuneler çalışma dışı bırakıldı ve yeni örnek istendi. Ankara dışından gelen örnekler için de laboratuvarımızda alınan örneklere uygulanan prosedür uygulandı.

Sonuçların standardizasyonu için tüm örneklere başlangıç testlerinden itibaren tüm testler tekrar uygulandı. Gülhane Porfirin Laboratuvarı, 2011 Aralık ayından bu yana EPNET (European Porphyria Network) üyesi olup, 1996 yılından bu yana RCPA (The Royal Collage of Pathologists of Australia) porfirin dış kalite kontrol programına dahildir. Tüm çalışmalarımız sırasında hasta örnekleriyle beraber negatif ve pozitif kontrol örnekleri, ilave kontrol amaçlı dış kalite kontrol programlarından gelen örnekleri de çalıştık.

3.4. Kullanılan Biyokimyasal Testler

3.4.1. İdrar ALA/PBG Tayini

Akut porfiriya tanısı için ilk yapılacak olan biyokimyasal test olan idrar PBG tarama testi olarak, GATA Porfirin Laboratuvarında kullandığımız kalitatif metot Hoesch testi [35] ve semi-kantitatif Porfobilinojen (PBG) test kiti[33] kullanıldı.

Kantitatif ALA/PBG tayini için, ticari ALA/PBG çift kolon spektrofotometrik test kiti (Bio-Rad Laboratories) (Şekil 8) kullanıldı. İdrar ALA için normalin üst sınırı 3.8 µmol/mmol kreatinin, idrar PBG için normalin üst sınırı ise 1.5 µmol/mmol kreatinin kadardır. Bu metodla kısaca, PBG anyon değiştirici kolon, 5-ALA katyon değiştirici kolon kullanılarak ayrıştırıldı (üre ve pigmentler yıkanarak dışarı atıldı). Sonuçta, oluşan rengin yoğunluğu 553nm'de fotometrik olarak ölçüldü.



Şekil 8 ALA/PBG çift kolon spektrofotometrik test kiti

3.4.2. İdrar Total Porfirin(İTP) Analizi

İdrar total porfirin analizinde, idrar porfirinlerinin 400nm civarında kuvvetli absorpsiyon (soret bandı) vermelerinden yararlanıldı. Önce asit ilavesi ile bağlı metaller porfirinlerden ayrıldı. Bu şekilde asit ilave edilmiş idrar porfirinleri spektrofotometrik olarak taranarak pik yüksekliği elde edildi ve uygun molar absorbtivitesi kullanılarak, total porfirin konsantrasyonu hesaplandı[86]. İdrar total porfirin için normalin üst sınırı 35 nmol/mmol kreatinin'dir.

3.4.3. Plazma Emisyon Tarama ve Plazma Total Porfirin(PTP) Analizi

Hasta plazması ayrıldıktan sonra 1:10 oranında fosfat buffered salin(PBS) tampon ile dilüe edilir. Taramalı spektrometrede 550-770nm arasında okuma yapıldı ve hangi nm'de pik verdiği gözlemlendi. Normal bireylerde pik bulunmamasına rağmen AİP hastalarında 618-620nm arasında pik tespit edilmesi beklenir.

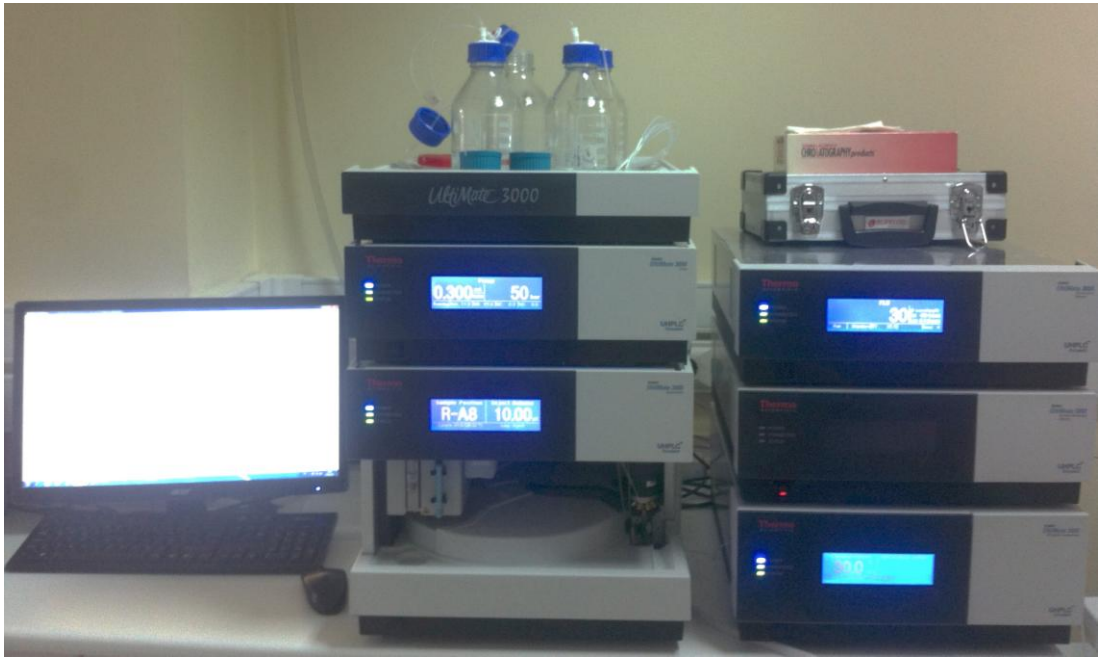
Plazma total porfirin seviyesi, laboratuvarımızda kullanılan etil asetat ekstraksiyon sonrası florimetrik ölçümle saptandı[86]. Plazma total porfirin seviyeleri, normal bireylerde <10 nmol/L'dir.

3.4.4. Tam Kan Total Porfirin Analizi

Protoporfirin ve hem içeren bileşikler, tam kandan, etil asetat-asetik asit karışımı ile ekstrakte edildi. Daha sonra HCl ile porfirinler tekrar ekstrakte edilerek tamkan total porfirin florimetrik olarak ölçüldü[87]. Sonuçlar $\mu\text{mol/L}$ RBC olarak verildi. Tamkan total porfirin için normal değer: $< 1.4 \mu\text{mol/L}$ RBC'dir.

3.4.5. Porfirin Fraksiyonasyon Testleri

İdrar porfirin fraksiyonlarının analizi, C18 Revers faz kolon ve floresan dedektör takılı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC, Thermo Scientific Ultimate3000, ABD) ile gerçekleştirildi. (Şekil 9) Asetonitril/amonyum asetat ve asetonitril/metanol'den oluşan mobil faz kullanılarak, asidifiye edilmiş örnekler, kromatografik fraksiyonlarına ayrılıp değerlendirilmeleri yapıldı[88].



Şekil 9 Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
(HPLC, Thermo Scientific Ultimate 3000, ABD)

3.4.6. Eritrosit HMBS Enzim Aktivite Analizi

Eritrosit HMBS enzim aktivite analizi Erlandsen E.J. ve arkadaşlarının yayınladığı metoda göre uygulandı[89]. Referans aralığı 2.5-5 U/L eritrosit'dir.

3.4.7. İdrar Kreatinin Seviyelerinin Ölçümü

İdrar kreatinin seviyeleri Olympus AU 2700 (Olympus Optical Co.Ltd, Japonya) cihazında kinetik Jaffe metodu ile ölçüldü.

3.5. Moleküler Testler (HMBS Gen Mutasyon Analizi)

3.5.1. DNA Ekstraksiyonu

Hasta örneklerinden DNA ekstraksiyonu Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Metabolizma Laboratuvarı Moleküler Analiz Ünitesi'nde DNA izolasyon odasında Invitrogen Iprep® izolasyon sistemi (iPrep™ Purification Instrument, Invitrogen Corporation) kullanılarak robotik DNA izolasyonu gerçekleştirildi (Şekil 10). İzolasyon sonrası DNA'nın kalite ve kantitesi NanoDrop® 1000 spektrofotometre (NanoDrop products, Delaware, ABD) ile belirlendi (Şekil 10). DNA örnekleri DNase ve RNase içermeyen Eppendorf tüplerde analiz anına kadar aynı ünite de bulunan ve rutin kalibrasyonu bulunan -200°C'deki derin dondurucuda muhafaza edildi.



Şekil 10 Invitrogen Iprep® izolasyon sistemi ve NanoDrop® 1000 spektrofotometre

3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR) ve DNA Dizi analizi

HMBS geninin 14 ekzonundan kodlayan 13 ekzonu ve ekzon-intron komşulukları, genomik DNA örneklerinden polimeraz zincir reaksiyonu ve bu çalışma için özel olarak düzenlenen oligonükleotid primerler (Tablo 7) kullanılarak çoğaltıldı. PCR için, 100 ng DNA, her primerden 0.4 mM, 0.75 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP ve 1 U Taq polimeraz ile 5 µL PCR buffer içeren toplam 50 µL reaksiyon karışımı kullanıldı. PCR ayarları her ekzon için, başlangıç denatürasyonu:95°C'de 2 dakika, 35 amplifikasyon siklusu boyunca 95°C'de 30 sn, 60°C'de 30 sn, 72°C'de 1 dk, ardından da 72°C'de 7 dakika şeklinde ayarlandı. Polimeraz zincir reaksiyonunun tamamlanmasını izleyen safhada, primer varlığı ve boyutlarının kontrolü için ürünler %1'lik agar ile hazırlanmış jele yüklenerek elektroforezde analiz edildi.

Tablo 7 HMBS geni ekzon ve ekzon-intron komşuluklarının amplifikasyonu ve dizi analizi için kullanılan ve bu çalışma için özel olarak düzenlenen primer çiftleri

F3	agggaccagccttgagat
R3	gagtcccccaatttggatg
F4	tccctcaggatctgcctaa
R4	ggcaaagccagaaatggtt
F5-6	tgtccccatcatgaatcgta
R5-6	gcatactaggggtcccagcaa
F7	cctaggctccaccactgaag
R7	cccaaagggaaaggcaaa
F8-9	tggggcagaaaactcaaga
R8-9	tgcatggaaagacagacagg
F10	agactcaggcagaggggaacc
R10	ggggatgactgtaaggcaga
F11	aggcctaccagccttcta
R11	gcagatgcagaagggttga
F12	cattggtggggaaagatca
R12	ttcaacaagaatgagtagcactg
F13-14	ggtctggggccacagttg
R13-14	gaggtgggatttggtagaaa
F15	gcatataatctctgttctcaccaaa
R15	agtgagaatggggcactgag

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri BigDye™ Terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) kullanılarak dizi analizine tabi tutuldu. Big Dye Terminator kit 2 µL, Big Dye buffer 2 µL, PCR ürünü 3.5 µL, primerlerden her biri 1 µL, ddH₂O 1.5 µL olacak şekilde totalde 10µL volüm ayarlandı. Döngüsel dizi ayarları her ekzon için, başlangıç denatürasyonu:96°C'de 1 dakika, 25 amplifikasyon siklusu boyunca 96°C'de 10 sn, 50°C'de 5 sn, 60°C'de 4 dk şeklinde gerçekleştirildi. Analizlerde Geneamp®9700 PCR

cihazı ile 3500 XL genetik analizörü (Applied Biosystems®, Foster City, CA) kullanıldı(Şekil 11). Analizlerde NG_008093.1 referans dizi olarak kullanıldı.



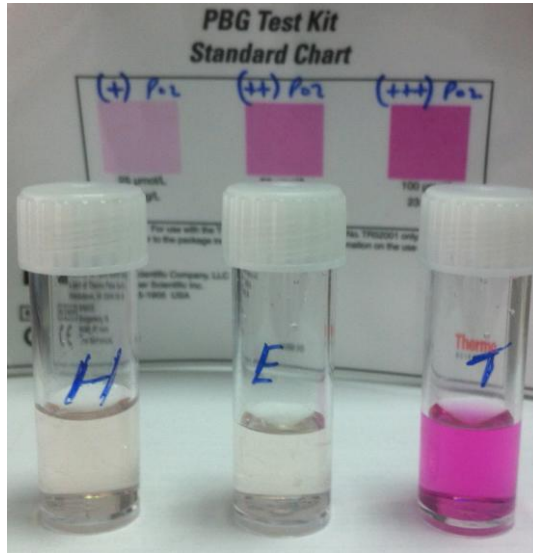
Şekil 11 Geneamp®9700 PCR cihazı ve Applied Biosystems® 3500xl genetik analizörü

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Porfirin Test Sonuçları

AİP tanısı için örnekleri alınan 7 aileden toplam 28 bireye biyokimyasal porfirin testleri ve DNA mutasyon analizi uygulandı. Hastalarımızın arasında yabancı uyruklu hasta mevcut değildi. Biyokimyasal test sonuçları 1 numaralı hastanın kızı ve yeğenin (hasta no:2 ve 3), 4 numaralı hastanın babası (hasta no:5) ve 8 numaralı hastanın kızının da (hasta no:9) AİP hastası olduğuna işaret etti. Bu bireyler 2, 3, 5 ve 9 numaralı hasta olarak numaralandırılmıştır. Sonuçta, 7 aileden 13 bireye biyokimyasal olarak AİP tanısı koyduk ve hastaları birden 13'e kadar numaralandırdık. Yaşları 14 ile 56 arasında değişen 13 hastanın (yaş ortalaması:32, ortancası:25) %69'u bayandı (Tablo 8).

İdrar PBG taraması 5, 7, 8, 9 ve 13 numaralı hastalarda negatif, kalan diğer hastalarda ise pozitif olarak bulundu. (Tablo 8). Şekil 13'de Trace PBG kitine ait örnek sonucumuz yer almaktadır.



Şekil 12 Trace PBG kitine ait örnek sonuçlar.

(Solda idrar PBG sonucu negatif olan bireye ait idrar örneği, ortada sağlıklı bireye ait idrar örneği, sağda ise pozitif sonucu olan 3 numaralı AİP hastamıza ait idrar örneği yer almaktadır.)

İdrar PBG seviyeleri 1.9 ile 55.8 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatinin arasında değişmekteydi. (İdrar PBG normalin üst sınırı: 1.5 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatinin) Hastaların ortalama idrar PBG konsantrasyonu 24.78 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatinin, ortanca 18.8 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatinin olarak bulundu. Asemptomatik dönemde örnek veren 7 ve 8 numaralı hastalar hariç tutulursa diğer tüm hastalarımızda idrar PBG seviyelerinin 4 ile 37 kat arası arttığını tespit ettik. 7 ve 8 numaralı hastalarımızda idrar PBG seviyelerini 1.9 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatinin olarak saptadık (Tablo 8).

1 ve 13 numaralı hastalar hariç tutulduğunda, kalan hastaların idrar ALA seviyeleri 2 ile 61 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatinin arasında değişmekteydi. Yükseklik tespit edilen hastalarda 1.9 ile 16 kat arası artış saptadık. İdrar ALA normalin üst sınırı: 3.8 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatinin olup; hastaların ortalama idrar ALA konsantrasyonu: 21.42 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatinin, ortanca ise 17.8 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatinin olarak bulundu (Tablo 8).

13 hastanın 6'sında idrar total porfirin seviyesi, normalin üst sınırı olan 35 nmol/mmol kreatininin seviyesini geçmedi.

Eritrosit PBG deaminaz enzim aktivitesinin sağlıklı bireylerdeki referans aralığı 2.5-5 UI/L RBC olup, hasta değerleri 1.2 ile 2.1 UI/L RBC arasında değişmekteydi. Hastalarımızda ortalama eritrosit PBG deaminaz enzim aktivitesi 1.72 UI/L RBC, ortancası ise 1.82 UI/L RBC olarak saptandı. Sağlıklı bireylerdeki mediana göre (sağlıklı bayanlarda median 3.61 UI/L RBC, erkeklerde ise 3.85 UI/L RBC'dir) hastaların eritrosit PBG deaminaz enzim aktiviteleri ise %33-55 arasında saptandı (Tablo 8).

1, 5, 9 ve 13 numaralı hastalarda plazma floresan emisyon tarama piki saptanmadı. Kalan hastaların (12 numaralı hasta haricinde) yarısında 621nm'de plazma floresan emisyon tarama piki saptandı. (Tablo 8). 10 ve 1 numaralı hastalara ait plazma floresan emisyon tarama sonuçları sırasıyla Şekil 13 ve Şekil 14'de örnek olarak verilmiştir.

Biyokimyasal olarak tanı konan 13 hastaya ait porfiriya test sonuçları tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8 Biyokimyasal olarak tanısı konmuş 13 hastaya ait porfiriya test sonuçları

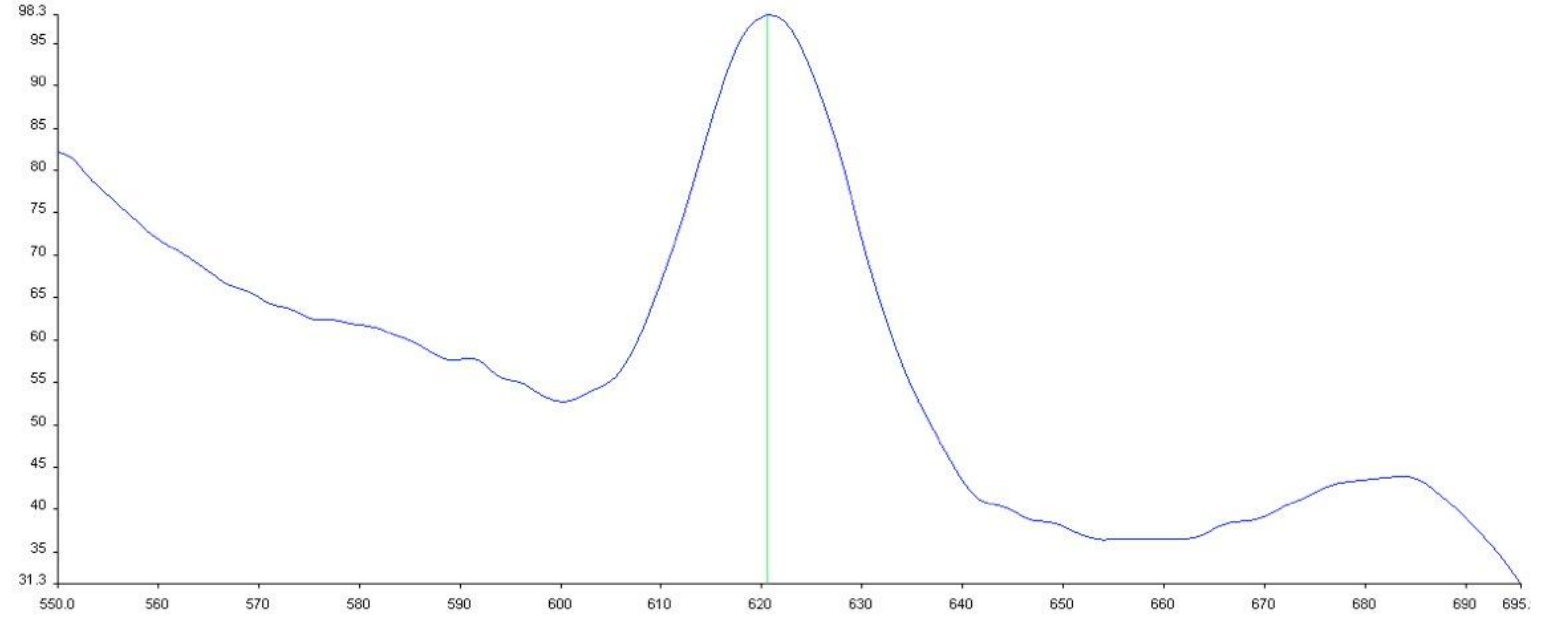
hasta no.	cinsiyet	yaş	PBG Tarama +:pozitif, -:negatif	İdrar PBG (<1.5µmol/mM kreatinin)	İdrar ALA (<3.8µmol/ mM kreatinin)	İdrar Total Porfirin (<35nM/mM kreatinin)	Eritrosit PBG Deaminaz aktivitesi (2.5-5 UI/L Rbc)	Mediana göre enzim aktivite yüzdesi (%)	Plazma Total Porfirin (<10nM/L)	Plazma floresans emiyon tarama piki (nm)	Tam Kan Total Porfirin (FEP) (<1.4µM/L Rbc)
1	k	56	+	18.8	2	11	1.6	46	12	pik yok	1.7
2	k	24	+	23.8	19.3	108	1.4	37	68	621	2.1
3	k	25	+	52.4	26.2	157	1.9	52	198	621	2.6
4	k	14	+	44.6	50.1	174	1.2	33	44	622	2
5	e	35	-	6.2	7.2	6	1.9	50	m.d.	pik yok	m.d.
6	k	24	+	11.8	9.1	188	1.9	51	55	624	2.6
7	e	25	-	1.9	18	29	1.8	49	77	621	m.d.
8	k	56	-	1.9	17.8	1	1.9	51	15	624	m.d.
9	k	30	-	54.4	5.2	28	1.4	36	10	pik yok	m.d.
10	k	23	+	15	61.0	89	1,7	46	132	620	1
11	k	31	+	55.8	47.2	334	1.9	52	76	621	0.9
12	e	52	+	28	12	44	2.1	55	7	m.d.	0.9
13	e	25	-	7.5	3.3	6	1.7	50	6	pik yok	0.5
ortalama		32		24.78	21.42	90	1.72	47	58.23	622	1.6
ortanca		25		18.80	17.8	44	1.82	50	49.30	621	1.7

md: mevcut değil, Rbc: Eritrosit

Aynı aileden olan hastalar: 1, 2 ve 3 numaralı hastalar, 4 ve 5 numaralı hastalar, 8 ve 9 numaralı hastalar, 11, 12 ve 13 numaralı hastalar .

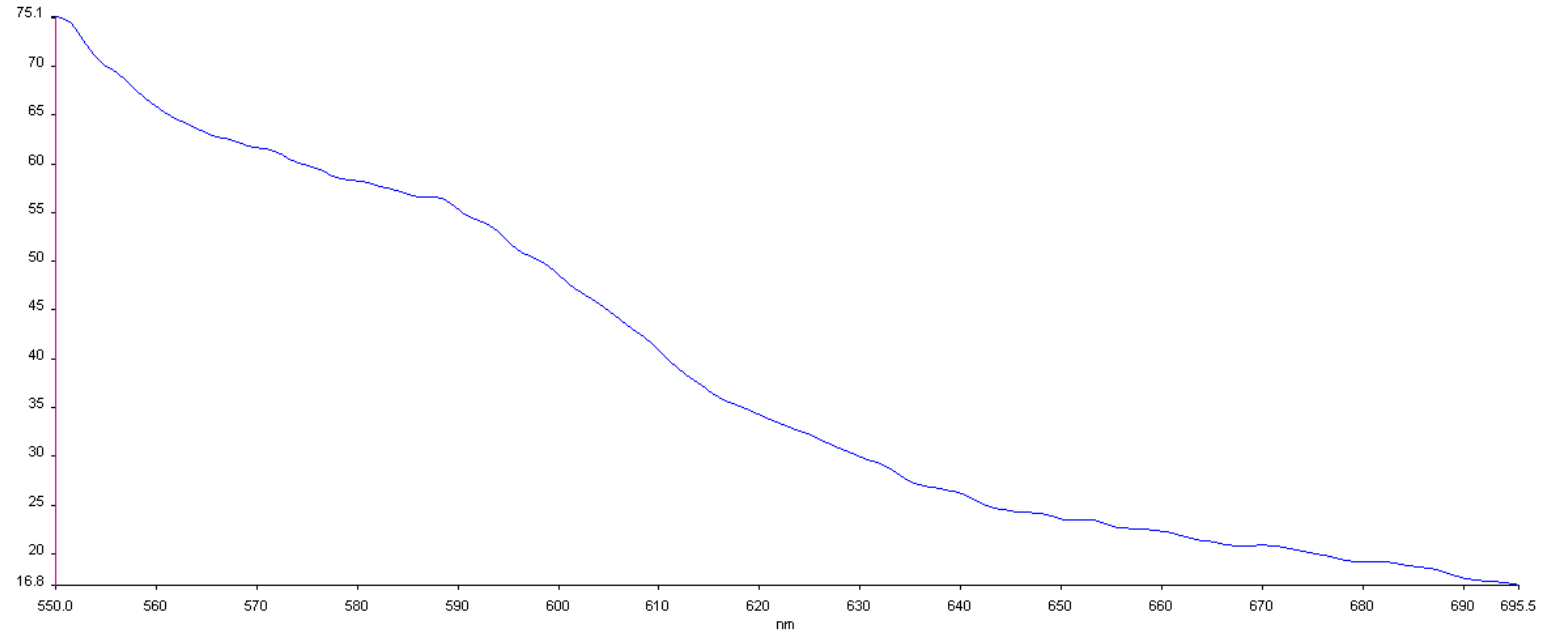
Şekil 13 10 numaralı hastaya ait plazma floresan emisyon tarama sonucu

(620nm'de pik)



Şekil 14 1 numaralı hastaya ait plazma floresan emisyon tarama sonucu

(pik yok)

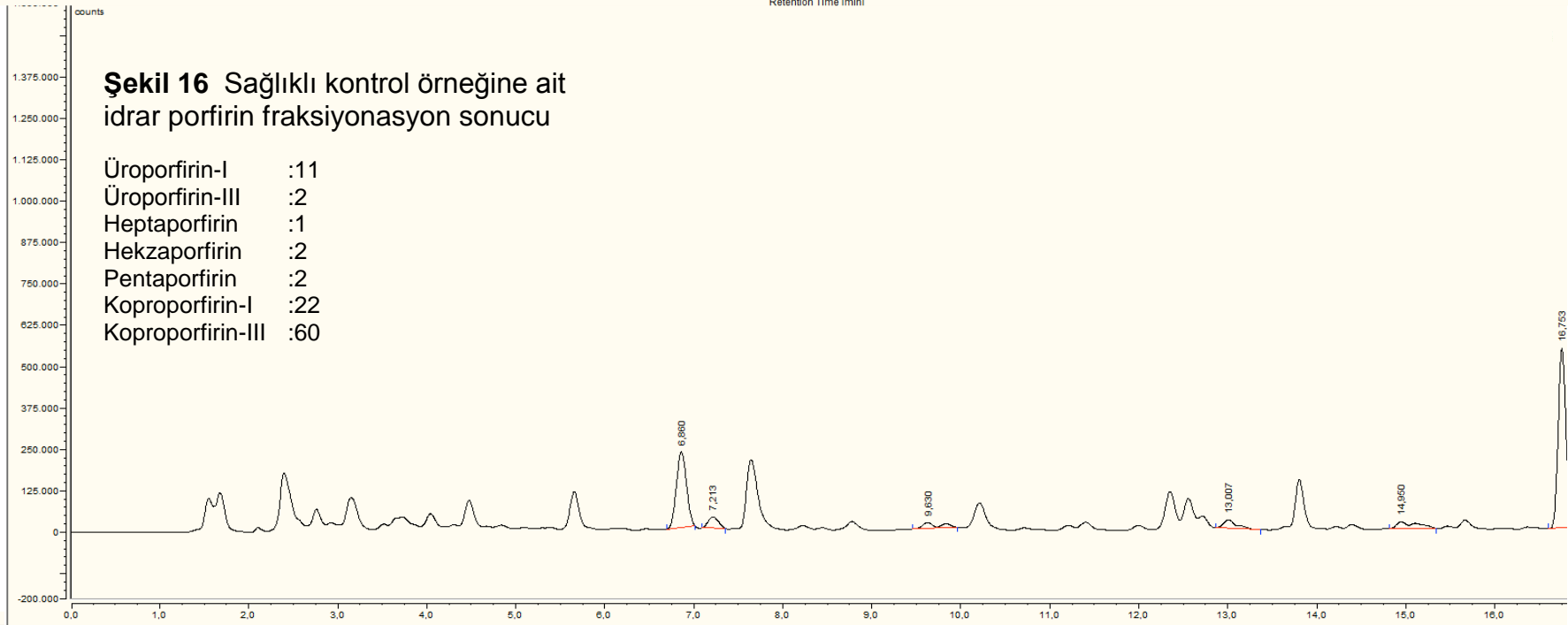
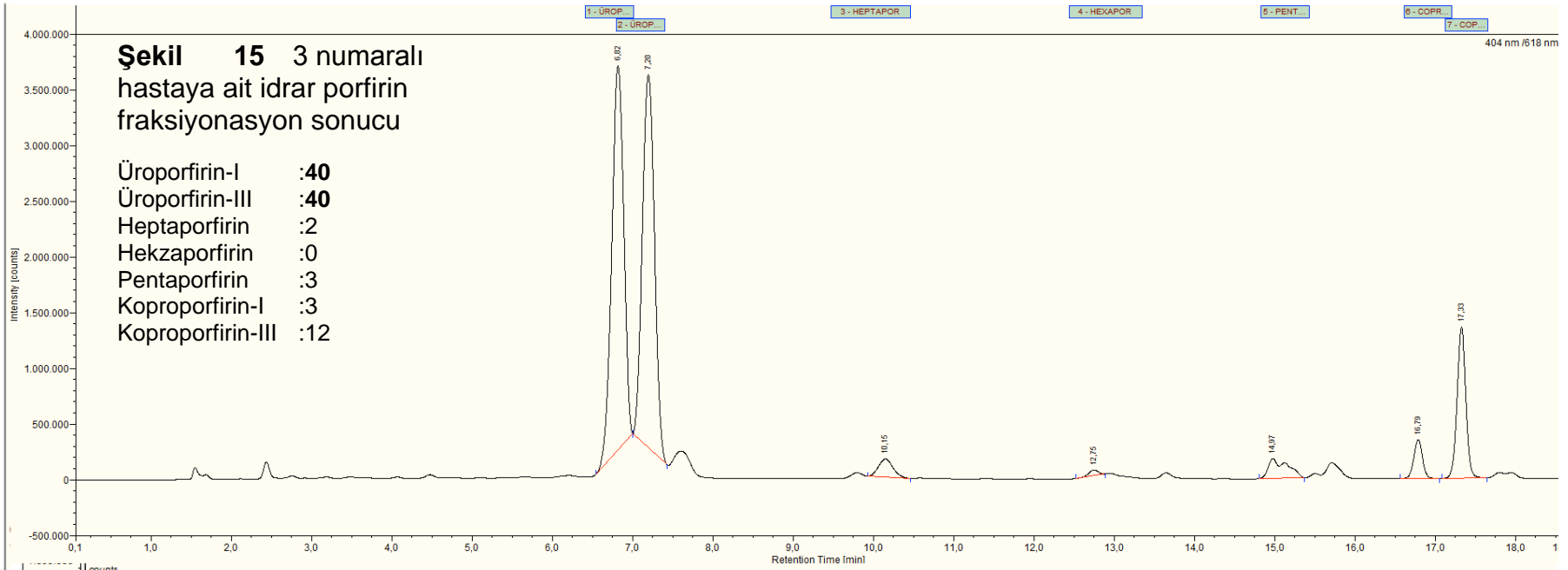


Hastaların çoğunda tanıyı destekleyecek şekilde idrar porfirin fraksiyonasyon sonuçları elde ettik. Hastaların idrar üroporfirin 1 ve 3 izomerlerinde artış saptadık. Normal bireylerde ortalama idrar HPLC fraksiyonasyon değerleri aşağıda belirtilen oranlardadır:

Üroporfirin-I:	%15
Üroporfirin-III:	%6
Heptaporfirin:	%5
Hekzaporfirin:	%1
Pentaporfirin:	%3
Koproporfirin-I:	%16
Koproporfirin-III	%54

Şekil 16'da 3 numaralı hastaya ait idrar porfirin fraksiyonasyon sonucu, Şekil 17'de ise sağlıklı kontrol örneğine ait idrar porfirin fraksiyonasyon sonucu yer almaktadır.

Hastalardan özellikle 1 numaralı hasta ve yakınlarının durumu dikkat çekiciydi: Hastanın asemptomatik kızlarından biri, biyokimyasal olarak laboratuvarımızda AİP tanısı aldı. Ancak yine asemptomatik olan diğer kızının düşük PBG deaminaz enzim aktivitesi (PBG deaminaz enzim aktivitesi:1.78 UI/L RBC, %47,46) haricinde kalan biyokimyasal porfiriya testleri normal olarak saptandı. Ayrıca 1 numaralı hastanın iki yeğeninden birisi (hasta no:3) de, biyokimyasal porfirin sonuçları göz önüne alındığında hasta olarak tespit edildi. Bu nedenlerden ötürü bu aileye HMBS gen mutasyon analizinin yapılması ve saptanacak olan HMBS gen mutasyonunun asemptomatik bireylerde taranması zorunluluktadır.



4.2. HMBS Gen Mutasyon Analiz Sonuçları

7 farklı aileden biyokimyasal ve klinik olarak AİP tanısı almış 13 hastaya HMBS gen mutasyon analiz yapıldı. 13 AİP hastasında daha önce rapor edilmiş 4 farklı heterozigot HMBS gen mutasyonu tespit edildi. Saptanan mutasyonlar Tablo 9'da verilmiştir. Bunlardan üçü missense mutasyon, birtanesi de splicing mutasyondur.

Tablo 9 AİP hastalarına ait HMBS gen mutasyon analiz sonuçları

Hasta no	Amino asit değişimi	Nükleotid değişimi	Mutasyon tipi veya etki	Kaynak
1	p.L30R	c.89T>G	missens mutasyon	Ulbrichova et al. (Hum Genet 2008; 124:315) [85]
2	p.L30R	c.89T>G	missens mutasyon	Ulbrichova et al. (Hum Genet 2008; 124:315) [85]
3	p.L30R	c.89T>G	missens mutasyon	Ulbrichova et al. (Hum Genet 2008; 124:315) [85]
4	p.R173W	c.517C>T	missens mutasyon	Méndez et al. (Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2009; 1;55(2):55-63) [90]
5	p.R173W	c.517C>T	missens mutasyon	Méndez et al. (Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2009; 1;55(2):55-63) [90]
6	p.R173W	c.517C>T	missens mutasyon	Méndez et al. (Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2009; 1;55(2):55-63) [90]
7	p.R173W	c.517C>T	missens mutasyon	Méndez et al. (Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2009; 1;55(2):55-63) [90]
8	p.R173W	c.517C>T	missens mutasyon	Méndez et al. (Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2009; 1;55(2):55-63) [90]
9	p.R173W	c.517C>T	missens mutasyon	Méndez et al. (Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2009; 1;55(2):55-63) [90]
10	p.L343P	c.1028T>C	missens mutasyon	Floderus et al. (Clin Genet 2002; 62, 288)[91]
11	?	c.913-2A>G	splicing mutasyon	Floderus et al. (Clin Genet 2002; 62, 288) [91]
12	?	c.913-2A>G	splicing mutasyon	Floderus et al. (Clin Genet 2002; 62, 288) [91]
13	?	c.913-2A>G	splicing mutasyon	Floderus et al. (Clin Genet 2002; 62, 288) [91]

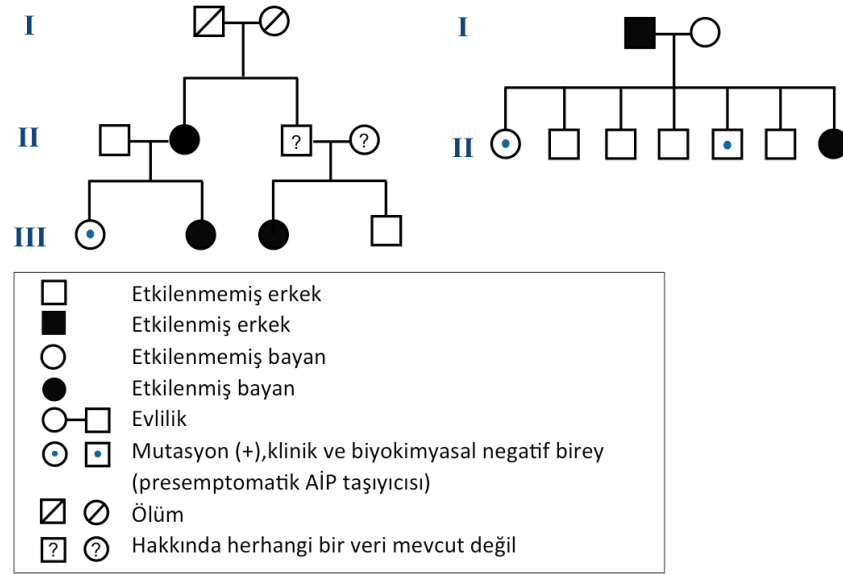
?:Mutasyonun fonksiyonel etkileri net değildir.

Aminoasit değişimlerinde kısaltmalar: L:Lösin, R:Arjinin, W:Triptofan, P:Prolin

Nükleotid değişimlerinde kısaltmalar: A:adenin, G:guanin, C:sitozin, T:timin

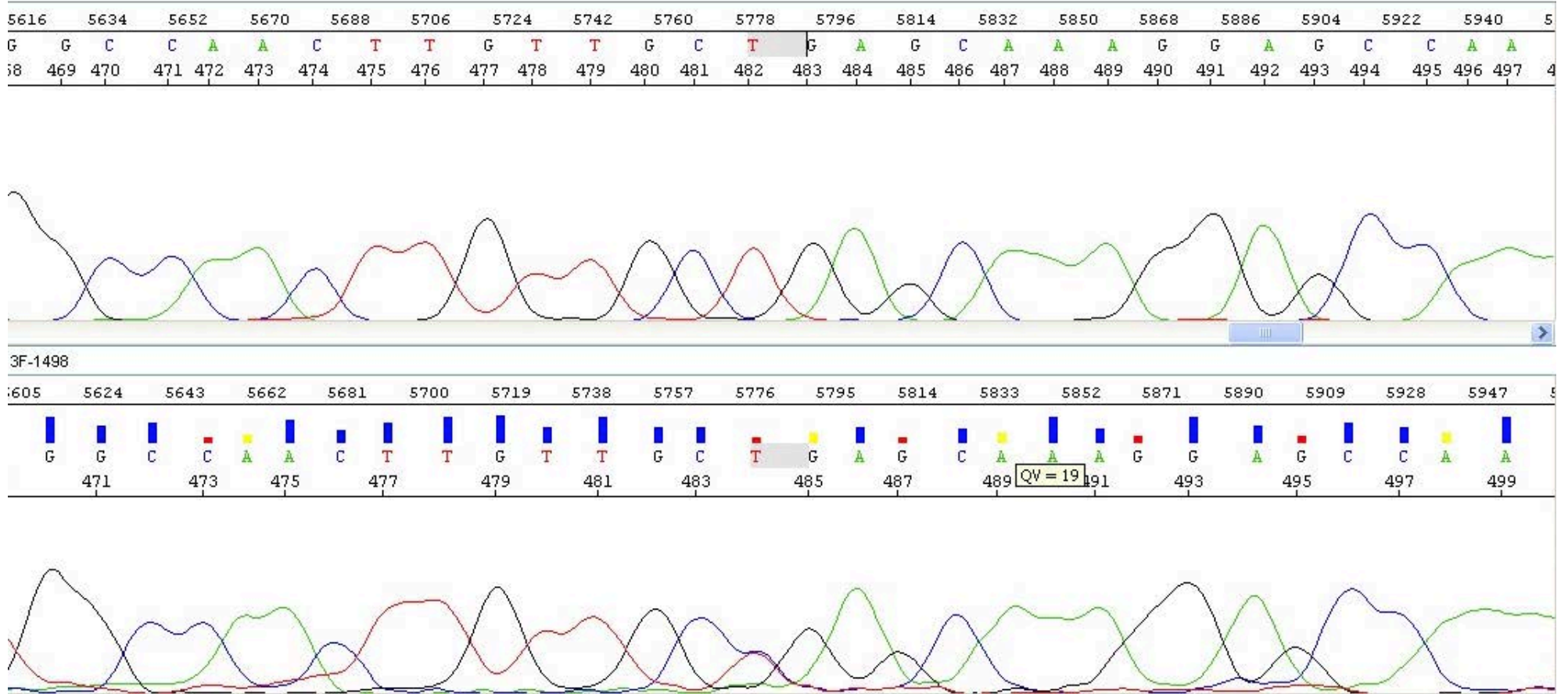
1 numaralı anne ve 2 numaralı kızında rastlanan c.89T>G mutasyonu, biyokimyasal olarak sadece PBGD enzim aktivite düşüklüğü gösteren diğer kızında da saptandı. Böylelikle anne, iki kızı ve bir yeğeninde de aynı mutasyon tespit edildi. Bu mutasyonda heterozigot olarak ekzon 4'ün 89. pozisyonuna timin yerine adenin gelmiştir. Oluşan missens mutasyon, 30'ncu pozisyondaki lösin yerine arjinin değişimi ve ilk üç AİP hastamızda klinik ve biyokimyasal belirtilerle sonuçlanmıştır.

Ayrıca 13 AİP hastasında saptanan 4 farklı HMBS gen mutasyonu, hastaların ulaşılabilen birinci dereceden 15 akrabasında da tarandı. Sonuç olarak, 15 asemptomatik akrabadan 5'inde presemptomatik AİP taşıyıcılığı (latent AİP) tespit edildi, ancak kalan 10'unda ise herhangi bir mutasyon tespit edilemedi. 1,2,3 numaralı hastalar (sırasıyla anne, kızı ve yeğeni) ve 4,5 numaralı hastaları (sırasıyla kızı ve babası) içeren ilk iki aileye ait pedigrî tablosu Şekil 17' de yer almaktadır.

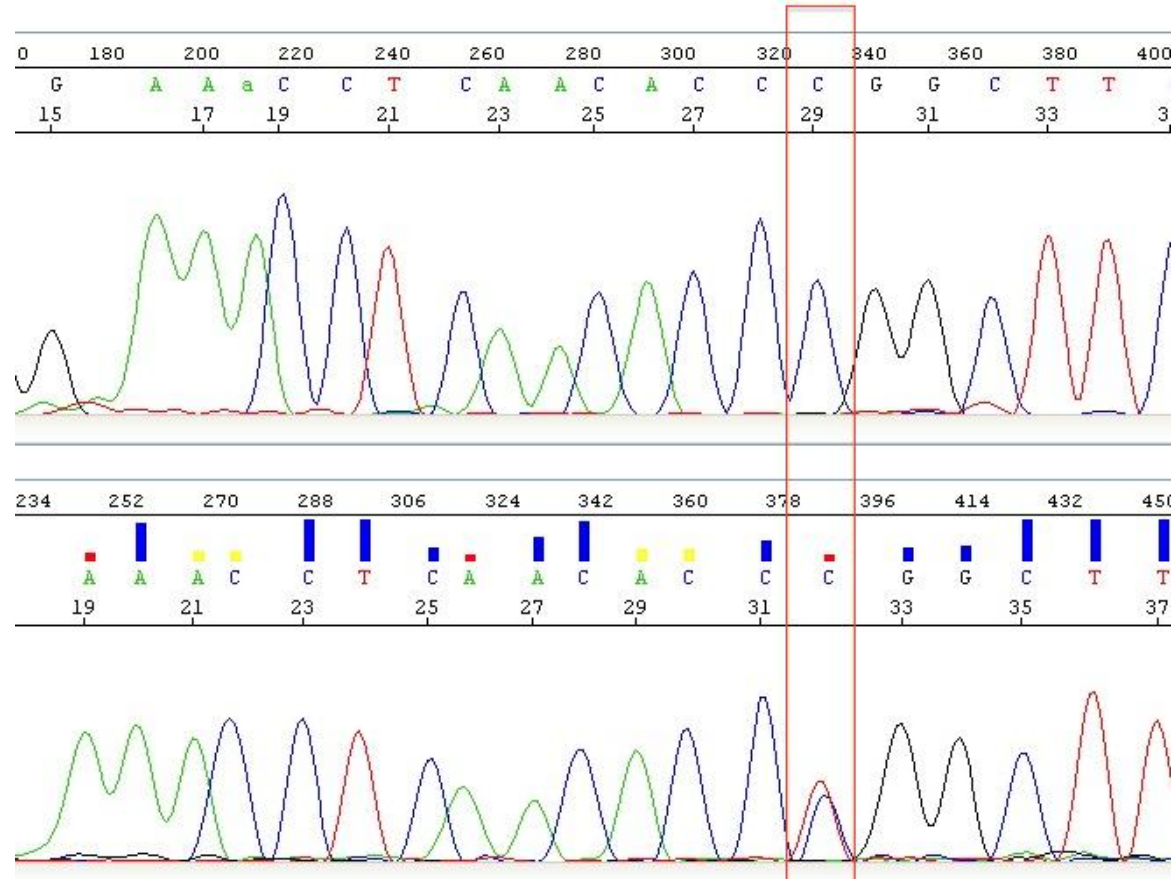


Şekil 17 1,2,3 numaralı hastalar(sırasıyla anne, kızı ve yeğeni) ve 4,5 numaralı hastaları(sırasıyla kızı ve babası) içeren ilk iki aileye ait pedigrî tablosu

Genetik analizörden elde edilen normal sonuçlara ait bir örnek Şekil 18'de gösterilmiştir. Şekil 19'da ise 1 numaralı hastanın mutasyonunu gösteren elektroferogram örnek olarak verilmiştir.



Şekil 18 Sekans analizöründen elde edilen piklere ait bir örnek
(sitozin(C):mavi, timin(T):kırmızı, adenin(A):yeşil, guanin(G):siyah).



Şekil 19 5 numaralı hastanın elektroferogramı: c.517C>T (p. R173W)

(sitozin(C):mavi, timin(T):kırmızı, adenin(A):yeşil, guanin(G):siyah).

5. TARTIŞMA

Akut porfiriyalar (AİP,HC, VP) hem biyosentezinin nadir rastlanan genetik bozukluklarıdır. Ancak bu bozukluklarda çeşitli faktörlerle (açlık, stres, hormonal değişimler, bazı ilaçların alınması vb) tetiklenen, doğru tanı almaz ve yanlış tedavi uygulanırsa yaşamı tehdit edebilen akut nörolojik ataklar görülebilmektedir.

Akut atak geçiren semptomatik hastalarda, vücut sıvılarında aşırı artmış hem ön maddeleri (PBG, ALA ve diğer porfirin türevleri) gösterilerek, atağın akut porfiryalardan kaynaklandığı gösterilebilirse de, genetik danışmanlık verilebilmesi açısından akut atağa sebep olan porfiriya tipinin(AIP, HC, VP) belirlenmesi gerekir. Bu ayırım, semptomatik hastaların çoğunda karakteristik porfirin birikim ve atım paternlerinin gösterildiği biyokimyasal analizlerle yapılabilirse de, atak geçirmeyen (asemptomatik) veya mutant gen taşıyan kişilerin belirlenerek akut ataklardan korunması için bu kişilerde akut porfiriya neden olan gen (HMBS gen, PPOX gen ve CPOX gen) mutasyonların DNA mutasyon analizi ile gösterilmesi şarttır.

Bu çalışmada, ülkemizde daha önce laboratuvar ve klinik olarak akut porfiriya yada akut intermitan porfiriya tanısı almış hastaların hem AİP tanısını moleküler analiz yaparak kesinleştirmeyi, hem de ulaşılabilen birinci derece akrabalarında HMBS gen mutasyon taşıyıcılığını araştırmayı amaçladık. Bu amaçla ulaşılabilen hastaların öncelikle biyolojik materyallerinde (idrara, gaita, kan, plazma) porfirin analizleri yapıldı. Ayrıca geliştirilen metotla ülkemizde ilk kez bu hastalarda eritrosit PBG deaminaz aktivitesi ölçüldü ve daha sonra kesin tanı için HMBS gen mutasyon analizleri yapıldı.

Çalışmanın ilk fazında toplanan tüm örneklere (n:28) biyokimyasal porfiriya testleri uygulandı. 7 aileden 13 hastanın dizi analizinin yapılmasının ardından 4 farklı mutasyon saptandı ve 13 AİP hastasının tanısı kesinleştirilmiş oldu. Saptanan HMBS gen mutasyonları 15 asemptomatik

birinci dereceden akrabada tarandı ve bunlardan 5'inde mutasyon analizi sayesinde ilk kez mutasyon taşıyıcısı(preseptomatik AİP taşıyıcısı) tanısı konulmuş oldu. Kalan 10 akrabada ise herhangi bir mutasyona rastlanmadı. Toplamda 28 örneğin 18'inde HMBS gen mutasyonu tespit edildi.

Hastaların tanıları dizi analizi ile doğrulanmış oldu. Bulduğumuz 4 farklı mutasyondan 3 tanesi (c.89T>G (p.L30R), c.517C>T (p.R173W) ve c.1028T>C (p.L343P)) heterozigot missense mutasyon olarak tespit edildi. Fonksiyonel etkisi tam olarak bilinmeyen bir adet heterozigot splicing mutasyon (c.913-2A>G) saptandı. Çalışılan örneklerde yeni mutasyon tespit edilemedi. Tüm mutasyonlar heterozigot mutasyondur, homozigot mutasyona rastlanmadı. Bu bulgu, heterozigot hastaların eritrosit PBG deaminaz aktivitelerinin normalin %50 civarında bulunması ile uyumludur. Kaynaklarda işaret edildiği gibi mutasyonlar ailelere özgü idi. Her ailede farklı mutasyon olması ve şimdiye değin HMBS geninde 390 farklı mutasyon saptanmış olması, AİP'dan şüphelenilen vakalarda sadece belli DNA mutasyonlarına yönelik tarama ile hızlı tanı konulmasına imkan tanımamaktadır. Bu nedenle, AİP'dan şüphelenilen hastalarda HMBS dizi analizi yapılması etkin yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır.

HMBS gen mutasyonlarının çoğu aileye özgü olmakla beraber, kuzey İsveç'deki AİP[49] gibi tek bir hastadan nesiller boyunca aktarılan ve sık rastlanılan mutasyonlar olabilir. Bizim çalışmamızda da örnekleri toplanan 7 farklı ailenin 4'ünde aynı mutasyon (c.517C>T (p. R173W)) saptanmıştır. Çalışma popülasyonunun 7 aileden oluşması nedeniyle gelecekte yapılacak çalışmalarla, bu mutasyonun Türk toplumunda sık görüldüğü tezi pekiştirilebilir.

Ülkemizde ulaşabildiğimiz yayınlanan üç akut intermitan porfiriya vakası vardır[92-94], fakat bu çalışmalarda PBGD enzim aktivite ölçümü ve HMBS gen mutasyon analizi mevcut değildir.

Otozomal dominant olarak geçmesine rağmen, AİP'nın klinik penetrasyonu değişkendir. Çoğunlukla latent seyreder. Bir kişide HMBS gen

mutasyonu çıkması, o kişinin AİP hastası olduğuna işaret etmemektedir. Zira akut ataklar, mutasyon taşıyıcıların ancak %5-15'inde gelişmektedir. Mutasyonu taşıyan 5 AİP taşıyıcısının, akut atağı presipite eden faktör ve durumlardan kaçınmaları, onların atak geçirmelerini büyük ölçüde önleyecektir.

Ayrıca HMBS gen mutasyonu taşıyan kişilerde bu mutasyonun gösterilmesi genetik danışmanlık ve prenatal tanı açısından önem arz etmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, bugüne kadar klinik ve biyokimyasal olarak AİP tanısı almış, ulaşabildiğimiz tüm hastaların porfirin analizleri tekrar yapılmış, ayrıca ülkemizde ilk kez eritrosit PBG deaminaz enzim analizi ve HMBS gen mutasyon analizi yapılarak AİP tanıları kesinleştirilmiştir.

Ayrıca hastaların ulaşılabilen birinci dereceden akrabalarında HMBS gen mutasyonu aranarak presemptomatik AİP taşıyıcı olan bireyler saptandı.

Nadir rastlanan, fakat tanı almadığı acil durumlarda hasta yaşamını tehdit edebilecek akut atak geçiren AİP hastaları ve ailelerindeki taşıyıcı bireylerin saptanmasına olanak sağlayan HMBS gen mutasyon analizinin ileride Tıbbi Biyokimya laboratuvarlarına kazandırılması, ülkemizin European Porphyria Network'e (EPNET) kabul edilmiş tek laboratuvarı olan Gülhane Porfirin laboratuvarında porfiriya biyokimyasal tanı testleri yanında moleküler tanı testleri yapılmasını sağlayarak uluslararası standartta eksiksiz spesifik porfiriya laboratuvar hizmetinin verilmesini sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Puy, H., L. Gouya, and J.-C. Deybach, *Porphyrias*. The Lancet, 2010. **375**(9718): p. 924-937.
2. Layer, G., et al., *Structure and function of enzymes in heme biosynthesis*. Protein Sci, 2010. **19**(6): p. 1137-61.
3. Balwani, M. and R.J. Desnick, *The porphyrias: advances in diagnosis and treatment*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2012. **2012**: p. 19-27.
4. May, B.K., et al., *Molecular regulation of heme biosynthesis in higher vertebrates*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1995. **51**: p. 1-51.
5. Cotter, P.D., M. Baumann, and D.F. Bishop, *Enzymatic defect in "X-linked" sideroblastic anemia: molecular evidence for erythroid delta-aminolevulinic synthase deficiency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(9): p. 4028-32.
6. Whatley, S.D., et al., *C-terminal deletions in the ALAS2 gene lead to gain of function and cause X-linked dominant protoporphyria without anemia or iron overload*. Am J Hum Genet, 2008. **83**(3): p. 408-14.
7. Anderson, K., et al., eds. *Disorders of heme biosynthesis: X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias*. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, ed. B.A. Scriver CR, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B. 2001: New York, McGraw Hill.
8. Foran, S.E. and G. Ábel, *Guide to porphyrias*. American Journal of Clinical Pathology. Pathology Patterns Reviews., 2003. **119**(Suppl 1): p. S86.
9. Göçmen, A., et al., *Hexachlorobenzene Episode in Turkey*. Biomedical and Environmental Sciences, 1989. **2**: p. 36-43.
10. Desnick, R., K. Astrin, and K. Anderson, *Inherited porphyrias*. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, 2007: p. 2331-2358.

11. Martasek, P., Y. Nordmann, and B. Grandchamp, *Homozygous hereditary coproporphyria caused by an arginine to tryptophane substitution in coproporphyrinogen oxidase and common intragenic polymorphisms*. Hum Mol Genet, 1994. **3**(3): p. 477-80.
12. Lindberg, R.L., et al., *Motor neuropathy in porphobilinogen deaminase-deficient mice imitates the peripheral neuropathy of human acute porphyria*. J Clin Invest, 1999. **103**(8): p. 1127-34.
13. Wahlin, S., et al., *Combined liver and kidney transplantation in acute intermittent porphyria*. Transpl Int, 2010. **23**(6): p. e18-21.
14. Soonawalla, Z.F., et al., *Liver transplantation as a cure for acute intermittent porphyria*. Lancet, 2004. **363**(9410): p. 705-6.
15. Stojeba, N., et al., *Recovery from a variegate porphyria by a liver transplantation*. Liver Transpl, 2004. **10**(7): p. 935-8.
16. Thunell, S., et al., *Liver transplantation in a boy with acute porphyria due to aminolaevulinate dehydratase deficiency*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1992. **30**(10): p. 599-606.
17. Dowman, J.K., et al., *Liver transplantation for acute intermittent porphyria is complicated by a high rate of hepatic artery thrombosis*. Liver Transplantation, 2012. **18**(2): p. 195-200.
18. Anderson, K.E., et al., *Recommendations for the diagnosis and treatment of the acute porphyrias*. Ann Intern Med, 2005. **142**(6): p. 439-50.
19. Solis, C., et al., *Acute intermittent porphyria: studies of the severe homozygous dominant disease provides insights into the neurologic attacks in acute porphyrias*. Arch Neurol, 2004. **61**(11): p. 1764-70.
20. Hift, R.J., et al., *Homozygous variegate porphyria: an evolving clinical syndrome*. Postgrad Med J, 1993. **69**(816): p. 781-6.
21. Nordmann, Y., et al., *Harderoporphyria: a variant hereditary coproporphyria*. J Clin Invest, 1983. **72**(3): p. 1139-49.
22. Hultdin, J., et al., *Acute intermittent porphyria in childhood: a population-based study*. Acta Paediatr, 2003. **92**(5): p. 562-8.

23. Stein, J.A., et al., *Abnormal iron and water metabolism in acute intermittent porphyria with new morphologic findings*. Am J Med, 1972. **53**(6): p. 784-9.
24. Ridley, A., *Porphyric Neuropathy*, in *Peripheral Neuropathy*, P.T. Dyck, PK; Lambert, EH, Editor. 1975, WB Saunders: Philadelphia. p. 942-55.
25. Church, S.E., et al., *Hypertension and renal impairment as complications of acute porphyria*. Nephrol Dial Transplant, 1992. **7**(10): p. 986-90.
26. Ostrowski, J., et al., *Abnormalities in liver function and morphology and impaired aminopyrine metabolism in hereditary hepatic porphyrias*. Gastroenterology, 1983. **85**(5): p. 1131-7.
27. Jeans, J.B., et al., *Mortality in patients with acute intermittent porphyria requiring hospitalization: a United States case series*. Am J Med Genet, 1996. **65**(4): p. 269-73.
28. Anderson, K.E., et al., *A gonadotropin releasing hormone analogue prevents cyclical attacks of porphyria*. Arch Intern Med, 1990. **150**(7): p. 1469-74.
29. Lip, G.Y., et al., *Smoking and recurrent attacks of acute intermittent porphyria*. BMJ, 1991. **302**(6775): p. 507.
30. Benassi, F., et al., *Cardiac surgery in patients with acute intermittent porphyria*. J Card Surg, 2012. **27**(3): p. 331-4.
31. Bonkovsky, H.L. and G.F. Barnard, *Diagnosis of porphyric syndromes: a practical approach in the era of molecular biology*. Semin Liver Dis, 1998. **18**(1): p. 57-65.
32. Mauzerall, D. and S. Granick, *The occurrence and determination of delta-amino-levulinic acid and porphobilinogen in urine*. J Biol Chem, 1956. **219**(1): p. 435-46.
33. Deacon, A.C. and T.J. Peters, *Identification of acute porphyria: evaluation of a commercial screening test for urinary porphobilinogen*. Ann Clin Biochem, 1998. **35 (Pt 6)**: p. 726-32.
34. Watson, C. and S. Schwartz. *A Simple Test for Urinary Porphobilinogen*. in *Proceedings of the Society for Experimental*

Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY). 1941. Royal Society of Medicine.

35. Lamon, J., T.K. With, and A.G. Redeker, *The Hoesch test: bedside screening for urinary porphobilinogen in patients with suspected porphyria*. Clin Chem, 1974. **20**(11): p. 1438-40.
36. Jacob, K. and M.O. Doss, *Excretion pattern of faecal coproporphyrin isomers I-IV in human porphyrias*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1995. **33**(12): p. 893-901.
37. Poh-Fitzpatrick, M.B., *A plasma porphyrin fluorescence marker for variegate porphyria*. Arch Dermatol, 1980. **116**(5): p. 543-7.
38. Hindmarsh, J.T., L. Oliveras, and D.C. Greenway, *Biochemical differentiation of the porphyrias*. Clin Biochem, 1999. **32**(8): p. 609-19.
39. Aarsand, A.K., P.H. Petersen, and S. Sandberg, *Estimation and application of biological variation of urinary delta-aminolevulinic acid and porphobilinogen in healthy individuals and in patients with acute intermittent porphyria*. Clin Chem, 2006. **52**(4): p. 650-6.
40. Allen, K.R., et al., *Hereditary coproporphyria: comparison of molecular and biochemical investigations in a large family*. J Inherit Metab Dis, 2005. **28**(5): p. 779-85.
41. Hift, R.J., et al., *Plasma fluorescence scanning and fecal porphyrin analysis for the diagnosis of variegate porphyria: precise determination of sensitivity and specificity with detection of protoporphyrinogen oxidase mutations as a reference standard*. Clin Chem, 2004. **50**(5): p. 915-23.
42. Kuhnel, A., U. Gross, and M.O. Doss, *Hereditary coproporphyria in Germany: clinical-biochemical studies in 53 patients*. Clin Biochem, 2000. **33**(6): p. 465-73.
43. Nordmann, Y. and H. Puy, *Human hereditary hepatic porphyrias*. Clin Chim Acta, 2002. **325**(1-2): p. 17-37.
44. Puy, H., et al., *Molecular epidemiology and diagnosis of PBG deaminase gene defects in acute intermittent porphyria*. Am J Hum Genet, 1997. **60**(6): p. 1373-83.

45. Puy, H., et al., *Acute intermittent porphyria: rapid molecular diagnosis*. Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France), 1997. **43**(1): p. 37.
46. Rosipal, R., et al., *Systematic analysis of coproporphyrinogen oxidase gene defects in hereditary coproporphyria and mutation update*. Hum Mutat, 1999. **13**(1): p. 44-53.
47. Whatley, S.D., et al., *Variegate porphyria in Western Europe: identification of PPOX gene mutations in 104 families, extent of allelic heterogeneity, and absence of correlation between phenotype and type of mutation*. Am J Hum Genet, 1999. **65**(4): p. 984-94.
48. Meissner, P.N., et al., *A R59W mutation in human protoporphyrinogen oxidase results in decreased enzyme activity and is prevalent in South Africans with variegate porphyria*. Nat Genet, 1996. **13**(1): p. 95-7.
49. Lee, J.S. and M. Anvret, *Identification of the most common mutation within the porphobilinogen deaminase gene in Swedish patients with acute intermittent porphyria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(23): p. 10912-5.
50. Stenson, P.D., et al., *The Human Gene Mutation Database: 2008 update*. Genome Med, 2009. **1**(1): p. 13.
51. Whatley, S.D., et al., *Diagnostic strategies for autosomal dominant acute porphyrias: retrospective analysis of 467 unrelated patients referred for mutational analysis of the HMBS, CPOX, or PPOX gene*. Clin Chem, 2009. **55**(7): p. 1406-14.
52. Elder, G.H., *Hepatic porphyrias in children*. J Inherit Metab Dis, 1997. **20**(2): p. 237-46.
53. Handschin, C., et al., *Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1alpha*. Cell, 2005. **122**(4): p. 505-15.
54. Watson, C.J., et al., *Use of hematin in the acute attack of the "inducible" hepatic porphyrias*. Adv Intern Med, 1978. **23**: p. 265-86.
55. Bonkowsky, H.L., et al., *Repression of the overproduction of porphyrin precursors in acute intermittent porphyria by intravenous infusions of hematin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(11): p. 2725-9.

56. Bonkovsky, H.L., et al., *Intravenous heme-albumin in acute intermittent porphyria: evidence for repletion of hepatic hemoproteins and regulatory heme pools*. Am J Gastroenterol, 1991. **86**(8): p. 1050-6.
57. Elder, G.H., R.J. Hift, and P.N. Meissner, *The acute porphyrias*. Lancet, 1997. **349**(9065): p. 1613-7.
58. Mustajoki, P. and Y. Nordmann, *Early administration of heme arginate for acute porphyric attacks*. Arch Intern Med, 1993. **153**(17): p. 2004-8.
59. Thadani, H., A. Deacon, and T. Peters, *Diagnosis and management of porphyria*. BMJ, 2000. **320**(7250): p. 1647-51.
60. Yasuda, M., et al., *AAV8-mediated gene therapy prevents induced biochemical attacks of acute intermittent porphyria and improves neuromotor function*. Mol Ther, 2010. **18**(1): p. 17-22.
61. Stein, J.A. and D.P. Tschudy, *Acute intermittent porphyria. A clinical and biochemical study of 46 patients*. Medicine (Baltimore), 1970. **49**(1): p. 1-16.
62. Cojocar, I.M., et al., *Acute Intermittent Porphyria—Diagnostic and Treatment Traps*. Romanian journal of internal medicine= Revue roumaine de médecine interne, 2012. **50**(1): p. 33.
63. Ulbrichova-Douderova, D. and P. Martasek, *Detection of DNA variations in the polymorphic hydroxymethylbilane synthase gene by high-resolution melting analysis*. Anal Biochem, 2009. **395**(1): p. 41-8.
64. Deybach, J.C. and H. Puy, *Porphobilinogen deaminase gene structure and molecular defects*. Journal of bioenergetics and biomembranes, 1995. **27**(2): p. 197-205.
65. Gázquez, S.I., et al., *Acute intermittent porphyria: a diagnostic dilemma*. Gastroenterología y hepatología, 2010. **33**(6): p. 436.
66. Crimlisk, H.L., *The little imitator--porphyria: a neuropsychiatric disorder*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1997. **62**(4): p. 319-28.
67. Watson, C.J., *Porphyria*. Adv Intern Med, 1954. **6**: p. 235-99.
68. Sassa, S., *Modern diagnosis and management of the porphyrias*. Br J Haematol, 2006. **135**: p. 281-292.

69. Kauppinen, R. and M. von und zu Fraunberg, *Molecular and biochemical studies of acute intermittent porphyria in 196 patients and their families*. Clin Chem, 2002. **48**(11): p. 1891-900.
70. Meyer, U.A., et al., *Intermittent acute porphyria—demonstration of a genetic defect in porphobilinogen metabolism*. New England Journal of Medicine, 1972. **286**(24): p. 1277-1282.
71. Bonaïti- Pellié, C., L. Phung, and Y. Nordmann, *Recurrence risk estimation of acute intermittent porphyria based on analysis of porphobilinogen deaminase activity: a Bayesian approach*. American journal of medical genetics, 1984. **19**(4): p. 755-762.
72. Mustajoki, P., *Normal erythrocyte uroporphyrinogen I synthase in a kindred with acute intermittent porphyria*. Annals of internal medicine, 1981. **95**(2): p. 162-166.
73. Kappas A, S.S., Gelbraith R, Nordmann Y, *The porphyrias, in: Scriver C, Beaudet A, Sly W.S, Valle D (Eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 1995, McGraw-Hill: New York. p. 2103–2159.
74. Brancaleoni, V., et al., *Seven novel genetic mutations within the 5'UTR and the housekeeping promoter of HMBS gene responsible for the non-erythroid form of acute intermittent porphyria*. Blood Cells Mol Dis, 2012. **49**(3-4): p. 147-51.
75. Lam, C.W., et al., *Circulating fluorocytes at the first attack of acute intermittent porphyria: A missing link in the pathogenesis*. Clinica Chimica Acta, 2011. **412**(1): p. 208-212.
76. Namba, H., et al., *Assignment of human porphobilinogen deaminase to 11q24. 1→ q24. 2 by in situ hybridization and gene dosage studies*. Cytogenetic and Genome Research, 1991. **57**(2-3): p. 105-108.
77. Yoo, H.W., et al., *Hydroxymethylbilane synthase: complete genomic sequence and amplifiable polymorphisms in the human gene*. Genomics, 1993. **15**(1): p. 21-29.
78. Chretien, S., et al., *Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result either in tissue-specific or in housekeeping expression*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. **85**(1): p. 6.

79. Grandchamp, B., et al., *Tissue- specific expression of porphobilinogen deaminase*. European Journal of Biochemistry, 1987. **162**(1): p. 105-110.
80. Whatley, S.D. and M.N. Badminton, *Role of genetic testing in the management of patients with inherited porphyria and their families*. Ann Clin Biochem, 2013. **50**(Pt 3): p. 204-16.
81. Groß, U., M. Honcamp, and M.O. Doss, *Heterogeneity of acute intermittent porphyria: A subtype with normal erythrocyte porphobilinogen deaminase activity in Germany*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2009. **34**(8): p. 613-618.
82. Di Pierro, E., et al., *A large deletion on chromosome 11 in acute intermittent porphyria*. Blood Cells Mol Dis, 2006. **37**(1): p. 50-4.
83. Whatley, S.D., et al., *Non-erythroid form of acute intermittent porphyria caused by promoter and frameshift mutations distant from the coding sequence of exon 1 of the HMBS gene*. Hum Genet, 2000. **107**(3): p. 243-8.
84. Lam, C.W., et al., *Novel mutation and polymorphisms of the HMBS gene detected by denaturing HPLC*. Clin Chem, 2001. **47**(2): p. 343-6.
85. Ulbrichova, D., et al., *Gene symbol: HMBS. Disease: Porphyria, acute intermittent*. Hum Genet, 2008. **124**(3): p. 315.
86. Blake D, Poulos V, Rossi R. *Diagnosis of Porphyria - Recommended Methods for Peripheral Laboratories*. Clinical Biochemist Reviews 1992;13(Supplement 1):S1-24
87. Wayne, P., *Erythrocyte protoporphyrin testing, approved guideline*. National committee for clinical laboratory standards (NCCLS), 1996.
88. Lim, C.K. and T.J. Peters, *Urine and faecal porphyrin profiles by reversed-phase high-performance liquid chromatography in the porphyrias*. Clin Chim Acta, 1984. **139**(1): p. 55-63.
89. Erlandsen, E.J., et al., *Determination of porphobilinogen deaminase activity in human erythrocytes: pertinent factors in obtaining optimal conditions for measurements*. Scand J Clin Lab Invest, 2000. **60**(7): p. 627-34.

90. Mendez, M., et al., *Identification and characterization of HMBS gene mutations in Spanish patients with acute intermittent porphyria*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2009. **55**(2): p. 55-63.
91. Floderus, Y., P.M. Shoolingin-Jordan, and P. Harper, *Acute intermittent porphyria in Sweden. Molecular, functional and clinical consequences of some new mutations found in the porphobilinogen deaminase gene*. Clin Genet, 2002. 62(4): p. 288-97.
92. Müsemma Karabel, Halil İbrahim Aydın., İsmail Kurt, Yavuz Tokgöz, Gökhan Baysoy. *Yineleyen karın ağrısının ender bir nedeni: Porfiri*. Göztepe Tıp Dergisi, 2014. 29(3): p. 198-202.
93. Özer, I. *Akut intermitan porfiri ve hipertansiyon: Bir vaka takdimi*. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 2004. 47: p. 128-131
94. Gürses, C., et al., *A severe neurological sequela in acute intermittent porphyria: presentation of a case from encephalopathy to quadriplegia*. 2008. 81(965):e135-40.