

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

ALKAPTONÜRİ HASTALARININ KLİNİK İZLEMİ VE
GENOTİP-FENOTİP İLİŞKİSİ

Dr. Alper İlker AKBABA

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2014

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

ALKAPTONÜRİ HASTALARININ KLİNİK İZLEMİ VE
GENOTİP-FENOTİP İLİŞKİSİ

Dr. Alper İlker AKBABA

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ali DURSUN

ANKARA
2014

TEŞEKKÜR

Hayatımın her anında bana destek olan, sevgisini hiç eksik etmeyen, her zaman yanımda hissettiğim aileme,

Bir parçası olmaktan gurur duyduğum “Pediatri Ailesine”

Rehberliklerini hiçbir zaman esirgemeyen Prof. Dr. Can Ömer Kalaycı ve Prof. Dr. Alev Özön’e,

Tez hocam Prof. Dr. Ali Dursun’a,

Çocuk Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Turgay Coşkun’a, Prof. Dr. Ayşegül Tokatlı’ya, Prof. Dr. Serap Sivri’ye,

Büyük özveri ile desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Rıza Köksal Özgülve Dr. Didem Yücel Yılmaz’a

Sonsuz teşekkürler.

Alper İlker Akbaba

Ankara 2014

ÖZET

Akbaba, A.İ., Alkaptonüri Hastalarının Klinik İzlemi ve Genotip-Fenotip İlişkisi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi. Ankara, 2014. Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hastanesi Çocuk Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı'nda izlenen ve mutasyon analizi yapılan on dört alkaptonüri hastasının dosyaları geriye dönük olarak incelenmiştir. Hastaların ortalama başvuru yaşı dokuz olarak bulunmuştur ve çocukluk çağında başvuran hastaların en sık başvuru sebebi idrar renginde koyulaşma iken adolesan ve erişkin yaş grubundaki hastalar eklem bulguları ile başvurmuşlardır. Hastalarda kardiyak tutulum saptanmamıştır. Üç hastada kristalüri ya da böbrek taşı saptanmıştır. Hastalarda homogentisik asit oksidaz (HGD) geninin tüm ekzonlarının taranması ile hastalarda 10 değişik mutasyon tespit edilmiştir. Mutasyonlardan ikisi yeni mutasyon olup bunlar Gly251Asp ve Val316Ile mutasyonlarıdır. Hastalarımızda en sık saptanan mutasyon S59fs ve R58fs mutasyonlarıdır. Hastalarımızda tespit edilen diğer mutasyonlar G161R ve N219S, H371fs, R330S, A218fs ve P274L mutasyonlarıdır. Pediatrik yaş grubundaki hastalara askorbik asit tedavisi denenmiş olup hiçbir hastaya nitisinone tedavisi verilmemiştir. İki hasta okronotik artropati nedeniyle opere edilmiş olup, erişkin yaş grubunda olan tek hastaya dejeneratif artriti olması nedeniyle steroid olmayan anti inflamatuvar ilaç ve immün supresif tedavi verilmiştir. Böbrek taşı olan hastaların hiçbirine medikal ya da cerrahi tedavi uygulanmamıştır. Mevcut çalışma grubunda genotip-fenotip korelasyonu saptanmamıştır.

Anahtar kelimeler: Alkaptonüri, homogentisik asit, homogentisik asit dioksijenaz, HGD, mutasyon analizi

ABSTRACT

Akbaba, A.İ., Clinical Follow-up of Alkaptonuria Patients and Genotype-Phenotype Correlation Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Pediatrics, Ankara, 2014. Hospital files of fourteen alkaptonuria patients whose mutation analyses were performed and who were being followed up in Section of Child Metabolism of Hacettepe University İhsan Doğramacı Child Health and İllness Hospital reviewed retrospectively. Their median diagnosis age was nine and in childhood age group the most common complaint was darkening of urine and in adolescence and adulthood main complaint was joint problems. None of the patients had cardiac problem. Three patients had either cyristaluria or renal stone. Ten mutation have been described and two of them were novel: Gly251Asp, Val316Ile. The most common mutations were S59fs, R58fs and most probably the origin of these mutations were Middle Asia. The other described mutations were G161R ve N219S, H371fs, R330S, A218fs ve P274L mutations. In pediatric age group ascorbic acid treatment was the main treatment and nitisinone treatment wasn't used. Two patients were operated due to ochronotic artropathy. The only adult patient, that has developped degenerative arthritis, has been treated with non-steroid anti-inflammatory drugs and immune supressives. Patients with renal stone were applied neither medical nor surgical treatment. In this studygroup genotype-phenotype correlation was not significiant.

Key Words: Alkaptonuria, homogentisic acid, homogentisic acid dioxigenase, HGD, mutation analysis

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	ix
TABLolar	x
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Alkaptonüri ve Tarihçesi	2
2.2. Metabolik Bozukluk	3
2.3. Genetik Bozukluk	3
2.4. Klinik Bulgular	5
2.5. Patofizyoloji	8
2.6. Alkaptonüri Tedavisi	8
HASTALAR VE YÖNTEM	11
3.1. Hasta Seçimi	11
3.2. Yöntem	11
3.2.1. Demografik Verilerin Toplanması	11
3.2.2. Klinik ve Biyokimyasal Verilerin Toplanması	11
3.2.3. Moleküler Verilerin Toplanması	11
3.3. Verilerin Elde edilmesinde Yapılmış Olan Analizler	11
3.3.1. Biyokimyasal Analizler	11
3.3.2. Moleküler Analizler	11
3.4. İstatistiksel Değerlendirme ve Etik Kurul Onayı	12
BULGULAR	13
4.1. Demografik Bulgular	13
4.2. Klinik Bulgular	13
4.3. Moleküler Bulgular	15

4.4. Tedavi Bulguları	15
TARTIŞMA	16
SONUÇLAR	19
KAYNAKLAR	21

SİMGELER VE KISALTMALAR

AKU	Alkaptonüri
HGD	Homogentisik Asit 1,2 Dioksigenaz
HGA	Homogentisik Asit
FAH	Fumaril Asetoasetik Asit Hidrolaz
EKO	Ekokargiografi
LAD	Sol Ön İnen Koroner Arter
NTBC	2-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]cyclohexane-1,3-dion
İOA	İdrar Organik Asit Analizi

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Alkaptonüri ve okronotik pigment oluşumu.	2
2.2.	Bugüne kadar tanımlanan HGD mutasyonları.	5

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
4.1.	Hastaların demografik, klinik, moleküler ve tedavi bulguları.	14

GİRİŞ

Alkaptonüri (AKU) (OMIM;203500) tirozin amino asit metabolizmasının ara ürünü olan homogentisik asidin (HGA) aromatik halkasını kıran homogentisik asiti “maleylacetoacetat”e dönüştüren “Homogentisate 1,2-dioxygenase” (homogentisic acid oxidase, homogentisicase) enzimin eksikliği sonucu gelişir (HGD)(1,2). Hastalığın sıklığı genel olarak 1/250.000 olarak tahmin edilmektedir. Düzeyi artan homogentisik asit yan metabolik yolakla “polyphenol oxidase” enzimi ile “benzokuinon asetik aside” okside olur. Bu bileşikler kollajen üzerinde fibriler yapılara bağlanarak melanin benzeri pigment oluştururlar. Hastalığın belirtileri arasında beklemekle koyulaşan idrar kıkırdaklarda ve bağ dokuda okronozis, üçüncü ve dördüncü dekatta ortaya çıkan artrit, kalp kapakçık bozuklukları, kristalüri ve/veya böbrek ve prostat taşı ile spontan tendon yırtılmasıdır (2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13). Hastalarda beklenen yaşam süresi azalmamıştır (14).

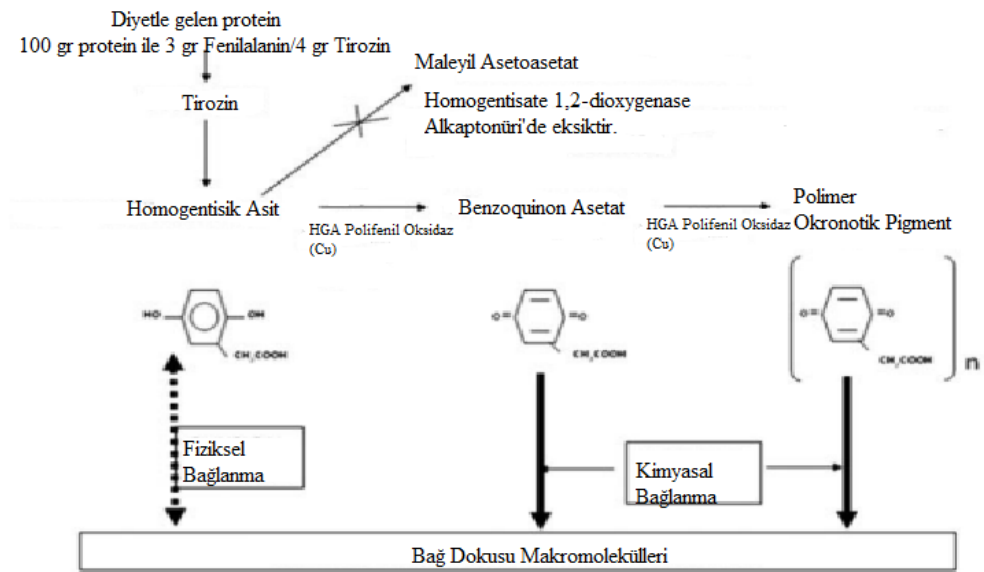
Homogentisate 1,2-dioxygenase enzimini kodlayan Homogentisik Asit 1,2 Dioksigenaz (HGD) geninde bugüne kadar yaklaşık olarak yüz yirmiye yakın mutasyon tanımlanmasına karşın hastalıkla ilgili genotip-fenotip ilişkisi ortaya konulamamıştır (15).

Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hastanesi Beslenme ve Metabolizma Ünitesi'nde takipli ve mutasyon analizi yapılan on dört hastanın demografik, klinik ve moleküler bulgularının ortaya konması ve olası genotip-fenotip ilişkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Alkaptonüri ve Tarihçesi

Alkaptonürde Homogentisik Asit 1,2 Dioksigenaz (HGD) enzim eksikliği sonucu tirozin amino asit metabolizması ara ürünü olan homogentisik asit maleylaasetoasetata dönüşemez, doku ve vücut sıvılarında düzeyi artar (1,2). Aşırı biriken homogentisik asit yan metabolik yolak ile benzokuinonlara okside olur ve kollajen üzerinde fibriler yapılara bağlanarak melanin benzeri pigment oluştururlar (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Alkaptonüri ve okronotik pigment oluşumu.

Alkaptonüri hastalığı Garrod tarafından ilk tanımlanan kalıtsal metabolik hastalıklardan birisidir (6,13). Hastalığının Dominik Cumhuriyeti ve Slovakya'da daha sık görüldüğü rapor edilmiştir (16,17). Bu ülkelerde hastalığın insidansı ortalama 1/19000 olarak rapor edilmiştir (3,5). Alkaptonüri hastalığı antik çağlardan beri farkedilen hastalıklardandır. Antik Mısır'da Harwa mumyasında arkeolojik çalışmalar sonucunda alkaptonüri hastalığı olduğu ispat edilmiştir (18). İkincil nedenlere bağlı olarak da insanlarda okronozis gelişebileceği bilinmektedir. Kronik cilt ülserlerinin tedavisinde kullanılan karbolik asitli elbiselerin okronozis yaparak alkaptonüriyi taklit edebileceği ortaya konmuştur (3,19). Atabrin'in uzun süreli

kullanımının alkaptonüri gibi okronozis ve belli bir seviyede artrit yapabileceği belirtilmiştir (20). Cilt rengini açmak için kullanılan kremlerdeki hidrokinononun (hydroquinon) da okronozis yapabileceği bildirilmiştir (21).

2.2. Metabolik Bozukluk

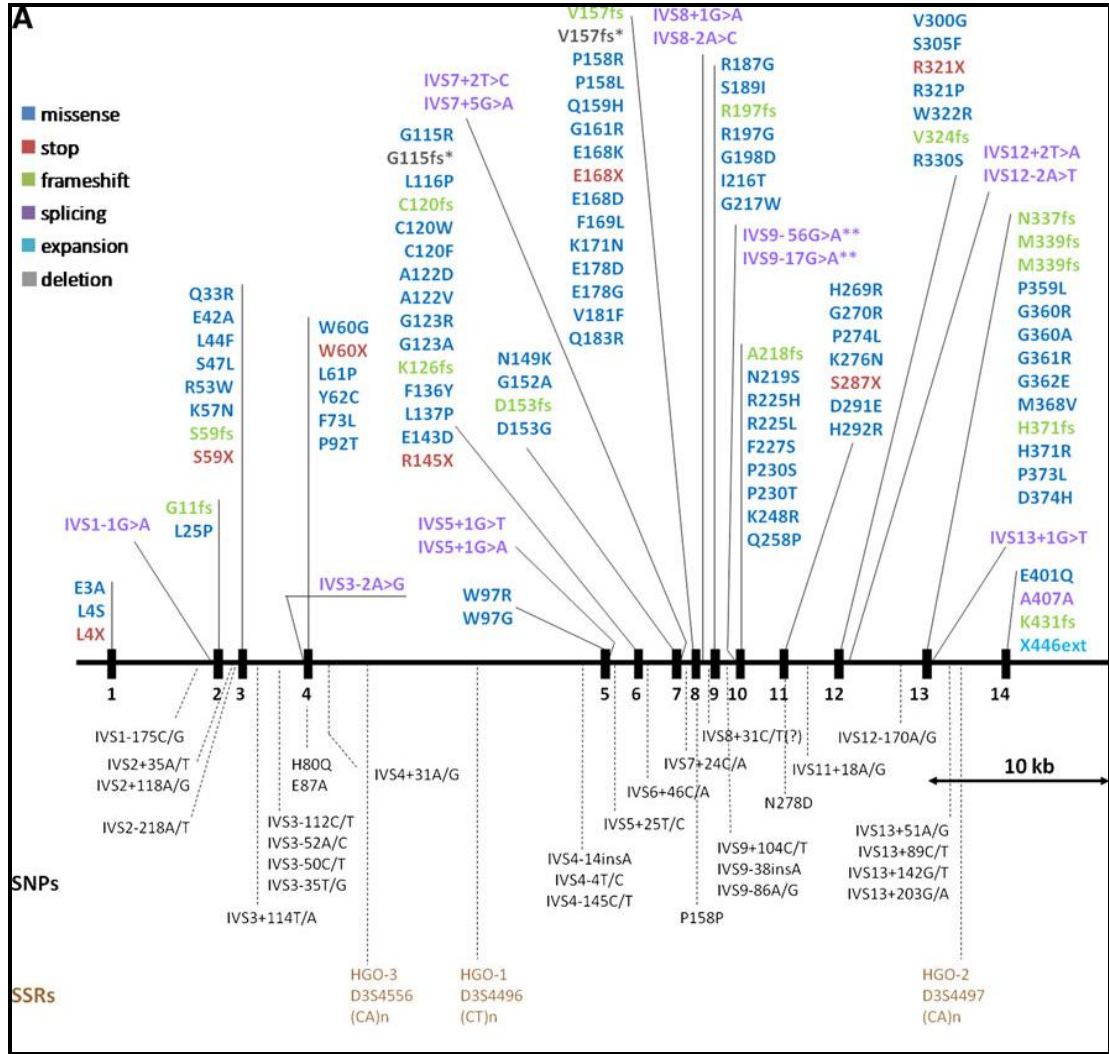
Diyetle alınan fenilalanin ve tirozin amino asitleri hormon (tiroksin ve katekolaminler gibi) ve yeni proteinlerin sentezi için kullanılır. Bu amino asitlerin sadece %5'i hormon ve protein sentezi için kullanılırken geri kalanı homogentisik asit aracılığı ile malat ve asetoasetata indirgenir. Homogentisik asit benzokininonlara okside olur ve onlar da kollajen üzerinde özgül fibriler yapılara bağlanan melanin benzeri pigment oluştururlar. Erişkin alkaptonürik bir insanın ortalama bir diyetle ürettiği günlük homogentisik asit (HGA) miktarı 5-7 gramdır ve bu miktar yüksek proteinli diyet alanlarda daha fazladır.

2.3. Genetik Bozukluk

Homogentisik Asit 1,2 Dioksigenaz (HGD) hem gen yapısı hem de protein yapısı olarak evrim boyunca sıkı korunmuştur (22,23,24). Gen dizisi bakteri, mantar, bitki, omurgasızlar, balık ve insanda homoloji gösterir (25). Homogentisik Asit 1,2 Dioksigenaz (HGD) geni 5.363 baz çiftinden oluşur ve 14 ekzonu vardır. Ekzon uzunlukları 35 ile 360 baz çifti arasında değişir ve 445 amino asitten oluşan proteini kodlar. Enzim yüksek oranda beta oluşumu gösteren N-terminalinde 280, C terminalinde 140 amino asit rezidüsü olan iki trimerik yapının quarterner yapı oluşturarak heksamer oluşturduğu, kofaktör olarak bir glutamat ve iki histidine bağlanan demiri kullanan bir moleküldür (24) Homogentisik Asit 1,2 Dioksigenaz (HGD) geni ilk kez 1998 tarihinde Beltran-Valero de Bernabe et al. tarafından klonlanmıştır. Daha sonra Granadino ve arkadaşları Homogentisik Asit 1,2 Dioksigenaz (HGD) gendeki mutasyonların alkaptonüri hastalığından sorumlu olduğu göstermişlerdir (24,26).

Alkaptonüri hastalarda yapılan mutasyon çalışmalarında 1997'de Gehrig et al. dört Slovak hastada G481A ve 454-457insG mutasyonları bildirmişlerdir (12). Beltran-Valero de Bernabe et al. çalışmalarında aralarında akrabalık bulunmayan 15 hastanın genomunu incelemişlerdir ve on iki yeni mutasyon (E42A, W97G, D153G, S189I, I216T, R225H, F227S, M368V, F10fs, IVS9-56G-->A, IVS9-17G-->A,

IVS5+1G-->T) saptanmıştır (26). Finlandiya'dan beş alkaptonürik hastada R58fs, R330S ve H371R mutasyonları bildirilmiştir (27). 2000 yılında İspanya'nın Madrid bölgesinden yapılan bir tarama programında Rodriguez ve ark. yedi yeni alkaptonüri mutasyonu (R53W, V181F, T196fs, H292R, R321X, W322R, INV13+1G→T) bildirmiştir (23). Mannoni ve arkadaşları dokuz hastadan oluşan bir alkaptonüri vaka serisinde genotip fenotip korelasyonunun kurulamadığını bildirmişlerdir (28). Ülkemizden Elçioğlu ve arkadaşları alkaptonürinin atipik bulgularını gösteren 39 yaşında bir hastada ekzon 11'de gly270arg ve ekzon 3'te 342 delA mutasyonları içeren birleşik heterozigot tespit etmişlerdir(29). 1998'de Ramos et al. beş kuşaktır alkaptonüri hastası olan bir ailede c.817C>T (p.P230S) mutasyonu bildirmiştir (30). 1999'da Felbor et al. Skleral tutulumu olan 71 ve 69 yaşlarındaki 2 hastada sırası ile L25P ve M368V mutasyonları saptamışlardır (31). Müller et al. 1999 yılında yayınladıkları bir çalışmada 30 alkaptonüri hastasında yaptıkları genetik çalışmada beş yeni (c.183-1G>A, c.241T>C, c.509+1G>A,c.975G>A ve c.1278insC) mutasyon saptamıştır (41). Porfirio et al. akraba olmayan 5 aileden gelen 10 alkaptonürik hastada beş yeni mutasyon bildirmişlerdir (32). Alkaptonürinin en sık görüldüğü yerlerden biri olan Dominik Cumhuriyeti'nden Goicoechea de Jorge et al. c.527T>G (C120W) mutasyonunun kurucu etkisi olduğunu rapor etmiştir. (3). Avustralya'dan Grasko et al. renal taş ve lomber disk aralığında daralma olan 38 yaşındaki bir hastanın mutasyon analizinde K57N mutasyonu rapor etmişlerdir (33). Çin'de Yang et al. Bir hastada IVS+1G>C ve F392C missense mutasyonu taşıyan bir alkaptonürik aile bildirmişlerdir (34). NIH tarafından 93 alkaptonüri hastada yapılan mutasyon analizlerinde 52 yeni olmak üzere 92 mutasyon bildirmişlerdir (35). 2011 yılında Zatkova et al. 9 farklı ülkeden 36 alkaptonüri hastasında yaptıkları çalışmada 11 yeni mutasyon bildirmişlerdir (36).Özet olarak bugüne kadar yüz on altı Homogentisik Asit 1,2 Dioksigenaz (HGD) mutasyonu yayınlanmış, bunların %66'sı missense, %12'si çerçeve kayması ve kırılma , %6'sı anlamsız mutasyonlardır (Şekil 2.2) (15).



Şekil 2.2. Bugüne kadar tanımlanan HGD mutasyonları.

2.4. Klinik Bulgular

Alkaptonüri hastalığının bulguları arasında beklemekle koyulaşan idrar ile kollajen ve kıkırdak dokunun okronotik pigmentasyonu en tanınan bulgulardır. Bunun yanında ortalama dördüncü on yılda ortaya çıkan sakroiliak eklemi tutmayan ankilozan spondilite benzeyen bulgular, diz eklemünde artrit, böbrek, prostat ve safra yollarında gelişen taş, böbrek yetmezliği, osteopeni, patolojik kemik kırıkları, tendon, kas ve ligaman yırtıkları, işitme bozukluğu, atrial fibrilasyon ve kalp kapaklarında bozulma hastalarda tanımlanmış diğer bulgulardır. Omurga tutulumu kifoz, vertebralarda yükseklik kaybı, lomber lordozun kaybolması, eklem hareketlerinde azalma ile sonuçlanabilir. Okronotik artrit yangısal artriti taklit edebilir. Eklem belirtileri tipik olarak hayatın üçüncü veya dördüncü on yılında

başlar ve fonksiyon kaybı ile sonuçlanır. Genelde elli yaşından sonra hastalara diz, kalça veya omuz rekonstrüksiyon ameliyatı yapılması gerekir. Bu hastalarda en ufak hareketlerle tendon veya ligaman yırtıkları gelişebilir. İdrarda yüksek homogentisik asit (HGA) atılımı (ortalama 400-500 mg/gün) hastalarda idrar taşı gelişmesine neden olur (10). Radyolojik incelemeler ile (Manyetik rezonans, BT ve ekokardiyografi) aşıl tendonunda kalınlaşma, koroner arter kalsifikasyonu ve kalp kapakçıklarındaki dejenerasyon rahatlıkla tespit edilebilir. Hastalara kalp kapak replasmanı gerekebilir. Okronotik prostat taşları ve radyolüsen böbrek taşları konvansiyonel radyolojik incelemeler ve ultrasonografik incelemeler ile rahatlıkla görüntülenebilir (37). Alkaptonüri hastalarında, beklenen yaşam süresi azalmamıştır (11). Hannoush ve ark. NIH'in 2012'de yayınlamış olduğu yetmiş altı hastalık bir seride hastalar 2000 ile 2009 yılında kardiyak yönden değerlendirilmişler, hastaların %16'sında aortik skleroz, %9'unda aort stenozunun geliştiği ve hastaların %8'inin aort kapak değişimine gittiği tespit edilmiştir (38). Çalışmada yaşın artmasıyla kardiyak etkilenme oranını arttırdığı ortaya konmuştur. Çalışmada BT taraması yapılan 40 hastanın, %18'inde koroner damar ve %47'sinde kapak kalsifikasyonu (bunların %18'inde ağır) saptanmıştır. Çalışmada kardiyak etkilenme ile eklem etkilenmesi arasında doğrusal bir ilişki olduğu bu nedenle hastaların kırk yaşından sonra ekokardiyografi ile taranması gerektiği önerilmiştir (39).

2004 yılında alkaptonüri hastalarındaki hastalığın takibi ve şiddeti için bir skorlama sistemi yayınlanmıştır (40). Amaç morbiditelerin gözden kaçırılmasını önlemektir. Bu skorlamada kornea veya kulak pigmentasyonu, böbrek ve prostat taşı oluşumu, kalp kapakçık tutulumu, konjestif kalp yetmezliği veya aritmi bulgularının, tendon yırtığının, serebrovasküler olayların, artrit ve eklem dejenerasyonunun şiddetine göre puanlama yapılmaktadır.

1989'da İsviçre'de bomba tehdidi sebebiyle treni boşaltırken iki ağır bavulu taşımak zorunda olan 65 yaşındaki bir kadında sağ kalçada olan osteoartrit ve intraoperatif okronozis saptanarak yük taşıyan eklemlerde oluşabilecek dejeneratif artrit bildirilmiştir (41).

Ayrıca alkaptonürinin tüm klinik bulgularını gösteren orta ve geç erişkinlik döneminde ürolitiazisi olan hastalar bildirilmiştir (9). Ayrıca alkaptonürinin en sık

görüldüğü Slovakya’da pediatrik yaş grubu alkaptonürik hastalarda ürolitiyazis sıklığının arttığı bildirilmiştir (38).

1978 yılında Levine et al. 50 yaşında unstabil anjina pektoris ile başvuran ve daha önce alkaptonüri tanısı konan hastaya aortik kapak replasmanı ve LAD koroner arter by pass operasyonu uyguladığını bildirmiştir. Hastada intraoperatif olarak aortik kapaklarda siyah pigment birikimi görülmüştür. Bu okronotik bir hastadaki ilk kalp kapak replasmanıdır (39). 2000 yılında Dereymaker et al. okronotik birikim sebebiyle acil aortik kapak değişimine giden bir hasta bildirmiştir (8).

58 hastalık yaşları 4 ile 80 arasında değişen bir seride, ortalama eklem replasman yaşı 55, böbrek taşı gelişimi 64 yaş, kalp kapakçık tutulumu 54 yaş, koroner arter kalsifikasyonu 59 yaş olarak saptanmıştır. Eklem ve omurgada hastalığın ciddiyetini belirlemek için radyolojik skorlama sistemi geliştirmişlerdir. Her bir servikal, torakal ve lomber bölge için disk aralıklarının mesafesi normal ise 0, minimal daralmışsa 1, belirgin daralmışsa 2 puan verilmiştir. Bu skorlamada kalsifikasyon yoksa 0, hafifse 1, ağırsa 2 puan verilmiş. Her bir bölge için maksimum skor 4, üç bölge için toplam maksimum puan 12 olarak hesaplanmıştır. Büyük eklemler için eklem aralığı tutulumu yoksa 0, osteofit, subkondral kist mevcut fakat eklem aralığı daralması yoksa minimal tutulum denerek 1, eklem daralması minimalse 2, orta derecede eklem daralması varsa 3, ağır derecede eklem daralması varsa 4 puan verilmiştir. Eklem kalsifikasyonu yoksa 0, hafifse 1, orta ise 2, ağır ise 3 puan almıştır. Büyük eklemler için (kalça, diz, omuz, dirsek, el bileği ve ayak bileği) maksimum puan yedi olarak alınmıştır. Eşlik eden spinal ve eklem hastalığı radyolojik skorlaması otuz yaşına kadar sıfır olarak saptanmış ve sonrasında hızlı bir şekilde artış gösterilmiştir. Erkeklerde progresyonun kadınlara göre daha hızlı olduğu ortaya konmuştur. Ortalama böbrek taşı oluşum yaşı 64, ortanca yaş 48, aort dilatasyonu ve kardiyak kapak etkileniminde ortalama yaş 54, ortanca yaş 52 bulunmuştur. Hiçbir hastada kırk yaşından önce koroner arter kalsifikasyonu görülmemiştir ve elli dokuz yaşında hastaların yüzde ellisinde bilgisayarlı tomografide koroner arter kalsifikasyonu bulgusu saptanmıştır (2).

2013 yılında Hindistan’dan yeni bir sınıflama sistemi yayınlanmıştır. Evre I hastalıkta yaş ile ilişkili dejeneratif değişiklikler olması gerektiğinden daha erken yaşlarda görülmekte idi. Evre II hastalıkta üç ya da daha az vertebrayı ilgilendiren

benekli disk kalsifikasyonu ortaya konmuştur. Evre III hastalıkta okronotik artropati için patognomonik görünüm olan sandviç görünümü oluşmaktadır. Patofizyolojisinde radyoopak pigment polimerleri ve kalsiyum hidroksi apatit kristal birikiminin sorumlu olduğu bildirilmiştir. Evre IV’ de hastalığın ankilozan spondiliti taklit edebileceği, vertebralarda osteofit gelişebileceği ve bambu ağacı görünümü olabileceği belirtilmiştir(44).

2.5. Patofizyoloji

2012 yılında Milluci et al. yedi alkaptonürik hastadan aldıkları kondrositler ile hücre kültürü ortamında yaptıkları çalışmada, alkaptonürde amiloid ve inflamatuvar sitokin ekspresyonunun artmış olduğunu göstermişlerdir. Bu hücreler metotreksat ile tedavi edilince sitokin ekspresyonu ve amiloidoz gerilemiştir (45).

Braconi et al. alkaptonüri hastalarından elde ettikleri okronotik olan ve olmayan kondrositlerde yaptıkları proteomiks analizinde otuz dört ve kırk bir proteinin ekspresyon paterninde değişiklik göstermişlerdir (46). Okronotik olan ve olmayan hücrelerde ekspresyon paterni değişen genlerden %20 ve %22’si protein translasyonu, %15 ve %24’ü hücre yapısı ve organizasyonu, %32 ve %22’si stres cevabı ile ilgili bulunmuştur ve bu bulgular alkaptonüri hastalığında hücrelerin reaktif oksijen radikallerine bağlı strese daha açık olduğunu ortaya koymuştur.

2013 yılında Spreafico et al homogentisik asitin (HGA) benzokionon asetata oksidasyonunun dejeneratif inflamasyona yol açtığı, bunu proinflamatuvar sitokin salınımının artırılması ile yaptığını, farklı proinflamatuvar sitokinlerin değişik mekanizmaları ile bu sürece katkıda bulunduğunu bildirmiştir (47).

2.6. Alkaptonüri Tedavisi

Askorbik asit okronozise bağlı artropati oluşumunu engellemektedir fakat rekonstrüktif cerrahi yöntemler eklem fonksiyonlarının yeniden kazanılmasına yardımcı olmaktadır (48). 2013 yılına kadar on üç yayında yirmi bir diz rekonstrüksiyonu bildirilmiştir (49). 1990’da 70 yaşında bir adamın onkrotik artropati nedeniyle bilateral kalça ve diz artroplastisi operasyonu olmak zorunda olduğu bildirilmiştir (50). 2004 yılında Fisher ve Davis (44) altta yatan hiçbir risk faktörü olmayan okronotik hastalarda çoklu kemik kırıkları bildirmişlerdir. 2013’te Hamada et al. altmış dokuz yaşında bir hastada okronozise bağlı subkondral

yetmezlik sonucu femur başı kırığı bildirmiştir ve total kalça artroplastisi operasyonu yapılmıştır (51). NIH tarafından Bethesda Klinik Araştırma Merkezi'nde iki mg NTBC tedavisinin alkaptonüriye bağlı eklem bulgularında yararı konusunda randomize kontrollü çalışması devam etmektedir (48). 1970 yılında sıçan modelinde yüksek doz askorbik asidin C₁₄-homogentisik asidin bağ dokusuna bağlanmasını zayıflattığı gösterilmiştir (51). 1989'da iki erişkin ve üç bebeğin yüksek doz askorbik asit ile tedavisi sonucu (pediatrik yaştaki hastalara 200 mg/kg/gün, erişkinlere 10 gram/gün dozunda) idrarda homogentisik asid ve toksik ürünü benzokuinon asetik asit atılımının azaldığı belirtilmiştir (54).

Yenidoğan döneminde tanı konan 48 yaşında bir hastaya dört farklı tedavi şekli birer ay denenmiş (askorbik asid 1 gr/gün ve 10 gr/gün ve düşük proteinli diyet 0,3 gr/kg/gün ve 1,3 gr/kg/gün kombinasyonları) ve askorbik asidin 1 gr/gün ve üstü dozlarında idrarda benzokionon atılımı belirgin olarak azalttığı buna karşın homogentisik asit atılımı değiştirmedeği gösterilmiştir. Hafif ve ağır derecede protein kısıtlaması benzokionon atılımını azaltmış fakat homogentisik asid atılımını değiştirmemiştir. Sonuç olarak alkaptonüri hastalarda 1 gr/günlük askorbik asidin faydalı olabileceği belirtilmiştir (55).

Homogentisik asidin p-hidroksifenilpürivik asidden oluşumunu sağlayan p-hidroksifenilpürivat dioksigenazın potent bir inhibitörü olan NTBC (2-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]cyclohexane-1,3-dion) etilnitrosüre ile alkaptonürik hale getirilen fare modellerinde denenmiştir. 100 µg NTBC verilen farelerde homogentisik asit atılımının azaldığı, diğer ara metabolit atımlarının arttığı tespit edilmiştir. Histolojik olarak karaciğerlerde hafif nonspesifik değişiklikler görülmüştür ve hiçbir farede okronotik eklem değişiklikleri görülmemiştir.

51 yaşında bir kadın hastada nitisinone ile idrarda homogentisik asit atılımının günlük 2,9 gramdan 0,13 grama düştüğü bildirilmiştir (2). 59 yaşında başka bir kadın hastada dokuz günlük tedavide benzer bulgular saptanmıştır. Plazma tirozin seviyesi bu hastalarda belirgin bir klinik belirti ve bulgu vermeden artmıştır. Uzun dönemli güvenlik ve etkinlik için daha fazla değerlendirme gerektiği belirtilmiştir.

2005 yılında NIH tarafından dokuz alkaptonüri hastasında nitisinone tedavisi denemesi yayınlandı (56). Hastalara 0,35 ile 1,05 mg/gün arası dozlarda nitisinone

verilmiştir. Çalışmanın son haftasında protein alımları en fazla kırk gram/gün olacak şekilde kısıtlanmıştır. Hastaların idrar homogentisik asit (HGA) atılımı azalmakla beraber tirozin seviyeleri tolere edilebilir sınırlarda bulunmuştur. Çalışmada klinik yanıtla ilgili bir değerlendirilme yapılmamakla beraber etkinlik ve güvenlik açısından bir değerlendirme yapılması için bulguların yeterli olmayabileceği belirtilmiştir.

2011 yılında NIH tarafından Nisan 2005 ve Nisan 2009 yılları arasında plasebo kontrollü randomize bir çalışma sonucu ile nitisinonun alkaptonüride tedavisindeki yerine dair bir makale yayınlanmıştır (57). Çalışmaya kırk hasta alınmış ve yarısına plasebo yarısına iki mg/gün nitisinone verilmiştir. Kontrol grubunda idrarda homogentisik asit (HGA) atılımı ortalama 5,80 gr/gün bulunmuş, bu atılım tedavi grubunda dördüncü ayda 5,1 gr/günden 125 mg/güne düşmüştür. Plazma homogentisik asit (HGA) seviyesi de tedavi grubunda yüzde doksan beş azalmıştır. Kontrol grubundaki kalça hareketleri sınırlarındaki azalma tedavi grubuna göre daha hızlı bulunmuştur. Tedavi grubunda plazma tirozin seviyesi on kat artmıştır. Erişkin hastalarda nitisinonun protein kısıtlaması olmadan kullanılabileceği belirtilmiştir.

2013 yılında Preston et al. yayınladıkları çalışmalarında benzer bulgular bildirmişlerdir. Alkaptonürik farelerde yaşla beraber artan okronozis varlığı ve sekiz ve on dört haftalık NTBC tedavi verilen farelerde plazma homogentisik asit (HGA) seviyesi belirgin azalma saptanmıştır (%88) ve kontrol fareleri ile büyüme eğrileri arasında belirgin bir fark bulunmamıştır. NTBC tedavisi verilen farelerin postmortem histolojik incelemelerinde okronozis saptanmamıştır. Yazarlar bu çalışma ile erken NTBC tedavisinin okronozis gelişimini engelleyebileceğini belirtmişlerdir (58).

HASTALAR VE YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi

Çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Çocuk Metabolizma Bilim Dalı'nda Alkaptonüri tanısı ile izlenen gerekli bilgilerine ulaşılabilen tüm hastalar dahil edilmiştir.

3.2. Yöntem

Hasta dosyaları retrospektif olarak incelenerek veriler elde edilmiştir.

3.2.1. Demografik Verilerin Toplanması

Tanı yaşı ve yılı, hastanın cinsiyeti belirlenmesi

3.2.2. Klinik ve Biyokimyasal Verilerin Toplanması

- a) Başvuru anındaki yakınması ve laboratuvar testi, idrar homogentisik asit atılımı (mmol/mol kre)
- b) Sistem tutulumlarının değerlendirilmesi
 - i. Eklem bulguları
 - ii. Kardiyak bulguları
 - iii. Renal bulgular
- c) Tedavi ve izlem
 - i. Askorbik asit tedavisi dozu
 - ii. Tedavi süresi

3.2.3. Moleküler Verilerin Toplanması

Homogentisik Asit 1,2 Dioksigenaz (HGD) geninde saptanan mutasyonlar ve allel frekansları tespit edilmiştir.

3.3. Verilerin Elde edilmesinde Yapılmış Olan Analizler

3.3.1. Biyokimyasal Analizler

İdrar Organik Asit İncelemesi (İOA): İdrar homogentisik asit atılımı miktarı.

3.3.2. Moleküler Analizler

Homogentisik Asit 1,2 Dioksigenaz (HGD) mutasyon analizi: Metabolizma Ünitesi Araştırma Laboratuvarı'nda Devlet Planlama Teşkilatı destekli (2006 K 120 640-06-03) "Türkiye'de sık Görülen Kalıtsal Metabolik Hastalıkların Moleküler Patoloji Profillerinin Belirlenmesi" projesi kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar ile rutin hasta hizmeti kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Polimorfizmler genomik DNA'dan LightCycler 1.2 ve ya 2.0 kitleri kullanılarak standart PCR-RFLP yöntemi ile çalışılmıştır.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme ve Etik Kurul Onayı

Analizler SPSS v16.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arası yüzde karşılaştırması için ki kare testi, ortalama karşılaştırırken Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 05.06.2014 tarih ve GO 14/260-11 numaralı kararı ile etik açıdan uygun bulunmuştur.

BULGULAR

Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Metabolizma ve Beslenme Ünitesi'nde 2000-2014 yılları arasında alkaptonüri tanısı almış 14 hastanın demografik, klinik, moleküler ve tedavi bulguları derlenmiştir. (Tablo 4.1).

4.1. Demografik Bulgular

Alkaptonüri olan 14 hastanın yedisi erkek (%50) yedisi kızdır (%50) ve erkek/kız oranı 1/1'dir. Hastaların tanı yaşı ortancaları 9 yaş olup en küçük hasta altı aylık ve en büyük hasta 59 yaşındadır.

Hastaların Türkiye coğrafyasına dağılımına bakıldığında; beş hasta Ankara'dan (%35) iki hasta Kırşehir'den, bir hasta Konya'dan, bir hasta Çorum'dan, bir hasta Sivas'tan, bir hasta Muş'tan, bir hasta Şanlıurfa'dan, bir hasta Gaziantep'ten, bir hasta da Bitlis'ten gelmektedir.

4.2. Klinik Bulgular

Hastaların tamamı başvuru anında semptomatik idi ve başka bir poliklinikten yönlendirilmişti.

Alkaptonüri hastalarında tanı koydurucu en sık yakınma idrar renginde koyulaşmaydı (n=10). Diğer hastalardaki tanı koydurucu bulgu seronegatif artritti (n=4). Başvuru belirti ve bulguları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Tanı anında dejeneratif artrit bulgusu olmayan bir hasta izlemde adolesan dönemde (17 yaşında) dejeneratif artrit tanısı almıştır. Çocukluk yaş grubundaki hastalarda (12 yaş altı, n=8) artrit bulgusu yokken, adolesan yaş grubundaki beş hastanın üçünde (%60), erişkin yaş grubundaki tek hastada artrit mevcuttu. Gruplar arası artrit sıklığında anlamlı bir farklılık yoktu. İdrar renginde koyulaşma şikayeti ile gelen üç hastanın yapılan üriner sistem ultrason görüntülemesinde nefrolitiazis veya böbrek parankiminde kristal ile uyumlu görüntü saptanmıştır. Hiçbir hastada kardiyak tutulum saptanmamıştır. Hastaların on üçü pediatrik yaş grubunda tanı alırken bir hasta erişkin dönemde tanı almıştır.

Tablo 4.1. Hastaların demografik, klinik, moleküler ve tedavi bulgular.

#	Demografik bulgular			Tanı			Klinik			Genetik Analiz			Tedavi		
	Adı Soyadı	C	Şehir	Yıl	Yaş (yıl)	Belirti/Bulgu	Artrit	Kalp Kapak tutulumu	Böbrek Taşı	Mutasyonu	Mutasyon türü	Protein değişikliği	Askorbik Asit kullanımı	Dozu	Süresi
1	G.K.	K	Ankara	2009	9	Koyu idrar	yok	yok	yok	c.481G>A/c1115 delGAC	Missense/delesyon	p.Gly161Arg/p.His371ProfsX4	var	250 mg/gün	5 yıl
2	G.T.	E	Ankara	2000	15	Artrit	var	yok	yok	c752G>A	missense	p.Gly251Asp	var	500 mg/gün	13 yıl
3	G.E.	K	Sivas	2000	13	Koyu idrar	var	yok	yok	c.656insAATCAA	insersiyon	p.Ala218ProfsX11	var	500 mg/gün	13 yıl
4	M.P.	E	Ankara	2010	10	Koyu idrar	yok	yok	yok	c.481G>A/c.946G>A	Missense/missense	p.Gly161Arg/p.Val316Ile	var	250 mg/gün	4yıl
5	S.Ö.	K	Muş	2008	17	Artrit	var	yok	yok	c.174delA/c.990G>T	Delesyon/missense	p.Arg58fsx...52X/p.Arg330Ser	var	1000 mg/gün	6 yıl
6	M.Ö.	K	Ş.Urfa	2008	15	Artrit	var	yok	yok	c.174delA	delesyon	p.Arg58fsx...52X	var	1000 mg/gün	6 yıl
7	B.T.	K	Konya	2008	3	Koyu idrar	yok	yok	yok	c.174delA	delesyon	p.Arg58fsx	var	250 mg/gün	6 yıl
8	M.Y.	E	Kırşehir	2009	4	Koyu İdrar	yok	yok	yok	c.821C>T	missense	p.Pro274Leu	var	250 mg/gün	5 yıl
9	A.S.	E	Ankara	2010	14	Koyu idrar	yok	yok	var	c.656 A>G	missense	p.Asn219Ser	var	500 mg/gün	4 yıl
10	E.K.	K	G.Antep	2011	7	Koyu idrar	yok	yok	var	c.174delA	delesyon	p.Arg58fsx	var	250 mg/gün	3 yıl
11	H.R.	E	Çorum	2011	6	Koyu idrar	yok	yok	var	c.175delA	delesyon	p.Ser59AlafsX52	var	500 mg/gün	3 yıl
12	Ö.K.	K	Kırşehir	2011	0.5	Koyu İdrar	yok	yok	yok	c.174delA	delesyon	p.Arg58fsx...52X	var	500 mg/gün	3 yıl
13	E.C.	E	Ankara	2013	3	Koyu idrar	yok	yok	yok	c.656 A>G	missense	p.Asn219Ser	var	250 mg/gün	1 yıl
14	İ.T.	E	Bitlis	2013	59	Dejenaratif Artrit	var	yok	var	c.175delA	delesyon	p.Ser59AlafsX52	yok		

4.3. Moleküler Bulgular

On dört hastada yapılan moleküler analiz sonucunda iki tanesi yeni olmak üzere toplam on mutasyon tespit edilmiştir. p.Gly251Asp ve p.Val316Ile mutasyonlar ilk kez tanımlanmıştır. p.Arg58fsx...52X ve p.Ser59AlafsX52 mutasyonları (S59fs, R58fs) (Literatürde bu iki mutasyon tek mutasyon olarak ele alınmış olduğu için çalışmamızda da tek mutasyon olarak değerlendirilmiştir.) altı hastada gösterilmiş olup en sık görülen mutasyonlardır (%42). Bu hastaların üçü yedi yaşından önce başvurmuş olup başvuru şikayetleri idrar renginde koyulaşmadır. Hastalar 1 ile 13 yıl arası süren izlemde artrit, nefrolitiyazis ve kalp kapakçık hastalığı geliştirmemiştir. Diğer üç hasta artrit şikayeti ile gelmiş olup yaş grubu olarak ikisi adolesan, biri erişkin yaş grubundadır. Adolesan yaş grubundaki hastalar dış merkezde ortopedi bölümünce opere edilip okronotik pigment birikimi ile gönderilmiştir ve hastaların kardiyak ve renal tutulumu bulunmamaktadır. Erişkin yaş grubundaki hastanın renal tutulumu mevcuttur. İstatistiksel olarak mutasyon hastalığın gidişatında anlamlı bir değişiklik oluşturmamaktadır. p.Gly161Arg (G161R) ve p.Asn219Ser (N219S) iki hastada gösterilmiş olup ikinci en sık görülen mutasyonlardır (%14). p.His371ProfsX4 (H371fs), p.Arg330Ser (R330S), p.Ala218ProfsX11 (A218fs) ve p.Pro274Leu(p274L) mutasyonları birer hastada bildirilmiştir.

4.4. Tedavi Bulguları

Pediyatrik yaş grubundaki hastaların hepsi yaşına ve kilosuna göre uygun dozlarda (250-1000 mg/gün) askorbik asit tedavisi almışlardır. Tedavisiz ve alternatif tedavi seçeneklerini alan (örn: nitisinone) bir kontrol grubu bulunmadığı için tedavi yanıtı için değerlendirme yapılamamıştır. İki hasta (%14) ortopedi ve travmatoloji bölümünce okronotik artrit sebebiyle opere edilmiştir. Seronegatif artrit tanısı ile romatoloji bölümünce takip edilen tek hastaya steroid olmayan anti inflamatuvar ilaç ve immünsüpresif tedavi verilmiştir. Böbrek taşı sebebiyle takip edilen hastalara medikal ya da cerrahi tedavi kaydı dosyalarda bulunamamıştır.

TARTIŞMA

Alkaptonüri, Mendelyan kalıtımın gösterildiği ilk dört hastalıktan biridir ve yaklaşık 150 yıldır bilinmektedir. Diğer metabolik hastalıkların aksine beklenen insan yaşam süresinde kısaltmaya neden olmaz. Nispeten nadir bir hastalık olması ve çoğunlukla geç bulgu vermesi sebebiyle tanı alan hasta sayısı azdır.

Çalışmaya alınan hasta popülasyonu incelendiğinde süt çocuğu ve oyun çocuğu döneminde tanı alan hastaların ilk bulgularının idrar renginde koyulaşma olduğu görülmektedir. Bu hastaların şikâyetleri çoğunlukla hematüri ile karıştırılmaktadır. Bu sebeple tanı almaları gecikebilmektedir veya tanısız kalabilmektedirler. Artmış homogentisik asidüri sebebiyle bu hastalarda böbrek taşı görülebilmektedir ve çalışmaya alınan üç hastada da bu bulgu mevcuttur.

Vaka serimizde adolesan yaş grubunda tanı alan beş hastanın üçünün ilk bulgularının artrit olduğu ve ortopedi ve travmatoloji uzmanlarınca intraoperatif olarak tanı konulabildiği görülmektedir. Artroskopik cerrahi girişimlerde okronotik artropati tanısı konan hastalar metabolizma ve beslenme ünitesine yönlendirilerek hastaların alkaptonüri tanısı alması sağlanmaktadır. Literatüre bakıldığında vaka sunumu şeklinde yapılan alkaptonüri bildirimlerinin en fazla ortopedi ve travmatoloji uzmanlarınca yapıldığı görülmektedir.

Erişkin yaş grubunda seronegatif dejeneratif artritin ayırıcı tanısında nadir nedenler arasında alkaptonüri yer almaktadır. Çalışmada yer alan tek erişkin yaş grubundaki hastanın bulgusu da dejeneratif artritir. Literatür ile uyumlu olarak hasta kırk yaşından sonra bulgu vermeye başlamıştır. Hastanın kulak sayvanı ve gözlerinde pigmentasyon sebebiyle romatoloji bölümü uzmanlarınca alkaptonüri olabileceği düşünülmüş ve homogentisik asidüri gösterilmiştir.

Çalışma grubundaki hastaların hiçbirinde kardiyak tutulum görülmemiştir. Hastaların pediatrik yaş grubunda olması bu durumu açıklayacak en olası nedendir.

Mutasyon analizinde en sık bulunan mutasyon olan S59fs, R58fs alkaptonüri hastalığı için bilinen eski ve sık mutasyonlardandır. İlk kez 1999 yılında tanımlanmış olup (27) Uyguner tarafından (59) yayınlanan 14 hastalık Türk hasta popülasyonunda da altı bireyde ve Elçioğlu (29) tarafından sunulan hastada da bildirilmiştir. Popülasyon genetiği incelenmesinde muhtemelen bu mutasyon Orta Asya'dan

yayılmıştır (59). Uyguner'in çalışmasında Karadeniz, Doğu Anadolu ve Marmara Bölgeleri'nden hasta bildirilmiştir. Çalışma grubundaki hastalardan üçü daha önce bildirilmeyen Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ndendir. Muhtemelen bu mutasyon Türkiye'deki en sık rastlanan Alkaptonüri mutasyonudur ve coğrafi bölge farklılıklarından etkilenmemektedir.

İkinci en sık görülen mutasyonlardan ilki G161R iki hastada birleşik heterozigot olarak bulunmuştur. İlk hasta geç çocukluk döneminde ikinci hastada erken adolesan dönemde bulgu vermiştir. Literatürde en eski ve en sık mutasyonlardan biri olarak belirtilen ve alkaptonürinin en sık görüldüğü ülke olan Slovakya'da %44 sıklıkta görülerek en sık mutasyondur (36).

N219S mutasyonu çalışma grubundaki diğer ikinci en sık mutasyondur. Literatürde sadece bir kez bildirilen (36) mutasyon sadece bir Türk hastada tanımlanmıştır. O hastanın belirti ve bulguları hakkında bilgi verilmemekle beraber çalışma popülasyonundaki hastaların ikisi de Ankara'dan gelmektedir fakat aralarında akrabalık bulunduğu dair bir bilgiye ulaşılamamıştır. İki hasta da idrar renginde koyulaşma şikâyeti ile gelmiştir ve ikinci hastada adolesan dönemde böbrek taşı oluşumu mevcuttur. Mutasyonun sadece üç Türk hastada tanımlanmış olması bu mutasyonun Türkiye'ye özgü bir mutasyon olabileceğini düşündürmektedir.

H371fs mutasyonu literatürde sık bildirilmiş bir mutasyondur. Bu mutasyonda 371. konumdaki histidin demir bağlanma bölgesi olması sebebiyle sık mutasyon görülen bir noktadır ve hasta grubunda bu mutasyonun görülmesi beklenmektedir. Bir hastada en eski ve sık mutasyonlardan biri olan G161R ile beraber birleşik heterozigot olarak bulunmuştur.

R330S mutasyonu literatürde sadece tek bir yazıda beş hastada tanımlanmıştır (27). Türkler gibi bir Orta Asya halkı olan beş Fin hastada tespit edilen bu mutasyonu taşıyan çocuk hastalar idrarda koyulaşma şikâyeti ile başvururken, orta yaşlı hastalarda okronotik artropati bildirilmiştir. Literatürde bu mutasyonu taşıyan ve artrit geliştiren ilk adolesan vaka çalışma grubu hastaları içerisinde tespit edilmiştir. Mutasyon için Orta Asya kaynaklı tezini savunabilecek yeterli veri mevcut değildir.

A218fs mutasyonu literatürde sadece iki hastada bildirilmiştir (36,60). Üçüncü hasta çalışma grubundan bulunmuş olup ilk bildirilen vaka gibi okronotik

artrit bulgusu mevcuttur. Mevcut bulgular ile nadir görülen bir metabolik hastalığın nadir görülen bir mutasyonu denebilir.

P274L mutasyonu sadece bir hastada bildirilmiştir (61). O hasta da çalışma grubundaki hasta gibi erken çocukluk döneminde bulgu vermiştir ve sadece idrar renginde koyulaşma şikâyeti ile başvurmuştur.

Çalışma grubundaki hastalarda iki yeni mutasyon tespit edilmiştir. Bunlar Gly251Asp ve Val316Ile mutasyonlarıdır. İlk mutasyonun taşıyıcısı hasta adolesan dönemde okronotik artropati, ikinci mutasyonun taşıyıcısı hasta idrar renginde koyulaşma şikâyeti ile gelen ek bir komorbiditeleri olmayan hastalardır. Bu çalışma ile literatüre iki yeni mutasyon eklenmiştir.

Daha önce Uyguner (59) tarafından Türk toplumunda sık rastlanabileceği söylenen ve üç hastada bildirilen G225H mutasyonu bu çalışma dahilindeki hasta popülasyonunda tespit edilememiştir.

Çalışmamızda on dört hastada ikisi yeni olmak üzere toplam on mutasyon tespit edilmesi nedeniyle alkaptonüri hastalığı için literatür ile uyumlu olarak fenotip-genotip ilişkisi kurulamamıştır.

SONUÇLAR

1. Homogentisik asit 1,2 dioksigenaz eksikliğine bağlı gelişen alkaptonüri nadir görülen bir doğuştan metabolik hastalıktır. Belirti ve bulguları arasında idrar renginde koyulaşma, okronotik artropati, böbrek taşı olabilmektedir.
2. Tanı idrarda artmış homogentisik asit atılımı ile konabilir.
3. Bulgular sıklıkla erişkin yaş grubunda ortaya çıkmakla beraber çocukluk yaş grubunda da sıklıkla bulgu verebilmektedir.
4. İdrar renginde koyulaşma ve böbrek taşı ile gelen pediatrik yaş grubu hastalarda diğer hematüri sebepleri ile beraber alkaptonüri de düşünülmelidir.
5. Adolesan dönemde artropati nedenleri içerisinde alkaptonüri mutlaka düşünülmelidir.
6. Erişkin yaş grubunda kazanılmış dejeneratif artrit ve kalp kapak hastalıklarında alkaptonüri mutlaka dışlanmalıdır.
7. Spontan tendon rüptürlerinde mutlak olarak alkaptonüri araştırılmalıdır.
8. Hastaların takibi için geliştirilmiş standart takip çizelgeleri kullanılmalıdır.
9. Tedavi de yüksek doz askorbik asit kullanılmakla beraber diğer anti oksidan maddeler ve nitisinone güncel tedavi yaklaşımlarıdır.
10. Artropati ve kalp kapak tutulumunun tedavisinde cerrahi tedavi seçenekleri birinci tedavi tercihleridir.
11. Bugüne kadar alkaptonüri hastalarında belirli bir genotipin hastalığın kliniği ile bir korelasyonu gösterilememiştir.
12. Çalışma popülasyonu pediatrik yaş grubu hastalar olduğu için kalp kapak ve koroner arter tutulumu saptanamamıştır.
13. Çalışma grubundaki hastaların başvuru belirti ve bulguları literatür ile uyumlu olarak idrar renginde koyulaşma ve artritir.
14. Çalışma grubunda en sık saptanan mutasyon S59fs (R58fs) mutasyonlarıdır ve mutasyon ile klinik korelasyon bulunamamıştır.
15. Uyguner tarafından S59fs, R58fs mutasyonunun Orta Asya'dan itibaren taşındığı belirtilmiştir ve mutasyon Türkiye'nin tüm coğrafi bölgelerinde görülmektedir.

16. Orta Avrupa ve Slovakya’da en sık rastlanan mutasyon G161R mutasyonu (%44) çalışma grubunda literatürde daha az saptanmıştır.
17. N219S mutasyonu çalışmada sıklığı en yüksek ikinci mutasyondur ve literatür taraması yapıldığında Türkiye’ye özgü bir mutasyon olduğu saptanmıştır.
18. H371fs bir hastada saptanmıştır ve demir bağlayan bölgedeki bir mutasyon olduğu için ve mutasyon oluşumu için bir sıcak nokta olduğu için de novo mutasyon olma ihtimali yüksektir.
19. R330S mutasyonu sadece Finlandiya popülasyonunda beş hastada bildirilmiştir. Bu çalışma bu mutasyonun bildirildiği ikinci çalışmadır.
20. A218fs mutasyonu nadir bir mutasyondur ve bu mutasyonu taşıyan ve okronotik artropati geliştiren ilk adolesan bu çalışma ile tespit edilmiştir.
21. P274L daha önce Arnavut bir çocukta bildirilmiştir ve ikinci kez bu çalışmanın hasta popülasyonunda bildirilmiştir. İki vaka klinik olarak birbirine benzemektedir.
22. Gly251Asp ve Val316Ile mutasyonları ilk defa tanımlanmıştır ve literatüre sunulmuştur.
23. Daha önce tanımlanmış ve Türk toplumunda sık görülebileceği belirtilmiş G225H mutasyonu bu çalışmada saptanmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Fernandez-Canon, J.M., Granadino, B., Beltran-Valero de Bernabe, D., Renedo, M., Fernandez-Ruiz, E., Penalva, M. A., Rodriguez de Cordoba, S. The molecular basis of alkaptonuria. *Nature Genet.* 1996; 14: 19-24.
2. Phornphutkul, C., Introne, W.J., Perry, M.B., Bernardini, I., Murphey, M.D., Fitzpatrick, D.L., Anderson, P.D., Huizing, M., Anikster, Y., Gerber, L.H., Gahl, W.A. Natural history of alkaptonuria. *New Eng. J. Med.* 2002; 347: 2111-21.
3. Goicoechea De Jorge, E., Lorda, I., Gallardo, M.E., Pérez, B., Pérez De Ferrán, C., Mendoza, H., Rodríguez De Córdoba, S. Alkaptonuria in the Dominican Republic: identification of the founder AKU mutation and further evidence of mutation hot spots in the HGO gene. *J. Med. Genet.* 2002; 39(7).
4. Srsen, S., Cisarík, F., Pasztor, L., Harmecko, L. Alkaptonuria in the Trencin district of Czechoslovakia. *Am. J. Med. Genet.* 1978; 2: 159-66.
5. Zatkova, A., Polakova, H., Micutkova, L., Zvarik, M., Bosak, V., Ferakova, E., Matussek, J., Ferak, V., Kadasi, L. Novel mutations in the homogentisate-1,2-dioxygenase gene identified in Slovak patients with alkaptonuria (Letter). *J. Med. Genet.* 2000; 37: 539-42.
6. Garrod, A.E. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. *Lancet* 1902; 160: 1616-20.
7. Abe, Y., Oshima, N., Hatanaka, R., Amako, T., Hirohata, R. Thirteen cases of alkaptonuria from one family tree with special reference to osteo-arthritis alkaptonuria. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1960; 42: 817-31.
8. Dereymaeker, L., Van Parijs, G., Bayart, M., Daenen, W., Lauwerijns, J., De Geest, H. Ochronosis and alkaptonuria: report of a new case with calcified aortic valve stenosis. *Acta Cardiol.* 1990; 45: 87-92.
9. Sener, R.N. Prostatic and renal stones and unilateral obstruction of the urinary tract caused by ochronosis. *Am. J. Roentgenology* 1992; 158: 214-5.

10. Manoj Kumar, R.V., Rajasekaran, S. Spontaneous tendon ruptures in alkaptonuria. *J. Bone Joint Surg. Br.* 2003; 85(6): 883-6.
11. Gehrig, A., Schmidt, S. R., Muller, C. R., Srsen, S., Srsnova, K., Kress, W. Molecular defects in alkaptonuria. *Cytogenet. Cell Genet.* 1997;76: 14-16
12. Orton, K.J., Garrod, A.E. The benzoilation of alkapton urine. *J. Physiol.* 1901; 2: 27(1-2): 89-94.
13. Knox, A.E. Sir Archibald Garrod's 'inborn errors of metabolism.' II. Alkaptonuria. *Am. J. Hum. Genet.* 1958; 10: 95-124.
14. Srsen, S., Vondráček, J., Srsnová, K., Svác, J. Analysis of the life span of alkaptonuric patients. *Cas. Lek. Cesk.* 1985; 18: 124(41-42): 1288-91.
15. Zatkova, A. An update on molecular genetics of Alkaptonuria (AKU). *J. Inherit. Metab. Dis.* 2011; 34(6): 1127-36.
16. Milch, R.A. Studies of alcaptonuria: inheritance of 47 cases in eight highly inter-related Dominican kindreds. *Am. J. Hum. Genet.* 1960; 12: 76-85.
17. Cervenansky, J., Sitaj, S., Urbanek, T. Alkaptonuria and ochronosis. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1959; 41: 1169-82.
18. Stenn, F.F., Milgram, J.W., Lee, S.L., Weigand, R.J., Veis, A. Biochemical identification of homogentisic acid pigment in an ochronotic Egyptian mummy. *Science* 1977; 197: 566-8.
19. Beddard, A.P., Plumtre, C.M. A further note on ochronosis associated with carboluria. *Quart. J. Med.* 1912; 5: 505-8.
20. Ludwig, G.D., Toole, J.F., Wood, J.C. Ochronosis from quinacrine (atabrine). *Ann. Intern. Med.* 1963; 59: 378-84.
21. Snider, R.L., Thiers, B.H. Exogenous ochronosis. *J. Am. Acad. Derm.* 1993; 28: 662-4.
22. Fernández-Cañón, J.M., Peñalva, M.A. Fungal metabolic model for human type I hereditary tyrosinaemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995; 26: 92(20): 9132-6.

23. Manning, K., Al-Dhalimy, M., Finegold, M., Grompe, M. In vivo suppressor mutations correct a murine model of hereditary tyrosinemia type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999; 12: 96(21): 11928-33.
24. Granadino, B., Beltrán-Valero de Bernabé, D., Fernández-Cañón, J.M., Peñalva, M.A., Rodríguez de Córdoba, S. The human homogentisate 1,2-dioxygenase (HGO) gene. *Genomics* 1997; 43(2): 115-22.
25. Rodríguez, J.M., Timm, D.E., Titus, G.P., Beltrán-Valero De Bernabé, D., Criado, O., Mueller, H.A., Rodríguez De Córdoba, S., Peñalva M.A. Structural and functional analysis of mutations in alkaptonuria. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9(15): 2341-50.
26. Beltran-Valero de Bernabe, D., Granadino, B., Chiarelli, I., Porfirio, B., Mayatepek, E., Aquaron, R., Moore, M.M., Festen, J.J.M., Sanmarti, R., Penalva, M.A., Rodriguez de Cordoba, S. Mutation and polymorphism analysis of the human homogentisate 1,2-dioxygenase gene in alkaptonuria patients. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 62: 776-84.
27. Beltran-Valero de Bernabe, D., Peterson, P., Luopajarvi, K., Matintalo, P., Alho, A., Konttinen, Y., Krohn, K., Rodriguez de Cordoba, S., Ranki, A. Mutational analysis of the HGO gene in Finnish alkaptonuria patients. *J. Med. Genet.* 1999; 36: 922-3.
28. Mannoni, A., Selvi, E., Lorenzini, S., Giorgi, M., Airó, P., Cammelli, D., Andreotti, L., Marcolongo, R., Porfirio, B. Alkaptonuria, ochronosis, and ochronotic arthropathy. *Semin. Arthritis Rheum.* 2004; 33(4): 239-48.
29. Elcioglu, N.H., Aytug, A.F., Muller, C.R., Gurbuz, O., Ergun, T., Kotiloglu E., Elcioglu, M. Alkaptonuria caused by compound heterozygote mutations. *Genet. Counsel.* 2003; 14: 207-13.
30. Ramos, SM, Hernández, M, Rocés, A, Larruga, JM, González, P, González, AM, Pinto, FM, Cabrera, VM. Molecular diagnosis of alkaptonuria mutation by analysis of homogentisate 1,2 dioxygenase mRNA from urine and blood. *Am. J. Med. Genet.* 1998; 78(2): 192-4.

31. Felbor, U., Mutsch, Y., Grehn, F., Müller, C.R., Kress, W. Ocular ochronosis in alkaptonuria patients carrying mutations in the homogentisate 1,2-dioxygenase gene. *Br. J. Ophthalmol.* 1999; 83(6): 680-3.
32. Porfirio, B., Chiarelli, I., Graziano, C., Mannoni, A., Morrone, A., Zammarchi, E., De Bernabé, D.B., De Córdoba, S.R. Alkaptonuria in Italy: polymorphic haplotype background, mutational profile, and description of four novel mutations in the homogentisate 1,2-dioxygenase gene. *J. Med. Genet.* 2000; 37(4): 309-12.
33. Grasko, J.M., Hooper, A.J., Brown, J.W., McKnight, C.J., Burnett, J.R. A novel missense HGD gene mutation, K57N, in a patient with alkaptonuria. *Clin. Chim. Acta.* 2009; 403(1-2): 254-6.
34. Yang, Y.J., Guo, J.H., Chen, W.J., Zhao, R., Tang, J.S., Meng, X.H., Zhao, L., Tu, M., He, X.Y., Wu, L.Q., Zhu, Y.M. First report of HGD mutations in a Chinese with alkaptonuria. *Gene.* 2013; 518(2): 467-9.
35. Vilboux, T., Kayser, M., Introne, W., Suwannarat, P., Bernardini, I., Fischer, R., O'Brien, K., Kleta, R., Huizing, M., Gahl, W.A. Mutation spectrum of homogentisic acid oxidase (HGD) in alkaptonuria. *Hum. Mutat.* 2009; 30(12): 1611-.
36. Zatkova, A., Sedlackova, T., Radvansky, J., Polakova, H., Nemethova, M., Aquaron, R., Dursun, I., Usher, J.L., Kadasi, L. Identification of 11 Novel Homogentisate 1,2 Dioxygenase Variants in Alkaptonuria Patients and Establishment of a Novel LOVD-Based HGD Mutation Database. *JIMD Rep.* 2012; 4: 55-65.
37. Muller, C.R., Fregin, A., Srsen, S., Srsnova, K., Halliger-Keller, B., Felbor, U., Seemanova, E., Kress, W. Allelic heterogeneity of alkaptonuria in Central Europe. *Eur. J. Hum. Genet.* 1999; 7: 645-51.
38. Ranganath, L.R., Jarvis, J.C., Gallagher, J.A. Recent advances in management of alkaptonuria (invited review; best practice article). *J. Clin. Pathol.* 2013; 66(5): 367-73.

39. Hannoush, H., Introne, W.J., Chen, M.Y., Lee, S.J., O'Brien, K., Suwannarat, P., Kayser, M.A., Gahl, W.A., Sachdev, V. Aortic stenosis and vascular calcifications in alkaptonuria. *Mol. Genet. Metab.* 2012; 105(2): 198-202.
40. Fisher, A.A., Davis, M.W. Alkaptonuric ochronosis with aortic valve and joint replacements and femoral fracture: a case report and literature review. *Clin. Med. Res.* 2004; 2(4): 209-15.
41. Cunningham, T.J., Roux, E., Lagier, R., Fallet, G.H. Rapidly progressive hip osteoarthritis: an unusual presentation of ochronosis. *Clin. Exp. Rheum.* 1989; 7: 315-8.
42. Zibolen, M., Srsnova, K., Srsen, S. Increased urolithiasis in patients with alkaptonuria in childhood (Letter). *Clin. Genet.* 2000; 58: 79-80.
43. Levine, H.D., Parisi, A.F., Holdsworth, D.E., Cohn, L.W. Aortic valve replacement for ochronosis of the aortic valve. *Chest* 1978; 74: 466-7.
44. Jebaraj, I., Chacko, B.R., Chiramel, G.K., Matthai, T., Parameswaran, A. A simplified staging system based on the radiological findings in different stages of ochronotic spondyloarthropathy. *Indian J. Radiol. Imaging* 2013; 23(1): 101-5.
45. Millucci, L., Spreafico, A., Tinti, L., Braconi, D., Ghezzi, L., Paccagnini, E., Bernardini, G., Amato, L., Laschi, M., Selvi, E., Galeazzi, M., Mannoni, A., Benucci, M., Lupetti, P., Chellini, F., Orlandini, M., Santucci, A. Alkaptonuria is a novel human secondary amyloidogenic disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1822(11): 1682-91.
46. Braconi, D., Bernardini, G., Bianchini, C., Laschi, M., Millucci, L., Amato, L., Tinti, L., Serchi, T., Chellini, F., Spreafico, A., Santucci, A. Biochemical and proteomic characterization of alkaptonuric chondrocytes. *J. Cell. Physiol.* 2012; 227(9): 3333-43.
47. Spreafico, A., Millucci, L., Ghezzi, L., Geminiani, M., Braconi, D., Amato, L., Chellini, F., Frediani, B., Moretti, E., Collodel, G., Bernardini, G., Santucci, A. Antioxidants inhibit SAA formation and pro-inflammatory cytokine release in a human cell model of alkaptonuria. *Rheumatology (Oxford).* 2013; 52(9): 1667-73.

48. Nag, H.L., Singh, V., Meena, S., Saini, P. Ochronotic black meniscus during knee arthroscopy. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 2013; 4(2): 502-4.
49. Ozmanevra, R., Güran, O., Karatosun, V., Günal, I. Total knee arthroplasty in ochronosis: a case report and critical review of the literature. *Eklemler Hastalıkları Cerrahisi* 2013; 24(3): 169-72.
50. Carrier, D.A., Harris, C.M. Bilateral hip and bilateral knee arthroplasties in a patient with ochronotic arthropathy. *Orthop. Rev.* 1999; 19: 1005-9.
51. Hamada, T., Yamamoto, T., Shida, J.I., Inokuchi, A., Arizono, T. Subchondral insufficiency fracture of the femoral head in a patient with alkaptonuria. *Skeletal. Radiol.* 2014; 43(6): 827-30.
52. Lustberg, T.J., Schulman, J.D., Seegmiller, J.E. Decreased binding of (14)C-homogentisic acid induced by ascorbic acid in connective tissues of rats with experimental alkaptonuria. *Nature* 1970; 228: 770-1.
53. Wolff, J.A., Barshop, B., Nyhan, W.L., Leslie, J., Seegmiller, J.E., Gruber, H., Garst, M., Winter, S., Michals, K., Matalon, R. Effects of ascorbic acid in alkaptonuria: alterations in benzoquinone acetic acid and an ontogenic effect in infancy. *Pediat. Res.* 1989; 26: 140-4.
54. Suzuki, Y., Oda, K., Yoshikawa, Y., Maeda, T., Suzuki, T. A novel therapeutic trial of homogentisic aciduria in a murine model of alkaptonuria. *J. Hum. Genet.* 1999; 44: 79-84.
55. Mayatepek, E., Kallas, K., Anninos, A., Muller, E. Effects of ascorbic acid and low-protein diet in alkaptonuria. *Europ. J. Pediat.* 1998; 157: 867-8.
56. Suwannarat, P., O'Brien, K., Perry, M.B., Sebring, N., Bernardini, I., Kaiser-Kupfer, M.I., Rubin, B.I., Tsilou, E., Gerber, L.H., Gahl, W.A. Use of nitisinone in patients with alkaptonuria. *Metabolism.* 2005; 54(6): 719-28.
57. Introne, W.J., Perry, M.B., Troendle, J., Tsilou, E., Kayser, M.A., Suwannarat, P., O'Brien, K.E., Bryant, J., Sachdev, V., Reynolds, J.C., Moylan, E., Bernardini, I., Gahl, W.A. A 3-year randomized therapeutic trial of nitisinone in alkaptonuria. *Mol. Genet. Metab.* 2011; 103(4): 307-14.

58. Preston, A.J., Kenan, C.M., Sutherland, H., Wilson, P.J., Wlodarski, B., Taylor, A.M., Williams, D.P., Ranganath, L.R., Gallagher, J.A., Jarvis, J.C. Ochronotic osteoarthropathy in a mouse model of alkaptonuria, and its inhibition by nitisinone. *Ann. Rheum. Dis.* 2014; 73(1): 284-9.
59. Uyguner, O., Goicoechea de Jorge, E., Cefle, A., Baykal, T., Kayserili, H., Cefle, K., Demirkol, M., Yuksel-Apak, M., Rodriguez de Córdoba, S., Wollnik, B. Molecular analyses of the HGO gene mutations in Turkish alkaptonuria patients suggest that the R58fs mutation originated from central Asia and was spread throughout Europe and Anatolia by human migrations. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2003; 26(1): 17-23.
60. Ladjouze-Rezig, A., Rodriguez de Cordoba, S., Aquaron R. Ochronotic rheumatism in Algeria: clinical, radiological, biological and molecular studies—a case study of 14 patients in 11 families. *Joint Bone Spine.* 2006; 73(3): 284-92.
61. Gucev, Z.S., Slaveska, N., Laban, N., Danilovski, D., Tasic, V., Pop-Jordanova, N., Zatkova, A. Early-onset ocular ochronosis in a girl with alkaptonuria (AKU) and a novel mutation in homogentisate 1,2-dioxygenase (HGD) *Prilozi.* 2011; 32(1): 305-11.