

**T.C.**

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**DOWN SENDROMU İÇİN OLASI RİSK FAKTÖRÜ OLARAK MTHFR  
GENİNDEKİ C677T VE A1298 POLİMORFİZMLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Eylem GÖKMEYDAN**

**Tıbbi Genetik Anabilim Dalı**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ESKİŞEHİR**

**2011**



**T.C.**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**DOWN SENDROMU İÇİN OLASI RİSK FAKTÖRÜ OLARAK MTHFR  
GENİNDEKİ C677T VE A1298 POLİMORFİZMLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Eylem GÖKMEYDAN**

**Tıbbi Genetik Anabilim Dalı**  
**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Doç. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU**

**ESKİŞEHİR**  
**2011**

## TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

TC  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Eylem GÖKMEYDAN' a ait "Down sendromlu çocuk sahibi olan annelerde MTHFR gen polimorfizmlerinin incelenmesi."adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı' nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 11.03.2011

Jüri Başkanı Prof.Dr. Sevilhan ARTAN  
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Üye Doç.Dr.M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU  
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Üye Prof.Dr.Arif AKŞİT  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu' nun 24.03.2011 Tarih ve 10 Sayılı Kararıyla Onaylanmıştır.

Dekan  
Prof. Dr. Necmi ATA

## **TEŞEKKÜR**

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim suresince bilgi ve deneyimleri ile yol gosteren sayın hocalarım Prof.Dr. Sevilhan ARTAN, Doç.Dr. M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU, Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK ARAS, Yrd. Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR, Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR ayrıca tezimde bana yardımcı olan Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalından sayın hocam Prof.Dr. Arif AKŞİT ve İstatistik Anabilim Dalından Yrd.Doç.Dr. Cengiz BAL ve. Muzaffer BİLGİN' e yardımları ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

## ÖZET

**GÖKMEYDAN E, Down sendromu için olası risk faktörü olarak MTHFR genindeki C677T ve A1298C polimorfizmlerinin değerlendirilmesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2011.** Down Sendromu (DS) ya da trizomi 21 insanda mental retardasyonun en sık görülen genetik nedeni ve en iyi bilinen kromozom hastalığıdır. İnsidansı 1/600~1/1000 canlı doğumdur. Olguların çoğunda neden maternal mayoz sırasında meydana gelen anormal kromozomal segregasyon ile ilişkili ayrılamamadır. DS oluşumu ile ilişkili risk faktörleri arasında ileri anne yaşı en iyi belirlenmiş olanıdır. Buna karşılık çoğu DS olgusunda anne yaşı 35'in altındadır. Bu durum ileri yaştaki annelere oranla genç annelerde farklı mekanizmaların trizomi 21 oluşumuna neden olabileceğini düşündürmektedir. Down sendromu etyolojisine yönelik çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda DNA metilasyonu ve sentezini etkileyen folat metabolizmasında görevli MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmlerinin Down sendromlu çocuk sahibi olma açısından bağımsız bir maternal risk faktörü oluşturduğu ileri sürülmektedir. Biz çalışmamızda maternal MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmleri ile down sendromlu çocuk sahibi olma arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda 120 Down sendromlu çocuk sahibi olan anne ile abortus öyküsü olmayan, en az bir sağlıklı çocuk doğurmuş 90 annede, MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmleri incelendi. Araştırmamızın sonucunda bu MTHFR gen polimorfizmlerinin Down sendromlu çocuk sahibi olma açısından Türk populasyonunda herhangi bir risk faktörü oluşturmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Down sendromu, MTHFR, Segregasyon, Polimorfizm, C677T, A1298C

## ABSTRACT

**GÖKMEYDAN, E. Evaluation of Maternal MTHFR C677T and A1298C polymorphisms as a risk factors for Down Syndrome. Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Medical Genetics, Eskişehir, 2011.** Down Syndrome (DS) or trisomy 21 is the most common genetic cause of mental retardation in humans and most well-known chromosomal disorder. Incidence is 1 / 600 ~ 1/1000 live births. Cause most of the cases occurred during maternal meiosis associated with abnormal chromosomal segregation. Maternal age for DS is one of the most well-defined risk factor. However, maternal age in most DS cases are under 35. In this situation it's suggested that in young mothers respect to older ones have different mechanisms may lead to the formation of trisomy 21. Studies in various countries for the etiology of Down syndrome affecting the synthesis of DNA methylation and folate metabolism, MTHFR C677T and A1298C polymorphisms responsible for having a child with Down syndrome has been proposed in terms of an independent maternal risk factor. In our study we investigated relationship between having a child with Down syndrome and maternal MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms. In our study MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms were analyzed in 120 mothers having children with Down syndrome without a history of abortion, at least 90 mothers gave birth to a healthy child. As a result of our research is that the MTHFR gene polymorphisms in Turkish population in terms of having a child with Down syndrome does not increase any risk factor.

Key Words: Down syndrome, MTHFR, Segregation, polymorphism, C677T, A1298C

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Down Sendromu	4
2.2. Down Sendromunun Bulguları	4
2.2.1. Sitogenetik Bulgular	5
2.2.2. Fiziksel Bulgular	7
2.2.3. Eşlik Eden Major Konjenital Anomaliler	8
2.2.4. Göz Bulguları	9
2.2.5. İşitme Bozuklukları	10
2.2.6. Nörolojik Bulgular	10
2.2.7. Hematolojik Bozukluklar	11
2.2.8. İmmünolojik Defektler	11
2.2.9. Tiroid Fonksiyon Bozuklukları ve Otoimmünite	12
2.2.10. Büyüme Hızı ve Boy Uzunluğu	12
2.2.11. Üreme Fonksiyonları	12
2.3. Down Sendromunun Prenatal tanısı	13
2.3.1. Prenatal Tanı	13
2.3.2. Prenatal Tanının Amacı	14
2.3.3. Prenatal Tanı Yöntemleri	14
2.3.4. Down Sendromunda Prenatal Tanı yöntemleri	14
2.4. Down Sendromunun Etyolojisi ve Etyolojine yönelik hipotezler	17
2.4.1. Folat Metabolizması ve DS Riski	19



2.4.2. Folat, Homosistein, Metiyonin Metabolizması ve DNA Metilasyonu veya Sentezi Üzerine Etkisi	22
2.4.3. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) ve Down Sendromu Riski	25
2.4.4. MTHFR 677C>T Polimorfizmi ve Down Sendromu Riski	25
2.4.5. MTHFR 1298A > C Polimorfizmi ve Down Sendromu Riski	27
2.4.6. Gebelikte Anne Yaşı ve Down Sendromu Riski: Folat Metabolizmasıyla İlişkisi	29
2.5. Down Sendromu İle İlişkili Diğer Genler	31
2.5.1. Metiyonin Sentaz-Metiyonin Sentaz Redüktaz (MTR-MTRR) Kompleksi	31
2.5.2. Folat Taşıyıcıları (RFC1 veya SLC19A1)	31
2.5.3. Sistatyonin Beta Sentaz (CBS)	32
2.5.4. Timidilat Sentaz (TYMS)	33
2.5.5. Metilentetrahidrofolat Dehidrogenaz (MTHFD1)	33
2.5.6. Transkobalamin (TC)	34
2.5.7. Folat/homosistein Metabolizmasında Görevli Kromozom 21'de Lokalize Olan Diğer Genler	34
2.6. MTHFR Gen Polimorfizm Ölçüm Yöntemleri	35
2.6.1. Genetik Polimorfizm Kavramı	35
2.6.2. Restriksiyon Fragmentinin Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP)	35
2.6.3. Polimorfik Markırların Genotiplemesinde PCR'ın Kullanımı	36
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	39
3.1. Araştırma Grubu Bireyleri	39
3.2. Kullanılan Gereçler	40
3.2.1. Kullanılan Araçlar	40
3.2.2. Kullanılan kimyasal maddeler	40
3.3. Yöntemler	41
3.3.1. Kan Örneklerinden DNA Elde Edilmesi	41
3.3.2. MTHFR geni Polimorfizmlerinin PCR-RFLP Yöntemiyle Belirlenmesi	44
3.3.3. İzole Edilen DNA Örneklerinin PCR İle Amplifikasyonu	45
3.3.4. Amplifikasyon Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleazlarla Kesimi	47
3.3.5. Enzim Kesim Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi İle Ayrılması	48

3.3.6. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	49
4. BULGULAR	50
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	83
7. KAYNAKLAR	85

## SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AFP	Alfa Feto Protein
Bp	Baz Çifti
C	Sitozin
CBS	Sistatyonin Beta Sentaz
CVS	Koryon Villus Örnekleme
DNA	Deoksi Deoksiribonükleik Asit
DS	Down Sendromu
DSA	Down Sendromlu Çocuk Sahibi Anne
DHEA	Dehidroepiandrosteron
dTMP	Deoksi Timidin Monofosfat
dUMP	Deoksi Uridin Monofosfat
dAMP	Deoksi Adenin Trifosfat
dCTP	Deoksi Sitozin Trifosfat
dGTP	Deoksi Guanin Trifosfat
dTTP	Deoksi Timidin Trifosfat
DKH	Doğumsal Kalp Hastalığı
EDTA	Etilendaimin Tetraasetik Asit
E3	Estriol
FBS	Fetal Kan Örnekleme

FISH	Floresan In Stu Hibridizasyon
FR	Folat Reseptör
G	Guanin
GA	Güven Aralığı
GİS	Gastrointestinal Sistem
HCG	İnsan Koryonik Globulin
hPGH:	İnsan Plasental Büyüme Hormonu
PAPP-A	Gebelikle İlişkili Plazma Protein A
kb	Kilobaz
MTHFD	Metilen Tetrahidrofolat Dehidrogenaz
MTR	Metiyonin Sentaz
MTRR	Metiyonin Sentaz Redüktaz
MTHFR	Metilentetrahidrofolat Redüktaz
NT	Nukal Kalınlık
NTD	Nöral Tüp Defekti
OR	Odds Ratio
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCFT	Proton- coupled Folat Transporter
RFC1	Azaltılmış Folat Taşıyıcı 1
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
RE	Restriksiyon Enzimi
SAH	S-adeozil Homosistein

SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SD	Standart Deviasyon
T	Timin
TC	Transkobalamin
THF	Tetrahidrofolat
TYMS	Timidilat Sentaz
Hcy	Homosistein
TBE	Tris-Borik EDTA
$\mu$ l	Mikrolitre

## ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. İnsan Folat Metabolik Yolağı

2.2. Polimorfik Markırların Genotiplemesinde PCR' ın Kullanımı

3.1. MTHFR Geninin 677. Baz Çiftini İçeren Bölgenin Hinf I Enzimi İle Kesim Sonucu (M: 100' lük marker)

3.2. MTHFR Geninin 1298. Baz çiftini İçeren Bölgenin Mbo II Enzimi İle Kesim Sonucu (M: 50' lik marker)

## TABLOLAR DİZİNİ

- 2.1. Down Sendromunda Minor Malformasyon Sıklığı
- 2.2. Anne Yaşı ile İlişkili Olarak Canlı Doğumlarda ve Fetüslerde Down Sendromu İnsidansı
- 3.1. MTHFR C677T ve A1298C Gen Polimorfizmlerinin PCR ürünleri ve RFLP uygulandıktan Sonra Enzim Kesim Ürünlerinin Genotiplere Göre Dağılımı
- 4.1 . DSA ve Kontrol Grupları Arasındaki Alel Frekansları
- 4.2. Maternal MTHFR C677T Genotipi ve Down Sendromu Riski
- 4.3 . Maternal MTHFR A1298C Genotipi ve Down Sendromu Riski
- 4.4. MTHFR C677T ve A1298C Kombine Genotiplerin Etkisi
- 4.5. Genç yaşta DS'li Çocuk Doğurmuş Olan Annelerde MTHFR C677T Ve A1298C Genotip Analizi
- 4.6. Genç yaşta DS'li Çocuk Doğurmuş Olan Annelerde MTHFR 677C>T Ve 1298A>C Polimorfizmlerinin Kombine Etkisi
- 4.7. Yaşa Bağlı Olarak DSA'ların Çocuklarında Malformasyon Sıklığı
- 5.1. Folat/Homosistein Metabolizması Gen Polimorfizmleri ve Maternal DS'li Çocuğa Sahip Olma Riski Arasındaki Genetik İlişki Çalışmaları.
- 5.2. Folat/Homosistein Metabolizması Gen Polimorfizmleri Arası Etkileşim ve Maternal DS'li Çocuğa Sahip Olma Riski Çalışmaları
- 5.3. DSA'da ve Kontrol Grubunda Homosistein, Folat, Vitamin B12 ve ilişkili Mikronutrisyonlar ve Bunların Folat/Hcy Metabolizma Gen Polimorfizmleri ile Aralarındaki Etkileşim.

## 1. GİRİŞ

Down sendromu insanda mental retardasyonun en sık görülen genetik nedenidir. İnsidansı 1/600~1/1000 canlı doğum olup erken gebelik kayıplarının önemli bir nedenidir. DS ayrıca en sık görülen ve en iyi bilinen kromozom hastalığıdır (1,2). Tahminlere göre 1/150 konseptus trizomi 21'lidir ve bunların %80'i erken gebelik sırasında kaybedilmektedir (3, 4, 5). İlerlemiş anne yaşı trizomi 21 için major risk oluşturmaktadır. Annelerin 35 yaş sonrasında DS'li çocuk doğurma riskleri hamilelik yaşı ile orantılı olarak artmaktadır (6). Çoğu DS vakasında anne yaşı 35 altındadır ve bu da yaşlı annelere oranla genç annelerde farklı mekanizmaların (örneğin bozulmuş folat homosistein metabolizmasının) kromozom 21 nondisjunctionuna neden olduğunu düşündürmektedir (7). Bununla birlikte anne yaşı DS'li çocuk doğurma riskinde folat metabolizmasının rolünü karmaşık hale getirmiştir. Yapılmış son çalışmalar anne yaşının etkisinin maternal mayozun II. evresinde hatalara neden olduğunu göstermektedir (8). Buna ek olarak maternal yumurtalık mozaizminin trizomi 21 için farklı bir risk faktörü olabileceği hipotez şeklinde düşünülmektedir (9). İlk olarak 1999'da rapor edilen folat homosistein metabolizmasındaki genetik polimorfizmler nedenli bozuklukların Down sendromlu çocuk sahibi olma riskini arttırdığı ortaya konulmuştur. In vitro ve in vivo araştırmalar bozulmuş folat homosistein metabolizmasının kromozom 21' in ayrılamaması ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Fakat DS'li bir çocuğun doğumunun çeşitli genetik, epigenetik, çevresel orjinli olduğu düşünülmektedir ki bu durum bu farklı nedenler arasında bağlantı kurulmasını güçleştirmektedir (10). Perisentromerik hipometilasyon hipotezinde açıklanan bozulmuş folat/hcy metabolizması sonucu meydana gelen kinetokor anormallikleri yüzünden bozulmuş kromozom segregasyonu gözlenmektedir (15). Yapılan çeşitli çalışmalarda folat yetersizliği ve insan anöplodileri arasında bağlantılı bulunmuştur (11). Geçtiğimiz on yıl içerisinde yapılan birçok çalışmada folat ve metil metabolizmasının DS riskindeki rolü açıklanmaya çalışılmıştır (12-36). MTHFR gen polimorfizmleri Brezilya (14, 16-18, 37), Hindistan (25, 29, 33) Amerika, Kanada, Mısır ve Çin gibi bazı popülasyonlarında bağımsız bir risk faktörü olarak değerlendirilirken



(12, 15, 21, 31, 32), Türkiye, Japonya ve Avrupada yapılan bazı çalışmalarda (13, 19, 20, 22, 23, 24, 26, 27,28, 30, 35, 36,) bağımsız bir risk faktörü olarak saptanmamıştır. Literatürde sonuçlardaki bu farklılıkların nedeninin allel frekanslarındaki farklılıklar, farklı olgu kontrol grup çalışmaları ya da çevresel faktörlerin etkisinden kaynaklanıyor olabileceği vurgulanmaktadır (10). Yakın zamanda yapılan çalışmalar da MTHFR 677C>T ve 1298A>C polimorfizmleri ve kromozomal hasar arasında bağlantı araştırılmış DS'li çocuk sahibi olan annelerde folat metabolizmasındaki MTHFR 677C>T ve 1298A>C polimorfizmlerinin anormal kromozomal segregasyon için artmış yatkınlık gösterdikleri saptanmıştır (35, 38). Gen-gen ilişkileri araştırılan çalışmalarda; Hcy metabolizmasında görev alan MTHFR enziminin 677T ve 1298C allellerinin ayrıca hücre içine folat taşınmasında görev alan RFC1, metiyonin sentaz (MTR) (125) ve metiyonin sentaz redüktazdaki (MTRR) mutasyonların DS için bir risk faktörü olduğu gösterilmiş olup bununla birlikte 3 veya daha fazla polimorfizm varlığında DS riskinin arttığı saptanmıştır (35). Farklı topluluklarda görülen tutarsız sonuçlar, folat metabolizmasına karışan genetik ve çevresel etkileşimleri de yansıtıyor olabilir. Risk faktörleri, gen çevre etkileşimine bağlı olabilir. Özellikle de bu polimorfizmlerin etkilerinin devamı folik asit kullanımına bağlı olabilir (10).

Literatürde özetle insanda kromozom nondisjunctionu multifaktöriyel bir mekanizma şeklinde vurgulanmaktadır ve bu duruma neden olan daha spesifik risk faktörlerinin incelenmesi gerekliliği üzerinde durulmaktadır (7, 8, 9). Bugünkü sonuçlarla DS ve maternal folat metabolizması arasında bağlantı olarak öne sürülen bu paradigmayı değerlendirmek için ileri araştırmalara gereksinim duyulmaktadır (12). DS olguların çoğu genç annelerden doğmaktadır. Bu durum genç annelerde farklı mekanizmaların kromozom 21'in ayrılmamasına neden olduğu şeklinde yorumlanmakta ve bu konuyu aydınlatmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır (7). Özellikle Down sendromlu çocukların %80'inin sitogenetik inceleme için endikasyonu bulunmayan 35 yaşın altındaki kadınlardan doğduğu, Down sendromlu fetüslerin sadece %20'sinin ileri yaş annelerden doğduğu bildirilmektedir. Dolayısıyla tüm tarama yöntemlerine rağmen Down sendromlu

gebelerin %80'inin prenatal olarak tespit edilemediği sonucu ortaya çıkmaktadır (39).

Bazı araştırmacılar genetik ve çevresel faktörlerin yanında diyetel faktörlerin 21. kromozomun iki çiftini taşıyan yumurtaların oluşması arasında karışık bir bağlantı olduğunu belirtmektedirler. Bu araştırmacılara göre folat metabolizmasının DS riskindeki rolünde diğeri bir karışıklık folat taşıyıcıları olan SCL19A1 ve RFC1 ve CBS genlerinin rolüdür. Bu genlerin trizomilerinin folat ihtiyacını arttırabileceği ve DS'li fetüslerin oluşmasına neden olabilecek sonuçlar doğurabilecekleri öne sürülmektedir (13, 14, 15, 17, 30).

Folat ve homosistein metabolizması ve trizomi 21 arasındaki kompleks ilişki günümüzde tekrar gözden geçirildiğinde, şu anki mevcut düşünce; maternal ve emriyonik kombinasyonların özellikle folat metabolizmasında rol alan genlerdeki polimorfizmlerle beraber annenin diyet ve yaşam tarzının trizomi 21'li fetüsün hayatta kalması ile ilişkili olduğudur (30). Ayrıca çoğu kromozom 21 nondisjunctionları büyükannenin vücudunda maternal embriyogenezisde meydana gelmektedir bununla birlikte büyükannenin genotipinin ve hamileliği esnasındaki nutrisyonel durumunun maternal yumurtaların iki adet kromozom 21 taşımasında etkili olabileceği düşünülmektedir (36,40).

Özetle insanda kromozom nondisjunctionu multifaktöriyel bir mekanizma şeklinde vurgulanmaktadır ve bu duruma neden olan daha spesifik risk faktörlerinin incelenmesi gerekliliği üzerinde durulmaktadır (7, 8, 9). Literatürde folat yolağında görevli olan gen çalışmalarını kadar down sendromlu etkilenmiş gebeliği olan kadınlardaki folat metil metabolizmasını içeren diğeri mikronutrisyonlar ile etkileşiminin sistematik çalışmalarının, down sendromunu önlemede halk sağlığı stratejilerinin geliştirilmesi için fırsatlar sağlayabileceği düşünülmektedir. Biz çalışmamızda literatürdeki MTHFR gen polimorfizminin down sendromlu çocuk doğurma açısından maternal risk faktörü olabileceği bulgularından yola çıkarak Türk populasyonunda Down sendromlu çocuk sahibi annelerde yaş gruplarını da dikkate alarak MTHFR gen polimorfizmlerinin ve down sendromlu çocuk doğurma açısından maternal bir risk faktörü olup olmadığının araştırılmasını amaçladık.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Down Sendromu

Down Sendromu (DS) ya da trizomi 21 insanda mental retardasyonun en sık görülen genetik nedenidir ve en iyi bilinen kromozom hastalığıdır. 1/600~1/1000 doğumda bir görülür. (1,2). Erken gebelik kayıplarının önemli bir nedenidir. Tahminlere göre 1/150 konseptus trizomi 21' lidir ve bunların %80' i erken gebelik sırasında kaybedilmektedir (3, 4, 5). DS için bir risk faktörü olarak sadece ileri maternal yaş kesin olarak kanıtlanmıştır, anne yaşı arttıkça bu kromozom anomalisinin görülme sıklığı artmaktadır (4, 41). Mongolizm terimi ilk kez 1846 yılında Edouard Onesimus Segwin tarafından verilen bir konferansta tanımlanmıştır. Klinik bulguları ise ilk defa 1866 yılında Langon Down tarafından belirtilmiştir ve daha sonraları mongol terminolojisi yerine Down Sendromu olarak isimlendirilmesi uygun görülmüştür. İleri anne yaşının yanında ileri paternal yaş, viral etkenler, radyasyon trizomilere neden olabilmektedir (42).

### 2.2. Down Sendromunun Bulguları

Down sendromunun klinik tanısında genellikle güçlük yaşanmaz. Ancak her DS' li olguya klinik olarak tanı konulsa dahi tanının doğrulanması ve genetik danışmaya temel oluşturmak üzere, DS' nin sitogenetik tipi belirlenmeli ve aileye bu sonuca göre genetik danışma verilmelidir. Belirli bir karyotipin hastanın fenotipi üzerine etkisi çok az olsa da tekrarlama riskinin saptanması açısından bu analiz çok önemlidir (42,43). DS sitogenetik olarak regüler tip, translokasyon tip ve mozaik tip olmak üzere değerlendirilir (43).

### 2.2.1. Sitogenetik Bulgular

#### a. Regüler Tip (Serbest Trizomi)

Normal bir insanda G grubuna ait 21 nolu kromozomdan iki adet bulunması gerekirken, DS' de üç tane bulunur. Sitogenetik olarak kadın genotipinde 47,XX+21, erkek genotipinde 47,XY+21 şeklinde gösterilir. Regüler trizomi 21 DS olgularının %95' inde bulunur. Çoğu olguda (%90) maternal mayoz I evresinde meydana gelen nondisjunction sonucunda, olguların diğer kısmı da (%10) paternal mayozda meydana gelen, genellikle Mayoz II evresinde oluşan bir hatadan kaynaklanmaktadır (43).

#### b. Robertsonyan Translokasyon Tip

Bu tipte bir tanesi kromozom 21q ile diğer akrosentrik kromozomlardan birinin (genellikle 14 veya 22. kromozom) uzun kolu arasında robertsonyan translokasyon sonucu oluşmaktadır ve total kromozom sayısı 46'dır. En sık olarak 14. kromozom ile translokasyon gözlenir (41). De novo ya da ailevi taşıyıcılıklar sonucu ortaya çıkmaktadır (44). Diğer tiplerden farklı olarak translokasyonlar anne yaşı ile bağlantı göstermezler. Özellikle annenin translokasyon taşıyıcısı olduğu ailelerde göreceli olarak artmış tekrarlıma riskine sebep olurlar (43).

#### c. 21q21q Translokasyonu

Bir 21q21q kromozomu, iki 21. kromozomun uzun kollarından oluşmuştur. Bunun bir robertsonyan translokasyonu olmaktan çok izokromozom olarak meydana geldiği düşünülmektedir. DS' li olguların çok az bir kısmında görülmektedir. Nadir görülmesine rağmen bu tip kromozomal translokasyon taşıyan kişinin tüm gametlerinin ya 21. kromozom materyalini çift doz

bulunduran 21q21q kromozomu içermesi ya da hiç 21. kromozom materyali olmayacak şekilde oluşması nedeniyle özel önem taşımaktadır. Eşinin kromozomal bir hastalığı yok ise oluşacak gebelik kaçınılmaz olarak ya down sendromlu ya da monozomi 21' li olacaktır (43).

#### **d. Mozaik Tip**

Mozaik tipi postzigotik mitotik hatalarla oluşur. Görülme oranı yaklaşık %1-2' dir (44). Bu olgularda hücrelerin bir kısmı normal 46 kromozoma sahip iken, bir kısmı trizomiktir. Bu hastalarda fenotipik özellikler trizomi 21'dekine göre daha hafif olabilmekle birlikte, erken gelişim safhasında embriyodaki trizomi 21'li hücrelerin oranına bağlı olarak geniş bir fenotipik değişkenlik söz konusudur (43).

#### **e. Kısmi trizomi 21**

Çok nadir olarak 21. kromozom uzun kolunun sadece bir kısmının üç kopya halinde bulunduğu down sendromlu olgular tanımlanmıştır, daha da nadir olarak sitogenetik olarak görülebilen bir kromozom bozukluğu olmayan down sendromlu olgularda saptanabilmektedir. Bu olgular 21. kromozomun hangi bölgelerinin down sendromu fenotipinin hangi komponentlerinden sorumlu olabileceği ve hangi bölgelerin 3 kopya olmasının bu fenotipik özelliğe etkisi olmayacağını belirlenmesi açısından önem taşırlar (43). İnsan Genom Projesinden elde edilen dizi bilgilerinin 21. kromozomda sadece birkaç yüz gen olduğunu göstermesine rağmen, belli genlerin 3 dozda bulunmasıyla belli down sendromu fenotipik özellikleri arasında ilişki kurmaya yönelik girişimler bugüne dek başarısız olmuştur (43).

### 2.2.2. Fiziksel Bulgular

Down Sendromu tipik yüz görünümü ile yenidoğan evresinden itibaren her yaşta kolaylıkla tanınabilir. DS’de minör anomalilerinin tarifi Smith, Berg ve Poeschel tarafından yapılmıştır (2,45).

Tablo 2.1. Down sendromunda minor malformasyon sıklığı (2,45)

Oblik palpebral fissürler	%82
Ense derisi kalınlığı	%81
Küçük ağız	%76
Brakisefali	%75
Hiperflexibilite	%73
Sandal gap	%68
Burun kökü basıklığı	%68
Küçük el ve kalın parmaklar	%64
Kısa boyun	%61
Dış anomalileri	%61
Epikantus	%59
Klinodaktili	%58
Brushfield lekeleri	%56
Skrotal dil	%55
Smian çizgisi	%53
Küçük ve displastik kulak	%50
Dilin dışarıda olması	%47

Bu bulgular ek olarak DS’a özgü dermatoglifik özellikler, kulak uzunluğu ve yapısı (kısa, displastik), 1. ve 2. ayak parmakları arasında geniş mesafe (sandal gap), 2 meme arasındaki mesafenin uzunluğu, iristeki Brushfield lekeleri, ensedeki deri bolluğu ile beraber değerlendirildiğinde klinik tanı %99,9’a ulaşır (2,45). Genel olarak DS’ nun sitogenetik tipi ile klinik olarak mental retardasyonun ağırlığı arasında bir ilişki olmayıp, tüm olgulara mental

retardasyon eşlik etmektedir (42). Ayrıca down sendromuna eşlik eden anomalilerin anne yaşı ile ilişkili olduğu saptanmıştır (46-48).

### 2.2.3. Eşlik Eden Major Konjenital Anomaliler

#### a. Doğumsal Kalp Hastalıkları (DKH)

Down sendromunda en sık rastlanan major konjenital anomali doğumsal kalp hastalıklarıdır (49-51). DS'li olgularda yaşam süresini etkileyen faktörlerin başında DKH gelmektedir. DKH'nın erken tanı ve tedavisi, DS'li olgularda prognozu ve yaşam kalitesini etkileyen önemli bir faktördür (49, 50, 52, 53). Türkiye'de yapılan bir çalışmada DS'de DKH sıklığı %40 olarak bulunmuştur (54).

Bu çalışmaya göre DS' de kalp anomalisi tipleri sıklık sırasına göre,

% 45 Atrioventriküler kanal defekti

%35 Ventriküler septal defekt

%8 Atrial septal defekt

%4 Fallot tetralojisi

%7 Patent duktus arteriosus

%1 Diğer görülebilen kalp anomalileri şeklinde saptanmıştır.

Türkiye' de yapılan diğer bir çalışmada Down sendromlu olgularda DKH değerlendirmesi yapılmıştır, bu çalışmada elde edilen sonuçlardan biri de % 72,4 vakada anne yaşının 35' in altında saptanması şeklinde olmuştur (55).

Literatür bulguları regüler tip trizomide DKH sıklığının daha yüksek olduğunu göstermektedir. Literatürde % 33 ile % 76 arasında değişen oranlar bildirilmiştir (53). İsveç, Fransa ve İtalya'nın katıldığı ortak bir çalışmada 5581 DS'li hastada doğumsal malformasyon prevalansı değerlendirilmiş; DKH oranı İsveç'te % 32, Fransa'da % 23, İtalya'da ise % 21 olarak bulunmuştur (56).

DS' li olgularda ilk 2 yıllık yaşamda mortalitenin başlıca sebebi kardiyak malformasyonlardır (51).

DS' li vakaların postmortem çalışmalarında aort ve pulmoner kapakta çok miktarda fenestrasyon ve senil vasküler değişiklikler rastlanmıştır. Bu nedenle DKH bulunmayan DS' li hastalarında düzenli aralıklarla kardiyolojik yönden değerlendirilmesi önerilmektedir (51).

### **b. Gastrointestinal Sistem Anomalileri**

Down Sendromlu olguların %5'inde gastrointestinal sistem (GİS) anomalileri saptanmıştır (57). En sık rastlanan GİS anomalileri şu şekilde sıralanmaktadır: %2,5 duodonal atrezi veya stenoz (annular pankreas ile beraber olabilir), %1 imperfore anüs, %0,56 Hirschsprung hastalığı, %0,43 trakeaözefagial fistül ya da özefagial atrezi. Ayrıca Hirschsprung hastalığı olan süt çocuklarının % 5,9'u, duodonal atrezi veya stenozu olanların %25'i DS'lidir (58).

#### **2.2.4. Göz Bulguları**

Down Sendromunda göz bulguları oldukça sık karşımıza çıkar. Gözde strabismus, katarakt, iriste beyaz lekeler (brushfield) ve nistagmus dikkati çeker. Bazı bulgular doğuştan olmasına karşın, bazı bulgular gelişim sürecinde ortaya çıkmaktadır. DS' li bireylerde % 88,6 mongoloid göz aksı, % 47,7 epikantus, %9 blefarit ve blefarokonjonktivit, % 31,8 içe şaşılık (esotropia), %35,8 myopi ve %20,5 hipermetropi (kırılma kusurları), %15,5 katarakt, %38,6 iriste brushfield noktaları, % 40,9 iriste hipoplazi ve değişik oranlarda göz kapağı anomalileri (pitozis, ektropion), keratokonus ve fundus bulguları şeklinde göz bulguları görülmektedir (59).



### 2.2.5. İşitme Bozuklukları

Down Sendromlu olgularda kulak enfeksiyonlarına sık rastlanmaktadır. Bunun başlıca nedenlerinden birincisi, DS' li olgularda immun sistemin yetersiz olmasıdır. İkincisi ise basık yüz yapıları, kafa kemiklerinde farklılıklar ve sinüslerinin küçüklüğü nedeniyle seröz otite daha sık oranda yakalanmalarındır (42). Bir çalışmada 30 DS' li çocuğun işitme düzeyi incelenmiş %60' ında hafif, %13' ün de orta derecede işitme kaybı tespit edilmiştir (60).

### 2.2.6. Nörolojik Bulgular

Down sendromlu yenidoğan ve süt çocuklarında en önemli özellik hipotonidir (61). Kas tonusu gelişimini olumsuz etkileyen önemli faktörlerden biri de doğumsal kalp hastalığının mevcudiyetidir (61). Ayrıca bu olgularda yenidoğan reflekslerinin kaybolması gecikebilir. Gelişme geriliği genellikle ilk birkaç ay içinde belirginleşir. Gelişim evreleri gecikmiştir. Down sendromlu bireylerdeki mental retardasyonun patogenezi tam olarak bilinmese de, 3 tane 21. kromozom üzerinde ki süperoksit dismutaz, S100 ve fosfofruktokinaz gibi enzimlerini kodlayan genlerin sayıca fazlalığından kaynaklanmış olabileceği iddia edilmektedir (62). Down Sendromlu bireylerin beyinlerindeki gelişme geriliği, olgunlaşma kusuru ve kortikal disgenezi, büyük bir ihtimalle fazla olan 21. kromozom tarafından oluşturulmaktadır. Ancak bundan sorumlu gen henüz tanımlanmamıştır. IQ düzeyleri genellikle 50'nin altındadır. Fakat düşük IQ düzeylerine rağmen öğrenme performansları oldukça iyidir. Genellikle mutlu, neşeli ve taklitçi karakterleri vardır. Müzikten hoşlanırlar. Son yıllarda geliştirilen uygulamalarla yenidoğan döneminden itibaren fizyoterapi ve özel eğitim uygulandığında, çoğu DS'li bireyin okuryazar duruma geldiği, kendi hayatını kendi kendine sürdürecektir yetenekleri geliştirebildiği görülmüştür (41). DS' li olguların %9' unda konvülsiyon görülmektedir (42). Down sendromunda Alzheimer hastalığının normalden daha sık olduğu ve erken yaşta başladığı bilinmektedir, bir çalışmada 30 yaşın üzerindeki DS' li bireylerin beyinlerinde

senil plaklar saptanmış ve beyin ağırlığının ortalama  $-2$  SD altında olduğu gösterilmiştir (63).

### **2.2.7. Hematolojik Bozukluklar**

Down Sendromunda lösemi riskinin arttığı ilk kez 1957 yılında yayınlanmıştır (64). Erken çocukluk döneminde lösemi riski yüksektir fakat yaşla birlikte azalmaktadır. DS' li olgularda lösemi en çok hayatın ilk 4 yılında ortaya çıkmaktadır (65). DS' li yenidoğanların %10' undan fazlasında kanda blastlar görülmektedir. Bu durum klinik ve morfolojik olarak konjenital lösemiden ayıramayabilir. Kendiliğinden remisyona çoğu olguda ilk 3 ayda meydana gelir, hayatı tehdit eden komplikasyonlar nadir olarak gözlenebilir. Bu durum geçici anormal miyelopoez, geçici lösemik reaksiyon veya geçici myeloproliferatif hastalık olarak adlandırılmaktadır (66). DS' de bir diğer hematolojik bozukluk ise yüksek hematokrit düzeyi, trombositoz veya trombositopenidir ayrıca yenidoğan döneminde makrositoz sık görülmektedir (67).

### **2.2.8. İmmünolojik Defektler**

Down Sendromlu olgularda üst solunum yolu enfeksiyonlarına sık rastlanması, yine bunlarda yüksek oranda antitiroid antikorlarının bulunması ve akut myeloid lösemisinin daha sık görülmesi immünolojik bir defektin varlığını düşündürmektedir. Bu konu üzerine yapılan araştırmalar bu defektin oldukça karmaşık olduğunu ve bireyler arasında farklı özellikler gösterdiğini ortaya koymaktadır (68, 69). DS' li bireyler humoral ve hücre aracılı immün sistemle ilgili birçok eksikliğe sahiptirler. DS' li bireylerin timuslarında birçok morfolojik anormallik olduğu tespit edilmiştir. DS' de immünolojik bozukluklara neden olan mekanizmalar tam açıklanamamakla birlikte immün sistemin değişik kademelerini içeren yetersizliklerin mevcut olduğu bilinmektedir (70).

### 2.2.9. Tiroid Fonksiyon Bozuklukları ve Otoimmünite

Down Sendromunda hipotiroidi ve hipertiroidi artmıştır. Yenidoğan tarama programı çalışmasında DS' li olguların %1,1' inde konjenital hipotiroidi saptanmıştır. Bu çalışmada ayrıca konjenital hipotiroidi insidansı DS' li olgularda normal popülasyona göre 28 kat fazla bulunmuştur (71). Erişkin DS' li bireylerde yapılan bir diğer çalışmada, hipotiroidi %17, hipertiroidi %2,5, guatr %18 oranında bulunmuştur (72). DS' li bireylerde yaşa bağımlı olarak tiroid antikoları oluşumu ve tiroid hastalık sıklığı artmaktadır. DS' li bireylerde tiroid disfonksiyonunun artan sıklığının sebebi bilinmemektedir ancak immun sistemdeki defektler bu durumdan sorumlu tutulmaktadır. DS' li bireylerde ayrıca çölyak hastalığı, alopesia areata, vitiligo, diabetes mellitus, adrenal disfonksiyon ve kronik aktif hepatit gibi otoimmun hastalıklara sık rastlanılmaktadır (73).

### 2.2.10. Büyüme Hızı ve Boy Uzunluğu

DS' de genellikle intrauterin gelişim geridir. Bu olgularda ilk 6-9 ay büyüme hızları iyidir ancak 3 yaşından sonra belirgin yavaşlama gözlenir. DS' li bireylerde boy -3SD' nin altındadır ve final boyları ise 140-160 cm arasında değişmektedir. Bu olgularda büyüme hormonu eksikliği yoktur ancak büyüme hormonu tedavisine iyi yanıt vermektedirler (74). DS' li bireylerde büyüme gelişmenin takibi için Down sendromuna özgün skalalar geliştirilmiştir (75).

### 2.2.11. Üreme Fonksiyonları

DS 'li erkek olgularda fertilitate çok azalmıştır ve genel olarak infertil oldukları bilinmektedir (42). Erkek olgularda birincil ve ikincil seks karakterlerinin gelişiminin, spesifik pitüiter ve testiküler hormon seviyelerinin iyi olduğu tespit edilmiştir, pubik kıllanmanın ve penis boyutunun normal adolesanlardan belirgin bir farkının olmadığını belirlenmiştir. Genel olarak DS' li erkeklerin fertilitate oranları düşük olmakla beraber, literatürde az sayıda da olsa çocuk sahibi olabilenlerine rastlanmaktadır (76). Erkeklerde ki bu total steriliteye rağmen kadın DS' li bireyler üreme fonksiyonuna sahiptirler ancak üreme fonksiyonları düşüktür. Geç menarş olur ve erken menapoz girerler. Down sendromlu kadınlarda gebelik oluşabilir ve tek bir gebelikte down

sendromlu çocuk doğurma olasılıkları %50'dir. İstenmeyen gebeliklerin önlenmesi için DS' li genç kadınların kontraseptif danışmanlık almaları gerekmektedir (77). DS' li dişilerde histolojik olarak yapılan çalışmalarda overlerde 14,5 yaşına dek folikül büyümesinin çok yavaşladığı ve antral folikül sayısının azaldığı gösterilmiştir (78).

## **2.3. Down Sendromunun Prenatal tanısı**

### **2.3.1. Prenatal tanı**

Anne ve babalar sağlıklı bir bebek sahibi olmayı hayal etmelerine karşın her gebelik istendiği şekilde devam etmemekte ve çiftler gebelik sürecinde bazı riskler yaşayabilmektedirler (79). Prenatal tanı denilince, fetüsteki normal dışı bulguların gebeliğin mümkün olduğu kadar erken döneminde test edilmesi ve gerekiyorsa gebeliğin sonlandırılması akla gelmektedir. Söz konusu problemler kalıtsal geçiş gösteren hastalıklar olabildiği gibi, değişik nedenlerle oluşan malformasyonlar, intrauterin enfeksiyonlar, teratojenik etkenler ve benzeri patolojileri de kapsamaktadır (80). Prenatal tanıda esas sorun fetüsün hasta veya etkilenmiş olabilmesi nedeni ile tehdit altında olmasıdır (80). Literatürde gebeliklerin %96' sının sağlıklı bebek ile sonuçlandığı ancak %4' ünün risk taşıdığı belirtilmektedir. Bu risk faktörlerinin belirlenmesinde prenatal tanı yöntemleri kullanılmaktadır (79).

Gebeliklerin % 8' inde genetik amaçlı prenatal tanı endikasyonu söz konusu olmaktadır. Prenatal tanı embriyonik ve fetal tanının tüm aşamalarını içermektedir (79). Prenatal tanı amacıyla birinci ve ikinci trimesterde, günümüzde yapılan girişimsel klasik yöntemler olarak "koryon villus örnekleme" (CVS), amniosentez (AS) ve "fetal kan örnekleme" (FBS, Kordosentez) uygulanmaktadır. Her yöntemin uygulanabilme zamanı, uygulanma kolaylığı, laboratuvar sonuçlarının alınma süresi ve komplikasyonları bakımından birbirlerine göre farklı özellikleri bulunmaktadır (81).

### 2.3.2. Prenatal tanının amacı

Prenatal tanıda esas amaç endikasyon varsa, olabildiğince erken tanıya varmaktır. Böylece fetusun sağlığı hakkında karar verilmek suretiyle sağlıklı gebeliğin devamı sağlanarak annenin sıkıntı ve endişeden kurtarılması hedeflenmektedir. Ayrıca erken tanı, gebeliğin sonlandırılması durumundan hem bedensel hem de psikolojik sorunların aza indirilmesinde önemli katkılar sağlamaktadır (81).

### 2.3.3. Prenatal Tanı Yöntemleri

#### Non invaziv Yöntemler

Fetal ultrasonografi

2. Maternal kanda bakılabilen markerlar
3. Pre-implantasyon genetik tanı

#### İnvaziv Yöntemler

1. Amniyosentez
2. Koryon villus örnekleme (CVS)
3. Fetal kan örnekleme (Kordosentez)
4. Fetal vücut doku örnekleme

### 2.3.4. Down Sendromunda Prenatal Tanı yöntemleri

Mental retardasyon yapması ve erken yaşta ölüme neden olması nedeniyle önde gelen toplumsal sorunlardan olan Down sendromu olgularının tümü olmasa da önemli bir kısmı, gebelik döneminde çeşitli tanı yöntemleriyle

tanınabilmektedir ve böylelikle ailelere gebeliği devam ettirme ya da sonlandırma seçenekleri sunulabilmektedir (82,83). İlk trimester tarama testi ve ense kalınlığı ölçümü, üçlü test, ikinci düzey ultrasonografi ile DS açısından yüksek riskli olan gebelikleri tespit etmek mümkündür (84).

Down sendromlu çocukların %80' i sitogenetik inceleme için endikasyonu bulunmayan 35 yaşın altındaki kadınlardan doğmaktadır. Down sendromlu fetüslerin sadece %20' si ileri yaş annelerden doğmaktadır. Dolayısıyla tarama yöntemleri ile Down sendromlu gebeliklerin %80' i prenatal olarak tespit edilemediği bildirilmektedir (39).

#### **a. Tarama Testleri**

Trizomi 21 taramasına ilk olarak 1970' li yılların başında ileri anne yaşı kullanılarak başlanmıştır. Ancak Down sendromlu çocukların %85' inin 35 yaş altındaki annelerden dünyaya geldiği görülmüştür. Bu durum, genç kadınların doğurganlık yüzdelerinin daha yüksek olmasıyla açıklanmaktadır. Yine de, bir kadının Down sendromlu bir çocuk doğurma olasılığı, yaşıyla birlikte artmaktadır. Örneğin, 20 yaşında 12 haftalık gebeliği olan bir kadında bu olasılık 1068 de 1 iken, 35 yaşındaki bir kadında 249 da 1'e, 40 yaşındaki bir kadında da 68 de 1' e çıkmaktadır (85).

Günümüzde Down Sendromu tarama stratejileri ikinci trimester serum biyokimya testlerini, birinci trimester testlerini (sonografik belirteçler ile serum biyokimyasının kombinasyonu) ve birinci ile ikinci trimester belirteçlerinin entegrasyonunu içermektedir (86).

Türkiye' de trizomi 21 riski belirlemede kullanılan en yaygın test halen üçlü testtir. Birçok ülkede de üçlü testin halen ulusal prenatal anöploidi tarama programında en önemli test olarak kullanıldığını bilinmektedir (87, 88). Araştırmalarda bebekte Down sendromu olması durumunda kan inhibin-A düzeylerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu yükseklik nedeni ile inhibin-A düzeylerinin Down sendromu için tarama testi olarak kullanılabileceği

düşünülmüştür. Ancak tek başına değerlendirildiğinde inhibin-A Down sendromlu olguların sadece %41' ini tanıyabilmektedir (89).

Down sendromunda AFP ve E3 gebelik haftasına göre olması gerekenden düşük, HCG ise olması gerekenden yüksektir. Burada en önemli nokta testin yapıldığı anda gebelik haftasının ultrasonografi ile teyit edilmiş olmasıdır çünkü ölçümü yapılan hormonların MoM değerleri gebelik haftasına göre değişkenlik göstermektedir. Bu tarama metodu tek başına anne yaşından daha etkilidir ve %50-70 doğruluk değeri ile trizomi 21' li fetüsü saptayabilmektedir (87, 90).

#### **b. Prenatal USG**

Genetik sonogram olarak da adlandırılan, fetüste ki bazı major ve minör ultrasonografik dismorfik bulguların belirli bir yöntem içinde (skorlama sistemi veya bilgisayar programı gibi) incelenmesi sonucunda % 4-15 yalancı pozitiflik oranıyla Down sendromlu fetusların % 65-75 kadarının belirlenebileceği gösterilmiştir (91).

Ense kalınlığı ölçümü trizomi 21'li olguların derilerindeki elastisite yetersizliğine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Down sendromunda ki bu özel cilt değişikliğinin, gebeliğin ilk üç ayı içerisinde yapılan ultrasonografide artmış nukal translusensi (NT) olarak saptanabileceği 1990'lı yıllarda fark edilmiştir. İlk trimesterde trisomi 21' li fetüslerin yaklaşık %75'inde NT artmıştır ve olguların %60-70'inde burun kemiği yoktur (92).

İkinci trimesterde Down sendromlu fetüslerin belirlenmesinde, özellikle son zamanlarda bazı ultrasonografik belirteçler kullanılmaktadır (93). İkinci trimesterdeki bu ultrasonografik belirteçler major ve minör olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Kardiyak anomaliler, duodenal atrezi, omfalosel ve hidrosefali gibi fetal malformasyonlar ve nukal kalınlık artışı major ultrasonografik belirteçler olarak kabul edilmektedir. Major ultrasonografik belirteçlerin her biri, Down sendromu tanısında düşük risk grubunda bulunan hastalarda dahi çok yüksek spesifisiteye bağlı olarak yüksek pozitif prediktif değere sahiptir. Minör dismorfik ultrasonografik belirteçler ise, tek başlarına

anomali olmayan ve normal fetüslerde de belli bir oranda görülen ancak anöploidili fetüslerde daha sık görülen belirteçlerdir. Bu belirteçler; hafif kısa femur, hafif kısa humerus, hafif piyelektazi, ekojenik intrakardiyak odak, hiperekojen bağırsak ve koroid pleksus kistleridir (94).

#### **2.4. Down Sendromunun Etyolojisi ve Etyolojiye Yönelik Hipotezler**

Down sendromunun kromozomal temelleri iyi biliniyor olmasına rağmen kromozomal bozukluğun nedenleri henüz çok iyi anlaşılamamıştır (43). DS' liler arasında anormal gametin maternal mayoz I'den kaynaklananlarının yüzdesinin yüksek olması, altta yatan nedenin ileri anne yaşına bağlı olarak gelişen maternal mayozun I. evresindeki bir hata olduğunu düşündürmektedir (43).

Olasılıklarda biri "yaşlı yumurta" modelidir. Yumurta yaşlandıkça kromozomların uygun olarak ayrılmalarında hata oluşma olasılığının arttığı düşünülmektedir. Trizomi 21 araştırmalarda, rekombinasyon olayının sayısı ve veya yerleşiminin kromozom çiftinin iki mayoz bölünme esnasında uygun olarak ayrılıp ayrılamayacağını belirleyicisi olduğunu göstermiştir. Yaşlı yumurtalar, rekombinasyon mekanizmasından kaynaklanan nondisjunction eğilimine cevap vermekte daha etkisiz kalabilirler. Bu modelin önemli bir özelliği bugün DS'li bir bebeğin doğumuna neden olan etyolojik olayın, bundan 35-40 yıl önce DS'li bebeğin annesi henüz bir fetüsken ve oositleri 1. mayoz bölünmenin profazında iken meydana gelmiş olmasıdır. Rekombinasyon kalıpları ve kromozom segregasyonu arasındaki önemli ilişki biliniyor olmasına rağmen 21. kromozomun ayrılamaması ve anne yaşı etkisi konusu henüz aydınlatılamamıştır (43).

DS'li çocuk riski 30 yaş civarındaki annelerde keskin olarak yükselmektedir ve en yaşlı anne grubunda 25 doğumda bire ulaşmaktadır (Tablo 1). Genç annelerde risk çok daha düşük olmasına rağmen, doğum hızlarının çok daha fazla olması nedeniyle tüm DS' li bebeklerin annelerinin yarısından fazlası 35 yaşın altındadır. Birleşik devletler ve Kanada'da 35 yaş ve üzerindeki gebelerin % 50 veya daha fazlasına prenatal tanı amaçlı fetal kromozom analizi



yapılmaktadır ancak analiz edilen fetüslerin sadece % 1'inde trizomi 21 saptanmaktadır (43).

Tablo 2.2. Anne yaşı ile ilişkili olarak canlı doğumlarda ve fetüslerde Down sendromu insidansı

Anne yaşı	Doğumda	Amniyosentezde(16.hafta)	CVS (9-11.hafta)
15-19	1/1250	-	-
20-24	1/1400	-	-
25-29	1/1100	-	-
30	1/900	-	-
31	1/900	-	-
32	1/750	-	-
33	1/625	1/420	1/370
34	1/500	1/333	1/250
35	1/385	1/250	1/250
36	1/300	1/200	1/175
37	1/225	1/150	1/175
38	1/175	1/115	1/115
39	1/140	1/90	1/90
40	1/100	1/70	1/80
41	1/80	1/50	1/50
42	1/65	1/40	1/30
43	1/50	1/30	1/25
44	1/40	1/25	1/25
45 ve üzeri	1/25	1/20	1/15

### 2.4.1. Folat metabolizması ve DS riski

Folatlar tek karbon biyosentezi ve epigenetik işlemler için gereklidirler. Hücrel folatlardaki bir yetmezlik hatalı DNA metilasyonu, nokta mutasyonları, kromozom kırılmaları, hatalı kromozom replikasyonu ve anöploidilere neden olmaktadır. İlk olarak 1999' da rapor edilen folat homosistein metabolizmasındaki genetik polimorfizmler nedeni bozuklukların Down sendromlu çocuk sahibi olma riskini arttırdığı ortaya konulmuştur. In vitro ve in vivo araştırmalar bozulmuş folat homosistein metabolizmasının kromozom 21' in ayrılmasını ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Fakat DS' li bir çocuğun doğumunun çeşitli genetik, epigenetik, çevresel orjinli olduğu düşünülmektedir ki bu durum bu farklı nedenler arasında bağlantı kurulmasını güçleştirmektedir (10).

B9 vitamini ailesi üyeleri genel olarak folatlar olarak bilinmektedirler. Folatlar tek karbon biyosentezi ve epigenetik işlemler için gerekli önemli bileşiklerdir. Folatlar diyetel kaynaklardan özellikle yeşil sebze ve meyvelerin tüketilmesiyle vücuda alınmaktadır. Folik asit ise folatların yiyeceklere ve ek diyet maddelerine sentetik olarak eklenmiş formudur. Folatın bağırsakta emildikten sonra karaciğerde 5- metil tetrahidrofolat (5-metil THF) formunu alması için redüksiyon ve metilasyon reaksiyonları geçirmesi gerekmektedir. Daha sonra kana salınır ve hücreler tarafından alınırlar. Böylece DNA ve RNA prekürsörleri tarafından veya homosisteinin metiyonine çevriminde kullanılırlar. Metiyonin de ana DNA metile edici ajan olarak bilinen SAM' ı oluşturmada kullanılır. Folik asit doğal biyolojik formu olan vitamin şekli, 5-metil THF haline, bağırsak duvarını geçtikten sonra enzimatik bir redüksiyon ve metilasyon işlemi sonucunda gelmektedir (95, 96). Hücrel folat metabolizmasındaki bir bozukluk hatalı DNA metilasyonu, nokta mutasyonları, kromozom kırıkları, artmış mikronükleus, hatalı rekombinasyon ve anöploidilere neden olmaktadır (97). Bozulmuş folat metabolizması benzer fonksiyonel enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizmler sonucunda da görülmekte olup çeşitli hastalık ve

kanser tiplerinde (98-101) kardiovasküler hastalıklarda (102, 103), nörodejeneratif hastalıklarda (104, 105) ve nöral tüp defektlerinde de bozulmuş folat metabolizmasına rastlanılmaktadır (106, 107).

Down sendromu olgularının % 95' inde kromozom 21 nondisjunction olayı maternal kaynaklı ve oositin olgunlaşma evresinde mayoz I sırasında meydana gelmektedir (101). Literatürde bazı çalışmalarda metabolik enzimlerdeki genetik polimorfizmlerle ilişkili olarak folat metabolizmasındaki bozuklukların DS' li çocuk doğurma riskini arttırdığı belirtilmektedir. Kuzey Amerika popülasyonunda MTHFR geninin 677T alelilinin DS' li çocuk sahibi olma açısından bir risk faktörü olabileceği belirtilmiştir (15). Araştırmalarda temel olarak folat metabolizmasının DS' li çocuk sahibi olma riskindeki muhtemel rolünü incelemek amaçlamıştır. Bu maksatla farklı ülkelerde birçok çalışma yapılmasına rağmen kesin bir sonuca ulaşılamamıştır (12-36). Elde edilen farklı sonuçlardan ortaya çıkan bilgiler ışığında bu SNP' ler bağımsız bir risk faktörü olarak değerlendirilmiştir ve şuan ki mevcut görüşe göre; folate / Hcy metabolik yolağının bozulmasıyla ilişkili genetik polimorfizmlerin tek başlarına DS' li çocuk sahibi olma riski oluşturması için yeterli olamayacağıdır. Bununla beraber bu polimorfizmlerin kombine olarak genomda bulunmaları ise DS' li çocuk sahibi olma riskini arttırmaktadır (9, 12-14, 17-19, 21, 24, 35).

Bazı araştırmacılar genetik ve çevresel faktörlerin yanında diyetSEL faktörlerin 21. kromozomun iki çiftini taşıyan yumurtaların oluşması arasında karışık bir bağlantı olduğunu belirtmektedirler. Bu araştırmacılara göre folat metabolizmasının DS riskindeki rolünde diğer bir karışıklık folat taşıyıcıları olan SCL19A1 ve RFC1 ve CBS genlerinin rolüdür. Bu genlerin trizomilerinin folat ihtiyacını arttırabileceği ve DS'li fetüslerin oluşmasına neden olabilecek sonuçlar doğurabilecekleri öne sürülmektedir (13, 14, 15, 17, 30).

Folat ve homosistein metabolizması ve trizomi 21 arasındaki kompleks ilişki günümüzde tekrar gözden geçirildiğinde, şu anki mevcut düşünce; maternal ve emrionik kombinasyonların özellikle folat metabolizmasında rol alan genlerdeki polimorfizmlerle beraber annenin diyet ve yaşam tarzının trizomi 21'li fetüsün hayatta kalması ile ilişkili olduğudur (30). Ayrıca çoğu kromozom

21 nondisjunctionları büyükannenin vücudunda maternal embriyogenezisde meydana gelmektedir bununla birlikte büyükannenin genotipinin ve hamileliği esnasındaki nutrisyonel durumunun maternal yumurtaların iki adet kromozom 21 taşımasında etkili olabileceği düşünülmektedir (36, 40).

İlerlemiş anne yaşı trizomi 21 için major risk oluşturmaktadır. Annelerin 35 yaş sonrasında DS' li çocuk doğurma riskleri hamilelik yaşı ile orantılı olarak artmaktadır (6). Çoğu DS vakasında anne yaşı 35 altındadır ve bu da yaşlı annelere oranla genç annelerde farklı mekanizmaların (örneğin bozulmuş folat homosistein metabolizmasının) kromozom 21 nondisjunctionuna neden olduğunu düşündürmektedir (7). Bununla birlikte anne yaşı DS' li çocuk doğurma riskinde folat metabolizmasının rolünü karmaşık hale getirmiştir. Yapılmış son çalışmalar anne yaşının etkisinin maternal mayozun II. evresinde hatalara neden olduğunu göstermektedir (8). Buna ek olarak maternal yumurtalık mozaisizminin trizomi 21 için farklı bir risk faktörü olabileceği hipotez şeklinde düşünülmektedir (9). Özetle insanda kromozom nondisjunctionu multifaktöriyel bir mekanizma şeklinde vurgulanmaktadır ve bu duruma neden olan daha spesifik risk faktörlerinin incelenmesi gerekliliği üzerinde durulmaktadır (7, 8, 9). Alkol kullanımı düşük serum folat seviyeleriyle ve bozulmuş MTR aktivitesi ile ilişkili bulunmuştur. Dolayısıyla DS' li çocuk riski çalışmalarında alkol kullanımı diğer bir diyetsel faktör olarak göz önünde bulundurulmalıdır (10).

DS vakasında sadece %5' ten az paternal mayozla ilişkili hatalar söz konusudur. Literatürde diyetsel faktörlerin sperm anöploidisine etkisi hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Yapılan son çalışmalar yüksek folat alımı olan erkeklerin spermlerinde ki monozomi 21 oranının düşük folat alan erkeklerle karşılaştırıldığında daha az olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca folat metabolizmasının insanda ki nondisjunction olayına etkisinin bir kanıtı olarak da bu bilgi sunulmaktadır (11).

#### **2.4.2. Folat, homosistein, metiyonin metabolizması ve DNA metilasyonu ya da DNA sentezi üzerine etkisi**

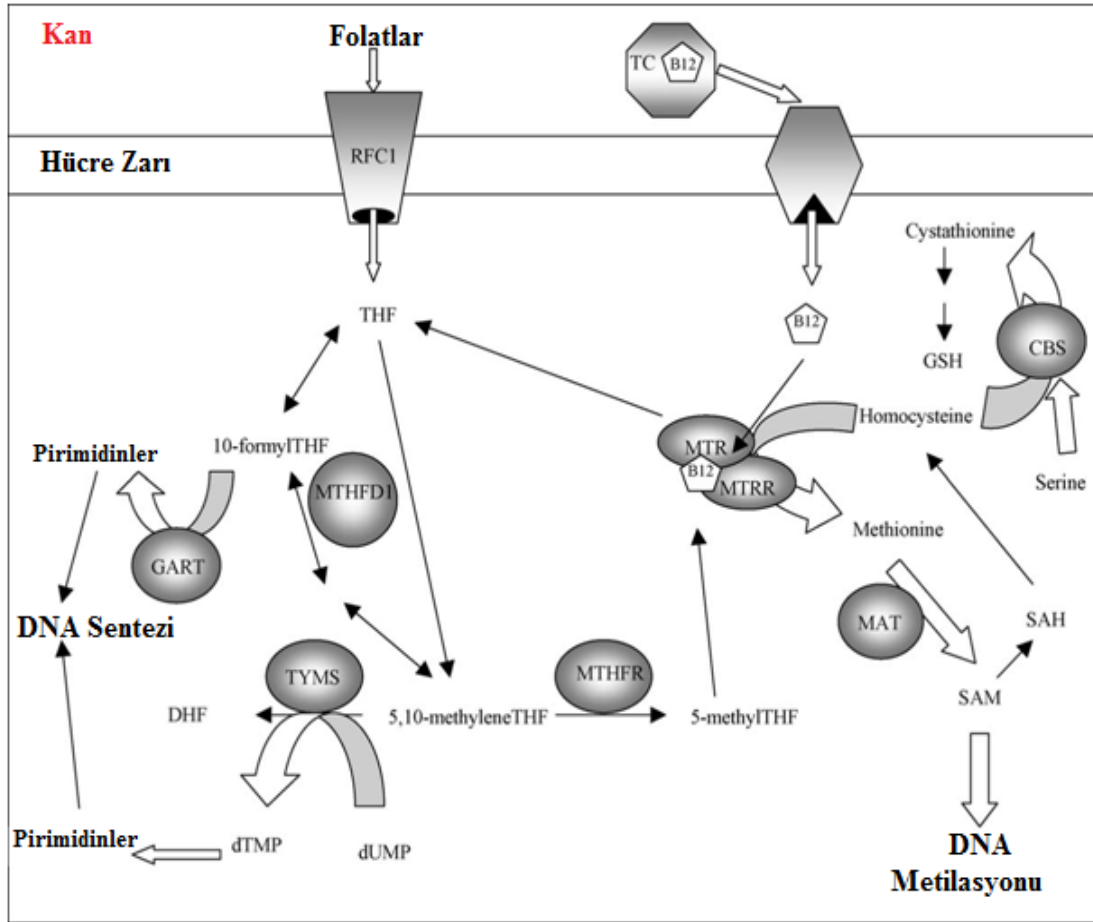
Hücre sel folatlar, hem DNA metilasyonu işleminde hem de nükleik asit prekürsörlerinin sentezinde kullanılabilirler (Şekil 1.1 ). Folatlar hidrofilik moleküllerdir ve biyolojik zarlardan tek başına difüzyonla geçemezler. Bu yüzden memeli hücre ve dokularına karmaşık membran transport sistemleri sayesinde geçebilirler. Folatlar genetik ve fonksiyonel olarak farklı transport sistemleri kullanılırlar. Bunlar RFC1(reduced folat carrier), FR (folat receptor) ve proton- coupled folat transporterdir (PCFT). Aralarında en iyi karakterize edilmiş olanı ve en çok eksprese olanı RFC1' dir (96, 108).

RFC1 genel olarak geniş bir ekspresyon paterni gösterirken, ek folat alım sistemlerinin ekspresyonları belirli dokularla sınırlıdır. Bu yüzden RFC1 memeli hücre ve dokularında folat kofaktörlerinin kandan hücre içine alınmasında major rol oynayan transport sistemidir (140).

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR), DNA metilasyonunun düzenlenmesinde düzenleyici bir rol oynamaktadır. MTHFR homosisteinin metiyonine remetilasyonunda bir karbon alıcı bulunan 5-metil-THF' nin sentezlenmesinde görev alır. Bu remetilasyon reaksiyonu MTR enzimi sayesinde gerçekleşir. MTR enzimi metiyonin döngüsünde anahtar bir enzimdir, kobalamin bağımlı bir reaksiyon olan homosisteinin metiyonine transmetilasyonu reaksiyonunu, metil-THF'yi metil grubu alıcısı olarak kullanarak gerçekleştirir. MTR bir metil grubunu 5 metil-THF'den Homosisteine metiyonin ve tetrahidrofolat oluşturmak üzere transfer eder. Kobalamin bu reaksiyonda kofaktör olarak görev yapar. Metiyonin sentaz redüktaz (MTRR) ise MTR'nin aktif olmasını sağlar. Metiyonin, metiyonin adenozil transferaz (MAT) tarafından katalizlenen reaksiyonda SAM' ın oluşumunda gerekli bir aminoasittir. Bu şekilde oluşturulan SAM'ın çoğu, S-adenozil homosisteine (SAH) dönüştürülerek transmetilasyon reaksiyonlarında kullanılır. SAH metil grubunu DNA gibi çeşitli biyolojik akseptörlere transfer eder, bu reaksiyonlar metiltransferaz tarafından katalizlenir. SAH daha sonra SAH hidrolaz tarafından

homosistein ve adenezine dönüştürülür. Böylece homosistein MTR aracılığıyla metiyonine dönüştürülebilir. Alternatif olarak homosistein serinle kondense olur ve sistatyonin formunu alır, vitamin B6'nın kofaktör olarak kullanıldığı bu reaksiyon sistatyonin b- sentaz (CBS ) tarafından katalizlenir. Sistatyonin ise daha sonra bir antioksidan olan glutatyonun (GSH) yapımında kullanılmaktadır. SAM allosterik olarak CBS aktivitesinin düzenlenmesinde kullanılır. MTR etanole maruz kaldığında metil grubu betainden homosisteine metiyonin oluşturmak üzere transfer edilir ve bu reaksiyon betain-homosistein metiltransferaz tarafından katalizlenir (109).

DNA metilasyonunda MTHFR' nin substratı olan 5,10-MTHF, moleküler ihtiyaçlara bağlı olarak DNA sentezinde kullanılır. Timidilat sentaz (TYMS) deoksi üridin monofosfat (dUMP) ve 5,10-MTHF' yi deoksi timin monofosfat (dTMP) ve dihidrofolata (DHF) dönüştürür (şekil 1.1). Metilentetrahidrofolat dehidrogenaz (MTHFD1) üçlü fonksiyona sahip bir enzimdir ve tetrahidrofolat pürin, metiyonin ve timidilat dönüşümünü katalizler. Enzimin bu 3 fonksiyonu, 5,10-MTHF dehidrogenaz, 5,10-metilen tetrahidrofolat siklohidrolaz ve 10 formil tetrahidrofolat sentetaz olarak görev yapmak ve sıralı olarak bir dizi reaksiyonu katalizlemek şeklindedir. Birinci reaksiyon 10-formil tetrahidrofolat sentetaz aktivitesi sayesinde gerçekleştirilir, 10-formil tetrahidrofolat, fosforibozil glisinamid transformilaz (GART) enzimi tarafından pürinlerin yapımında kullanılabilir (110). Özetle folat metabolizması birkaç enzime ihtiyaç duyar ve burada görevli kofaktörler hücrel metabolik ihtiyaçları karşılarlar (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. İnsan folat metabolik yolağı (67).

**Enzimler:** CBS: Sistatyonin b-sentaz; GART: Fosforibozilglisinamid transformilaz; MTHFD1: Metilentetrahydrofolat dehidrogenaz; MAT: Metiyonin adenoziltransferaz; MTHFR: Metilentetrahydrofolat redüktaz; MTR: Metiyonin sentaz; MTRR: Metiyonin sentaz redüktaz; RFC1: Reduced folate carrier; TC: Transkobalamin; TYMS: Timidilat sentaz.

**Metabolitler:** DHF: Dihidrofolat; GSH: Glutatyon; THF: Tetrahydrofolat; dTMP: Deoksitimidin monofosfat; dUMP: Deoksiüridin monofosfat; SAH: S-adenozil homosistein; SAM: S-adenozil metiyonin. **Kofaktörler:** B12: Vitamin B12 veya kobalamin.

### 2.4.3. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) ve Down Sendromu Riski

MTHFR aktivitesini azalttığı bilinen iki adet polimorfizm bulunmaktadır. Bunlardan birincisi MTHFR 677C>T (Ala222Val) ve MTHFR 1298A>C (Glu429Ala)' dir (111). Çeşitli çalışmalarda MTHFR 677T allelinin artmış total plazma Hcy ve azalmış serum folat seviyeleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (114,115). MTHFR 1298A>C polimorfizminin enzim aktivitesi üzerine etkisi 677C>T polimorfizminin etkisinden daha azdır.

Birçok çalışmada farklı MTHFR 1298 A>C genotiplerini taşıyan bireylerde total Hcy veya serum folat seviyelerinde farklılıklar tespit edilmiştir (112). Bu iki polimorfizmin insanlarda MTHFR enzimi üzerine etkisi geçtiğimiz yıllarda ortaya konmuştur (112, 113). Yamada ve arkadaşları MTHFR enziminin insanlarda dimerler halinde bulunduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu modele göre monomerler birleşmektedirler ve katalitik enzim dimeri oluşturmaktadırlar. Dimeri oluşturan katalitik domain 222. pozisyonda diğer düzenleyici domain ise 429. pozisyonda bulunmaktadır. Bu modele göre monomerler birbirine bağlanmakta ve katalitik enzim formunu oluşturmaktadırlar (116). Katalitik domain flavin adenozin dinükleotid (FAD) kofaktörüne ve folata bağlanır. Düzenleyici domain ise SAM' a bağlanırken, düzenleyici domain ve katalitik domainin alt birimi arasında allosterik bir etkileşim olur. Araştırmacılar, sıcaklık etkisiyle dimer yapısının bozulduğunu ve enzim aktivitesinin sona erdiğini gözlemlemişlerdir. Fakat yeniden fizyolojik folat, FAD ve SAM seviyeleriyle muamele edildiğinde enzimin stabilize olduğu tespit edilmiştir (116).

### 2.4.4. MTHFR 677C>T polimorfizmi ve Down Sendromu Riski

1999 da anormal folat ve metil metabolizmasının DNA hipometilasyonuna ve anormal kromozomal segregasyona neden olabileceği kanıtına dayanarak James ve arkadaşları MTHFR 677C>T polimorfizminin genç annelerde maternal mayotik nondisjunctiona neden olabileceği ve DS için bir risk faktörü oluşturabileceği hipotezini ortaya atmışlardır. Elli yedi DSA ve elli kontrol annesinde yaptıkları çalışmada DSA' larda önemli miktarda artmış plazma Hcy konsantrasyonu ve lenfosit metotreksat sitotoksitesi tespit etmişlerdir ki bu da anormal folat ve metil metabolizmasının birbiriyle ilişkili olduğunu



göstermektedir. Bununla birlikte MTHFR 677 T allelinin 2,6 kat fazla DS' li çocuk riski ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada DSA' da folat metabolizmasının anormal olduğunu ve bunun MTHFR genindeki bir mutasyona bağlı olarak meydana geldiği gösterilmiştir (15). Geçtiğimiz on yıl içerisinde yapılan birçok çeşitli çalışma folat ve metil metabolizmasının DS riskindeki rolünü açıklamak amacıyla yapılmıştır. Bu çalışmaların hemen hemen hepsinde MTHFR 677C>T polimorfizmi araştırılmıştır (12-36) (Tablo 5.1).

MTHFR 677C > T polimorfizmi Amerika, Kanada, Mısır ve Çin popülasyonlarında DS' li çocuklar için bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilmiştir (12, 15, 21, 31, 32). Benzer sonuçlar Brezilya (14, 16, 17, 18, 37) ve Hindistan' da da (25, 29, 33) saptanmıştır. Avrupada yapılan çeşitli çalışmalarda (13, 19, 20, 22-24, 28, 30-36), Türkiye ve Japonyada ki çalışmalarda (26, 27) bu polimorfizm bağımsız bir risk faktörü olarak bulunmamıştır. Sonuçlardaki bu farklılıkların nedeninin, allel frekanslarındaki farklılıklar, farklı olgu kontrol grup çalışmaları ya da çevresel faktörlerin etkisinden kaynaklanıyor olabileceği vurgulanmıştır (10).

Akdeniz ülkelerinde yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre sadece Mısır dışında MTHFR 677T alleli DS için bağımsız bir risk faktörü olarak görülmemiştir. Akdeniz diyetine bağlı olarak daha fazla folat açısından zengin besinler tüketilmesinin MTHFR 677T alleli için ters bir etki yaptığı düşünülmektedir (13, 20, 28). Bununla birlikte Meguid ve arkadaşlarının Mısırdaki yaptığı çalışmada MTHFR genotipi ve folat alımı arasında önemli bir ilişki ortaya konmuştur (32).

Gen-gen ilişkileri araştırılan çalışmalarda; Hcy metabolizmasında görev alan MTHFR enziminin 677T ve 1298C allellerinin ayrıca hücre içine folat taşınmasında görev alan RFC1, metiyonin sentaz (MTR) (35) ve metiyonin sentaz redüktazdaki (MTRR) mutasyonların DS için bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte ayrıca 3 veya daha fazla polimorfizm varlığında DS riskinin arttığı saptanmıştır (35). Sonuçlar MTHFR 677T allelinin tek başına DS için riski arttırmaya yetmediğini göstermektedir. MTHFR 677T alleli, düşük

folat alımı ve aynı metabolik yolda bulunan diğer polimorfizmler ile kombine edildiğinde DS için bir risk faktörü oluşturmaktadır (10).

#### **2.4.5. MTHFR 1298A > C polimorfizmi ve Down Sendromu Riski**

Down sendromu için bir risk faktörü oluşturması açısından MTHFR 1298A > C polimorfizmi, 677C > T polimorfizmine göre daha az çalışılmıştır (Tablo 5.1). MTHFR 1298A alleli ve DS arasındaki ilişki ilk olarak 2002 yılında Brezilya popülasyonunda yapılan çalışma sonucunda ortaya atılmıştır (16). Bazı araştırmalarda artmış DS riski ile MTHFR 1298A > C ve 677C > T polimorfizmlerinin ilişkili olduğunu tespit edilmiştir (16-18, 23-28). Benzer sonuçlar Hindistan (29) ve Güney İtalya' da da (19) saptanmıştır, ayrıca iki varyantında beraberliği DS için bir risk faktörü oluşturduğuna dair veriler Mısırda yapılan çalışmada da gösterilmiştir. Brezilyada yapılan beş çalışmadan dördünde, MTHFR 1298C varyantı ve folat metabolizmasında rol oynayan diğer genlerdeki polimorfizmlerin beraberliğinin artmış DS riski oluşturduğu gösterilmiştir (14, 16, 17, 18, 37).

#### **2.4.6. Gebelikte Anne Yaşı ve Down Sendromu Riski: Folat Metabolizmasıyla İlişkisi**

Gebelikte ilerlemiş anne yaşı trizomi 21 için major risk oluşturmaktadır. Otuz beş yaş sonrası DS hamileliği riski, yaşın arttığı oranda artmaktadır (117). Bununla birlikte DS sebebi olarak mayotik nondisjunction görülüyor olsa dahi hala mekanizma hakkında birçok bilinmeyen vardır. Trizomi 21 çalışmalarında, mayoz I ve II' de görülen maternal nondisjunction sonucu oluşan farklı rekombinasyon seviyeleri tespit edilmiştir. Bundan dolayı, ilerlemiş anne yaşı ve genetik rekombinasyonun yeri kromozom 21 ayrılama durumu için iki önemli risk faktörüdür (118, 119).

Maternal yaş ve değişmiş kromozom 21 rekombinasyon paternleri arasında ilişki olup olmadığını belirlemek için Lamb ve arkadaşları 21. kromozomu maternal mayoz I orijinli olan 400 hastayı maternal yaşa göre gruplamışlar. Bu çalışma ile kromozom 21 nondisjunctionu olan yaşlı bir annede

ilerlemiş yaşa bağlı olan mayotik mekanizmanın daha çok hataya yatkın olması sonucunda oositlerin yanlış segregasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık genç annelerde eksik veya değişmiş rekombinasyon yeri (sentrome ya da telomere yakın) sonucu meydana gelen kromozom 21 nondisjunctionu saptanmıştır (7).

Mayoz II hatalarını incelemek amacıyla yapılmış diğer bir çalışmada ise 21q perisentromerik bölgesi değişiminin anne yaşı ile ilgili risk faktörü oluşturduğu saptanmıştır. Buna zıt olarak maternal mayoz I' deki hataların analizi nondisjunction için aynı riski oluşturmaktadır, fakat burada oositin yaşında bağımsız bir durum söz konusu bulunmuştur (8). Sentromerik DNA kromatini, spesifik sentromerik metilasyon paternlerinin epigenetik kalıtımıyla ve spesifik metil duyarlı proteinlerin kinetikor oluşumunun sağlanması için düzgün DNA yapısının devam ettirilmesi sayesinde stabilitesini koruduğu düşünülmüştür (120). Bu yüzden DNA metilasyonundaki bir hatanın mayotik nondisjunction için potansiyel bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (15). Perisentromik hipometilasyon hipotezinde açıklanan bozulmuş folat/hcy metabolizması sonucu meydana gelen kinetikor anormallikleri yüzünden bozulmuş kromozom segregasyonu gözlenmektedir (15). Çeşitli çalışmalarda folat yetersizliği ve insan anöploidileri ile bağlantılı bulunmuş, ayrıca özel olarak, kültüre edilmiş insan lenfositlerinde folat yetersizliğinin kromozom 17 ve kromozom 21 anöploidileri görülmesinin arttığı (121) ve diyetdeki azalmış folat miktarının spermlerde görülen anöploidi (özellikle kromozom 21) dizomisi sıklığı arttığı gözlenmiştir (11).

İlginç olarak, Waterland ve Jirtle gestasyon aşamasında maternal metil alıcısı ilavesinin daha sonraki kuşağın fenotipini, epigenomu metilleyerek değiştirdiğini göstermişlerdir. Bundan dolayı büyük olasılıkla büyükannenin gebeliği sırasında azalmış folat alımının veya folat metabolik yolağındaki bozuklukların kromozom rekombinasyon bölgelerini ve perisentromerik bölgelerini içeren bazı kromozom bölgelerinde metilasyon paternini değiştirebilmesi ve böylece anöploidili gamet formasyonunda bir artışın söz konusu olabileceği belirtilmektedir (122).

Primordial germ hücrelerinin CpG adalarındaki DNA metilasyonu, bir organizmanın hayatı boyunca bazı genleri imprinte etmesi sayesinde onların monoalelik ekspresyon göstermelerini sağlar örneğin dişilerde bir X kromozomunun inaktivasyonu gibi, ayrıca bu durum retrotranspozonlarında inaktif durumda kalmalarını da sağlamaktadır. Bunun yanında son çalışmalarındaki kanıtlar DNA metilasyonunun rekombinasyonu baskılayıcı bir rolü olduğunu göstermektedir (123). Crossing over bilindiği gibi mayoz ve seleksiyonun gelişmesi açısından oldukça önemlidir. Crossing over rastgele değildir, spesifik ve de özel hot spot bölgelerde meydana gelir. Bu hotspot bölgeler, bireyden bireye ve popülasyonlara göre farklılık gösterir. DNA metilasyonunun crossing over oluşumunu engellediği gösterilmiştir bu da memelilerdeki CG miktarı ve rekombinasyon oranının korelasyon göstermesi ile açıklanabilir (123). Böylece folat/hcy metabolizmasındaki bozukluk sonucu değişmiş DNA metilasyon paterni mayozda hatalı kromozom 21 rekombinasyonu meydana getirebilir ve artmış down sendromu riski oluşturabilir. Ayrıca genç ve yaşlı kadınlarda farklı mekanizmalar kromozom 21 nondisjunctionuna neden oluyorsa folat metabolizmasında görevli genlerdeki polimorfizmlerin etkisi de yaş gruplarına göre farklı olabilir (19, 29, 125). DS riski ile maternal yaş bağlantısı konusunda yapılan çalışmalarda tutarsızlık bu nedenle olabilir.

Hulten ve arkadaşları maternal ovaryum 21. kromozom trizomi mozaizmini DS'li gebeliğe neden olabilen başka bir faktör olarak göstermişlerdir. Bu araştırmacılar FISH yöntemiyle 14 - 22 haftalık sekiz dişi fetüste 21. kromozoma özgü prob kullanarak yumurta hücrelerinde 21. kromozomun kopya sayılarını incelemişler. Sekiz fenotipik olarak normal dişi fetüsün hepsinde ovaryum hücrelerinin mozaik olarak ekstra kromozom 21 taşıdığını belirlemişlerdir. Trizomi 21, premayotik ve ovaryum mezenkimal stroma hücrelerinde mayoza giren hücrelerdeki gibi aynı sıklıkta meydana gelmiştir. Bu yüzden araştırmacılar kromozom 21'den iki kopya taşıyan trizomik 21 hücrelerinin ovaryumun premayotik hücrelerinden köken aldığını düşünmüşlerdir (109).

Hulte'n ve arkadaşları ayrıca maternal yaş etkisinin ovulasyona kadar fetal ve postnatal gelişim sürecinde bu hücrelerin farklı bir seçilimine neden olduğunu ve yüksek derecede ovaryum mozaisizminin bazı kadınların henüz genç yaşta olmalarına rağmen neden DS 'li çocukları olduğunu ve sonraki gebeliklerdeki artmış insidanslarını açıklayabileceğini öne sürmektedirler (9). Son zamanlarda yapılan retrospektif bir analizde 151 DS' li bebek sahibi ailenin 8' inde gonadal mozaisizm taşıyıcılığı saptanmıştır. Taşıyıcılık saptanan ailelerin tümünde anne yaşının 35'in altında olduğu tespit edilmiş ve genç çiftlerde parental mozaisizm prevalansı yaklaşık olarak % 6,5 olarak saptanmıştır (126). Diğer bir çalışmada Hulte'n ve arkadaşlarının bulgularına paralel olarak 35 yaş öncesi doğum yapmış DSA' ların periferik lenfositlerinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 13 ve 21. kromozomun her ikisinde segregasyon bozukluklarının sıklığında önemli bir artış gözlenmiştir (127). Bu bulgular somatik hücrelerde de meydana gelen nondisjunction olaylarının mayotik ve mitotik işlemlerde anormal kromozomal segregasyona yatkınlığın nedeni olabileceğini göstermektedir (127). Son çalışmalar da DSA' larda kan hücrelerinde MTHFR 677C>T ve 1298 A>C polimorfizmleri ve kromozomal hasarlar arasında bağlantı gözlenmiş, genç yaşta DS' li çocuk sahibi olan annelerde folat metabolizmasının anormal kromozomal segregasyon için artmış bir yatkınlık oluşturduğu tespit edilmiştir (35, 38). Özet olarak, insanda nondisjunction multifaktöriyel tehdit oluşturmaktadır. Bu tehdit parçalarına ayrılarak bağlantılı risk faktörleri belirlenmelidir.

## **2.5. Down sendromu ile ilişkili diğer genler**

### **2.5.1. Metiyonin Sentaz-Metiyonin Sentaz Redüktaz (MTR-MTRR) Kompleksi**

Metiyonin sentaz enzimi homosisteinin metiyonine transmetilasyonunu katalizler. İnsan MTR enzimi amino ucundan karboksil ucuna bağlanan 4 farklı fonksiyonel modül içermektedir. Bunlar sırasıyla hcy, 5- metil THF, kobalamin ve SAM'dır. Karboksil terminal aktivasyon domaini ayrıca MTRR ile

etkileşmektedir (128). NADPH bağımlı olan MTRR enzimi kobalamin bağımlı MTR enziminin aktivasyonunun azaltılması için gereklidir (129). MTR geninde sıklıkla görülen bir polimorfizm olan MTR 2756 A>G (Asp919Gly) geniş ölçekli populasyon çalışmalarında incelenmiştir ve hcy seviyelerine etkisi olabileceği düşünülmektedir (130). Ancak yapılan çalışmalarda tutarsız sonuçlardan dolayı bu polimorfizmin hcy seviyelerine etkisi olup olmadığı henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Bu polimorfizmin folat yolağındaki diğer genlerin genotipleri ile kombine edildiğinde ve üstüne çevresel faktörler de eklendiğinde etkisinin bireyler arasında farklılık gösterdiği ileri sürülmektedir (131). Ayrıca MTR A2756G polimorfizmi DS' lilerde artmış homosistein konsantrasyonlarıyla ilişkilendirilmektedir. MTRR geninde MTRR 66 A>G (Ile22Met) polimorfizmi sık gözlenen ve üzerinde fazla çalışılmış diğer bir polimorfizmdir. Bu polimorfizmin serum homosistein seviyesine etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu konuda yapılan geniş kapsamlı populasyon çalışmalarında bu polimorfizmin homosistein seviyesine etkisinde bağımsız bir rolü olmadığını gözlenmesiyle MTHFR polimorfizmi ile beraberliğinde homosistein seviyesinde etkili olabileceği düşünülmüştür (130,132).

### **2.5.2. Folat taşıyıcıları (RFC1 veya SLC19A1) ve Down Sendromu riski**

Memelilerin hücre ve dokularında kandan hücreye folatı taşıyan en önemli transport molekülleri azaltılmış folat taşıyıcılarıdır (RFC) (133). Ayrıca folat taşıyıcılarının folatın bağırsaktan emilimi, kan beyin bariyerini geçişi ve bazolateral membrandan renal tüplere transportlarında önemli görevleri vardır.

RFC1 gen polimorfizimleri ile ilgili ilk çalışma 2000 yılında Chango ve arkadaşları (25) tarafından yapılmış 80G>A dönüşümü yüksek frekansta gözlenmiştir. Araştırmalarda homozigot RFC1 80GG/ MTHFR 677TT genotipli bireylerde serum homosistein seviyelerinde RFC1 80GG/MTHFR 677CC genotipli bireylerle kıyasladığında az da olsa belirli bir artış tespit edilmiştir. Buna ek olarak RFC1 80AA/ MTHFR 677CT genotipli bireylerde plasma folat

düzeyi RFC1 80GG/MTHFR 677CT genotiplerine kıyaslandığında daha yüksek bulunmuştur. Diğer çalışmalarla bu sonuçlar arasında tutarsızlık bulunduğundan RFC1 80GG/ MTHFR 677CT polimorfizminin plazma folat ve homosistein seviyelerindeki etkisi hala tartışmalıdır (10).

### 2.5.3. Sistatyonin b- Sentaz (CBS)

Sistatyonin beta-sentaz homosistein kondensasyonunda ve serinin sistatyonine dönüşümde görevli bir hemoproteindir. İnsan CBS proteini açıkça ayırılabilen üç modülden oluşmuştur. Bunlar heme domaini, katalitik çekirdek domaini ve düzenleyici domain olan C terminal domainidir. Bu enzim tam yapısıyla tetramer formunda bulunmaktadır. CBS aktivitesinin eksikliğinde hiperhomosisteinemi ve CBS aktivitesinde bir eksiliğe neden olur ve bu da homosistinüri adı verilen bir hastalığa neden olur. CBS geninde birçok missense, nonsense, insersiyon, delesyon, splice bölgesi mutasyonları olmak üzere çok sayıda mutasyon tanımlanmıştır (10).

CBS yetersizliğine bağlı bir homosistinüri hastasında ilk olarak 844ins68 insersiyonu rapor edilmiştir. Ancak daha sonra yapılan çalışmalar bu insersiyonun populasyonda belli bir frekansta gözlenen ve hastalığa neden olmayan bir polimorfizm olduğunu göstermiştir.

Çeşitli çalışmalarda CBS 844ins68 polimorfizminin tek başına homosistein seviyelerinde bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (73,74). Ancak CBS 844ins68 insersiyonunun, MTHFR 677 C>T, MTHFR 1298 A>C ve MTR 2756 A>G polimorfizmleri ile kombine değerlendirildiğinde homosistein seviyelerine etkisi olabileceği düşünülmektedir (27, 28). Yapılan çalışmaların hiç biri CBS 844ins68 ve DS riski arasındaki bağlantıyı araştırma amaçlı yapılmamış. Sadece Silva ve arkadaşları MTHFR 677T, MTHFR 1298C, MTR 2756G, MTRR 66G ve CBS 844ins68 mutant alellerin birlikte değerlendirildiğinde DSA' ya yatkınlığa neden olabilecekleri ve down sendromu riski üzerine poligenik olarak etkili olabilecekleri sonucuna varılmıştır (17).

#### 2.5.4. Timidilat sentaz (TYMS) ve Down Sendromu riski

Folatlar nükleotidlerin de novo sentezi için gereklidirler. Metilasyon yolağında 5,10-MTHF, MTHFR tarafından redüklenir. Bu görevinin yanında ayrıca pirimidinlerin de novo sentezinde, timidilat sentaz tarafından MTHFR, deoksiüridin monofosfatın (dUMP) deoksitimin monofosfata (dTMP) dönüşümünde görev alır. Böylece MTHFR enzimi ile ilgili polimorfizmler 5,10-Metil THF üzerinden DNA metilasyonunu etkilediği gibi TYMS genindeki polimorfizmlerde aynı etkiyi gösterebilmektedir. TYMS geninin promotöründe bilinen iki polimorfizmin TYMS mRNA ekspresyonu ve stabilitesini etkilediği gözlenmiştir (134, 135). MTHFR ve TYMS genlerindeki polimorfizmlerin kombinasyonları sonucu enzim aktivitesinin bozulması sonucu DNA metilasyonunda bozukluklar ve bunun etkisiyle kromozom segregasyonu ve sonuç olarak DS riski oluşturduğu düşünülmektedir (35).

#### 2.5.5. Metilentetrahidrofolat dehidrogenaz (MTHFD1)

Metilentetrahidrofolat dehidrogenaz üç fonksiyonlu bir enzim olup tetrahidrofolatların pürine çevrilmesinde ayrıca metiyonin ve timidilat sentezinde görev alır. Sık gözlenen MTHFD1 1958 G>A polimorfizmi (Arg653Gln) enzimin aktivitesini ve stabilitesini azaltmakta ve bu da nöral tüp defekti, konjenital kalp defektleri ve açıklanamayan ikinci trimester gebelik kaybı gibi birçok hastalık ile ilişkili bulunmuştur (136-137).

Scala ve arkadaşları MTHFD 1958 G>A polimorfizmini DS' li çocuk sahibi olma açısından maternal risk faktörü olarak değerlendirmişler ve kombine MTHFD1 1958 AA/ RFC1 80 GG genotipleri ile DS' li çocuk sahibi olma riski arasında pozitif ilişki bulmuşlardır (19).

#### 2.5.6. Transkobalamin (TC)

Vitamin B12 metil kobalamin formunda iken, metiyonin sentaz için koenzim olarak rol oynar ve hcy' nin metiyonine remetilasyonunda görevlidir. Vitamin B12 iki plazma proteini olan transkobalamin veya haptocorrine bağlanır. Transkobalamin vitamin B12'nin hücre içine alınması için gerekli olan bir transport proteinidir. Spesifik membran reseptörleri transkobalamin-Vitamin B12 kompleksini tanır ve bu şekilde vitamin B12 hücre içine alınır (138, 139).



Sık görülen TC 776 C>G polimorfizmi prolinin arjinine değişimi sonucu vitamin B12 metabolizmasını negatif olarak etkilemektedir böylece plazma hcy seviyeleri artmaktadır (140). Biselli ve arkadaşları 67 Brezilyalı DSA'da TC 776 C>G polimorfizmi ile maternal DS riski arasında ilişki tespit etmemişlerdir (34).

### **2.5.7. Folat /homosistein metabolizmasında görevli kromozom 21' de lokalize diğer genler**

RFC1 ve CBS ile beraber folat/homosistein metabolizmasında görevli diğer genler kromozom 21'de lokalizedirler. DS'li fetüslerde bu genlerin overekspresyonu karbon metabolitlerine olan ihtiyacı arttırır ve bu durum hamilelik esnasında maternal nutrisyonu ve fetal genotipi etkiler. Kromozom 21 üstünde folat/hcy metabolizmasında görev yapan fosforibozilglisinamid transformilaz (GART), formiminotetrahidrofolat siklodeaminaz (FCTD), metil transferazlar veya metil transferaz benzeri proteinleri kodlayan diğer genler protein arjinin N-metiltransferazlar (HRMT1L1, PRMT2), DNA metil transferaz 3- like (DNMT3L) ve aday metiltransferazlar (NAMT1, PRED28) bulunmaktadır. Bu genlerin DS riski ile olası bağlantıları henüz aydınlatılmayı beklemektedir (141, 10).

## **2.6. MTHFR Gen Polimorfizm Ölçüm Yöntemi**

MTHFR gen polimorfizmlerinin belirlenmesinde, diğer polimorfizmlerin belirlenmesinde olduğu gibi, çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. MTHFR gen polimorfizmlerinin analiz edilmesinde ilk defa uygulanan ve hala günümüzde yaygın olarak kullanılmakta olan polimeraz zincir reaksiyonu/ restriksiyon enzimi uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemidir. Günümüzde bu yöntemin yanı sıra light cycler (LC) gibi gerçek zamanlı PCR (realtime-PCR) cihazları ve floresan boyalarla işaretili hibridizasyon problemlerinin geliştirilmesi ile floresan rezonans enerji transferi (FRET) yöntemleri de kullanılmaktadır (142).

### 2.6.1. Genetik Polimorfizm Kavramı

Dünyadaki birçok bireyin kromozomlarında aynı yerde bulunan DNA dizileri birbirine benzerlik gösterir. Populasyonda iki farklı birey arasında DNA'nın yaklaşık 1000 bç uzunluğundaki herhangi bir kısmı ortalama sadece bir baz çifti değişimi içerir. Bir genin belli bir lokusta yer alan alternatif kopyalarından her birine allel denir. Allellerin genel populasyonda kromozomlarda %1'den fazla bulunması genetik polimorfizm olarak tanımlanmaktadır. İntronlarda ve genler arasında lokalize olmuş DNA dizilerinde değişim gösteren bazı alleller vardır. Kodlanan dizi farklılıkları protein çeşitliliğine ve farklı fenotiplerin ortaya çıkmasına sebep olurlar. Genetik hastalığa sebep olan zararlı mutasyonların birçoğu nadir değişimlerdir. Ağır hastalığa neden olan mutant alleller genetik çeşitliliğin bir sonucudur. Birçok proteinin, farklı populasyonlarda nispeten yaygın ve ayrılabilen şekillerde olduğu tespit edilmiştir (142).

### 2.6.2. Restriksiyon Fragmentinin Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP)

Restriksiyon enzimleri DNA'daki dizileri özgül olarak tanır ve sonuç olarak genomik DNA'da dizi değişiklikleri, belirli kesim bölgeleri yaratır veya onları yok eder. Bu nedenden dolayı boyutları değişen bir veya birden fazla DNA fragmenti southern blot ve klonlanmış DNA probu ile hibridizasyondan sonra görünür hale gelir. 1970'lerin sonunda genom analizi için southern blot tekniğinin uygulanmasından kısa bir süre sonra restriksiyon enzim bölgelerinin dağılımının bütün insanlarda tam olarak aynı olmadığı keşfedilmiştir. Her ne kadar bazı nükleotid değişikliklerinin varlığı mutasyon ve protein polimorfizmleri hakkındaki bilgiler vasıtası ile saptanabiliyorsa da, southern blot tekniğiyle belirlenen değişimin derecesi bir sürpriz olarak ortaya çıkmıştır. Southern blot ile belirlenen enzim kesim yerlerindeki DNA değişimleri, Restriksiyon Fragmentinin Uzunluk Polimorfizmleri (RFLPs) olarak adlandırılır (142).

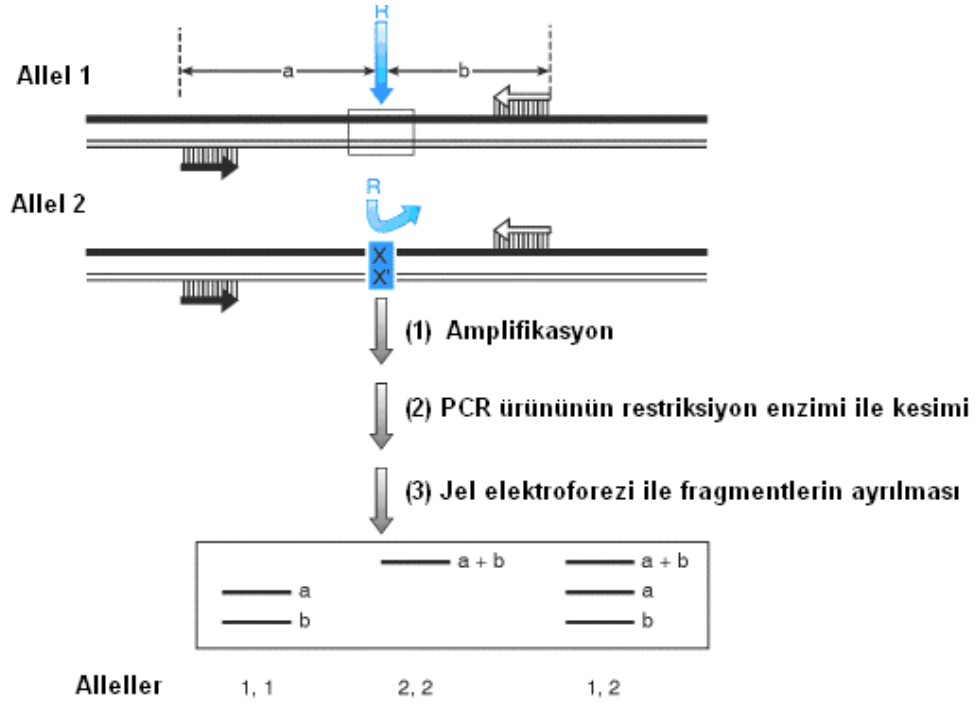
Belirli restriksiyon endonükleaz kesilme bölgelerindeki değişimlerden oluşan RFLP'ler, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP, Single Nucleotide

Polymorphism) olarak bilinirler. Tek nükleotid polimorfizmleri genetik haritalar için belirleyici olarak kullanılabilir. Kompleks hastalıklardan sorumlu belirli genlerin kalıtımını incelemek için tek nükleotid polimorfizmlerine gerek vardır. DNA sarmalı özgül restriksiyon enzimleri ile kesildiği zaman farklı uzunluklarda fragmentler oluşur ve bu fragmentler elektroforetik davranışlarındaki farklılıklar ile jel elektroforezinde gözlenebilirler (142).

### 2.6.3. Polimorfik Markırların Genotiplemesinde PCR'ın Kullanımı

Tek nükleotid polimorfizmleri Southern blot ile ortaya konabildiği gibi, polimeraz zincir reaksiyonunun ardından restriksiyon enzim kesim yöntemi kullanılarak da belirlenebilir (Şekil 1.2 ). Bunun için önce polimorfik bölgeyi içine alan primerler kullanılarak PCR aracılığıyla bu polimorfik bölge çoğaltılır. Uygun restriksiyon enzimi ile PCR ürününün kesiminin ardından elde edilen fragmentler agaroz jel elektroforezinde yürütülür ve analiz edilir (143).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), herhangi bir DNA örneğinde istenen bölgenin çoğaltılmasını sağlayan hızlı bir in vitro yöntemdir. PCR elde bulunan DNA örneklerinde seçici olarak istenen bölgenin çoğaltılmasını sağladığı için, çoğaltılacak bölge hakkında önceden bilgi sahibi olunmasını gerektirmektedir. Bu bilgi istenen bölgeyi çoğaltmak için gereken, 15-25 nükleotid arasında değişen uzunluklarda bir çift primerin belirlenebilmesi için şarttır. Denatüre edilen kalıp DNA içerisine primerler eklendikten sonra bu primerler tamamlayıcı dizilerine bağlanırlar. Uygun bir polimeraz enzimini ve dört çeşit deoksिनükleozid trifosfattan (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) yeterli miktarda bulunması halinde, primerler hedef DNA'nın komplementlerinin sentezlenmesini sağlarlar (143).



**Şekil 2.2.** Polimorfik markırların genotiplenmesinde PCR'ın kullanımı (143).

PCR, bir zincir reaksiyonudur çünkü yeni sentezlenen DNA dalları, ardışık döngülerde sentezlenecek diğer DNA'lar için kalıp görevi yapmaktadırlar. Isı ile bozulmayan polimeraz enzimlerinin kullanımı gerekmektedir çünkü PCR ısı değişimlerine dayanan üç temel basamaktan oluşmaktadır:

- i. Denatürasyon: Yaklaşık 93-95 °C'de gerçekleşir. DNA tek dal haline gelmektedir.
- ii. Bağlanma: 50-70 °C arasında gerçekleşen ve primerlerin hedef DNA'ya bağlanmasının gerçekleştiği basamaktır.
- iii. Uzama : 70-75 °C arasında gerçekleşir ve yeni DNA dallarının elde edildiği aşamadır (156).

### 3.GEREÇ ve YÖNTEMLER

### 3.1. Araştırma Grubu Bireyleri

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına başvuran klinik olarak Down sendromu tanısı alan ve sitogenetik olarak regüler trizomi 21 saptanmış DS'li çocuk sahibi olan 120 anne ve en az 1 sağlıklı çocuğu olan hiç abortus yapmamış 90 gönüllü anne ile gerçekleştirilmiştir. DS varlığının teyidinin eksikliği, çocuklarında herhangi bir tek gen hastalığı olması, sitogenetik olarak saptanmış yapısal kromozomal anomali veya ek sendrom veya malformasyon varlığı bilinenler ile herhangi bir kronik hastalığı olan anneler çalışmaya dahil edilmemiştir.

DSA ve kontrol grubu anneleri, bilgilendirilmiş onam formu imzalatıldıktan sonra çalışmaya alınmıştır. Çalışma grubuna demografik özellikler, gebelikte koruyucu veya risk oluşturabilecek faktörler ve DS'li çocuklarında major anomali varlığı ile ilişkili soruları içeren standardize bilgi formları uygulanmıştır.

Prenatal dönemde konsepsiyon öncesi veya postnatal dönemde folik asit kullanmış alan anneler “folik asit kullanıcı”, gebeliğinde folik asit almayan veya irregüler kullananlar ise “folik asit kullanmayanlar” şeklinde değerlendirildi. Sigara kullanımı gebelikte içmiş olan bireylerde pozitif kabul edilmiştir. İki grup maternal etnisite ve sosyoekonomik özgeçmiş gibi iki önemli faktör açısından karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda amacımıza uygun olarak seçilmiş olan olgu ve kontrol grubu bireylerinden genetik analiz yapmak için EDTA'lı tüpe 2 ml venöz kan örneği alınmıştır.

### 3.2. Kullanılan Gereçler

### 3.2.1. Kullanılan Araçlar

1. PCR aleti (thermal cyclers) (PE GenAmp PCR System 9700)
2. Jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Gene Genius)
3. Elektroforez aleti (Consort E844)
4. Elektroforez için güç kaynağı (EKR)
5. Hassas terazi (Setra)
6. Pipet takımı (Gilson)
7. Mikrosantrifüj (Eppendorf)
8. Pastör pipeti
9. Su banyosu (Nüve)
10. Vorteks (Heidolph)
11. Mezür (100'lük 1000'lik)
12. Beher (250'lik, 500'lük)
13. Deep-freeze (Arçelik)
14. Mikrodalga fırın (Arçelik)
15. Buzdolabı (Arçelik)
16. Falkon tüpü (50'lik)
17. Ependorf Tüpü (1,5 ml'lik)
18. PCR tüpleri (strip) (Perkin Elmer)
19. Toplama tüpü (QIAGEN)
20. Spin kolonu (QIAGEN)
21. Mini soğutucu
22. Enjektörlük bidistile su
23. EDTA'lı tüp

### 3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

1. Ultra Pure agoroz (invitrogen)
2. dNTP seti (QIAGEN)
3. EDTA (dihidrat)
4. Etanol (95%)
5. Etidyum Bromid (Sigma E-1510)

6. Moleküler Weight Marker
7. Taq DNA polimeraz (Biotools, AppliedBiosystems)
8. Hinf I restriksiyon enzimi (Takara)
9. Mbo II restriksiyon enzimi (Takara)

### **Kullanılan çözeltiler**

#### **Agaroz jel elektroforezi çözeltileri**

%3' lük Ultra Pure Agaroz jel Hazırlanması: 9 gr ultra pure agaroz tartılıp bir beher içinde 1XTBE solüsyonu ile 300 ml ye tamamlanmış ve mikrodalga fırında %100'lük güçten %10'luk güce kadar kademeli olarak azaltılarak 5 dakika kaynatılmıştır.

20X TBE Stok Solüsyonunun Hazırlanması: 121 gr Tris (1 M), 61,7 gr borik asit (1 M) ve 7,44 gr EDTA (20 mM) tartılarak 1000 ml distile su içerisinde karıştırıcı yardımı ile çözündürülmüştür.

### **3.3. Yöntemler**

#### **3.3.1. Kan Örneklerinden DNA Elde Edilmesi**

Çalışma grubuna ait kan örnekleri, pıhtılaşmayı engellemek amacıyla EDTA'lı tüplere alındı ve DNA izolasyonu yapıncaya kadar +4°C'de saklandı. DNA örnekleri E.Z.N.A. DNA izolasyon kiti ile aşağıda verilen işlem basamakları uygulanarak izole edildi.

### E.Z.N.A. DNA izolasyon kitinin içeriği

SOLÜSYON	MİKTAR
HiBind DNA kolon	200 adet
2 ml Santrifüj Tüpleri	600 adet
Buffer BL	60 ml
Wash Buffer (Konsantre)	2 x 60 ml
HB Buffer	110 ml
Elution Buffer	100 ml
Proteaz enzimi	4 x 70 mg

### İşlem Basamakları:

1. Örneğin isim ve DNA numarası bilgileri steril ependorf tüpe ve takip listesine yazılarak kayıt altına alındı.
2. Her bir kan örneğinden 250 µl alınıp 1,5 ml' lik steril ependorf tüplere konuldu.
3. Üzerine 250 µl Buffer BL ve 25 µl Proteaz enzimi eklenip 15 sn vortekslendi.
4. Tüpler sıcak su banyosuna yerleştirildi ve oluşan lizat solüsyonu 55 °C' de 20 dakika inkübe edildi.
5. Sıcak su banyosundan alınan tüplere 260 µl etanol (%100) ilave edilip 15 sn vortekslendi.
6. Tüp içeriği 2 ml' lik santrifüj tüplerine yerleştirilmiş HiBind DNA spin kolona aktarıldı.
7. Tüpler 10000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Santrifüj tüpleri atıldı ve spin kolon yeni bir santrifüj tüpüne yerleştirildi.
9. Üzerine 500 µl HB Buffer eklendi.
10. Tüpler 10000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Santrifüj tüplerindeki sıvı döküldü, aynı tüp içine yerleştirilen spin kolon üzerine 650 µl Wash Buffer ilave edildi ve 10000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.



12. Santrifüj tüpleri atıldı ve spin kolonlar yeni santrifüj tüplerine yerleştirilip 650 µl Wash Buffer ilave edildi.
13. Tüpler 10000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.
14. Tüpler değiştirilmeden bir kez daha 10000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilerek artıkların tamamen spin kolondan ayrılması sağlandı.
15. Spin kolonlar 1,5 ml' lik steril tüplere yerleştirildi ve üzerine 100 µl 70°C' de bekleyen Elution Buffer eklendi.
16. Tüpler 70°C' de 5 dakika inkübe edildi.
17. Tüpler 10000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.
18. Tüpler değiştirilmeden 100 µl Elution Buffer eklendi ve 70°C' de 5 dakika inkübe edilip 10000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi.
19. Spin kolonlar atıldı ve son volümü 200 µl olan DNA örneği elde edildi.
20. İzolasyon sonrası elde edilen her örnek için DNA miktar ve saflık tayini spektrofotometre kullanılarak ölçüldü.
21. DNA örnekleri etiketlenerek -20°C' de saklandı.

### **3.3.2. MTHFR geni C677T ve A1298C Polimorfizmlerinin PCR-RFLP Yöntemiyle Belirlenmesi**

### 3.3.3. İzole edilen DNA Örneklerinin PCR ile amplifikasyonu

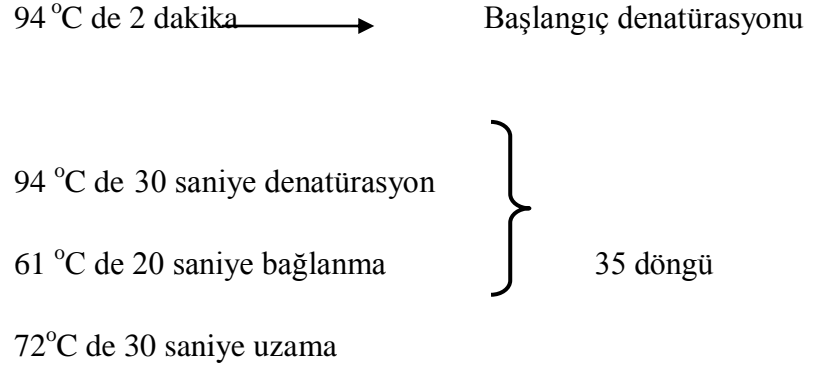
Hinf I enzimi ile kesim için MTHFR 677. baz çiftini içeren gen bölgesi amplifikasyon karışımı;

ddH <sub>2</sub> O	24.4 µl
10xPCR buffer	5 µl
dNTP mix	0.4 µl
primer F	4 µl
primer R	4 µl
Taq pol	0.2µl
DNA	7 µl
MgCl <sub>2</sub>	2.5 µl
	+
	-----
	50 µl

Mbo II enzimi ile kesim için MTHFR 1298. baz çiftini içeren gen bölgesi amplifikasyon karışımı;

ddH <sub>2</sub> O	31,8 µl
10xPCR buffer	5 µl
dNTP mix	1 µl
primer 1	1,5 µl
primer 2	1,5 µl
Taq pol	0,2 µl
DNA	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	4 µl
	+
	-----
	50 µl

### MTHFR geni için kullanılan amplifikasyon şartları



En sonunda 72°C de 5 dakika tutularak ürünün arttırılması sağlanmıştır.

### MTHFR Kullanılan primer dizileri

677. baz çiftini içeren bölge için kullanılan primer dizileri;

F: 5'- AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG- 3'

R: 5'- TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA- 3'

1298. baz çiftini içeren bölge için kullanılan primer dizileri;

F: 5'- CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA C- 3'

R: 5'- CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG- 3'

## PCR Ürünlerinin Elektroforezi

PCR işleminin ardından hedef DNA bölgesinin amplifikasyonunun doğru gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrol edilmesi için PCR ürünleri jelde yürütülür.

### 3.3.4. Amlifikasyon ürünlerinin restriksiyon endonükleazlarla kesimi

#### MTHFR Geni 677. Baz çiftini içeren bölgenin Hinf I enzimi ile kesimi

15 µl' lik PCR ürününe 2,5 µl enzim buffer, 0,5 µl enzim ve 7 µl ddH<sub>2</sub>O eklenmiş, 37 °C 16 saat inkübe edilerek kesim yapılmıştır.

Hinf I Digest Buffer	→ 2,5 µl	} 37 °C de 16 saat inkübasyon
Hinf I enzim	→ 0,5 µl	
ddH <sub>2</sub> O	→ 7 µl	
PCR ürünü	→ 15 µl	
+		
-----		
25 µl		

#### MTHFR Geni 1298. Baz çiftini içeren bölgenin Mbo II enzimi ile kesimi

20 µl'lik PCR ürününe 1 µl enzim buffer, 0,5 µl enzim ve 3,5 µl ddH<sub>2</sub>O eklenmiş, 37 °C 16 saat inkübe edilerek kesim yapılmıştır.

Mbo II Buffer	→ 1 µl	}	37 °C de 16 saat inkübasyon
Mbo II enzim	→ 0,5 µl		
ddH <sub>2</sub> O	→ 3,5 µl		
PCR ürünü	→ 20 µl		

+

-----  
25 1

### 3.3.5. Enzim kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile ayrılması

PCR örneklerinin Hinf I, Mbo II restriksiyon enzimleri ile kesimlerinden sonra oluşan ürünlerin incelenmesi için %3' lük ultra pure agaroz jeli hazırlanarak örnekler agaroz jel elektroforezi yöntemine tabi tutulmuştur. %3' lük agaroz jel için hazırlanan agaroz mikrodalga fırın kullanılarak yüksek ısıda 1XTBE solüsyonu içinde çözüldürülmüştür. Çözeltinin soğuması beklenerek içerisine konsantrasyonu 0,5 µl/ml olacak şekilde etidyum bromür eklenmiştir.

-Elektroforeze başlamadan önce tank, taraklar ve jel yatağı temizlenip, tankın benç üzerindeki dengesi ayarlanmış, tarak ve jel küveti tanka yerleştirilip, hazırlanan jel küvete dökülmüştür. Jel donduktan sonra tank 1×TBE çözeltisi ile doldurulmuştur.

-20 µl PCR ürünü alınıp, üzerine 2,5 µl 6X lik yükleme tamponundan konarak karıştırılmış ve jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir.

-Yükleme işlemi bittikten sonra elektrodlar yerleştirilerek 90 voltta yürütülmüştür.

-Elektroforez tamamlandıktan sonra jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi ile incelenerek görüntüsü alınmıştır.

### **3.3.6. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi**

Tüm istatistiksel analizler için SPSS software 15,0 istatistik programı kullanılmıştır.  $P < 0,05$  önemlilik düzeyi olarak kabul edilmiştir. Sonuçların %95 güven aralıkları belirlenmiştir. Sürekli değişkenler için ortalama +/- standart sapma değerleri verilmiştir. Kategorik veriler için frekans dağılımı tabloları verilmiştir. Demografik özellikler belirtilmiştir. Kontrol ve olgu gruplarının arasındaki kategorik alel ve genotip sıklıklarının karşılaştırılması için ki kare testi kullanılmıştır. Her iki heterozigot ve homozigot mutant genotipler için Odds oranları, wild tipler ile çoklu karşılaştırmalı olarak, MTHFR genotipleri ve DS'li çocuk sahibi anneler arasındaki önemli farklar belirlenmiştir. Maternal risk faktörleri ile malformasyonlu DS'li çocuklara sahip olma riskini tespit etmek için ve anne yaşının etkisinin belirlenmesinde OR (odds ratio) ve logistik regresyon analizi kullanılmıştır.

## 4.BULGULAR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına başvuran çocuğunda Down sendromunun bir alt tipi olan regüler DS tanısı almış olan 120 DS'li çocuk annesi ve en az bir sağlıklı çocuğu olan hiç düşüğü olmayan gönüllü sağlıklı kadınlardan oluşan 90 kontrol grubu ile olmak üzere toplam 210 kişi çalışmaya dahil edilmiştir. Her iki gruptaki anneler aynı coğrafik bölgeden (benzer sosyoekonomik durum) ve yaklaşık olarak aynı yaşlardaki bireylerden seçilmiştir. Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı 6 temmuz 2010 tarihli 2000/117 sayılı etik kurulu kararıyla çalışmamız gerçekleştirilmiştir. Tüm katılımcılardan bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır. DS'li çocuk anneleri, bulgular içerisinde "DSA" olarak tanımlanmışlardır. Laboratuvar aşamasında olgu ve kontrol grubuna ait bireylerden, EDTA'lı tüplere alınmış ve MTHFR C677T ve A1298C polimorfizm analizi için moleküler analizler (periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu, PCR, RFLP) Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. DSA ve kontrol grubuna ait elde edilmiş olan bulgular ve istatistiksel analiz sonuçları sırasıyla belirtilmiştir.

### 4.1.Araştırma Grubu Bireylerinin Demografik Özellikleri

Çalışma grubumuza dahil edilen gruplardan DSA grubunu oluşturan toplam 120 olgu yaş açısından incelendiğinde yaş ortalaması  $29,42 \pm 6,77$  olarak hesaplanmıştır. Sağlıklı kadınlardan oluşan kontrol grubunu oluşturan toplam 90 olgu yaş açısından incelendiğinde yaş ortalaması  $28,92 \pm 6,025$  olarak saptanmıştır. DSA olguların 90'ı (%75) kontrol grubu annelerinin 75'i (%83,3) 35 yaşın altındaki grubu oluşturmaktadır. Çalışmamızda 35 yaşın altındaki grup tüm grubun % 78,6'sını, 35 yaş ve üzeri grup ise % 23,4'ünü oluşturmaktadır.

Down sendromlu çocuk annelerinin %63,3'ü ilköğretim, %21,7'si lise, %8'i üniversite mezunu iken, %8,3'ü ise hiç eğitim almamıştır. Olgu annelerinin çoğunluğunda eğitim düzeyleri düşük olarak saptanmıştır. DSA'ların %



13,3'ünde akrabalık evliliği varken büyük bir kısmında akrabalık evliliğinin olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu grubunun % 63,3'ünü abortus öyküsü olmayan, %36,7' sini en az bir abortus öyküsü olan kısım oluşturmaktadır. Kontrol grubunun tamamı ise hiç abortus yapmamış kadınlardan oluşturulmuştur.

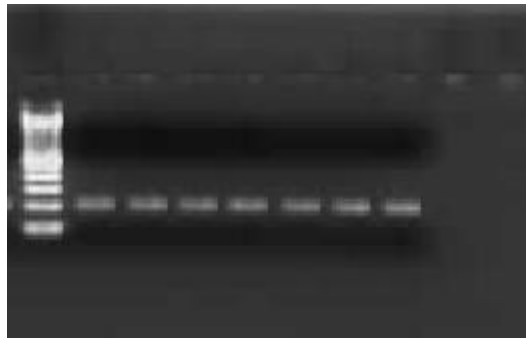
DSA grubunun %75'i sigara kullanmayan, %15'i sigara kullanıcısı olup gebelikte bırakmış olan grubu, geri kalan %10'luk kısmı ise sigara kullanıcısı olup gebelikte de sigara kullanmış olan kısımdan oluşmaktaydı.

Olgu annelerinin regüler trizomi 21'li çocuklarında %55 DKH, % 23,3 GİS anomalisi pozitif saptanmıştır.

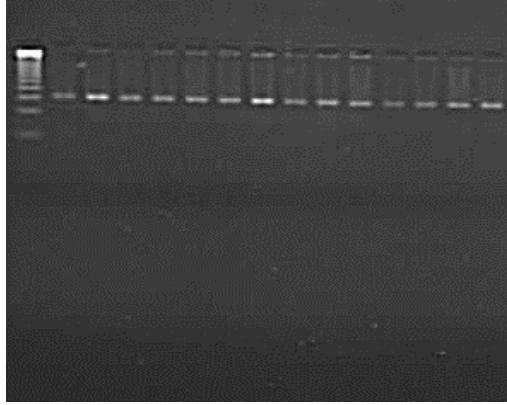
DSA grubunun %65,8' ini gebelik esnasında hiç folik asit takviyesi almamış olanlardan %34,2'sini folik asit kullanmış olanlardan oluşturmaktaydı. Ancak olgulardan aldığımız bu verilerin, annelerin büyük kısmında eğitim seviyelerinin düşüklüğü ve şüpheli bilgi vermeleri nedeniyle bu oranların tam olarak demonstratif olmadığını ve dolayısıyla bu oranın çalışma grubumuzdaki folik asit kullanımının gerçek değerini yansıtmadığını düşünmekteyiz.

### **MTHFR Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi**

120 DSA ile 90 kontrol grubu bireyin DNA izolasyonu periferik kan örneklerinden gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrası izole edilen DNA Örneklerinden MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmlerini içeren hedef bölgenin PCR ile amplifikasyonu yapıldı. PCR işleminin ardından hedef DNA bölgesinin amplifikasyonunun doğru gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrol edilmesi için PCR ürünleri jelde yürütüldü (Şekil 3.1, Şekil 3.2)



Şekil 3.1. C677T bölgesinin PCR sonrası jel elektroforez görüntüsü



Şekil 3.2. A1298C PCR sonrası jel elektroforez görüntüsü

### **Jelin görüntüleme cihazı ile değerlendirilmesi**

PCR sonrası elde edilen amplifikasyon ürünlerinin restriksiyon endonükleazlarla kesimi gerçekleştirildikten sonra, kesilen DNA örnekleri agaroz jel elektroforeziyle ayrılmış ve jel görüntüleme sistemi yardımı ile Hinf I enzimi ile kesim sonucuna göre CC, CT, TT; Mbo II enzimi ile kesim sonucuna göre AA, AC, CC genotipleri tanımlanmıştır. Sonuçlara göre bireyler homozigot wild tip, heterozigot, homozigot mutant olarak adlandırılmıştır( Tablo 3.1)

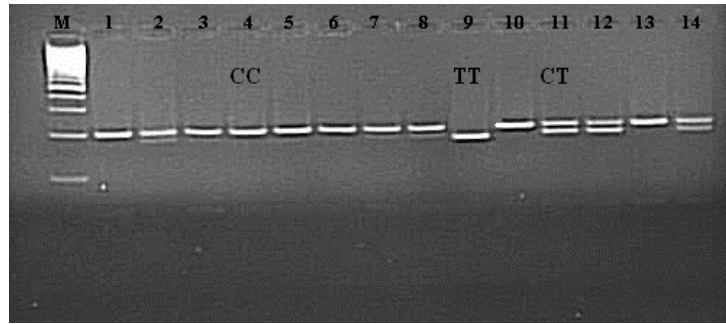
Tablo 3. 1. MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin PCR ürünleri ve RFLP uygulandıktan sonra enzim kesim ürünlerinin genotiplere göre dağılımı

Çalışılan Polimorfizm	Kullanılan Restriksiyon Enzimi	PCR Ürünü	Normal Genotip Enzim Kesim Ürünleri	Heterozigot Genotip Enzim Kesim Ürünleri	Homozigot Genotip Enzim Kesim Ürünleri
MTHFR C677T	Hinf I	198 bç	198 bç	198 bç 175 bç 23 bç	175 bç 23 bç
MTHFR A1298C	Mbo II	163 bç	56 bç 31 bç 30 bç 28 bç 18 bç	84 bç 56 bç 31 bç 30 bç 28 bç 18 bç	84 bç 31 bç 30 bç 18 bç

### **MTHFR Gen polimorfizm Baz Çiftini içeren bölgenin Restriksiyon enzimi ile Kesim Sonuçları**

#### **MTHFR Geninin 677. Baz çiftini içeren bölgenin Hinf I enzimi ile kesim sonucu**

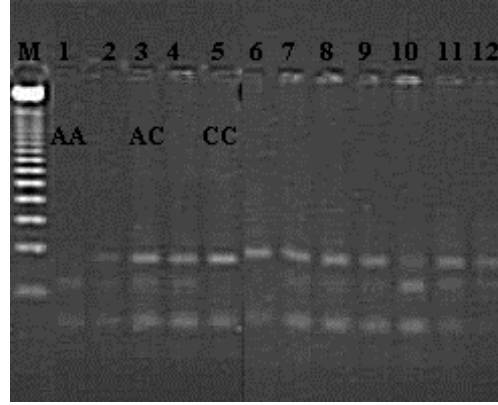
PCR sonrası elde edilen 198 bç'lik PCR amplifikasyon ürününün Hinf I RE ile kesimi sonucu, kesim bölgesinin olup olmamasına ve kesim sonucu oluşan fragmentlerin büyüklüğüne göre bireyler; CC (198 bç), CT (198 bç, 175 bç, 23 bç) ve TT (175 bç ve 23 bç) olarak adlandırılmıştır (şekil 3.3)



Şekil 3.3. MTHFR Geninin 677. Baz çiftini içeren bölgenin Hinf I enzimi ile kesim sonucu

#### **MTHFR Geninin 1298. Baz çiftini içeren bölgenin Mbo II enzimi ile kesim sonucu**

PCR sonrası oluşan 163 bç'lik amplifikasyon ürününün Mbo II RE ile kesimi sonucu, kesim bölgesinin olup olmamasına ve kesim sonucu oluşan fragmentlerin büyüklüğüne göre bireyler; AA (18bç, 20bç, 28bç, 31bç, 56bç), AC (18bç, 28bç, 31bç, 31bç, 56bç, 84 bç), CC (18bç, 30bç, 31bç, 84bç) olarak adlandırılmıştır (Şekil 3.3 ).



Şekil 3.3 MTHFR Geninin 1298. Baz çiftini içeren bölgenin Mbo II enzimi ile kesim sonucu

### **MTHFR Gen Polimorfizmlerinin Alel Frekansları**

Çalışmamıza dahil edilen DSA ile kontrol grupları arasında 677 T (mutant) alleli için allel frekansı sırasıyla %28,3 ve %30,6; 677 C (wild tip) için allel frekansı sırasıyla % 71,7 ve % 69,4 olarak belirlenmiştir. Yaş grupları göz önüne alındığında 35 yaş altındaki DSA ve kontrol grubu arasında T (mutant) alleli için allel frekansı sırasıyla %25,5 ve %30,6; C (wild tip) için allel frekansı sırasıyla % 74,4 ve % 69,4 olarak belirlenmiştir. Allel frekansları açısından gruplar arasında hem 677 T hem 677 C alleli açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.1).

Her iki grup arasında 1298 C (mutant) alleli için, allel frekansı DSA ve kontrol grubu arasında sırasıyla %37,5 ve %41,7; 1298 A (wild tip) alleli için allel frekansı sırasıyla %62,5 ve %58,3 olarak saptandı. Yaş grupları göz önüne alındığında 35 yaş altındaki DSA ve kontrol grubu arasında 1298 C (mutant) alleli için allel frekansı sırasıyla % 36,6 ve %41,7; 1298 A (wild tip) için allel frekansı sırasıyla % 63,3 ve % 58,3 olarak belirlenmiştir. Allel frekansları açısından gruplar arasında hem 1298 C hem 1298 A alleli açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 DSA ve Kontrol grupları arasındaki alel frekansları

<b>Genotip</b>	<b>Alel</b>	<b>DSA Alel (%) n= 240</b>	<b>Kontrol Alel (%) n =180</b>	<b>Ki-kare Değeri</b>	<b>P Değeri</b>
<b>677</b>	<b>C</b>	172(%71,7)	125(%69,4)	0.245	P>0.05
	<b>T</b>	68 (%28,3)	55 (%30,6)		
<b>1298</b>	<b>A</b>	150 (%62,5)	105 (%58,3)	0.749	P>0.05
	<b>C</b>	90 (%37,5)	75 (%41,7)		
		<b>DSA Alel (%) (&lt;35yaş) n= 180</b>	<b>Kontrol Alel (%) (&lt;35yaş) n= 180</b>	<b>Ki-kare Değeri</b>	<b>P Değeri</b>
<b>677</b>	<b>C</b>	134 (%74,4)	125 (%69,4)	1,115	P>0,05
	<b>T</b>	46 (%25,5)	55 (%30,6)		
<b>1298</b>	<b>A</b>	114 (%63,3)	105 (%58,3)	0,944	P>0,05
	<b>C</b>	66 (%36,6)	75 (%41,7)		

## Maternal MTHFR C677T ve A1298C Gen Polimorfizmleri ve Down Sendromu Riski

### Maternal MTHFR C677T Genotipi ve Down Sendromu Riski

Çalışma grubumuzda; DSA ve kontrol grubu arasında MTHFR geninin C677T polimorfizmi açısından genotip frekansları karşılaştırıldığı zaman DSA grubu arasında 677 TT (homozigot mutant) (% 9,4) ya da 677 CT (heterozigot mutant) (%49,1) frekanslarının kontrol grubundaki genotip frekansları (sırasıyla % 11,1 ve %52,9) ile benzerlik gösterdiği gözlemlendi. Genotip frekansları açısından DSA ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (  $P>0,05$ ) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Maternal MTHFR C677T Genotipi ve Down Sendromu Riski

Genotip MTHFR C677T	DSA (n =120)	Kontrol (n= 90)	Odds ratio	%95 CI	P
CC	58 (%50,9)	40 (%47,1)	1.0		
CT	56 (%49,1)	45 (%52,9)	1.165	0.664- 2.045	>0.05
TT	6 (%9,4)	5 (%11,1)	1.208	0.345- 4.232	>0.05
CT ve TT	62 (%51,7)	50 (%55,6)	1.169	0.676- 2.024	>0.05

### Maternal MTHFR A1298C Genotipi ve Down Sendromu Riski:

Çalışma grubumuzda; DSA ve kontrol grubu arasında MTHFR geninin A1298C polimorfizmi açısından genotip frekansları karşılaştırıldığı zaman DSA grubu arasında 1298 CC (homozigot mutant) (%27,3) ya da 1298 AC (heterozigot mutant) (%52,9) frekanslarının kontrol grubundaki genotip frekansları (sırasıyla %28,6 ve %68,8) ile benzerlik gösterdiği gözlemlendi. Genotip frekansları açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (  $P>0,05$ ) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3 Maternal MTHFR A1298C Genotipi ve Down Sendromu Riski

Genotip MTHFR A1298C	DSA (n =120)	Kontrol (n= 90)	Odds ratio	%95 CI	P
AA	48 (%47,1)	25 (%31,3)	1.0		
AC	54 (%52,9)	55 (%68,8)	1.956	1.060- 3.607	>0.05
CC	18(%27,3)	10 (%28,6)	1.067	0.429- 2.655	>0.05
AC ve CC	72 (%60)	65 (%72,2)	1.733	0.962- 3.122	>0.05



**Down Sendromu Riskine Maternal MTHFR gen polimorfizmlerinin kombine etkisi:**

Çalışma grubumuzda; DSA ve kontrol grubu arasında DS için bir risk faktörü olarak her iki MTHFR polimorfizminin kombine genotiplerin etkisi araştırıldığında kombine genotip frekansları açısından DSA ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (  $P>0,05$ ) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. MTHFR C677T ve A1298C kombine genotiplerin etkisi. ( ): Her gruptaki olgu sayısı a: Referans kategori

MTHFR A1298C Genotipi DSA (n=120)	677 CC	677CT	677TT
AA	(16 (% 27.6)) <sup>a</sup>	(26 (%46.4))	(6 (%100))
AC	(30 (%51.7)) OR:1.96 GA:1.06-3.607 P>0.05	(24 (%42.9)) OR:2.167 GA:0.892- 5.264 P>0.05	(0) OR: (-) P>0.05
CC	(12 (%20.7)) OR:1.067 GA: 0.429- 2.655 P>0.05	(6 (%10.7)) OR: 3.250 GA:0.942- 11.219 P>0.05	(0)
Kontrol (n=90)	677 CC	677CT	677TT
AA	(9 (%22.5)) <sup>a</sup>	(12 (%26.7))	(4 (%80))
AC	(30 (%75))	(24 (%53.3))	(1 (%20))
CC	(1 (%2.5))	(9 (%20))	(0 )

**Genç Annelerde Down Sendromu Riskine MTHFR C677T ve A1298C Kombine Genotiplerin Etkisi:**

Çalışma grubumuza dahil olan 35 yaş altındaki genç DSA ve kontrol grubu annelerde her iki MTHFR polimorfizminin genotip dağılımları analiz edildiğinde aralarında genotip frekansları açısından istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $P>0.05$ ) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5 35 yaşın altındaki annelerde MTHFR C677T ve A1298C genotip analizi ve kombine genotiplerin etkisi

C677T Genotip	DSA (35yaş>) (n=90)	Kontrol(35yaş>) (n=75)	OR	Güven aralığı	P değeri
CC	46	34			
CT	42	38	1.244	0.656-2.884	$P>0.05$
TT	2	3	2.029	0.321-12.820	$P>0.05$
CT veya TT	44	41	1.261	0.681-2.330	$P>0.05$
A1298C Genotip	DSA (35yaş>) (n=90)	Kontrol(35yaş>) (n=75)	OR	Güven aralığı	P değeri
AA	38	20			
AC	38	47	2.350	1.179-4.685	$P>0.05$
CC	14	8	1.086	0.39-3.022	$P>0.05$
AC veya CC	52	55	2.010	1.038-3.892	$P>0.05$

Çalışma grubumuza dahil olan 35 yaş altındaki genç DSA ve kontrol grubu annelerde her iki MTHFR polimorfizminin genotip dağılımları analiz edildiğinde gruplar arasında her iki MTHFR polimorfizminin kombine genotip frekansları açısından da anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $P>0.05$ ) (Tablo 4.6).

Tablo 4.6 DS' li çocuk doğurmuş olan 35 yaş altındaki kadınlarda MTHFR 677C>T ve 1298A>C polimorfizmlerinin kombine etkisi

<b>C677T Genotip</b>	<b>A1298C genotip AC veya CC DSA (35yaş&gt;)</b>	<b>A1298C genotip AC veya CC Kontrol (35yaş&gt;)</b>	<b>OR</b>	<b>Güven aralığı</b>	<b>P değeri</b>
CC	16 (%42,1)	9 (%45)			
CT veya TT	22 (%57,9)	11 (%55)	1,636	0,762 - 3,515	P>0,05
<b>C677T Genotip</b>	<b>A1298C genotip CC DSA (35yaş&gt;)</b>	<b>A1298C genotip CC Kontrol (35yaş&gt;)</b>	<b>OR</b>	<b>Güven aralığı</b>	<b>P değeri</b>
CC	46 (%51,1)	34(%45,3)			
CT veya TT	44(%48,9)	41(%54,7)	0,705	0.310 - 1.606	P>0,05

#### 4.4. Down Sendromlu Çocuğu Olan Annelerde Yaşa Bağlı Olarak DS'li Çocuklarında Malformasyon Sıklığının Karşılaştırılması

DSA grubu genç annelerde ileri yaş annelere göre doğumsal kalp hastalığı olan DS' li çocuk sahibi olma oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ( $P<0.05^*$ ). Bununla birlikte aynı grupta GİS anomalisi bulunan DS' li çocuk sahibi olma sıklığı açısından, yaş grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ( $P>0.05$ ) (Tablo 4.7 ).

**Tablo 4.7** Yaşa bağlı olarak DSA'ların DS'li çocuklarında malformasyon sıklığı

	<b>DSA (&lt;35)</b>	<b>DSA (35 ≤)</b>	<b>Ki-kare</b>	<b>P</b>
<b>DKH(+)</b>	56 (% 62.2)	10(%33.3 )	0.006	$P<0.05^*$
<b>DKH(-)</b>	34 (% 37.8)	20 (% 66.7)		
<b>GİS Hastalığı (+)</b>	10 (%11,1)	2 (%6,7)	0.482	$P>0.05$
<b>GİS Hastalığı (-)</b>	80 (%88,9)	28 (%93,3)		

#### 4. TARTIŞMA

##### **Down Sendromunun Etyolojisinde Olası Hipotezler ve Risk Faktörleri**

Down sendromu insanda mental retardasyonun en sık görülen genetik nedenidir. İnsidansı 1/600~1/1000 canlı doğum olup erken gebelik kayıplarının önemli bir nedenidir. DS ayrıca en sık görülen ve en iyi bilinen kromozom hastalığıdır (1, 2). Tahminlere göre 1/150 konseptus trizomi 21'lidir ve bunların %80'i erken gebelik sırasında kaybedilmektedir (3, 4, 5). İleri anne yaşı trizomi 21 için major risk oluşturmaktadır. Annelerin 35 yaş sonrasında DS'li çocuk doğurma olasılıkları gebelik yaşı ile orantılı olarak artmaktadır (6).

DS'nin sebebi olarak mayotik nondisjunction görülüyor olsa dahi hala mekanizma hakkında birçok bilinmeyen vardır. Çoğu DS olgusunda anneler 35 yaş altındadır ve bu da ileri yaştaki annelere oranla genç annelerde farklı mekanizmaların kromozom 21'in ayrılmamasına neden olduğunu düşündürmektedir (7). Bununla birlikte anne yaşı DS'li çocuk doğurma riskinde folat metabolizmasının rolünü karmaşık hale getirmektedir. Son çalışmalar anne yaşının etkisinin maternal mayozun II. evresinde hatalara neden olduğunu göstermektedir (8). Buna ek olarak maternal ovaryum mozaisizminin trizomi 21 için farklı bir risk faktörü olabileceği hipotez şeklinde düşünülmektedir (9). Özetle insanda kromozom nondisjunctionu multifaktöriyel bir mekanizma şeklinde vurgulanmaktadır ve bu duruma neden olan daha spesifik risk faktörlerinin incelenmesi gerekliliği üzerinde durulmaktadır (7, 8, 9). Yapılan trizomi 21 çalışmalarında, mayoz I ve II'de görülen maternal nondisjunction sonucu oluşan farklı rekombinasyon seviyeleri tespit edilmiştir. Bundan dolayı, ilerlemiş anne yaşı ve genetik rekombinasyonun yeri kromozom 21 ayrılmama durumu için iki önemli risk faktörü olarak gösterilmektedir (118, 119). Maternal yaş ve değişmiş kromozom 21 rekombinasyon paternleri arasındaki ilişkiyi belirlemek için Lamb ve arkadaşları 21. kromozomu maternal mayoz I orijinli olan 400 olguyu maternal yaşa göre gruplayarak analiz etmişler. Bu çalışma ile kromozom 21 nondisjunctionu olan ileri yaştaki annelerde, ileri yaşa bağlı

mayotik mekanizmanın daha çok hataya meyilli olması nedeniyle oositlerde yanlış segregasyona neden olduğu gösterilmiştir ancak buna karşılık genç annelerde eksik veya değişmiş rekombinasyon yeri (sentrome ya da telomere yakın) sonucu meydana gelen kromozom 21 nondisjunctionu saptanmıştır (7). Mayoz II hatalarını incelemek amacıyla yapılmış diğer bir çalışmada ise 21q perisentromerik bölge değişiminin anne yaşı ile ilgili risk faktörü oluşturduğu saptanmıştır. Buna zıt olarak maternal mayoz I'deki hataların analizinde nondisjunction için aynı riski oluşturduğu gözlenmiş fakat burada oositin yaşında bağımsız bir durum saptanmıştır (8). Sentromerik DNA kromatininin, spesifik sentromerik metilasyon paternlerinin epigenetik kalıtımıyla ve spesifik metil duyarlı proteinlerin kinetikor oluşumunun sağlanması için düzgün DNA yapısının devam ettirilmesi sayesinde stabilitesini koruduğu düşünülmektedir (120). Bu yüzden DNA metilasyonundaki bir hatanın mayotik nondisjunction için potansiyel bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (15). Perisentromerik hipometilasyon hipotezinde açıklanan bozulmuş folat/hcy metabolizması sonucu meydana gelen kinetikor anormallikleri yüzünden bozulmuş kromozom segregasyonu gözlenmektedir (15). Çeşitli çalışmalarda folat yetersizliği ve insan anöploidileri birbiriyle bağlantılı bulunmuş, ayrıca kültüre edilmiş insan lenfositlerinde folat yetersizliğinde kromozom 17 ve kromozom 21 anöploidilerinin arttığı (121) ve diyetle azalmış folat miktarının spermlerde görülen anöploidi (özellikle kromozom 21) dizomisi sıklığını arttırdığı tespit edilmiştir (11). Waterland ve Jirtle gestasyon aşamasında maternal metil alıcısı ilavesinin daha sonraki kuşağın fenotipini, epigenomu metilleyerek değiştirdiğini göstermişlerdir. Bundan dolayı büyük olasılıkla büyükannenin gebeliği sırasında azalmış folat alımının veya folat metabolik yolağındaki bozuklukların kromozom rekombinasyon bölgelerini ve perisentromerik bölgelerini içeren bazı kromozom bölgelerinde metilasyon paternini değiştirebilmesi ve böylece anöploidili gamet formasyonunda bir artışın söz konusu olabileceği belirtilmektedir (122). Böylece folat/hcy metabolizmasındaki bozukluk nedeniyle değişmiş olan DNA metilasyon paterni mayozda hatalı kromozom 21 rekombinasyonu meydana getirebilir ve bu da sonuç olarak artmış down sendromu riski oluşturabilir. Ayrıca genç ve ileri yaş annelerde farklı mekanizmalar kromozom 21 nondisjunctionuna

neden oluyorsa folat metabolizmasında görevli bu genlerdeki polimorfizmlerin etkisi de yaş gruplarına göre farklı yani ya daha fazla ya da daha az olabileceği ileri sürülmektedir (29, 19, 125). DS riski ile maternal yaş arasında ilişki çalışmalarındaki tutarsızlık bu nedenle olabilir.

Bosco ve ark., 2003( 24); Takamura ve ark., 2004 (26); da Silva ve ark., 2005(17) çalışmalarında kontrol grubu anneleriyle karşılaştırıldığında DS'li çocuk sahibi olan annelerde Hcy konsantrasyonlarının önemli derecede daha yüksek olduğu gözlemleri bu kadınlardaki folat metabolizmasında bir anormallik olabileceğine dair diğer bir kanıt olarak görülmektedir. Sonuçta DS'nin etyolojisini açıklamaya yönelik çalışmalarda, folat/hcy metabolizmasındaki bozuklukların değişmiş DNA metilasyon paterni ve mayozda hatalı kromozom 21 rekombinasyonu meydana getirebileceği ve bunun da sonuç olarak artmış down sendromu riski oluşturabileceği ifade edilmektedir. DS riski ile maternal yaş ilişkisindeki tutarsızlığın nedeninin genç ve ileri yaş kadınlarda farklı mekanizmaların kromozom 21 nondisjunctionuna neden olması ve folat metabolizmasında görevli olan genlerdeki polimorfizmlerin etkisinin de yaş gruplarına göre farklı olabileceğinden dolayı olduğu ileri sürülmektedir (29, 19, 125). Bir çalışmada 35 yaş öncesi gebe kalan DSA' ların periferik lenfositlerinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki 13 ve 21. kromozomunda segregasyon bozukluklarının sıklığında önemli bir artış gözlenmiştir (127). Bu bulgular somatik hücrelerde de meydana gelen nondisjunction olaylarının mayotik ve mitotik işlemlerde anormal kromozomal segregasyona yatkınlığın nedeni olabileceğini göstermektedir (127).

### **MTHFR 677C>T polimorfizmi ile Maternal Down Sendromlu Çocuk Sahibi olma Riski arasında ilişki çalışmaları**

1999 da anormal folat ve metil metabolizmasının DNA hipometilasyonuna ve anormal kromozomal segregasyona neden olabileceği kanıtına dayanarak James ve arkadaşları MTHFR 677C>T polimorfizminin genç annelerde maternal mayotik nondisjunctiona neden olabileceği ve DS için bir risk faktörü oluşturabileceği hipotezini ortaya atmışlardır. Elli yedi DSA ve elli kontrol annesinde yaptıkları çalışmada DSA' larda önemli miktarda artmış

plazma Hcy konsantrasyonu ve lenfosit metotreksat sitotoksitesi tespit etmişlerdir ki bu da anormal folat ve metil metabolizmasının birbiriyle ilişkili olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte MTHFR 677 T allelinin 2.6 kat fazla DS' li çocuk riski ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada DSA'da folat metabolizmasının anormal olduğunu ve bunun MTHFR genindeki bir mutasyona bağlı olarak meydana geldiği gösterilmiştir.

Geçtiğimiz on yıl içerisinde yapılan birçok çeşitli çalışma folat ve metil metabolizmasının DS riskindeki rolünü açıklamak amacıyla yapılmıştır. Bu çalışmaların hemen hemen hepsinde MTHFR 677C>T polimorfizmi araştırılmıştır (12-36) (Tablo 5.1).

Acácio ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları çalışmada MTHFR 677C T polimorfizmi ve aşırı sigara içimi down sendromu için maternal risk faktörleri olarak ilişkili bulunmuştur. Bunun dışında James ve arkadaşları (15) (1999), Hobbs ve arkadaşları (2000), Grillo ve arkadaşları (16) (2002), da Silva ve arkadaşlarının(2005) çalışmalarında bir veya iki MTHFR 677T alelinin varlığı DS için artmış bir maternal risk ile ilişkili bulmuşlardır. Bu çalışmalardan farklı olarak bizim çalışmamızda DSA ile kontrol grupları arasında 677 T (mutant) alleli için allel frekanslarını sırasıyla %28,3 ve %30,6 olarak belirlenmiştir. Yaş grupları göz önüne alındığında 35 yaş altındaki DSA ve kontrol grubu arasında T (mutant) alleli için allel frekansı sırasıyla %25,5 ve %30,6; belirlenmiştir. Allel frekansları açısından gruplar arasında 677 T alleli açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.1). Elde ettiğimiz sonuç ışığında MTHFR 677T allelinin türk popülasyonunda tek başına DS için riski arttırmaya yetmediğini düşünmekteyiz.

Akdeniz ülkelerinde yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre sadece Mısır dışında MTHFR 677T alleli DS için bağımsız bir risk faktörü olarak görülmemiştir. Bir Akdeniz ülkesi olarak bizim çalışmamızda da bu çalışmalarla benzer olarak MTHFR geni 677 T polimorfizmleri DS'li çocuk sahibi olma arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Akdeniz diyetine bağlı olarak daha fazla folat açısından zengin besinler tüketilmesinin MTHFR 677T alleli için ters bir etki yaptığı düşünülmektedir (13, 20, 28). Bununla birlikte Meguid ve



arkadaşlarının Mısırda yaptığı çalışmada MTHFR genotipi ve folat alımı arasında önemli bir ilişki ortaya konmuştur (32). Bizim çalışmamızda DSA'larda bu polimorfizmi değerlendirildiğimizde 677T alelinin bağımsız bir risk faktörü oluşturmadığı saptanmıştır.

Yapılan tüm çalışmalarda baktığımızda MTHFR 677C > T polimorfizmi Amerika, Kanada, Mısır ve Çin popülasyonlarında DS' li çocuklar için bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilmiştir (12, 15, 21, 31, 32). Benzer sonuçlar Brezilya (14, 16, 17, 18, 37) ve Hindistan' da da (25, 29, 33) saptanmıştır. Avrupada yapılan çeşitli çalışmalarda (13, 19, 20, 22, 23, 24, 28, 30, 35, 36), Türkiye ve Japonyada ki çalışmalarda (26, 27) bu polimorfizm bağımsız bir risk faktörü olarak bulunmamıştır (Tablo 5.1). Bizim çalışmamızda da benzer olarak DSA'larda MTHFR 677C polimorfizminin bağımsız bir risk faktörü oluşturmadığı saptanmıştır.

Sonuçlardaki bu farklılıkların nedenini, allel frekanslarındaki farklılıklar, farklı olgu kontrol grup seçimleri ya da folat metabolizmasında görev alan diğer genlerin kombine etkileşimleri, beslenme ve çevresel faktörler (gebelikte folat, sigara, alkol kullanımı) ve görevleri henüz aydınlatılmayı bekleyen diğer aday genlerin folat metabolizması üzerine etkisinden kaynaklanıyor olabilir. Çalışmamızda MTHFR 677T alleli, düşük folat alımı ve folat metabolik yolağında görevli diğer polimorfizmler ile kombine edildiği zaman DS için bir risk faktörü oluşturabilir.

### **MTHFR 1298A > C polimorfizmi ile Maternal Down Sendromlu Çocuk Sahibi olma Riski arasında ilişki çalışmaları**

Down sendromu için bir risk faktörü oluşturması açısından MTHFR 1298A>C polimorfizmi, 677C>T polimorfizmine göre daha az çalışılmıştır (Tablo 5.1). MTHFR 1298A alleli ve DS arasındaki ilişki ilk olarak 2002 yılında Brezilya popülasyonunda yapılan çalışma sonucunda ortaya atılmıştır (16). Bizim çalışmamızda DSA ve kontrol grubu arasında MTHFR geninin A1298C polimorfizmi açısından genotip frekansları karşılaştırıldığı zaman genotip ve allel frekansları açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (  $P>0,05$ ) (Tablo 4.1, Tablo 4.3).

Bazı araştırmalarda artmış DS riski ile MTHFR 1298A>C ve 677C>T polimorfizmlerinin ilişkili olduğu tespit edilmiştir (16-18, 23-28). Bizim alışmamızda MTHFR 1298A>C ve 677C>T gen polimorfizmleri ile artmış DS riski arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır.

Hindistan ve GÜney İtalya' da yapılan çalışmalarda MTHFR 1298A > C ve 677C > T polimorfizmleri ile artmış DS riski arasında bir ilişki saptanmıştır (19, 29). Ayrıca iki varyantında beraberliğinin DS için bir risk faktÖrü olduğuna dair veriler Mısırdaki yapılan çalışmada gösterilmiştir (32). Bizim alışmamızda ise MTHFR her iki gen polimorfizminin DSA'larda ve kontrol grubu arasında genotip dağılımları ayrı ayrı ve kombine olarak incelendiğinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ( $P>0.05$ ). Çalışmamız türk popülasyonunda folat metabolizmasında yaygın polimorfizm gösteren MTHFR A1298C ve C677T allellerinin tek başına veya kombine olduğunda DS'li ocuk riski açısından bağımsız bir maternal risk faktÖrü olmadığını göstermektedir ( $P>0,05$ ). Çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonucun nedeninin MTHFR A1298C ve C677T genotipi ile diğer polimorfizmler ve/veya gruplar arasında beslenme durumu gibi farklı çevresel faktÖrlerin kombinasyonlarının birbiriyle bağlantısı olabileceğini düşünmekteyiz.



Tablo 5.1. Folat/homosistein metabolizması gen polimorfizmleri ve maternal DS' li çocuğa sahip olma riski arasındaki genetik ilişki çalışmaları.

Yıl	Çalışma Grubu	Ülke	DSA	Kontrol	MTHFR C677T
1999	James ve ark.	ABD	57	50	P <sup>b</sup> OR=2.6 (1.2–5.8) <sup>c</sup>
2000	Hobbs ve ark.	ABD Kanada	157	144	P <sup>a</sup> OR=1.9 (1.2–3.0) <sup>c</sup>
2002	O'Leary ve ark.	İrlanda	48	192	N <sup>a,b</sup> OR=N.A
2002	Chadefaux- Vekemans ve ark.	Fransa*	85	107	N OR=N.A.
2002	Stuppia ve ark	İtalya *	64	112	N OR=N.A.
2003	Bosco ve ark	İtalya* (sicily)	63	72	N OR=N.A.

Tablo 5.1. Folat/homosistein metabolizması gen polimorfizmleri ve maternal DS' li çocuğa sahip olma riski arasındaki genetik ilişki çalışmaları. ( devamı)

<b>2003</b>	Sheth ve Sheth	Hindistan	NA	NA	N OR=N.A
<b>2004</b>	Takamura ve ark	Japonya	31	60	N OR=N.A.
<b>2006</b>	Martí nez Fri´as ve ark.	İspanya*	91	90	N OR=N.A
<b>2007</b>	Wang ve ark	Çin	100	100	P <sup>b</sup> OR=3.4 (1.4–8.4) <sup>c</sup>
<b>2008</b>	Meguid ve ark.	Mısır*	42	48	P OR=4.1 (1.0–5.7) <sup>c</sup>
<b>2008</b>	Wang ve ark	Çin	64	70	N OR=3.8(1.8–8.5) <sup>c</sup>
<b>2008</b>	Biselli ve ark.	Brezilya	72	194	N <sup>a</sup> OR = 1.7 (0.6–4.6) <sup>c</sup>
<b>2008</b>	Kohli ve ark.	Hindistan	104	109	N OR = N.A
<b>2008</b>	Santos-Rebouças ve ark.	Brezilya	103 genç	108	N OR = 0.6 (0.5–1.4) <sup>c</sup>

Tablo 5.1. Folat/homosistein metabolizması gen polimorfizmleri ve maternal DS' li çocuğa sahip olma riski arasındaki genetik ilişki çalışmaları. ( devamı)

2008	Biselli ve ark.	Brezilya	67	113	-
2008	Coppede` ve ark.	İtalya*	94	113	N <sup>a</sup> OR=1.2 (0.8-1.8) <sup>c</sup>
2009	Pozzi ve ark.	İtalya *	74	184	N OR=0.9 (0.4- 2.2) <sup>c</sup>

P: Polimorfizmler ile DS riski arasında artmış ilişki; N: Polimorfizmler ile DS riski arasında ilişki yok; N.A: Mevcut değil; (-): Çalışılmadı; <sup>a</sup> : Gene-gene etkileşimi (Table 2'de tanımlandı); <sup>b</sup> : Gene-çevre etkileşimi (Table 3'te tanımlandı); <sup>c</sup> : OR=odds oranı (güven aralığı %95); \* Akdeniz ülkeleri

Tablo5.2. Folat/homosistein metebolizması gen polimorfizmleri arası etkileşim ve maternal DS' li çocuğa sahip olma riski çalışmaları

Yıl	Çalışma Grubu	Ülke	Gen –gen etkileşimi
2000	Hobbs ve ark.	ABD Kanada	MTHFR 677T+MTRR 66G * OR=4.1 (1.9–8.6) <sup>c</sup>
2002	O'Leary ve ark.	İrlanda	MTHFR 677T + MTRR 66G *OR = 2.9 (1.2–7.5) <sup>c</sup>
2002	Grillo ve ark.	Brezilya	MTHFR 677CT + MTHFR 1298AC* OR = N.A.
2003	Bosco ve ark.	İtalya	MTR 2756AG + MTRR 66AG *OR = 5.0 (1.1–24.1) <sup>c</sup>
2005	Da Silva ve ark.	Brezilya	MTHFR 677T + MTHFR 1298C + MTR 2756G + MTRR 66G + CBS 844 ins68 * (complex a) OR = 1.2 (1.0–1.6) <sup>c</sup>
2005	Acacio ve ark.	Brezilya	MTHFR 677CT + MTHFR 1298AC * OR = 5.7 (1.7–18.8) <sup>c</sup>
2006	Coppede` ve ark.	İtalya	MTHFR 677TT + RFC1 80GG * OR = 6.0 (1.0–35.9) <sup>c</sup> MTHFR 1298AA + RFC1 80GA/AA ^ OR = 0.4 (0.1–0.9) <sup>c</sup>
2006	Rai ve ark.	Hindistan	MTHFR 677CC + MTHFR 1298CC *OR = 4.0 (1.2–13.6) <sup>c</sup>
2006	Scala ve ark	İtalya	MTHFR 677TT + MTHFR 1298CC/CA *OR = 7.2 (1.4–47.2) <sup>c</sup> RFC1 80 GG + MTHFD 1958 AA *OR = 4.4 (1.2–17.9) <sup>c</sup> MTHFR 1298CC/CA + RFC1 80 GG/GA *OR= 2.6 (1.1–6.3) <sup>c</sup> MTHFR 677T-1298C haplotip * OR = N.A.
2008	Wang ve ark.	Çin	MTHFR 677TT/CT + MTRR 66GG *OR = 6.0 (2.0–17.5) <sup>c</sup>

Tablo 5.2 (Devam ediyor)

<b>2008</b>	Biselli ve ark.	Brezilya	MTHFR 677T + MTHFR 1298C + RFC1 80G + MTR 2756G * (complex a) OR = 1.7 (1.0–3.0) <sup>c</sup>
<b>2009</b>	Coppede`	İtalya	MTHFR 677TT + MTR 2756AA *OR = 3.0 (1.0–8.5) <sup>c</sup> MTHFR 1298AC + TYMS 2R/2R ^OR = 0.11 (0.1–0.5) <sup>c</sup>





\*: DS için artmış maternal risk ile ilişkili ^: DS için azalmış maternal risk ile ilişkili <sup>a</sup>: DSA'larda kontrollere göre mutant allellerde önemli düzeyde anlamlılık gösterilmiştir. <sup>c</sup>OR = Odds ratio (Güven Aralığı %95).

Tablo5.3 . DSA'da ve kontrol grubunda homosistein, folat, vitamin B12 ve ilişkili mikronutrisyonlar ve bunların folat/Hcy metabolizma gen polimorfizmleri ile aralarındaki etkileşim.

Yıl	Çalışma Grubu	Ülke	Plasma homocysteine (Hcy) concentration	Diğer Nutrientler
1999	James ve ark.	ABD	DSA'da artmış Hcy MTHFR C677T polimorfizmi ve Hcy düzeyi ile etkileşimi +	
2002	O'Leary ve ark	İrlanda	DSA ve kontrol annelerinde Hcy düzeyi ilişki yok MTHFR C677T polimorfizmi ve Hcy düzeyi ile etkileşimi +	Plazma folat ve VitB12 düzeyi Hcy seviyesinin önemli belirleyicisidir
2002	Chadefaux-Vekemans ve ark.	Fransa	DSA ve kontrol arasında Hcy düzeyi arasında fark yok MTHFR C677T polimorfizmi ve Hcy düzeyi arasında etkileşim yok	

<b>2003</b>	Bosco ve ark.	İtalya	DSA'da artmış Hcy düzeyi + Hcy düzeyi ile MTHFR C677T, MTR A2756G ve MTRR A66G polimorfizmleri arasında etkileşim yok	DSAVE kontrol arasında Folat ve vitamin B12 düzeyinde fark yok
<b>2003</b>	Sheth ve Sheth	Hindistan	DSA'da artmış Hcy düzeyi +	
<b>2004</b>	Takamura ve ark	Japonya	DSA'da artmış Hcy düzeyi + DSA'da azalmış folik asit düzeyi +	DSAVE kontrol arasında vitabin B6 ve vitamin B12 düzeyinde fark yok
<b>2005</b>	Silva ve ark.	Brezilya	DSA'da artmış Hcy düzeyi + MTHFR C677T polimorfizmi ve Hcy düzeyi arasında etkileşim var +	
<b>2006</b>	Scala ve ark.	İtalya	DSA ve kontrol arasında Hcy düzeyi arasında fark yok -	
<b>2006</b>	Martínez-Frías ve ark.	İspanya	Tablo 5.3 (Devam ediyor) 8C ve MTRR A66G polimorfizmleri arasında kompleks etkileşim	
<b>2007</b>	Wang ve ark.	Çin	DSA'da artmış Hcy düzeyi + MTHFR C677T polimorfizmi ve Hcy düzeyi arasında etkileşim var +	
<b>2008</b>	Meguid ve ark.	Mısır		DSA ve kontrol grubunda besinlerden alınan Folat alımı günlük önerilen düzeyden önemli oranda daha düşük bulunmuş

Tablo 5.3 (Devam ediyor)

<b>2008</b>	Biselli ve ark.	Brezilya	DSA'da artmış Hcy düzeyi + MTHFR A1298C polimorfizmi ve Hcy düzeyi arasında etkileşim var +	
<b>2008</b>	Kohli ve ark	Hindistan	DSA'da azalmış Hcy düzeyi -	
<b>2008</b>	Santos-Reboucas ve ark.	Brezilya		DSA ve kontrol grubunda besinlerden alınan Folat alımı günlük önerilen düzeyden daha düşük bulunmuş DSA'da çinko ve metiyonin alımı kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunmuş
<b>2009</b>	Coppede ve ark.	İtalya	DSA ve kontrol annelerinde Hcy düzeyi ilişki yok <sup>a</sup>	DSA ve kontrol olguları arasında folat ve vitamin B12 düzeylerinde fark yok <sup>a</sup>

<sup>a</sup> :DSA ve kontrol annelerinden sınırlı sayıda bilgi elde edilmiştir

Gen-gen ilişkileri araştırılan çalışmalardan bazılarında her iki MTHFR 677C>T ve 1298A>C gen polimorfizminin kombine değerlendirildiğinde DS için bir risk faktörü oluşturduğu görülmektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar da MTHFR 677C>T ve 1298A>C polimorfizmleri ve kromozomal hasar arasında bağlantı araştırılmıştır. Bu çalışmalarda DSA'larda ve genç yaşta DS'li çocuk sahibi olan annelerde folat metabolizmasındaki MTHFR 677C>T ve 1298A>C polimorfizmlerinin anormal kromozomal segregasyon için artmış yatkınlık gösterdiği saptanmıştır (35, 38). Brandalize ve arkadaşları (144) çalışmalarında 239 DSA ile 197 kontrol annesinde DS ve DKH gelişiminde maternal bir risk faktörü olarak MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmlerini PCR-RFLP tekniğini kullanarak incelemişler. Genotip dağılımlarını her iki grupta benzer bulmuşlar. Fakat 677CT veya TT ve 1298AA kombine genotiplerinde DS' li çocuk doğurma açısından artmış risk tespit etmişler. OR=1.99; (1.11–3.55)). Olgu annelerinde doğumsal kalp hastalıklı olan DS'li çocuklarının sıklığı ile maternal polimorfizmlerin ilişkisini değerlendirmişler. 677T allel varlığında doğumsal kalp hastalıklı çocuklarının olmasında 2.07 kat artmış risk tespit etmişler (P<0.01). MTHFR 677CT veya TT genotiplerini taşıyan, perikonsepsiyonel folik asit kullanımı olmayan DKH olan etkilenmiş DS'li 57olgu annesinde DKH'ya sahip DS'li çocuk doğurma olasılığında 2.26 kat artmış risk tespit edilmiş. (1.25–4.09)c. Bu çalışmada maternal 677 T alelinin DS'li çocuk riskini sınırda artırdığını tespit etmişler. Ayrıca 677 T alelinin DKH olan DS'li çocuk doğurma riski artışıyla ilişkili olduğunu ve perikonsepsiyonel folik asit kullanımının bu polimorfizmi taşıyanlarda yararlı olduğunu belirtmişler(144). Çalışmamızda farklı olarak MTHFR 1298 ve 677 alel frekansları ve genotip dağılımları değerlendirildiğine her iki gen polimorfizminin DS'li çocuk doğurma için bir risk faktörü olmadığını tespit ettik. Bunun dışında çalışmamız folik asit kullanımının bu polimorfizmlerle kombine değerlendirilerek DS'li çocuk riskini saptamaya yetecek güçte değildi.

Grillo ve arkadaşları (16), Acácio ve arkadaşları (18) çalışmalarında MTHFR A1298C varyantı heterozigotluk durumunda ve 677CT genotipi ile birlikte olduğunda DS için artmış maternal risk ile ilişki bulmuşlardır. Biz çalışmamızda anne yaşını göz önüne bulundurarak 35 yaş altındaki genç anneleri

ayrı bir grup halinde değerlendirildiğimizde de MTHFR gen polimorfizmleri ile genç DSA' lar arasında ayrı ayrı veya kombine olarak MTHFR gen polimorfizmlerinin DS'li çocuk doğurma riski açısından bağımsız bir maternal bir risk faktörü oluşturmadığı saptadık. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, türk populasyonunda MTHFR gen polimorfizmlerinin hem genotip dağılımlarının hem de kombine genotiplerinin DS'li çocuk doğurma riskinde bağımsız bir risk faktörü olmadığını göstermiştir ( $P>0.05$ ). Bunun dışında Brezilyada yapılan beş çalışmadan dördünde, MTHFR 1298C varyantı ve folat metabolizmasında rol oynayan diğer genlerdeki polimorfizmlerin beraberliğinin artmış DS riski oluşturduğu gösterilmiştir (14, 16, 17, 18, 37). Bu çalışmalarda Biselli ve arkadaşları 56 DSA ile MTHFR C677T, A1298C, MTR A2756G ve RFC1 A80G den üç veya daha fazla polimorfik alel varlığının ve Hcy konsantrasyonunun 4.99  $\mu\text{mol/L}$  üstünde olması durumunun DS için maternal risk faktörü olduğu sonucunu saptamışlar ve sonuç olarak folat metabolizmasındaki diğer polimorfik alellerin de benzer bir etkiye yol açabilmesinin mümkün olabileceğine işaret etmişlerdir (14). Buna benzer diğer bir çalışmada homosistein metabolizmasında görev alan MTHFR enziminin 677T ve 1298C alleleriyle birlikte hücre içine folat taşınmasında görev alan RFC1, metiyonin sentaz (MTR) ve metiyonin sentaz redüktazdaki (MTRR) polimorfizmlerin de DS için bir risk faktörü olduğu gösterilmiş ve ayrıca 3 veya daha fazla polimorfizm varlığında DS riskinin arttığı belirtilmiştir (35). Benzer olarak James ve ark (15), 1999; Grillo ve ark.(16) , 2002; Acácio ve ark., 2005 (18) ; da Silva ve ark. (17); Scala ve ark.(19) 2006; Coppede ve ark. (20) 2006 nın çalışmalarında da MTHFR, MTR ve RFC1 gibi folat metabolizmasında bulunan genlerdeki polimorfizmler ile DS için artmış maternal risk arasında ilişkili bulunmuştur. Bosco ve arkadaşlarının çalışmalarında (24) MTR A2756G ve MTR 2756G alleli varlığında artmış hcy konsantrasyonu ile kombine edildiğinde DS için risk artışı gözlenmiştir. Ancak Chango (25) ve arkadaşlarının çalışmasında bu polimorfizm ile bir risk artışı ilişkisi doğrulanmamıştır. da Silva ve ark.,(17) 2005 çalışmasında 3 veya daha fazla polimorfik alel varlığında DS için maternal riskte 1.74 kat artış gözlenmiştir. Kontrol anneleri ile DS'li anneleri karşılaştırıldığında gözlenen ortalama olarak daha yüksek polimorfik aleller

saptamışlardır. Araştırmacılar yaptıkları 2. çalışmada cystathionine  $\beta$ -synthase genindeki 844ins68 polimorfizm ve methionine synthase reductase genindeki A66G ve ek olarak MTHFR ve MTR geni polimorfizmlerini araştırmışlar ve çalıştıkları bu polimorfik alellerden herhangi birinin varlığında Down sendromlu çocuğa sahip olma şansında 1.259 kat artış olduğunu gözlemişler. Shao-shuai WANG ve arkadaşları çalışmalarında yaşları benzer olan 64 DS'li annesi ve 70 kontrol annede PCR-RFLP tekniğini kullanarak MTHFR 677C→T, MTRR 66A→G polimorfizmleri ile bu genotiplerin Down sendromu riski arasındaki ilişkiyi incelemişler. MTHFR 677T polimorfizmi ve homozigot MTRR 66G polimorfizminin eşzamanlı varlığının DS'li çocuğa sahip olma açısından maternal riskte 6 kat artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Kombine genotiplerde, birinde veya her ikisinde MTHFR 677T alel varlığında risk 3,78 kat artış ile ilişkilendirilmiş ayrıca MTRR'deki homozigot 66G aleli varlığı 5,2 kat artmış bir risk saptanmıştır (12)DS'nin etyolojisini açıklamaya yönelik çalışmalarda, folat/hcy metabolizmasındaki bozuklukların değişmiş DNA metilasyon paterni ve mayozda hatalı kromozom 21 rekombinasyonu meydana getirebileceği ve bunun da sonuç olarak artmış down sendromu riski oluşturabileceği ifade edilmektedir. Lokalize folat metil yetersizliği durumunda, yeni sentezlenen ipliklerin remetilasyonunda DNA metiltransferazın başarısızlığı, kalıcı DNA metilasyon paterni kaybı ile sonuçlanabileceği belirtilmektedir son yapılan araştırmalarda normal kromozom segregasyonu için kararlı/dengeli perisentromerik DNA metilasyonunun önemi vurgulanmaktadır. Ayrıca literatürde DS riski ile maternal yaş ilişkisindeki tutarsızlığın nedeninin genç ve ileri yaş kadınlarda farklı mekanizmaların kromozom 21 nondisjunctionuna neden olması ve folat metabolizmasında görevli olan genlerdeki polimorfizmlerin etkisinin de yaş gruplarına göre farklı olabileceğinden dolayı olduğu ileri sürülmektedir (29, 19, 125).Literatürde insanda kromozom nondisjunctionu multifaktöriyel bir mekanizma şeklinde vurgulanmaktadır. Biz bu duruma neden olan faktörlerin aydınlatılabilmesi amacıyla daha spesifik risk faktörlerinin seçilerek incelenmesinin gerekli olduğunu ve folat yolağında bulunan diğer aday genlerde yapılacak ek çalışmalar kadar down sendromlu etkilenmiş gebeliği olan kadınlardaki folat metil metebolizmasını içeren diğer mikronutrisyonlar ile

etkileşiminin sistematik çalışmalarının da, down sendromunu önlemede başlıca halk sağlığı stratejilerinin gelişmesi için fırsatlar sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda dikkat çeken bir unsur da hem DS' li çocuk sahibi olan 35 yaş altındaki genç annelerin DS' li çocuklarında DKH sıklığının ileri yaş anne grubuna göre fazla bulunmasıydı. Çalışmamız folik asit desteği alan anne sayısının azlığı ve annelerin eğitim düzeyleriyle orantılı olarak gebelik hakkında yeterli bilgi alamamamız nedeniyle gebelikte folik alımını değerlendirmek konusunda demonstratif olmadığını ve bununla beraber maternal folik asit alımının DS üzerine muhtemel etkisini tespit edebilecek yeterlilikte olmadığını düşünmekteyiz. Down sendromunda en sık rastlanan major konjenital anomali doğumsal kalp hastalıklarıdır (49, 50, 51). Literatürde regüler tip trizomide DKH sıklığının daha yüksek olduğu belirtilmektedir. Bu oranlar % 33 ile % 76 arasında değişmektedir (53). Türkiye' de yapılan bir çalışmada DS'nde DKH sıklığı %40 olarak bulunmuştur (54). Bizim çalışmamızda bu sıklık ise bu oran %55 olarak bulunmuştur. Türkiye' de yapılan diğer bir çalışmada geniş bir popülasyonda Down sendromlu olgularda DKH değerlendirmesi yapılmıştır. Bizim bulgumuz ile benzer olarak bu çalışmanın sonucunda % 72,4 vakada anne yaşının 35'in altında olduğu saptanmıştır (55). Bizim çalışmamızda da genç yaş annelerde ileri yaş annelere oranla DS'li çocuklarında DKH sıklığı (%62,2) anlamlı derecede fazla saptanmıştır ( $p<0,05^*$ ). Sonuç olarak çalışmamızda Türk popülasyonunda doğumsal kalp hastalığı olan DS'li çocuk doğurma oranının, genç annelerde ileri yaş DS'li çocuk doğuran annelere göre daha sık olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeninin folat metabolizması ile ilişkili genlerdeki polimorfizmlerle ve/veya gen-çevre etkileşimine (sigara, alkol, gebelikte yetersiz folat alımı gibi ) bağlı olarak artmış hcy düzeyinin genç annelerde DS'li etkilenmiş gebeliklerin sağkalım oranını arttırdığı ileri sürülen literatürde çalışmalar mevcuttur (144).DS'li olgularda ilk 2 yıllık yaşamda mortalitenin başlıca sebebi kardiyak malformasyonlardır (51). Folatın KVS gelişimi sürecinde kritik bir role sahip olduğu biliniyor. Ancak folat metabolizmasının hangi mekanizmalar aracılığıyla KKH oluşumuna karşı koruduğu bilinmemektedir. Bizim çalışmamız folik asit desteği alan anne sayısının azlığı ve hatırlanamayan



veya bilgi veremeyen bireylerin çoğunlukta olması nedeniyle alınan verilerin demonstratif olmadığını ve maternal folik asit alımının DKH üzerine muhtemel etkisini tespit edebilecek yeterlilikte değildi.

## 6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda literatüreki MTHFR gen polimorfizminin down sendromlu çocuk doğurma açısından maternal risk faktörü olabileceği bulgularından yola çıkarak Türk popülasyonunda Down sendromlu çocuk sahibi annelerde yaş gruplarını da dikkate alarak MTHFR gen polimorfizmlerinin ve down sendromlu çocuk doğurma açısından maternal bir risk faktörü olup olmadığı araştırılmıştır. Bizim çalışmamız MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmleri ile birlikte analiz edildiğinde DS ile folat/hcy yolağındaki genetik polimorfizmler arasında bir ilişki olduğunu desteklememektedir. Sonuç olarak çalışmamızda MTHFR gen polimorfizmlerinin down sendromlu çocuk doğurma açısından bağımsız bir maternal risk faktörü olmadığı sonucuna varılmıştır. Ancak; bu çalışmanın olgu sayısının genişletilmesi ve homosistein seviyelerinin ölçümü ile bir ilişki kurularak değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Bugünkü elde edilen sonuçlarla Down sendromu ile maternal folat metabolizması arasında öne sürülen bu ilişki ile ilgili olarak bu paradigmayı değerlendirmek için daha fazla araştırmaya gereksinim olduğunu söyleyebiliriz.

Farklı topluluklarda görülen tutarsız sonuçlar, folat metabolizmasına karışan genetik ve çevresel etkileşimleri yansıtıyor olabilir. Risk faktörleri, gen çevre etkileşimine bağlı olabilir. Özellikle de bu polimorfizmlerin etkileri devamı folik asit kullanımına bağlı olabilir. Bizim çalışmamızda maternal folik asit kullanımı ile DS riski ilişkisiz bulunmuştur. Maternal folik asit alımı ile genotip etkileşimlerin incelenebilmesi ve bu ilişkinin geniş örnekli çalışmalar ile gelecekteki araştırmalar içinde sorgulanması gereklidir. Sonuç olarak trizomi 21 oluşumunun nedenlerini birbirinden ayırabilecek, folat homosistein gen polimorfizimleri ile arasındaki bağlantıları gösterebilecek daha spesifik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Özet olarak, insan nondisjunctionu multifaktöriyel tehdit oluşturmaktadır. Bu tehdit parçalarına ayrılarak bağlantılı olan risk faktörleri belirlenmelidir. Gebelikte tüm tarama yöntemlerine rağmen Down sendromlu gebeliklerin büyük kısmı prenatal olarak tespit edilememektedir. Folat yolağında görevli olan diğer aday gen çalışmaları kadar down sendromlu etkilenmiş gebeliği olan

kadınlardaki folat metil metabolizmasını içeren genlerin mikronutrisyonlar ile etkileşiminin sistematik çalışmalarının, down sendromunu önlemede halk sağlığı stratejilerinin geliştirilmesi için fırsatlar sağlayabileceği düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Jyothy A, Kumar KS, Mallikarjuna GN, Babu Rao V, et al. (2001). Parental age and the origin of extra chromosome 21 in Down syndrome. *J. Hum. Genet.* 46: 347-350.
2. Smith, G, Berg, J, 1995. Down's Anomaly, 2nd Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh and New York
3. Boué, J., Boué, A., Lazar, P., Gueguen, S., 1975. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1506 karyotyped spontaneous abortions. *Teratology*, 12(1):11-26. [doi:10.1002/tera.1420120103]
4. Hassold, T.J., Jacobs, P.A., 1984. Trisomy in man. *Ann. Rev. Genet.*, 18(1):69-97. [doi:10.1146/annurev.ge.18.120184.000441]
5. Freeman, S, Grantham, M., Hassold, T., Pettay, D., Takaesu, N., 1991. Cytogenetic and molecular studies of human spontaneous abortions. *Am. J. Hum. Genet. Suppl. A*, 49:9-16.
6. S.E. Antonarakis, M.B. Petersen, M.G. McInnis, P.A. Adelsberger, A.A. Schinzel, F. Binkert, C. Pangalos, O. Raoul, S.A. Slaugenhaupt, M. Hafez, The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms, *Am. J. Hum. Genet.* 50 (1992) 544–550.
7. N.E. Lamb, K. Yu, J. Shaffer, E. Feingold, S.L. Sherman, Association between maternal age and meiotic recombination for trisomy 21, *Am. J. Hum. Genet.* 76 (2005) 91–99.
8. T.R. Oliver, E. Feingold, K. Yu, V. Cheung, S. Tinker, M. Yadav-Shah, N. Masse, S.L. Sherman, New insights into human nondisjunction of chromosome 21 in oocytes, *PLoS Genet.* 4 (2008) e1000033.
9. M.A. Hulthe´ n, S.D. Patel, M. Tankimanova, M. Westgren, N. Papadogiannakis, A.M. Jonsson, E. Iwarsson, On the origin of trisomy 21 Down syndrome, *Mol. Cytogenet.* 18 (2008) 21.
10. F.Coppede`, The complex relationship between folate/homocysteine metabolism and risk of Down syndrome. *Mutation Research* 682 (2009) 54–70

11. Young S.S, B. Eskenazi, F.M. Marchetti, G. Block, A.J. Wyrobek, The association of folate, zinc and antioxidant intake with sperm aneuploidy in healthy nonsmoking men, *Hum. Reprod.* 23 (2008) 1014–1022.
12. Shao-shuai WANG, Fu-yuan QIAO, Ling FENG, Juan-juan LV. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in China. Wang et al. / *J Zhejiang Univ Sci B* 2008 9(2):93-99
13. O’Leary V.B, Parle-McDermott A, Molloy A.M, Kirke P.N, Johnson Z, Conley M, Scott J.M, Mills J.L, MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? *Am. J. Med. Genet.* 107 (2002) 151–155.
14. Biselli J.M, Goloni-Bertollo E.M, Zampieri B.L, Haddad R, Eberlin M.N and Pavarino-Bertelli E.C. Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil. *Genetics and Molecular Research* 7 (1): 33-42 (2008)
15. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, et al. (1999). Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 495-501.
16. Grillo L.B, Aca’cio G.L, Barini R, Pinto Jr. W, Bertuzzo C.S, Mutations in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene and Down syndrome, *Cad. Saude Publica* 18 (2002) 1795–1797.
17. L.R. da Silva, N. Vergani, C. Galdieri Lde, M.P. Ribeiro Porto, S.B. Longhitano, D. Brusoni, V. D’Almeida, A.B. Alvarez, Perez, Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down syndrome in Brazil, *Am. J. Med. Genet. A* 135 (2005) 263–267.
18. L. Acacio, R. Barini, C.S. Bertuzzo, E.C. Couto, J.M. Annichino-Bizzacchi, W.P. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with trisomy 21, *Prenat. Diagn.* 25 (2005) 1196–1199.
19. Scala I, Granese B, Sellitto M, Salome S, et al. (2006). Analysis of seven maternal polymorphisms of genes involved in homocysteine/folate metabolism and risk of Down syndrome offspring. *Genet. Med.* 8: 409-416.
20. Coppede` F, Marini G, Bargagna S, Stuppia L, Minichilli F, Fontana I, Colognato R, Astrea G, Palka G, Migliore L, Folate gene polymorphisms and the risk of

- Down syndrome pregnancies in young Italian women, *Am. J. Med. Genet. A* 140 (2006) 1083–1091.
21. Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, et al. (2000). Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 623-630.
  22. Chadeaux- Vekemans B, Coude' M, Muller F, Oury J.F, Chabli A, Jar's J, P. Kamoun, Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in the etiology of Down syndrome, *Pediatr. Res.* 51(2002)766–767.
  23. Stuppia L, Gatta V, Gaspari A.R, Antonucci I, Morizio E, Calabrese G, G. Palka, C677T mutation in the 5.10-MTHFR gene and risk of Down syndrome in Italy, *Eur. J. Hum. Genet.* 10 (2002) 388–390.
  24. Bosco P, Gueant-Rodriguez R.M, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, Roman A, Romano C, Gueant J.L, Methionine synthase (MTR)2756(A>G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR)66AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome, *Am. J. Med. Genet. A* 121 (2003) 219–224.
  25. Sheth J.J, Sheth F.J, Gene polymorphism and folate metabolism: a maternal risk factor for Down syndrome, *Indian Pediatr.* 40 (2003) 115–123.
  26. N. Takamura, T. Kondoh, S. Ohgi, K. Arisawa, M. Mine, S. Yamashita, K. Aoyagi, Abnormal folic acid-homocysteine metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in Japan, *Eur. J. Nutr.* 43 (2004) 285–287.
  27. Bodurođlu K, Alanay Y, Koldan B, Tuñçbilek E, Methylenetetrahydrofolate reductase enzyme polymorphisms as maternal risk for Down syndrome among Turkish women, *Am. J. Med. Genet. A* 127 (2004) 5–10.
  28. Chango A, Fillon-Emery N, Mircher C, Ble'haut H, Lambert D, Herbeth B, James S.J, Re'thore' M.O, Nicolas J.P, No association between common polymorphisms in genes of folate and homocysteine metabolism and the risk of Down's syndrome among French mothers, *Br. J. Nutr.* 94 (2005) 166–169.
  29. Rai A.K, Singh S, Mehta S, Kumar A, Pandey L.K, Raman R, MTHFR C677T and A1298C polymorphisms are risk factors for Down's syndrome in Indian mothers, *J. Hum. Genet.* 51 (2006) 278–283.

30. Martı́nez-Frı́as M.L, Pe´ rez B, Desviat L.R, Castro M, Leal F, Rodrı́guez L, Mansilla E, Martı́nez-Ferna´ndez M.L, Bermejo E, Rodrı́guez-Pinilla E, Prieto D, Ugarte M, ECEMC Working Group, Maternal polymorphisms 677C-T and 1298A-C of MTHFR, and 66A-G MTRR genes: is there any relationship between polymorphisms of the folate pathway, maternal homocysteine levels, and the risk for having a child with Down syndrome? *Am. J. Med. Genet. A* 140 (2006) 987–997.
31. Wang W, Xie W, Wang X, The relationship between polymorphism of gene involved in folate metabolism, homocysteine level and risk of Down syndrome, *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 24 (2007) 533–537.
32. Meguid N.A, Dardir A.A, Khass M, Hossieny L.E, Ezzat A, El M.K, Awady, MTHFR genetic polymorphism as a risk factor in Egyptian mothers with Down syndrome children, *Dis. Markers* 24 (2008) 19–26
33. Kohli U, Arora S, M. Kabra, L. Ramakrishnan, S. Gulati, R.M. Pandey, Prevalence of MTHFR C677T polymorphism in north Indian mothers having babies with Trisomy 21 Down syndrome, *Downs Syndr. Res. Pract.* 12 (2008) 133–137.
34. Santos-Rebouc C.B, Correˆa J.C, Bonomo A, Fintelman- Rodrigues N, Moura K.C, Rodrigues C.S, Santos J.M, Pimentel M.M, The impact of folate pathway polymorphisms combined to nutritional deficiency as a maternal predisposition factor for Down syndrome, *Dis. Markers* 25 (2008) 149–157.
35. Coppede` F, Migheli F, Bargagna S, Siciliano G, Antonucci I, Stuppia L, Palka G, Migliore L, Association of maternal polymorphisms in folate metabolizing genes with chromosome damage and risk of Down syndrome offspring, *Neurosci. Lett.* 449 (2009) 15-19.
36. Pozzi E, Vergani P, Dalpra` L, Combi R, Silvestri D, Crosti F, Dell Orto M, Valsecchi M.G, Maternal polymorphisms for methyltetrahydrofolate reductase and methionine synthetase reductase and risk of children with Down syndrome, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 200 (2009) 636.e1–636.e6.
37. Biselli J.M, Brumati D, Frigeri V.F, Zampieri B.L, Goloni-Bertollo E, Pavarino-Bertelli E.C, A80G polymorphism of reduced folate carrier 1 (RFC1) and C776G

- polymorphism of transcobalamin2 (TC2) genes in Down's syndrome etiology, Sao Paulo Med. J. 126(2008)329–332.
38. Zhu J.L, Madsen K.M, Vestergaard M, Olesen A.V, Basso O, Olsen J, Paternal age and congenital malformations, Hum. Reprod. 20 (2005)3173–3177
  39. Has R. Fetal sendromların sonografik tanısı:Yüksel A (eds). Obstetrik ve Jinekolojide Sonografi:Prensip ve Klinik uygulamalar. 5.baskı. İstanbul, Ulusal Tıp Kitabevi;2000;493-571.
  40. Patterson D, Folate metabolism and the risk of Down syndrome, Downs Syndr. Res. Pract.12(2008)93–97.
  41. Alphan Cura, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları,Basım 1999
  42. Katkı Pediatri Dergisi 1997;5:557-66
  43. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson Genetics in Medicine, 6th edn. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001: 157-162.
  44. Başaran N. Tıbbi Genetik, 7.baskı. Bursa: Güneş & Nobel Tıp Kitabevi, 1999:180-195, 250-256.
  45. Puschel SM, Sassaman EA, Scola PS, Thuline HC, et al: Biomedical aspects in Down syndrome, in Puschel SM, Rynders JE (eds): Down Syndrome. advances in biomedicine and the behavioral sciences. Cambridge, MA, Ware,1982,p 169.
  46. Buchin PJ, Levy JS, Schullinger JN. Down's syndrome and gastrointestinal tract. J Clin Gastroenterol 1986; 8:111-4
  47. Granzotti JA, Paneto IL, Amaral FT, Nunes MA. Incidence of heart defects in Down syndrome. J Pediatr (Rio J). 1995; 71:28-30.
  48. Freeman SB, Taft LF, Dooley KJ, Allran K, et al. Populationbased study of congenital heart defects in Down syndrome. Am J Med Genet 1998, 80:213-7.
  49. Reller MD, Morris CD. Is Down syndrome a risk factor for poor outcome after repair of congenital heart disease? J Pediatr 1998; 132: 738-41.
  50. Torfs CP, Christianson RE. Anomalies in Down syndrome individuals in a large population-based registry. Am J Med Genet 1998;77:431-8.
  51. Kabbani MS, Giridhar S, Elbarbary M, Elgamal MA, Najm H, Godman M. Postoperative cardiac intensive care outcome for Down syndrome children. Saudi Med J 2005; 26: 943-76.



52. Figueroa J. R, Magana B. P, Hach JL P, Jimenez C.C, Jimenez C. C, et al. Heart malformations in children with Down syndrome. *Rev Esp Cardiol*. 2003 Sep; 56(9):894-9.
53. Hayes C, Johnson Z, Thornton L, Fogarty J, Lyons R, et al. Ten year survival of Down syndrome births. *Int J Epidemiol* 1997;4:822-29.
54. Öztürk B. Down Sendromunda Konjenital Kalp Hastalığı: 566 Hastada Prevalansı ve Prognozu Etkileyen Faktörlerin İncelenmesi. İstanbul 2001.
55. Kuzucu A, Vidinlisan S, Kibar A.E, Ekici F, Alpan N, Çakır H.T. Down sendromunda konjenital kalp hastalığı sıklığının ve ekokardiyografik bulguların değerlendirilmesi. *Genel Tıp Derg* 2008;18(3):105-110
56. Kallén B, Mastroiacova P, Robert E. Major congenital malformations in Down syndrome. *Am J Med Genet* 1996; 65:160-6.
57. Zitelli J.B, Davis W.H, Atlas of Pediatric Physical Diagnosis. 4th Edition
58. Levy J: The gastrointestinal tract in down syndrome, in Epstein CJ (ed): *The Morphogenesis of Down Syndrome*. New York, Wiley-liss, 1991, p 245
59. Suyugül Z. Down Sendromu olgularında göz bulguları. *Uzmanlık Tezi*. İstanbul 1990:11-2
60. Epstein CS. Down Syndrome. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The Metabolic And Molecular Basis Of Inherited Disease*. CD-Ropm, 7th ed. The McGraw- Hill Companies 1997.
61. Rosner F, Ong BH, Paine RS, Mahanand D: Blood-serotonin activity in trisomic and translocation Down syndrome. *Lancet* 1:1191, 1965
62. Lejeune J. Pathogenesis of mental deficiency in trisomy 21. *Am Med Genet* 1990; 7: 20-30.
63. Wisniewski KE, Wisniewski HM, Wen GY: Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer' disease in down syndrome. *Ann Neurol* 17: 278, 1985.
64. Kriviz W. Good RA. Simultaneous Occurrence of Mongolizm and Leukemia. *Am J Dis Child* 1957;94:289-98.
65. *Lancet Oncol* 2001;2:429-36.

66. Ravindranath Y, Abella E, Krischer JP, et al. Acute myeloid leukemia (AML) in Down's Syndrome is highly responsive to chemotherapy: experience on Pediatric Oncology Group AML Study 8498. *Blood* 1992;80: 2210-14.
67. Miller JC, Scherrill JG, Hathaway WE: Thrombocythemia in the myeloproliferative disorders of Down's syndrome. *Pediatrics* 40:847,1967.
68. İter, Ö., Hatemi, N., Tümay, S.B.: Down's syndrome and Dysgammaglobulinemia type IV; *Med. Bull İstanbul*, 1, 282, 1968.
69. Nelson, T.L., Calif, E.: Serum Protein, Lipoprotein Fractions in Mongolism; *Amer. Jour. Dis. Child.* 102, 115, 1961.
70. Luigi M. Larocca, Libero Lauriola, Franco O. Ranelletti, Mauro Piantelli, Nicola Maggiano, Riccardo Ricci, and Arnaldo Capelli. Morphological and Immunohistochemical Study of Down Syndrome Thymus. *American Journal of Medical Genetics Supplement* 7:225-230, 1990.
71. Fort P, Lifshitz F, Bellisario R, Davis J, Lanes R, et al. Abnormalities of thyroid function in infants with Down syndrome. *J Pediatr* 104:545, 1984.
72. Sare Z, Ruvalcaba RHA, Kelley VC: Prevalence of thyroid disorder in Down syndrome. *Clin Genet* 14: 154, 1978.
73. Loudon NM, Day RE, Duke EM. Thyroid Dysfunction in Down's syndrome: *Arch Dis child* 1985; 60: 1149-51
74. Günöz H, Öcal G, Yordam N, Kurtoğlu S. *Pediatric Endocrinoloji* 1. Basım 2003.
75. Cronk C, Crocker AC, Pueschel SM, Shea, AM, et al: Growth charts for children with Down syndrome: 1 month to 18 years of age. *Pediatrics* 81: 102, 1988.
76. Pueschel SM, Orson JM, Boylan JM, Pezzullo JC. Adolescent development in males with Down syndrome.; *American Journal of Diseases of Children.* 1985; 139: 236-23
77. Castelão TB, Schiavo MR, Jurberg P. Sexuality in Down syndrome individuals.; *Rev Saude Publica.* 2003 Feb; 37(1):32-9.
78. Hojager B, Peters H, Byskov AG, Faber M: Follicular development in ovaries of children with Down syndrome. *Acta paediatr Scand* 67:637, 1978.
79. [http://hacettepehemsirelikdergisi.org/pdf/pdf\\_HHD\\_69.pdf](http://hacettepehemsirelikdergisi.org/pdf/pdf_HHD_69.pdf)
80. Bektaş S. *Fetal Tıp, Prenatal Tanı Medical Networks Nobel*, 1996

81. Seyfettin ULUDAĞ, Prenatal tanı amacıyla yapılan girişimlerde komplikasyonlar ve zamanlama. *Perinatoloji Dergisi*, Cilt:7, Sayı: 4/Aralık 1999 s:281:289
82. Marsk A, Grunewald C, Saltvedt S, Valentin L, Almstrom H. If nuchal translucency screening is combined with first-trimester serum screening the need for fetal karyotyping decreases. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006; 85: 534-8.
83. Cicero S, Avgidou K, Rembouskos G, Kagan KO, Nicolaides KH. Nasal bone in first-trimester screening for trisomy 21. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 109-14.
84. Aylin Başgöl Yiğiter, Zehra Neşe Kavak Anne Karnında Down Sendromu Tanısına Güncel Yaklaşımlar ve Bir Olgu Sunumu *Türk Aile Hek Derg* 2006; 10(4): 178-182
85. Snijders RJ, Sundberg K, Holzgreve W, Henry G, Nicolaides KH. Maternal age- and gestation-specific risk for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999;13:167-70.
86. Wald N, Rodeck C, Hackshaw A, Rudnicka A. SURUSS in perspective. *Seminars in perinatology*,2005; 29 (4): 225-235.
87. Ukudeeva, A, İlhan H, Kavak ZN, Pekin T, Gökaslan H. Down sendromu taramasında ilk trimester tarama testi ile üçlü testin karşılaştırılması. *Türkiye Klinikleri Jinekoloji Obstetrik Dergisi* 2003; 13: 194-8.
88. Ville Y. How to improve the screening and diagnosis of fetal aneuploidy? *Bull Acad Natl Med* 2005;189:1773-84.
89. Nicolaides KH. 11-14.Hafta Ultrasonu: Fetal Anomalilerin Tanısı. İstanbul, Kanaat Basımevi, 2003:7-57.
90. Conde-Agudelo A, Kafury-Goeta AC. Triple-marker test as screening for Down syndrome: a meta-analysis. *Obstet Gynecol Surg* 1998; 53: 369-76.
91. Shipp TD, Benacerraf BR. Second trimester ultrasound screening for chromosomal abnormalities. *Prenat Diagn* 2002;22: 296-307
92. Nicolaides KH. 11-14.Hafta Ultrasonu: Fetal Anomalilerin Tanısı. İstanbul, Kanaat Basımevi, 2003:7-57.
93. Benacerraf BR, Nadel A, Bromley B. Identification of second-trimester fetuses with autosomal trisomy by use of a sonographic scoring index. *Radiology* 1994; 193: 135-40

94. Benacerraf BR. Should sonographic screening for fetal Down syndrome be applied to low risk women? *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000; 15: 451-5
95. L.B. Bailey, J.F. Gregory III, Folate metabolism and requirements, *J. Nutr.* 129 (1999) 779–782.
96. R. Zhao, L.H. Matherly, I.D. Goldman, Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues, *Expert Rev. Mol. Med.* 11 (2009) e4.
97. M. Fenech, The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells, *Mutat. Res.* 475 (2001) 57–67.
98. D. Lin, H. Li, W. Tan, X. Miao, L. Wang, Genetic polymorphisms in folate-metabolizing enzymes and risk of gastroesophageal cancers: a potential nutrient– gene interaction in cancer development, *Forum Nutr.* 60 (2007) 140–145.
99. P. Bolufer, E. Barragan, M. Collado, J. Cervera, J.A. Lopez, M.A. Sanz, Influence of genetic polymorphisms on the risk of developing leukemia and on disease progression, *Leuk. Res.* 30 (2006) 1471–1491.
100. Kono, K. Chen, Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and colorectal cancer and adenoma, *Cancer Sci.* 96 (2005) 535–542.
101. C.F. Skibola, M.S. Forrest, F. Coppede, L. Agana, A. Hubbard, M.T. Smith, P.M. Bracci, E.A. Holly, Polymorphisms and haplotypes in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma, *Blood* 104 (2004) 2155–2162.
102. E. Trabetti, Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms and cardiovascular risk, *J. Appl. Genet.* 49 (2008) 267–282.
103. Y.M. Smulders, C.D. Stehouwer, Folate metabolism and cardiovascular disease, *Semin. Vasc. Med.* 5 (2005) 87–97.
104. G. Anello, R.M. Gueant-Rodriguez, P. Bosco, J.L. Gueant, A. Romano, B. Namour, R. Spada, F. Caraci, G. Pourie, J.L. Daval, R. Ferri, Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in Alzheimer's disease, *Neuroreport* 15 (2004) 859–861.

105. X.H. Bi, H.L. Zhao, Z.X. Zhang, J.W. Zhang Association of RFC1 A80G and MTHFR C677T polymorphisms with Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging*, in press. N.M. van der Put, H.W. van Straaten, F.J. Trijbels, H.J. Blom, Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview, *Exp. Biol. Med.* 226 (2001)
106. Van der Put N. M, van Straaten F.J., Tribels H.J., Blom, Folat, Homocysteine and neural tube defects on overview. *Exp. Biol. Med.* 226(2001)243-270
107. A.M. Molloy, L.C. Brody, J.L. Mills, J.M. Scott, P.N. Kirke, The search for genetic polymorphisms in the homocysteine/folate pathway that contribute to the etiology of human neural tube, *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 85 (2009) 285–294.
108. L.H. Matherly, D.I. Goldman, Membrane transport of folates, *Vitam. Horm.* 66 (2003) 403–456.
109. V. Purohit, M.F. Abdelmalek, S. Barve, N.J. Benevenga, C.H. Halsted, N. Kaplowitz, K.K. Kharbanda, Q.Y. Liu, S.C. Lu, C.J. McClain, C. Swanson, S. Zakhari, Role of Sadenosylmethionine, folate and betaine in the treatment of alcoholic liver disease: summary of a symposium, *Am J Clin Nutr.* 86 (2007) 14–
110. Hol F.A, van der Put N.M, M.P. Geurds, S.G. Heil, F.J. Trijbels, B.C. Hamel, E.C. Mariman, H.J. Blom, Molecular genetic analysis of the gene encoding the trifunctional enzyme MTHFD (methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase, methenyltetrahydrofolate-cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase) in patients with neural tube defects, *Clin. Genet.* 53 (1998)119–125.
111. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R, A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity, *Mol. Genet. Metab.* 64(1998)169–172.
112. Gellekink H, den Heijer M, Heil S.G, Blom H.J, Genetic determinants of plasma total homocysteine, *Semin. Vasc. Med.* 5(2005)98–109.
113. Ulvik A, Ueland P.M, Fredriksen A, Meyer K, Vollset S.E, Hoff G, Schneede J, Functional inference of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C > T and 1298A > C polymorphisms from a large-scale epidemiological study, *Hum. Genet.* 121 (2007)57–64.

114. Ueland P.M, Hustad S, Schneede J, Refsum H, S.E. Vollset, Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism, *Trends Pharmacol. Sci.* 22(2001) 195–201.
115. Strandhagen E, Zetterberg H, Aires N, Palme'r M, Rymo L, Blennow K, Landaas S, Thelle D.S, The methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is amajor determinant of coffee-induced increase of plasma homocysteine: a randomized placebo controlled study, *Int. J. Mol. Med.* 13 (2004)811–815.
116. Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews R.G, Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 14853–14858.
117. Antonarakis S.E, Down Syndrome, in: Jameson J.L (Ed.), *Principles of Molecular Medicine*, Humana Press Inc, Totowa, NJ, 1998, pp.1069–1078.
118. Lamb N.E, Freeman S.B, Savage-Austin A, Pettay D, Taft L, Hersey J, Gu Y, Shen J, Saker D, May K.M, Avramopoulos D, Petersen M.B, Hallberg A, Mikkelsen M, Hassold T.J, Sherman S.L, Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II, *Nat. Genet.* 14(1996)400–405.
119. Lamb N.E, Feingold E, Sherman S.L, Estimating meiotic exchange patterns from recombination data: an application to humans, *Genetics* 146(1997)1011–1017.
120. Karpen G.H, Allshire R.C, The case for epigenetic effects on centromere identity and function, *Trends Genet.* 13(1997)489–496.
121. Wang X, Thomas P, Xue J, Fenech M, Folate deficiency induces aneuploidy in human lymphocytes in vitro-evidence using cytokinesis-blocked cells and probes specific for chromosomes 17 and 21, *Mutat. Res.* 551(2004)167–180.
122. Waterland R.A, Jirtle R.J, Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation, *Mol. Cell. Biol.* 23(2003)5293–5300.
123. D.J. Lees-Murdock, C.P. Walsh, DNA methylation reprogramming in the germ line, *Epigenetics* 3 (2008) 5–13.

124. J. Buard, B. de Massy, Playing hide and seek with mammalian meiotic crossover hotspots, *Trends Genet.* 23 (2007) 301–309.
125. Scala, B. Granese, A. Lisi, P. Mastroiacovo, G. Andria, Response to “folate gene polymorphisms and the risk of Down syndrome pregnancies in young Italian women” by F. Coppede` et al. (2006), *Am. J. Med. Genet. A* 143 (2007) 1015–1017.
126. N.V. Kovaleva, M. Tahmasebi-Hesari, Detection of gonadal mosaicism in parents of children with Down syndrome, *Tsitol. Genet.* 41 (2007) 36–42.
127. L. Migliore, G. Boni, R. Bernardini, F. Trippi, R. Colognato, I. Fontana, F. Coppede`, I. Sbrana, Susceptibility to chromosome malsegregation in lymphocytes of women who had a Down syndrome child in young age, *Neurobiol. Aging* 27 (2006) 710–716.
128. K.R. Wolthers, N.S. Scrutton, Cobalamin uptake and reactivation occurs through specific protein interactions in the methionine synthase-methionine synthase reductase complex, *FEBS J.* 276 (2009) 1942–1951.
129. K.R. Wolthers, N.S. Scrutton, Protein interactions in the human methionine synthase-methionine synthase reductase complex and implications for the mechanism of enzyme reactivation, *Biochemistry* 46 (2007) 6696–6709.
130. Fredriksen, K. Meyer, P.M. Ueland, S.E. Vollset, T. Grotmol, J. Schneede, Largescalepopulation-based metabolic phenotyping of thirteen genetic polymorphisms related to one-carbon metabolism, *Hum. Mutat.* 28 (2007) 856–865.
131. A.C. Ale´ ssio, J.M. Annichino-Bizzacchi, S.P. Bydlowski, M.N. Eberlin, A.P. Vellasco, N.F. Ho¨ ehr, Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and homocysteine levels in Brazilian children, *Am. J. Med. Genet. A.* 128 (2004) 256–260.
132. Q.H. Yang, L.D. Botto, M. Gallagher, J.M. Friedman, C.L. Sanders, D. Koontz, S. Nikolova, J.D. Erickson, K. Steinberg, Prevalence and effects of gene-gene and gene-nutrient interactions on serum folate and serum total homocysteine concentrations in the United States: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey DNA Bank, *Am. J. Clin. Nutr.* 88 (2008) 232–246.

133. Z. Hou, L.H. Matherly, Oligomeric structure of the human reduced folate carrier: identification of homo-oligomers and dominant-negative effects on carrier expression and function, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 3285–3293.
134. N. Horie, H. Aiba, K. Oguro, H. Hojo, K. Takeishi, Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 50-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase, *Cell. Struct. Funct.* 20 (1995) 191–197.
135. C.M. Ulrich, J. Bigler, R. Bostick, L. Fosdick, J.D. Potter, Thymidylate synthase promoter polymorphism, interaction with folate intake, and risk of colorectal adenomas, *Cancer Res* 62 (2002) 3361–3364.
136. L.C. Brody, M. Conley, C. Cox, P.N. Kirke, M.P. McKeever, J.L. Mills, A.M. Molloy, V.B. O’Leary, A. Parle-McDermott, J.M. Scott, D.A. Swanson, A polymorphism, R653Q, in the trifunctional enzyme methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methenyltetrahydrofolatecyclohydrolase/formyltetrahydrofolate synthetase is a maternal genetic risk factor for neural tube defects: report of the Birth Defects Research Group, *Am. J. Hum. Genet.* 71 (2002) 1207–1215.
137. Christensen K.E, Rohlicek C.V, Andelfinger G.U, J. Michaud, J.L. Bigras, A. Richter, R.E. Mackenzie, R. Rozen, The MTHFD1 p.Arg653Gln variant alters enzyme function and increases risk for congenital heart defects, *Hum. Mutat.* 30 (2009) 212–220.
138. Hall C.A, The carriers of native vitamin B12 in normal human serum, *Clin. Sci. Mol. Med.* 53 (1977) 453–457. [123] R. Carmel, The distribution of endogenous cobalamin among cobalamin-binding proteins in the blood in normal and abnormal states, *Am. J. Clin. Nutr.* 41(1985)713–719.
139. Carmel R, The distribution of endogenous cobalamin among cobalamin-binding proteins in the blood in normal and abnormal states, *Am. J. Clin. Nutr.* 41(1985)713–719.
140. von Castel-Dunwoody K.M, Kauwell G.P, Shelnutt K.P, Vaughn J.D, Griffin E.R, Maneval D.R, Theriaque D.W, Bailey L.B, Transcobalamin C776G



- polymorphism negatively affects vitamin B-12 metabolism, *Am. J. Clin. Nutr.* 81(2005)1436–1441.
141. D. Patterson, Folate metabolism and the risk of Down syndrome, *Downs Syndr. Res. Pract.* 12 (2008) 93–97.
  142. Nussbaum R.L, McInnes R.R, Willard H.F, Conelius F.B.II: Thompson & Thompson Tıbbi Genetik, 6. Baskı, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Saunders, (2005).
  143. Strachan T,Read A.P: *Human Molecular Genetics 2*, 2nd Edition, BIOS Scientific Publishers, Ltd, Oxford, UK,(1999).
  144. Brandalize A.P. C, Bandinelli E, Almeida dos Santos P, Roisenberg I, and Schuler-Faccini L Evaluation of C677T and A1298C Polymorphisms of the MTHFR Gene as Maternal Risk Factors for Down Syndrome and Congenital Heart Defects *Am J Med Genet Part A* 149A:2080–2087.