



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Türk popülasyonunda maternal MTHFR geni polimorfizmleri ve Down sendromlu çocuk sahibi olma riski

Maternal polymorphisms of MTHFR gene and risk of Down syndrome offspring in Turkish population

Nurşen Keser¹, Ayfer Pazarbaşı², Lütfiye Özpak²

¹Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü; Adana, Turkey

²Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı; Adana, Turkey

Cukurova Medical Journal 2018;43(1):73-80.

Abstract

Purpose: The aim of this study was to determine the allele frequencies and genotype distributions of MTHFR (metylenetetrahydrofolat redüktaz) gene C677T and A1298C polymorphisms and investigate the relationship between these genotypes and folate and homocysteine levels for mothers that having children with down syndrome.

Materials and Methods: Two common variants C677T and A1298C of the MTHFR gene were screened in mothers with down syndrome children (n=67) and control mothers with healthy children (n=66) from Çukurova region of Turkey. The MTHFR genotypes were studied by RFLP analysis of PCR-amplified products.

Results: The difference between case and control groups was found to be statistically significant in terms of genotype and allele frequencies for C677T polymorphism. While the rate of T allele frequency (%53.7) was detected great in case group, the rate of C allele frequency (%62.9) was determined great in control group. On the other hand, the difference between case and control groups wasn't found to be statistically significant in terms of genotype and allele frequencies for A1298C polymorphism. While the rate of C allele frequency (%40.8) was detected great in case group, the rate of A allele frequency (%70.3) was determined great in control group.

Conclusion: While C677T polymorphism is significantly associated with risk of having Down syndrome pregnancy, the A1298C polymorphism is not associated. The 1298C allele and 677T allele may be closely related to the risk of developing the having children with Down syndrome.

Key words: Down syndrome, folic acid, homocysteine, MTHFR, polymorphism.

Öz

Amaç: Bu çalışmada Down sendromlu çocuk sahibi olan hastalarda MTHFR (Metilentetrahydrofolat redüktaz) geni C677T ve A1298C polimorfizmleri allel frekansları ve genotip dağılımlarını belirlemek ve bu genotipler ile folat ve homosistein düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: MTHFR geninin iki yaygın varyantı C677T ve A1298C, Türkiye Çukurova Bölgesi'nde Down Sendromu tanısı almış çocukların annelerinde (hasta grubu, n=67) ve sağlıklı çocuk sahibi annelerde (kontrol grubu, n=66) araştırılmıştır. MTHFR genotipleri PZR amplifiye ürünlerinin RFLP analizi ile belirlenmiştir.

Bulgular: C677T polimorfizmi için genotip ve allel frekansları bakımından hasta ve kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Hasta grubunda T alleli frekansına ait oran (%53.7) yüksek iken kontrol grubunda C alleli frekansına ait oran (%62.9) yüksektir. Ayrıca A1298C polimorfizmi için genotip ve allel frekansları bakımından hasta ve kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Hasta grubunda C alleli frekansına ait oran (%40.8) yüksek iken kontrol grubunda A alleli frekansına ait oran (%70.3) yüksektir.

Sonuç: C677T polimorfizmi Down sendromlu çocuk sahibi olma durumu ile ilişkili iken A1298C polimorfizmi ilişkili değildir. 1298C alleli ile 677T alleli Down sendromu riski ile yakın ilişkili olabilir.

Anahtar kelimeler: Down sendromu, folik asit, homosistein, MTHFR, polimorfizm.

GİRİŞ

İkinci en küçük kromozom olan 21. kromozom Down Sendromu (DS) karyotipinde 3 tane tespit edilmiştir. Daha sonraki çalışmalar DS' nin en küçük kromozom trizomisi olduğunu göstermiştir. Kromozom 21 akrosentrik kromozomlardandır. 21. Kromozomun uzun kolunun (q11.1) proksimal (sentromere yakın) heterokromatik bölgesi β -satellit DNA'dan oluşmaktadır¹.

DS en sık görülen canlı doğan anöploididir Bu doğum defektinin çoğunluğu 21. kromozomda ayrılamama, parental gametogenez' de mayoz süresince kromozomların uygun biçimde ayrılmasında başarısızlıktan kaynaklanmaktadır. Diğer otozomal anöploidiler gibi DS'li doğumların yaklaşık %90'ı maternal oogeneze' de meydana gelen hatalardan kaynaklanmaktadır ve bunların büyük bir çoğunluğu I. Mayotik bölünmede meydana gelmektedir. DS'lu doğum için maternal risk faktörleri araştırıldığında ileri maternal yaş ve mayotik rekombinasyondaki hata, oositte 21. kromozom ayrılamaması altında yatan mekanizma ile ilişkili öne çıkan iki güçlü bağlantı olarak tespit edilmiştir^{2,3,4,5,6}.

Histon deasetilasyonu ve kromatin kondensasyonu için DNA metilasyonuna bağlı son değerlendirmeler, normal kromozom dağılımı için kromatin yapısında gerekli epigenetik değişimlere bağlı olabilen muhtemel DNA metilasyon modellerini desteklemektedir. Oositler gibi replike olmayan hücrelerde DNA'da metile CpG bölgelerinde metil gruplarının kaybı 5-metilsitozinin timine spontan deaminasyonu ile ya da replikasyonla ilişkili DNA sarmalı değişiminde kesip çıkarma onarımı sırasında meydana gelebilir. DNA metiltransferazın yeni sentezlenen ipliklerde remetilasyonunun başarısızlığında, folat/metil yetersizliği koşullarında DNA metilasyon modellerinin sürekli eksikliği ile sonuçlanabilir⁷.

Folat eksikliği anöploidi için bir risk faktörü olarak belirtilmiştir. Yetersiz folat içeren diyetle beslenmiş olan kadınlardan alınan lenfositlerde, anormal kromozom dağılımını temsil eden kinetokor pozitif mikronükleli frekansının arttığı tespit edilmiştir. Folatın eksik olduğu dönemden sonra folat desteği bu sentromerik fragmentlerde önemli bir azalma ile ilişkilendirilmiştir⁷. Folat eksikliğinden kaynaklanan homosisteinin birikimi plazmada artan homosistein düzeyleri ile sonuçlanmaktadır. Artmış intraselüler ve ekstraselüler değerler sitotoksik olmak için uygun

değerlerdir⁸.

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR), folat metabolizmasında anahtar bir enzimdir. MTHFR, 1998 yılında klonlanmış olup 102 bp'den 432 bp'ye değişen uzunluklarda 11 ekzondan oluşmaktadır. Normal MTHFR aktivitesi metionin ve folat döngüsünün devamına yardımcı olabilir ve homosistein oluşumunu önlemektedir. MTHFR geninde birçok polimorfizm bildirilmiştir. MTHFR C677T polimorfizmi, 4. ekzon 677. Pozisyonda sitozinin timine transisyonudur. Enzim aktivitesinde azalma ve alaninin valin yerine geçmesi ile sonuçlanmaktadır. T alleli için homozigotluk, Hcy seviyesini orta derecede yükselten azalmış enzim aktivitesi ile ilişkilidir. MTHFR A1298C polimorfizmi, 7.ekzon 1298. pozisyonda adeninin sitozine transisyonudur. Glutamatın alanine değişimi ile sonuçlanır. Enzim aktivitesi azalır fakat C677T allelindeki azalma ile aynı ölçüde değildir. Ayrıca, azalan MTHFR aktivitesi ile ilişkili olarak, down sendromlu çocukların annelerinin yüksek frekansta MTHFR C677T (Ala222Val) ve A1298C (Glu429Ala)'nin heterozigot polimorfizmine sahip olduğu belirtilmiştir^{9,10}. Bu çalışmada Down Sendromlu çocuk sahibi olma durumu ile MTHFR C677T ve A1298C polimorfizimleri ile homosistein ve folik asit düzeyleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta seçimi

Çalışma grupları Down Sendromu tanısı almış çocukların annelerinden (hasta grubu, n=67) ve herhangi bir hastalık tanısı almamış normal çocuk sahibi annelerden (kontrol grubu, n=66) oluşturulmuştur. Down sendromu ya da herhangi bir sendrom şüphesiyle küretaj geçmişi bulunan anneler kontrol grubuna dahil edilmemiştir. Bu çalışmaya katılan annelerin, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (02.05.2013 tarih ve 19/8 nolu karar) Araştırma Projesi Bilgi ve Taahhüt Formunda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmış onam formlarını doldurmalari sağlanmıştır.

DNA izolasyonu ve polimorfizimler

DNA izolasyonu için EDTA' lı tüpe kan alınmıştır. Periferik kandan DNA eldesi için Miller ve arkadaşlarının geliştirdiği salting out (tuzla

çöktürme) yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır¹¹. DNA konsantrasyonu ve saflık derecesini belirlemek için UV (ultraviyole) spektrofotometresi kullanılmıştır.

Çalışmamızda MTHFR (Gen ID: 4524) gen polimorfizmlerinin belirlenmesi için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), 200 ng DNA, 25mM dNTP, 10 pmol primerler, 1 ünite Taq Polimeraz ve 2.5 µl tampon çözelti kullanılarak toplam konsantrasyon 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. A1298C polimorfizminin belirlenmesi için forward primer 5'-GGG AGG AGC TGA CCA GTG CAG-3' ve reverse primer 5'- GGG GTC AGG CCA GGG GCA G-3'dizilimi kullanılarak PZR yöntemi ile 138 bç'lik bölge çoğaltılmıştır. PZR koşulları 95°C' de 3dk ön denatürasyon, 95°C 'de 45sn denatürasyon, 62°C' de 30 sn yapışma, 72°C' de 30 sn sentez olmak üzere 30 döngü, 72°C'de 5 dk final uzama ve 4°C'de saklama şeklinde uygulanmıştır. A1298C polimorfizminin tespiti için *Fnu4HI* restriksiyon enzimi (New England Biolab) kullanılarak 10 µl PZR ürünü 37°C' de 1 gece bekletilmiştir. Kesim reaksiyonu sonucunda adenine-sitozin (A>C) nükleotit değişimi olmayan homozigot bireylerde (AA genotipli) 138 bç' lik tek bant, tek allelinde nükleotit değişimi olan heterozigot bireylerde (AC genotipli) 138, 119, 19 bç' lik üç bant, her iki allelinde nükleotit değişimi görülen bireylerde de (CC genotipli) 119, 19 bç' lik 2 bant görülmüştür.

C677T polimorfizminin belirlenmesi için forward primer 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' ve reverse primer 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3' dizilimi kullanılarak PZR yöntemi ile 198 bç' lik bölge çoğaltılmıştır. PZR koşulları 94°C' de 2dk ön denatürasyon, 94°C 'de 30sn denatürasyon, 62°C' de 30 sn yapışma, 72°C' de 30 sn sentez olmak üzere 40 döngü, 72°C'de 7 dk final uzama ve 4°C'de saklama şeklinde uygulanmıştır. C677T polimorfizminin tespiti için *HinfI* restriksiyon enzimi (New England Biolab) kullanılmıştır. 10 µl PZR ürünü 37°C' de 1 gece bekletilmiştir. Kesim reaksiyonu sonucunda sitozin-timin (C>T) nükleotit değişimi olmayan homozigot bireylerde (CC genotipli) 198 bç' lik tek bant, tek allelinde nükleotit değişimi olan heterozigot bireylerde (CT genotipli) 198, 175, 23 bç' lik üç bant, her iki allelinde nükleotit değişimi görülen bireylerde de (TT genotipli) 175, 23 bç' lik iki bant oluşmuştur¹².

Folat ve homosistein düzey tespiti

Folat ve homosistein değerlerinin tespiti için biyokimya tüpüne kan alınmıştır. Hasta ve kontrol gruplarından alınmış olan kanlar 3500 devirde 4 dakika santrifüj edildikten sonra kan serumları elde edilmiştir. Serumlar, folat ve homosistein değerlerinin belirlenmesi için analiz yapılmaya kadar -20°C' de bekletilmiştir. Folat değerleri Beckman Coulter BX1800 cihazı kullanılarak kemilüminisans test kiti ile homosistein değerleri ise SunRed Human (HCY) ElisaKit kullanılarak Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarı' nda belirlenmiştir.

İstatistiksel analiz

İstatistik analizler SPSS 11.5 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasında genotip ve allel frekanslarının karşılaştırmalarında "Ki Kare (χ^2) Testi", folat ve homosistein değerlerinin karşılaştırılmasında "Student t Testi" ve "Mann Whitney U" testi kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

Yaptığımız çalışmada 67 down sendromlu çocuk sahibi anne ve 66 sağlıklı çocuk sahibi anneden alınan DNA örneklerinde Metilentetrahidrofolat Redüktaz Geni 1298 A>C ve 677 C>T polimorfizmlerinin genotip dağılımları ve allel frekansları ile homosistein (nmol/mL) ve folat (ng/mL) değerleri belirlenmiştir.

Hasta ve kontrol grupları arasında klinik bulgular açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Hasta ve kontrol gruplarında 1298 AA genotipli bireyler arasında homosistein ve folat değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Ayrıca hasta grubunun 1298AA genotipli bireylerinde folat değerleri ortalaması diğer genotiplere göre daha düşük iken, kontrol grubundaki 1298AA genotipli bireylerde folat değerleri diğer genotiplere göre daha yüksek bulunmuştur. Homosistein değerlerinde de benzer sonuçlar gözlenmiştir. 677 CT ve 677 TT genotipleri açısından, hasta ve kontrol grubu folat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p<0.05$) (Tablo 1).

Tablo 1. Down sendromlu çocuk sahibi annelerin ve sağlıklı çocuk sahibi annelerin homosistein ve folat değerlerinin karşılaştırılması

	Folat (Ortalama±Standart Hata)			Homosistein (Ortalama±Standart Hata)		
	Down sendromlu çocuk sahibi anneler	Sağlıklı çocuk sahibi anneler	P değeri	Down sendromlu çocuk sahibi anneler	Sağlıklı çocuk sahibi anneler	P değeri
Genel	6.05±0.29	7.85±0.52	p<0.05	13.46±0.95	18.14±1.64	p<0.05
1298 AA	5.63±0.44	8.58±0.68	p<0.05	11.24±0.68	18.45±2.35	p<0.05
1298 AC	6.91±0.55	7.27±0.85	p>0.05	12.99±0.89	18.30±2.53	P<0.05
1298 CC	8.58±2.21	7.68±1.40		23.80±6.11	18.29±10.68	
677 CC						
677 CT	6.23±0.36	9.08±1.65	p<0.05	14.30±1.15	18.06±3.23	p>0.05
677 TT	6.25±0.71	8.01±0.46	p<0.05	20.25±6.55	15.53±3.17	p>0.05

Tablo 2. MTHFR geni 1298 bölgesi için hasta ve kontrol gruplarına ait genotip dağılımları

n (%)	Genotip frekansları			
	AA	CC	AC	AC+CC
DS çocuklu anneler (n:65)	29 (44.6)	17 (26.2)	19 (29.2)	36 (55.3)
Sağlıklı çocuklu anneler (n:64)	33 (51.6)	7 (10.9)	24 (37.5)	31 (48.4)
χ ² Testi (p>0.05)	4.99			0.623
OR (%95 CI)	1	0.362(0.132-0.995)	1.11 (0.508-2.426)	

DS: Down sendromu; OR: Odds değeri; CI: Güven aralığı; n: birey sayısı

Hasta ve kontrol grupları arasında MTHFR geni A1298C polimorfizmi genotip dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05). A1298C polimorfizmi AC+CC genotip dağılımları, AA genotip dağılımı ile karşılaştırıldığında, hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (p>0.05). Allel frekansları karşılaştırıldığında, her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05) (Tablo 2, Tablo 3).

Hasta ve kontrol grupları arasında CC genotip dağılımı bakımından oransal değerlendirme yapıldığında, hasta grubundaki genotip dağılımı oranının kontrol grubundan daha yüksek olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (p<0.05). Benzer şekilde allel frekanslarının genel karşılaştırmasında hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Fakat "C" allel frekansı oranı hasta grubunda(%40.8) kontrol grubuna(%29.7) göre daha yüksektir ve bu oransal fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05). "A" allel frekansı oranı kontrol grubunda (%70.3) hasta grubuna (%59.2) göre daha yüksektir ve iki grup arasındaki bu oransal

fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05). MTHFR geni C677T polimorfizmi genotip dağılımları ve allel frekansları açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (p<0.05). C677T polimorfizmi CC genotip dağılımı ile CT+TT genotip dağılımı açısından karşılaştırıldığında hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (p<0.05) (Tablo 4, Tablo 5).

Diğer taraftan 677CT genotip dağılımı oranı hasta grubunda daha yüksek bulunmuştur ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05). Kontrol grubunda yüksek olan 677CC genotip dağılımı oranı, hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) bir oransal farka sebep olmaktadır. Benzer şekilde hasta ve kontrol grupları arasında allel frekansları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. "T" allel frekansı oranı hasta grubunda(%53.7) kontrol grubuna(%37.1) göre daha yüksektir ve oranlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05). "C" allel frekansı oranı kontrol grubunda (%62.9) hasta grubuna (%46.3) göre daha yüksek bulunmuştur ve iki gruptaki bu oransal fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05).

Tablo 3. MTHFR geni 1298 bölgesi için hasta ve kontrol gruplarına ait allel frekansları

N (%)	Allel frekansları	
	A	C
DS çocuklu anneler (n:65)	77 (59.2)	53 (40.8)
Sağlıklı çocuklu anneler (n:64)	90 (70.3)	38 (29.7)
χ^2 Testi (p>0.05)	3.469	
OR (%95 CI)	1	0.613 (0.37-1.03)

DS: Down sendrom; OR: Odd Değeri; CI: Güven Aralığı; n:birey sayısı

Tablo 4. MTHFR geni 677 bölgesi için hasta ve kontrol gruplarına ait genotip dağılımları

n (%)	Genotip frekansları			
	CC	TT	CT	CT+TT
DS çocuklu anneler (n:67)	6 (9)	11 (16.4)	50 (74.6)	61 (91.04)
Sağlıklı çocuklu anneler (n:66)	28 (42.4)	11 (16.7)	27 (40.9)	38 (57.6)
χ^2 Testi (p<0.05)	21.009			19.572
OR (%95 CI)	1	0.214 (0.064-0.722)	0.116(0.043-0.314)	

DS: Down sendrom; OR: Odd Değeri; CI: Güven Aralığı; n:birey sayısı

Tablo 5. MTHFR geni 677 bölgesi için hasta ve kontrol gruplarına ait allel frekansları (n: birey sayısı)

n(%)	Allel frekansları	
	C	T
DS çocuklu anneler (n:67)	62 (46.3)	72 (53.7)
Sağlıklı çocuklu anneler (n:66)	83 (62.9)	49 (37.1)
χ^2 Testi (p<0.05)	7.399	
OR (%95 CI)	1	0.508 (0.31-0.83)

DS: Down sendrom; OR: Odd Değeri; CI: Güven Aralığı; n:birey sayısı

TARTIŞMA

Kronik folat ve metil eksikliği; anormal DNA metilasyonu, DNA kırıkları ve kromozom ayrılmasında kusurlarla sonuçlanmaktadır. Klinik ve deneysel çalışmalar, genomik DNA hipometilasyonunun kromozomal değişme ve anormal segregasyonla ilişkili olduğunu göstermektedir. Bir dizi genetik ve beslenme gibi çevresel faktörler, anöploidizasyonda interaktif bir rol sağlarlar. Down sendromu aynı zamanda anormal homosistein metabolizması ile de bağlantılıdır. DS' da mayotik nondisjunction altında yatan hücrel ve moleküler mekanizmalar bilinmemektedir. Anne yaşı, DS riski ile inkar edilemez ilişkili olan tek faktördür. Yakın zamanlarda, DNA metilasyonundaki bir kusur mayotik ayrılmanın potansiyel bir nedeni olarak belirtilmektedir. Bu hipoteze göre sentromerlerin hipometilasyonu, kinetokor ve mikrotübüllerin formasyonunda anomalilere yol açmaktadır. Sentromerik hipometilasyon için gerekli genetik faktörler arasında SAM (S-adenosilmetiyonin)' in düzenlenmesinde önemli rol oynayan MTRR ve MTHFR'dir¹³. Muthuswamy ve arkadaşları¹⁴,

Hindistan popülasyonunda, maternal C677T ve A1298C polimorfizmleri ve Down sendromlu çocuk sahibi olma arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaları bir araya getiren metaanaliz sonuçlarına göre, C677T polimorfizmi taşıyan annelerde risk 2.48 artmış olup, çalışmamız ile uyumlu olarak istatistiksel olarak da önemlidir. A1298C polimorfizmi taşıyan annelerde ise sırası ile dominant ve resesif modelde risk artışı 1.60 ve 2.12 olarak bulunmuştur ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir ve bu sonuç çalışmamız ile uyumludur.

Boduroğlu ve arkadaşları¹⁵ tarafından yapılmış bir çalışmada MTHFR A1298C ve C677T polimorfizmlerinin down sendromlu çocuk sahibi olma durumu ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir. C677T ve A1298C polimorfizmleri homozigot ve heterozigot genotipler arasında da istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunmadığı belirtilmiştir. MTHFR A1298C polimorfizmi için belirtilmiş olan bu sonuçlar çalışmamızda tespit edilen sonuçlarla benzer olmakla beraber C677T polimorfizmi için aynı durum söz konusu değildir.

Meta-analiz çalışmaları Down sendromlu çocuk sahibi olma durumu ile MTHFR geninde meydana

gelen polimorfizmlerin ilişkileri hakkında farklı sonuçlar içerebilmektedir. Wu ve arkadaşları¹⁶ tarafından yapılmış olan bir meta-analiz çalışmasında 2806 down sendromlu çocuğu olan anne ve 4597 sağlıklı çocuğu olan annelerde maternal MTHFR genindeki bu iki yaygın polimorfizmin etkisini araştırmışlardır. MTHFR C677T varyant genotipi (TT+CT) DS riski ile ilişkili olarak tespit edilmiştir. Özellikle 677T alleli taşıyıcılarının DS için yüksek riske sahip olduğu belirtilmiştir. MTHFR A1298C polimorfizmi için 1854/2364 (DS' lu çocuğu olan anne sayısı/sağlıklı çocuğu olan anne sayısı) bireyde yaptıkları analizde bu polimorfizmin DS için risk oluşturmadığını göstermişlerdir.

MTHFR C677T ve/veya A1298C polimorfizmlerinin belirlendiği bireylerde ilgili polimorfizm sıklıkları incelendiği bir araştırmada¹⁷, çalışmaya dahil edilmiş olan 164 bireyden 109' unda (%66.5) C677T, 95' inde (%57.9) A1298C polimorfizmi gözlenmiştir. Her iki polimorfizm sıklıkları açısından herhangi bir farklılık saptanmamıştır. Türk populasyonunda yapılan benzer çalışmalarda C677T polimorfizmi frekansı yaklaşık olarak %50-65, MTHFR A1298C polimorfizmi frekansı ise %50-58 oranları arasında değişiklik göstermektedir. Çalışmamız da ise 133 bireyden 99' unda (%74.4) MTHFR C677T, 129 bireyden 65'inde (%50) A1298C polimorfizmi gözlenmiştir. Çalışmamızda C677T polimorfizmi frekansı diğer çalışmalardan daha yüksek olmasına rağmen A1298C polimorfizmi frekansı benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda Down sendromlu çocuk sahibi olan anneler ile kontrol grubu anneler arasında homosistein değerleri bakımından istatistiki olarak önemli bir fark bulunmuştur ve birinci grupta homosistein değerleri ortalaması 13.46 (nmol/mL) iken kontrol grubunda 18.14 (nmol/mL) olarak belirlenmiştir. Kohli ve arkadaşları¹⁸ tarafından yapılmış olan benzer bir çalışmada ise birinci grubun homosistein değerleri ortalaması 12.26 (µmol/L) iken ikinci grubun (kontrol grubu) 17.33 (µmol/L) olarak belirlenmiştir ve iki grup arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Benzer sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen literatürle bir uyum gözlenmemiştir^{19,20}. Bir çok çalışmada kontrol grubunda homosistein değerlerinin ortalaması down sendromlu çocuğu olan annelere ait gruptan daha düşük bulunmuştur. Bunun sebepleri arasında etilkobalamin eksikliği ve diğer genetik faktörler belirtilebilir¹⁸. Çalışmamızda MTHFR C677T

polimorfizmi DS' lu çocuk sahibi olma riski ile ilişkili bulunmuştur. Genotipler gözönüne alındığında down sendromlu çocuğu olan ve 677TT genotipine sahip annelerin serum homosistein değerlerinin ortalaması (20.25 nmol/mL), kontrol grubundaki annelerin homosistein değerlerinin ortalamasından (15.53 nmol/mL) daha yüksek olduğu görülmektedir. 677CT bireylerde ise serum homosistein düzeylerine ait ortalamalar kontrol grubunda hasta grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. 677TT genotipli bireylerin serum homosistein seviyeleri literature ile uyumludur. Folik asit değerleri açısından hem genel değerlendirme hem de her iki polimorfizme ait genotiplerin değerlendirilmesinde literatürle uyumlu sonuçlar görülmektedir. Yani Down sendromlu çocuğu olan annelere ait folat değerleri, sağlıklı çocuğu olan annelere ait folat değerlerinden daha düşük bulunmuştur ve 1298AC genotipi hariç tüm genotiplerde ve genel değerlendirmede hasta ve kontrol grubu arasındaki farklılık önemli olarak tespit edilmiştir.

İzci ve arkadaşları²¹, folat metabolizmasında görevli maternal gen polimorfizmleri ile down sendromlu çocuğa sahip olma riski arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. MTHFR 677C allel frekansı Down sendromlu çocuğu olan annelerde önemli oranda yüksek bulunmuştur. Azaltılmış folat taşıyıcısı 1 geninde A80G polimorfizmi ile down sendromlu çocuk sahibi olma durumu arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir. Bizim çalışmamızla benzer sonuçlar sözkonusu değildir. Ancak Down sendromlu çocuk sahibi olma durumu ile folat metabolizmasında görevli genlerin polimorfizmlerinin birlikte incelenmesi gerektiği, gen-beslenme, gen-gen etkileşimi ve etnik kökenin gözönünde bulundurulması gereken önemli değişkenler olduğunu vurgulamışlardır.

Gen ekspresyonu ve kromozom biyolojisi kromozomlarda bulunan epigenetik mekanizmalardan etkilenmektedir. Epigenetik bilgi heterokromatin oluşumunda temeldir. Heterokromatinin yapısı post-translasyonel histon modifikasyonu ve DNA metilasyonuna bağlıdır. Heterokromatin yapısındaki DNA tekrarları önemsiz olarak değerlendirilse de son çalışmalarda heterokromatinin kromozom dağılımı boyunca önemli bir role sahip olabileceği belirtilmiştir. DNA metilasyonu, sitozin halkasının 5. karbonuna SAM metil grubunun kovalent bağlanmasıdır. DNA metilasyonu, histondeasetilazlar gibi enzimatik

bileşenler ve metillenmiş DNA' ya bağlı spesifik proteinler aracılığıyla tamamlanır ve histonların post-translasyonel modifikasyonlarıyla yönlendirilmektedir²². Yapılacak diğer çalışmalarda ilgili polimorfizmlerin DNA metilasyon değerleri gözönünde bulundurularak değerlendirilmesi MTHFR gen polimorfizmleri ile down sendromlu çocuk sahibi olma durumu arasındaki ilişkinin altında yatan mekanizmaların ortaya çıkarılmasında etkili olabilecektir.

1298CC genotipine sahip olma durumu down sendromlu çocuk sahibi olma durumu ile ilişkili olabilir. C677T polimorfizmi açısından, CT ve TT genotipleri oranı, CC genotipine oranla, down sendromlu çocuk sahibi annelerde, kontrol grubu annelere göre daha yüksek bulunmuştur. Bu bölge açısından bir ya da her iki allelini polimorfik taşıyan annelerin down sendromlu çocuk sahibi olma riskinin daha yüksek olduğu düşülebilmektedir. Bu polimorfizmler ile down sendromlu çocuk sahibi olma durumu arasındaki ilişki hakkında kesin bir yargıya varmak için hasta ve kontrol grubunda örnek sayısının artırılması gerekmektedir.

Down sendromlu çocuk sahibi olma riskinin belirlenmesinde, MTHFR gen polimorfizmlerinin ve folat metabolizmasında etkili olan diğer genlerin polimorfizmlerinin birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. DNA metilasyon düzeylerinin değerlendirilmesi down sendromlu çocuk sahibi olma durumu hakkında daha açıklayıcı sonuçlara ulaşabilmemizi sağlayabilir. MTHFR geni 1298 ve 677 polimorfizmlerinin down sendromlu çocuk sahibi olma ile ilişkisi üzerine yapılan çalışmalarda ve bizim çalışmalarımızda gözlenen farklılıklar populasyonlara ve etnik kökene özgü farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Tarafından TF2013YL6 No' lu Proje ile Desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Dey S. Genetics and Etiology of Down Syndrome, Croatia, Intech, 2011.
2. Lejeune J, Gauthier M, Turpin R. Les chromosomes humains en culture de tissus. C R Acad Sci Gen. 1959;248:602-3.
3. Antonarakis SE. Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms Down Syndrome Collaborative Group. N Engl J Med. 1991;324:872-6.
4. Freeman SB, Allen EG, Oxford-Wright CL, Tinker SW, Druschel C, Hobbs CA et al. The National Down Syndrome Project: design and implementation. Public Health Rep. 2007;122:62-72.
5. Antonarakis SE, Petersen MB, McInnis MG, Adelsberger PA, Schinzel AA, Binkert F et al. The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. Am J Hum Genet. 1992;50:544-50.
6. Yoon PW, Freeman SB, Sherman SL, Taft LF, Gu Y, Pettay D et al. Advanced maternal age and the risk of Down syndrome characterized by the meiotic stage of chromosomal error: a population-based study. Am J Hum Genet. 1996;58:628-33.
7. Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. Am J Hum Genet. 2000;67:623-30.
8. Christensen B, Rosenblatt DS. Effects of folate deficiency on embryonic development. Baillieres Clin Haematol. 1995;8:617-37.
9. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a huge review. Am J Epidemiol. 2000;151:862-77.
10. Esfahani ST, Cogger EA, Caudill MA. Heterogeneity in the prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in women of different ethnic groups. J Am Diet Assoc. 2003;103:200-7.
11. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Acids Res. 1988;16:1215.
12. Izmirlı M, Alptekin D, Topçuoğlu MS, Güzel AI. Investigation of methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in coronary by-passed patients due to coronary atherosclerosis etiology. Türkiye Klinikleri Cardiovascular Sciences. 2009;21:303-8.
13. Pozzi E, Vergani P, Dalpra L, Combi R, Silvestri D, Crosti F et al. Maternal polymorphisms for methyltetrahydrofolate reductase and methionine synthetase reductase and risk of children with Down syndrome. Am J Obstet Gynecol. 2009;200:636.e1-636.e6.
14. Muthuswamy S, Agarwal S. Do the MTHFR gene polymorphism and Down syndrome pregnancy association stands true? a case-control study of Indian population and meta-analysis. The Egyptian Journal of Medical Human Genetics. 2016;17:87-97.
15. Boduroğlu K, Alanay Y, Koldan B, Tuncbilek E. Methylenetetrahydrofolate reductase enzyme polymorphisms as maternal risk for Down Syndrome among turkish women. Am J Med Genet. 2004;127A:5-10.
16. Wu X, Wang X, Chan Y, Jia S, Luo Y, Tang W. Folate metabolism gene polymorphisms MTHFR C677T and A1298C and risk for Down syndrome

- Offspring: a meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;167:154-9.
17. Uğuz N, Erden G, Güngör O, Bal C, Yıldırımkaaya M. MTHFR Geninde c677t ve/veya a1298c polimorfizmi tespit edilen bireylerde bu polimorfizm sıklıklarının incelemesi. *Journal of Clinical and Experimental Investigations.* 2012;3:472-6.
 18. Kohli U, Arora S, Kabra M, Ramakrishnan L, Gulati S, Pandey RM. Prevalence of MTHFR C677T polymorphism in north indian mothers having babies with trisomy 21 Down syndrome. *Downs Syndr Res Pract.* 2008;12:133-7.
 19. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr.* 1999;70:495-501.
 20. Sheth JG, Sheth FJ. Gene polymorphism and folate metabolism: a maternal risk factor for Down syndrome. *Indian Pediatr.* 2003;40:115-23.
 21. İzci Ay O, Ay ME, Erdal ME, Cayan F, Tekin S, Soylemez F et al. Folate metabolism gene polymorphisms and risk for Down syndrome offspring in turkish women. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2015;19:191-7.
 22. Herrera LA, Prada D, Andonegui MA, Dueñas-González. The epigenetic origin of aneuploidy. *Curr Genomics.* 2008;9:43-50.