

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**SPİNA BİFİDALI HASTALARDA METİLEN
TETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ (MTHFR), PAIRED-BOX3
(PAX3) VE TRANSKRİPSİYON FAKTÖR2 (TEAD2) GEN
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Mehmet SARAÇ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ş. Kerem ÖZEL**

**ELAZIĞ
2009**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr.
DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

.....
.....
.....Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

.....
Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

.....
.....
.....
.....
.....
.....

TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesi ve hazırlanmasında yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Ş. Kerem ÖZEL'e, uzmanlık eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet KAZEZ hocama,

Tezimin laboratuvar çalışmaları aşamasında büyük emekleri olan Tıbbi Biyoloji AD öğretim üyesi Doç. Dr. Hüseyin YÜCE ve Dr. Ebru ÖNALAN ETEM'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalıştığım araştırma görevlisi arkadaşlarıma, Çocuk Cerrahisi kliniği hemşireleri, personeli ve sekreterine teşekkür ederim.

Asistanlık eğitimim süresince hep yanımda olan annem, babam ve kardeşlerime minnet ve şükran duygularıyla...

Ekim, 2009- Elazığ

ÖZET

Bu çalışmada, Spina Bifidalı (SB) hastalarda Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR), Transkripsiyon Faktör2 (TEAD2) ve Paired-Box3 (PAX3) polimorfizmlerinin genotip ve allel sıklıklarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çocuk Cerrahisi polikliniğine başvuran ve spina bifida tanısı konulan 67 hastanın anamnez, fizik muayene ve rutin tetkikleri yapıldı. Sakral muayene bulgusu normal 80 kişilik kontrol grubu oluşturuldu. Çalışma ve kontrol grubundan alınan kan örneklerinde MTHFR, TEAD2 ve PAX3 gen polimorfizmleri araştırıldı. Her olgunun demografik özelliklerini ve klinik öykülerini içeren detaylı bir anket yapıldı.

Hasta grubunda (n= 67), 26 kız (%38.8), 41 erkek olgu (%61.2) vardı. Ancak hastaların dört tanesi çalışmamız devam ederken kaybedildi. Hastaların yaş ortalamaları 2.46 ± 3.22 yıl, (1 ay - 18 yaş), kızların yaş ortalaması 2.52 ± 3.80 yıl (1 ay - 18 yaş arası) erkeklerin yaş ortalaması 2.42 ± 3.22 yıl (1 ay - 14 yaş), arasındaydı. Anne yaşlarına baktığımızda yaş ortalamaları 28.15 ± 4.71 yıl (19 - 44 yaş) idi. Spina Bifidalı (SB) olan hastaların ikisi meningoel (%3), 65'i meningomyelose (%97) idi. Hastaların annelerinin 16 tanesinde (%23.9) abortus öyküsü, 18 annede (%26.9) akrabalık öyküsü bulunduğu tespit edildi. Hastaların 14 (%20.9) tanesinin ailesinde başka konjenital anomalili yakını varken, konjenital anomalilerin 8 (%57.1) tanesinde NTD mevcuttu. NTD olan bebeklerin annelerinin gebelikte ilaç kullanımı 11 (%16.4) hastada varken, 56 (%83.6) hastada yoktu. Bölge hastanesi konumunda olan Fırat Üniversitesi hastanesine getirilen hastaların 37 (%55.2) tanesi Elazığ'dan, geriye kalan 30 (%44.8) hasta da çevre illerden gelen hastalardan oluşmaktaydı.

Sonuç olarak NTD etyopatogenezinde içinde genetik faktörlerin de rol oynadığı multifaktöryel olaylar rol oynamaktadır. Yapılan bu çalışmada bölgemizde, NTD gelişiminde PAX3 allel sıklıklarındaki değişikliklerin etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Bu allel sıklığının oluşmasında ise çevresel faktörler etkili olmuş olabilir. Bu açıdan SB nin etyolojisinin aydınlatılmasında daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Spina bifida, gen polimorfizmi, MTHFR, TEAD2, PAX3

ABSTRACT

DETERMINATION OF METHYL TETRAHYDROFOLATE REDUCTASE, TEAD2 AND PAX3 GENE POLYMORPHISMS IN PATIENTS WITH SPINA BIFIDA

In the present study, genotype and allele frequencies of Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR), Transkripsiyon Faktör2 (TEAD2) and Paired-Box3 (PAX3) polymorphisms in patients with spina bifida (SB) were investigated. Anamnesis, physical examination and routine analyses of 67 patients applied to pediatric surgery clinics and diagnosed with spina bifida were included in the study.

Control group included 80 patients with normal sacral findings. Gene polymorphisms of MTHFR, TEAD2 and PAX3 were investigated. A detailed survey including demographic characteristics and clinical history of all cases were performed.

Study group (n=67) consisted of 26 (%38.8) girls, and 41 (%61.2) boys. Four subjects died during the study. Average age of study group was 2.46 ± 3.22 years, (1 month - 18 years), that of girls was 2.52 ± 3.80 years (1 month - 18 years) and boys' was 2.42 ± 3.22 years (1 month - 14 years). Average age of mothers was 28.15 ± 4.71 years (19 - 44 years). Two of Spina Bifida (SB) cases were meningocell (%3) and 65 were meningo-myelocell (%97). Sixteen of mothers (%23.9) had an abortion history and 18 (%26.9) had a relative-marriage history. There was a congenital abnormality history in near relatives of 14 patients (%20.9) and there was NTD in 8 of them (%57.1). Eleven mothers (%16.4) had a medication history while 56 (%83.6) did not use any medicine. Firat University hospital is a regional hospital serving for a large region and 37 (%55.2) patients were from Elazığ and 30 (%44.8) were from other provinces.

In conclusion, multifactorial processes including genetic factors play role in etiopathogenesis of NTD. Results of the present study indicate that alterations in PAX3 allele frequencies may influence development of NTD and that environmental factors may contribute to these alterations. Further studies are required to enlighten etiology of SB.

Keywords : Spina bifida, gene polymorphism, MTHFR, TEAD2, PAX3

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Embriyoloji	1
1.1.1. Embriyonik Diskin Oluşumu	1
1.1.2. Nörolasyon	3
1.1.3. Kanalizasyon	6
1.1.4. Regresyon	6
1.1.5. Beyinin Gelişimi	6
1.2. Nöral Tüp Kapanma Defektleri	7
1.2.1. Kranyal Disrafizm	8
1.2.1.1. Anensefali	8
1.2.1.2. Ensefalosel ve Kranyal Meningosel	8
1.2.2. Spina Bifida	8
1.2.2.1. Spinal Defektin Patoembriyolojisi	9
1.2.2.2. Spinal Disrafizm Tipleri	9
1.2.2.2.1. Spina Bifida Aperta (Açık spinal disrafizm)	9
1.2.2.2.2. Spina Bifida Okülta	10
1.2.2.3. İnsidans	11
1.2.2.4. Etyoloji	12
1.2.2.5. Tanı Yöntemleri	12
1.2.2.6. Korunma	13
1.2.2.7. Spina Bifida Klinik Önemi	13
1.2.2.7.1. Ürolojik ve Nefrolojik Problemler	13
1.2.2.7.2. Gastrointestinal ve Lokomotor Problemler	14

1.3. NTD Etiyolojisinde Multifaktöriyel Kalıtımın Rolü	15
1.3.1. Polimorfizm	15
1.3.1.1. Kısa DNA Baz Tekrarları	16
1.3.1.2. Uzun DNA Baz Tekrarları	17
1.3.1.3. DNA'nın Tek Bir Bazındaki Değişiklikler	17
1.3.1.4. DNA'yı Kesen Enzimlerin Oluşturduğu Uzunluk Polimorfizmleri	18
1.3.2. Tıbbi Genetik'te Polimorfizmlerin Kullanımı	19
1.3.3. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR)'ın Nöral Tüpün Kapanmasındaki Rolü	20
1.3.3.1. MTHFR Enziminin Yapısı ve Görevi	20
1.3.3.2. MTHFR Enziminin Tanımlanması ve Fonksiyonu	21
1.3.3.3. MTHFR Geninin Yapısı ve Özellikleri	22
1.3.3.4. MTHFR Enzim Polimorfizmleri	22
1.3.3.5. MTHFR Genindeki C677T Polimorfizmi	23
1.3.3.6. MTHFR C677T Polimorfizmi ve Nöral Tüp Kusurları	24
1.3.4. PAX3 ve TEAD2'nin Nöral Tüpün Kapanmasındaki Rolü	24
2. GEREÇ VE YÖNTEM	31
2.1. Polimorfizmlerin Tayininde Kullanılan Gereçler	31
2.2. Polimorfizmlerin Tayininde Kullanılan Kimyasallar	32
2.3. Polimorfizmlerin Tayininde Kullanılan Çözeltiler	33
2.4. DNA İzolasyon İşlemi	33
2.4.1. Kullanılan Solüsyon ve Gereçler	33
2.4.2. İzolasyon Aşamaları	33
2.4.3. DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi	33
2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Çalışması	34
2.6. Polimorfizmlerin Belirlenmesi	34
2.7. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi	37
2.8. Agaroz Jel Elektroforezi	37
2.9. İstatistik Analizler	38
3. BULGULAR	39
3.1. Hasta ve Kontrollerde MTHFR Polimorfizm Dağılımları	40
3.2. Hasta ve Kontrollerde PAX3 rs16863657 Polimorfizm Dağılımları	40

3.3. Hasta ve Kontrollerde TEAD2 Genindeki rs375306 Polimorfizm Dağılımları	42
4. TARTIŞMA	43
5. KAYNAKLAR	50
6. EKLER	64
7. ÖZGEÇMİŞ	70

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Bilaminar germinal diskin dorsal yüzeyinin görünümü	1
Şekil 2. Mezodermi oluşturmak üzere göç eden hücrelerin kullandığı yollar ve yönleri	2
Şekil 3. Notokordun oluşması ve sefalik yöne doğru büyümesi	3
Şekil 4. Notokordun bir silindir halini alarak alttaki endodermden ayrılması	4
Şekil 5. 18-20. günlerde nöral plağın büyümesi	5
Şekil 6. 20. gününde olan bir embriyonun elektron mikrografik görünümü	5
Şekil 7. Nörolasyon	6
Şekil 8. 29. gününde olan bir embriyoda SSS'nin görünümü	7
Şekil 9. Metil grubu metabolizmasını içeren anahtar enzimler yolağı	21
Şekil 10. MTHFR geninin kromozom 1'deki yerleşimi	22
Şekil 11. PAX3 transgenik farede β -galaktosidaz ekspresyonu	26
Şekil 12. TEAD2 ve PAX3 arka nöral tüpte birlikte eksprese edilir	27
Şekil 13. NCE2'nin kalitesini arttıran TEAD2'nin bağlandığı alandaki mutasyonlar	28
Şekil 14. Dominant negatif TEAD2 ekspresyonunun PAX3 ekspresyonu üzerindeki etkisi	29
Şekil 15. MTHFR polimorfizm genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımları	40
Şekil 16. PAX3 genindeki rs16863657 polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü	41
Şekil 17. TEAD2 genindeki rs375306 polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü	42

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. SB ye bağlı nörojen mesanede KBY gelişmesi	14
Tablo 2. MTHFR geninde bugüne kadar tespit edilen mutasyon tipleri ve sayıları	23
Tablo 3. MTHFR geninde tanımlanmış polimorfizmler	23
Tablo 4. PAX3 genine ait variant gen rs16863657 polimorfizmi için dizayn edilen primerler	35
Tablo 5. TEAD2 genine ait variant gen rs375306 polimorfizmi için dizayn edilen primerler ve Hind III restriksiyon enzim kesim bölgesi	36
Tablo 6. Hastaların yaş, cinsiyet dağılımları ve anne yaşı	39
Tablo 7. Hastaların demografik ve klinik özellikleri	39
Tablo 8. MTHFR polimorfizm genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımları	40
Tablo 9. PAX3 rs16863657 polimorfizm genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımları	41
Tablo10. TEAD2 genindeki variant gen rs375306 polimorfizm genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımları	42

KISALTMALAR LİSTESİ

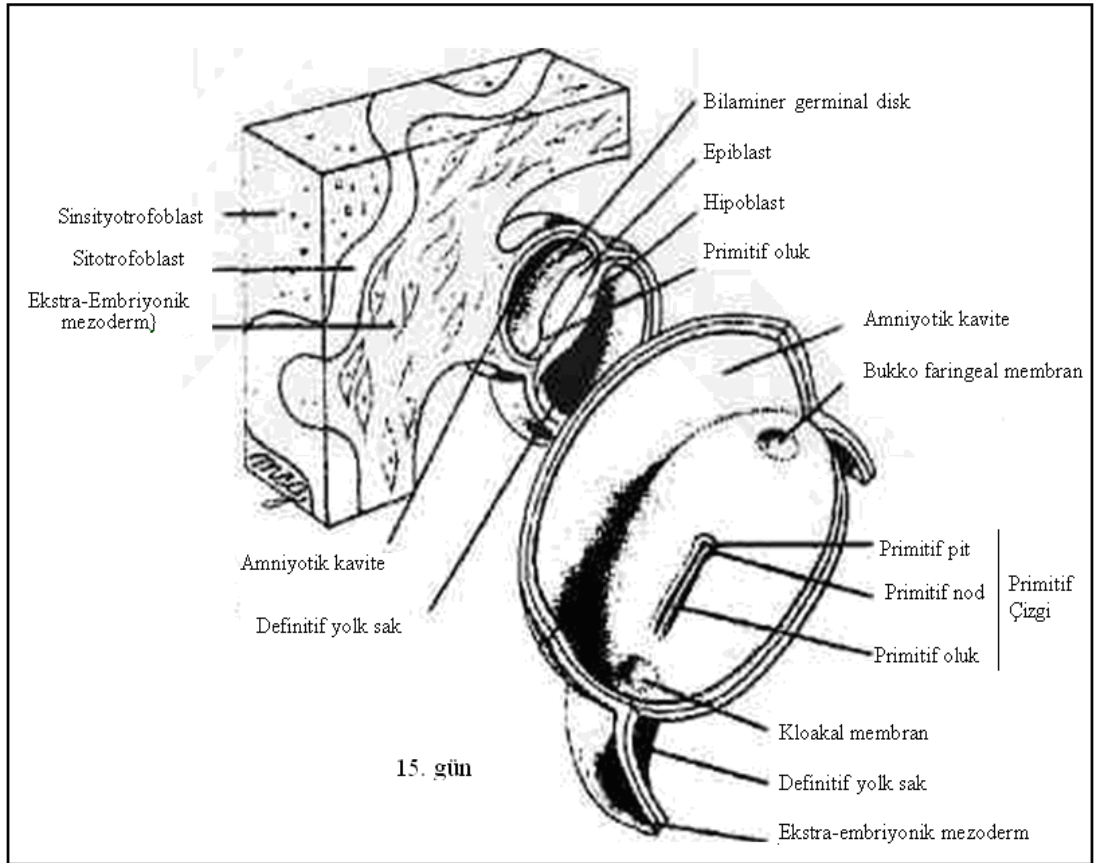
SSS	: Santral Sinir Sistemi
NTD	: Nöral Tüp Defekti
SB	: Spina Bifida
AFP	: Alfa-fetoprotein
USG	: Ultrasonografi
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
cmH₂O	: Santimetre su
ml	: Mililitre
VUR	: Veziko Üreteral Reflü
DSD	: Detrusor Sfinkter Dissinerjisi
GAG	: Glikozaminoglikan
TAK	: Temiz Aralıklı Kateterizasyon
İSÜG	: İşeme Sistoüretrografisi
GİS	: Gastrointestinal Sistem
S	: Sakral
L	: Lomber
T	: Torakal
IMSG	: International Myelodysplasia Study Group (Uluslararası Miyelodisplazi Çalışma Grubu)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
mRNA	: Mesajcı RNA
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MTHFR	: Metiltetrahidrofolat Redüktaz
SAM	: S-Adenozil Metiyonin
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NTKD	: Nöral Tüp Kapanma Defekti

1. GİRİŞ

Canlı doğumların % 1'inde santral sinir sisteminin (SSS) doğumsal anomalileri görülmekte ve doğum öncesi fetal ölümlerin % 72'sinden sorumlu tutulmaktadır (1). Bu anomalilerin % 64'ü, vücudun arka-orta hattında nöral tüpün kapanma ya da gelişim bozukluğu sonucu oluşmaktadır (2, 3).

1.1. Embriyoloji

SSS'nin embriyolojik gelişimi; a-) embriyonik dönem (0-8.5 gestasyonel hafta), b-) fetal dönem (8.5-40. hafta), c-) doğum sonrası dönem olmak üzere üç dönemde olmaktadır (2).



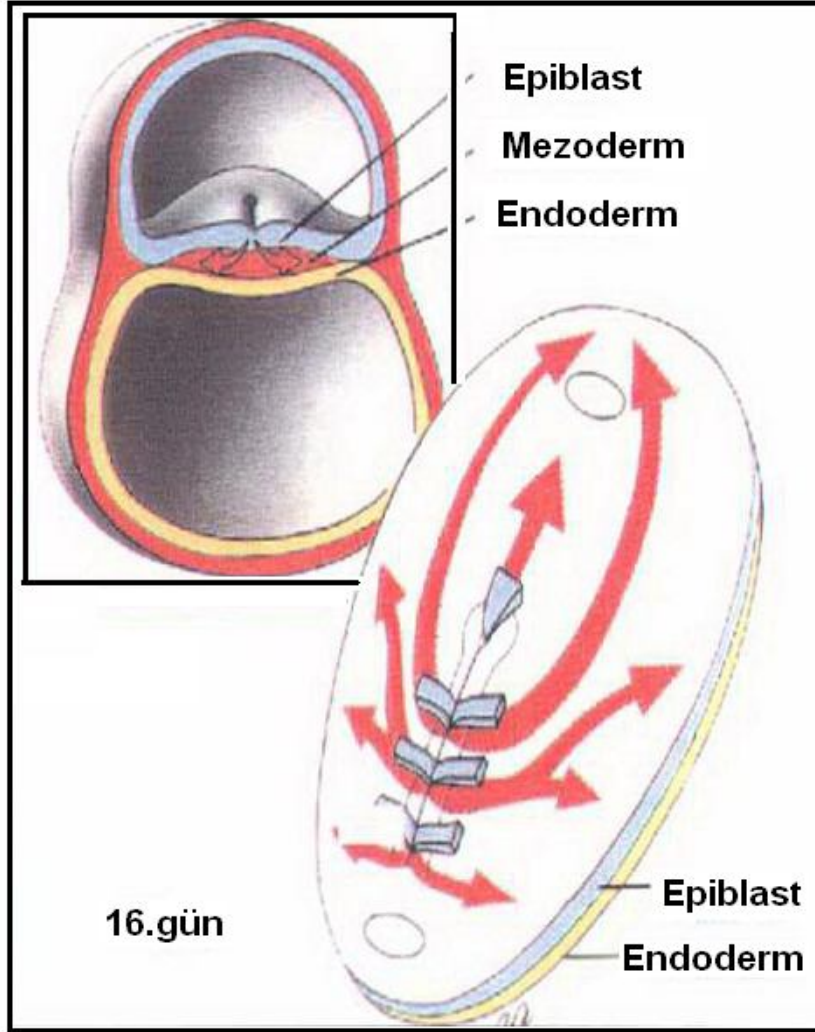
Şekil 1. Bilaminar germinal diskin dorsal yüzeyinin görünümü. Primitif çizgi bir gün önce oluşmuştur ve germinal disk uzunluğunun % 50'sini kapsamaktadır. Yukarıdaki şekilde embriyonun koryonik kavite duvarına tutunması görülmektedir (4).

1.1.1. Embriyonik Diskin Oluşumu

Sürekli bölünen hücreler blastosit denen hücre kümelerini oluşturur. Gebeliğin 14. gününde, farklılaşma ve özelleşme başlar ve düz, oval bir disk belirir. Daha sonra, bu

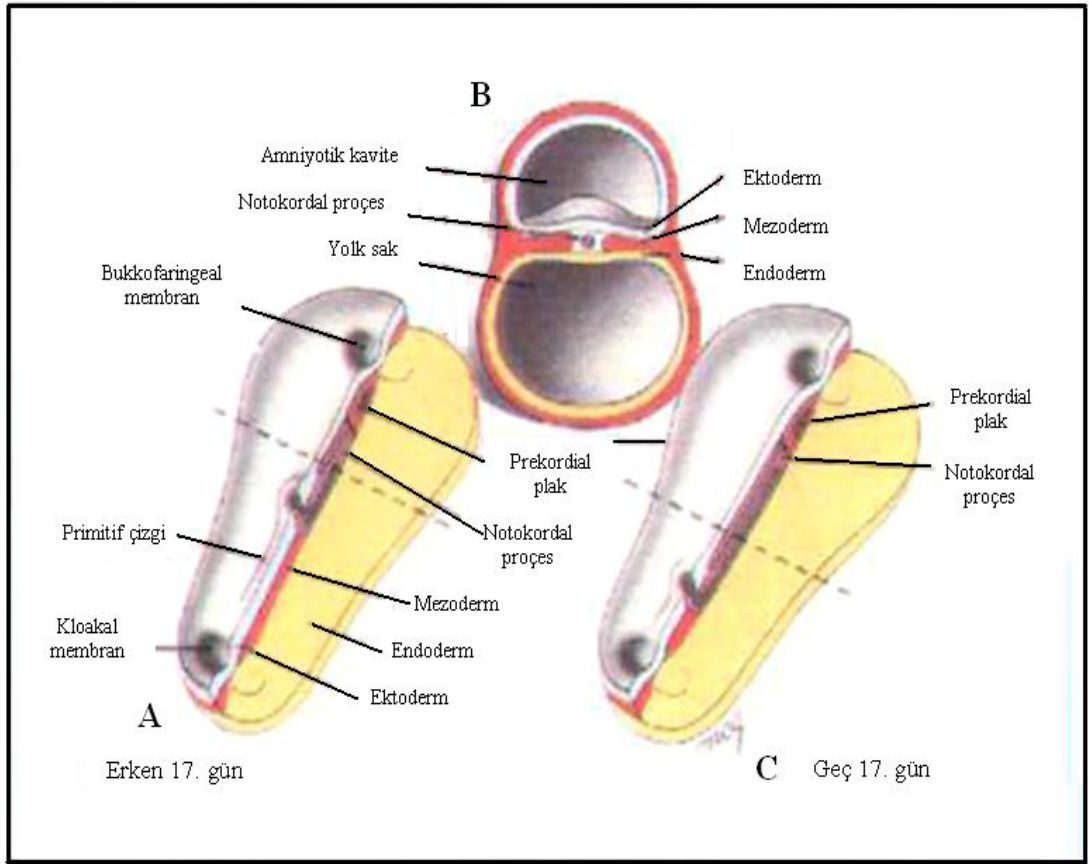
diskin kaudal ucunda uzunlamasına bir oluk (primitif çizgi) oluşur ve oluğun sefalik ucunda primitif nod belirginleşir (Hensen nodu). Bu aşamadaki embriyonik diskın dış tarafında ektoderm, iç tarafında ise endoderm tabakası yer alır (4) (Şekil 1).

Hücreler primitif çizginin her iki tarafından, sefalik yöne ve iç kısımlara doğru göç ederek, endoderm ile ektoderm arasındaki para-aksiyel intra-embriyonik mezodermi oluştururlar (2, 4) (Şekil 2).



Şekil 2. Mezodermi oluşturmak üzere göç eden hücrelerin kullandığı yollar ve yönleri görülmektedir (4).

Hensen nodundan köken alan yüzeyel hücreler, gebeliğin 17.gününde sefalik yönde ilerleyerek, endoderm ve ektoderm arasındaki notokord'u oluştururlar (2, 4) (Şekil 3).



Şekil 3. (A,C) Notokordun oluşması ve sefalik yöne doğru büyümesi görülmektedir. (B) Çizgi ile gösterilen seviyedeki germinal diskin kesitsel görünümü (4).

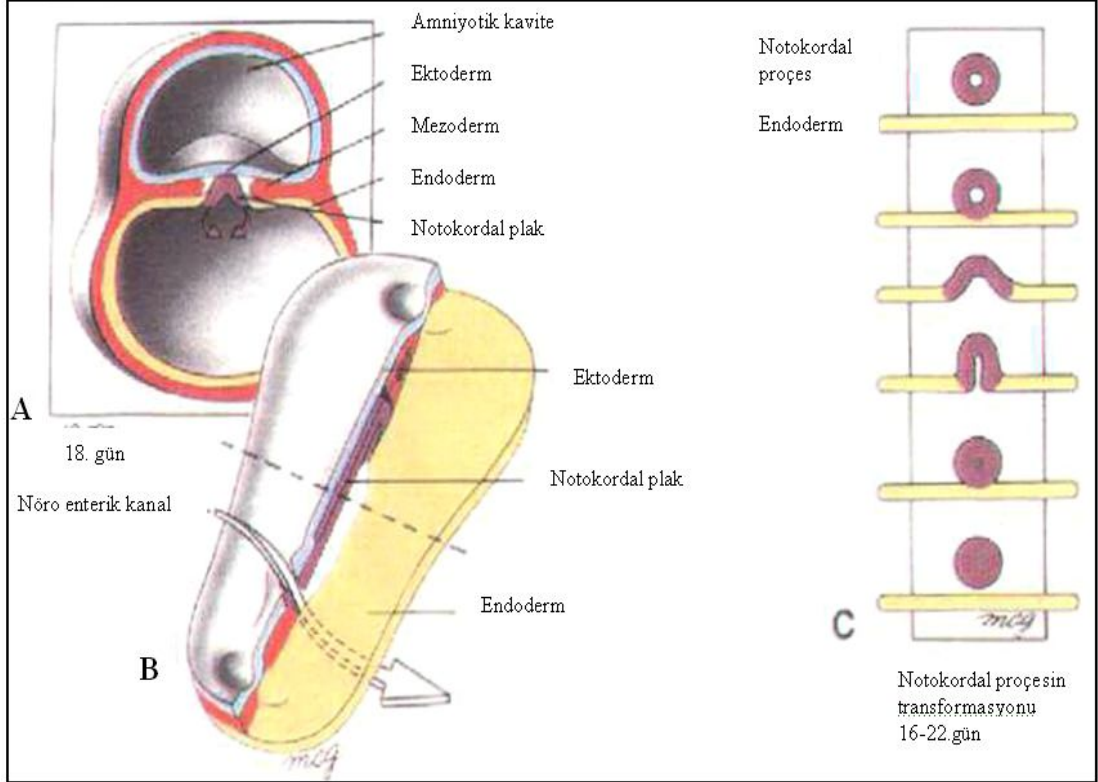
Gebeliğin 18. gününde, notokord bir silindir halini alır ve alttaki endoderm dokusundan ayrılır (Şekil 4c). Nöral tüpün bundan sonraki gelişimi nörolasyon, kanalizasyon ve regresyon olarak üç dönemde incelenir (2, 4).

1.1.2. Nörolasyon

18-28. gebelik günleri arasındaki dönemdir ve bu dönemde meydana gelen bozukluklar, ciddi kranyal ve spinal disrafizm ile sonuçlanır. Bu dönem, menstrüel siklusun son 1-2 haftasına denk gelen ve çoğu kadının bir sonraki menstrüasyonunu beklediği dönemdir. Bu nedenle, bu kritik aşamadaki kadınlar hamile olduklarının genellikle farkında değildirler (1).

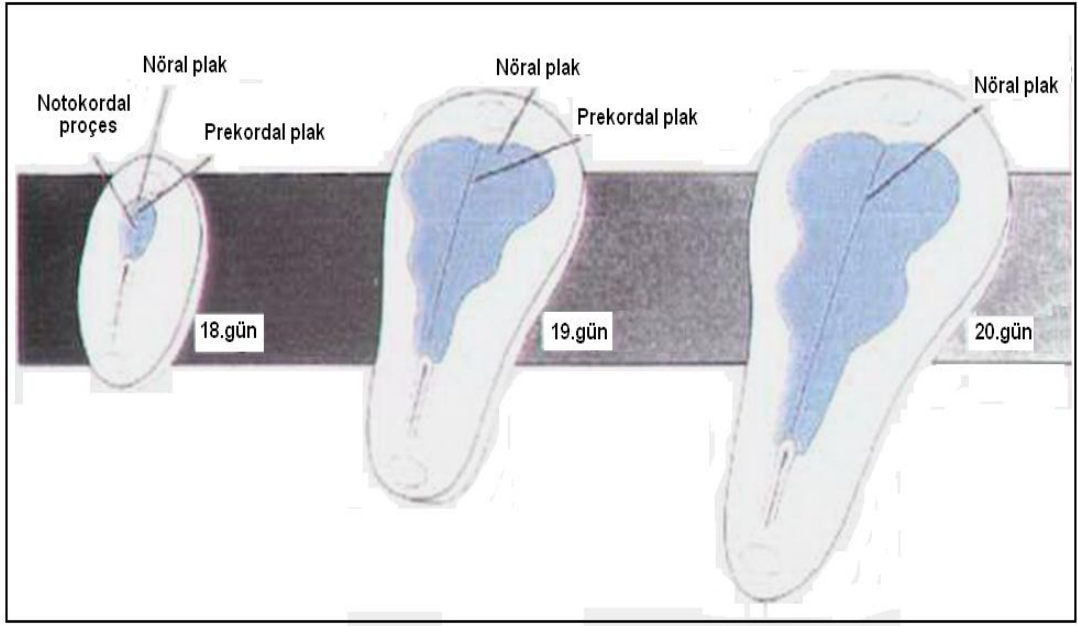
Üçüncü gebelik haftasında ektoderm kalınlaşır ve nöral plak oluşur. Takip eden günlerde, nöral plağın dış kısımları yükselmeye başlar ve nöral kıvrımlar meydana gelir. Ortada ise nöral oluk bulunur (1, 2, 4) (Şekil 5,6).

Nöral kıvrımlar orta hatta birleşerek nöral tüpü oluşturur. Nöral tüpün kapanması, servikal bölgeden başlayarak kranyal ve kaudal kısma doğru ilerler. Gebeliğin 23-25. günlerinde ön ve arka bölümlerin kapanması tamamlanır (Şekil 7 a, b,c,d). Daha sonra, yüzeyel ektoderm nöral tüpten ayrılarak orta hatta birleşir (1,2,4) (Şekil 7e).

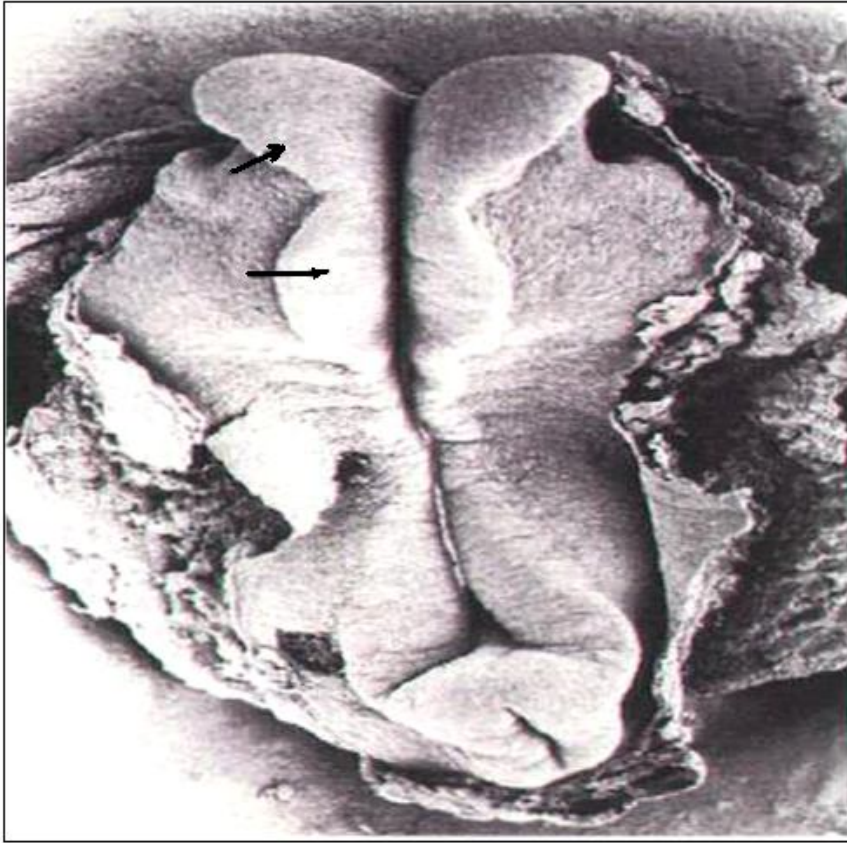


Şekil 4 (a.b.c). Notokordun bir silindir halini alarak alttaki endodermden ayrılması şematize edilmiştir. Öncelikle notokordun ön yüzü (ventral) endodermle birleşerek notokord plağını oluşturur, daha sonra notokord endodermden ayrılır (16-22. günler) (4).

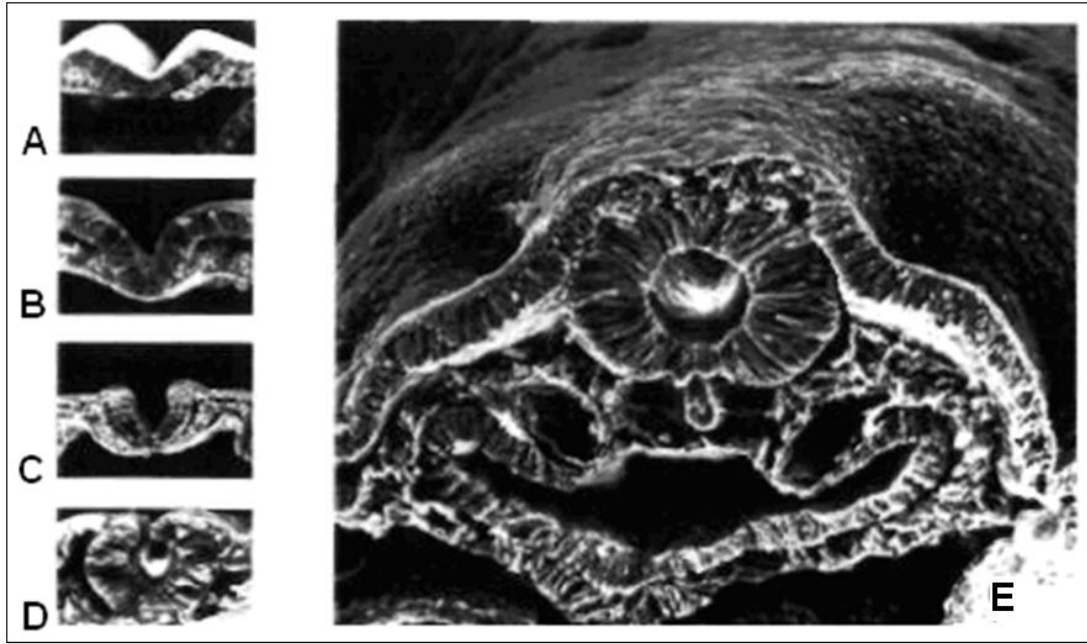
Cilt, nöral tüp ve notokord arasına mezenkimal hücreler göç ederler ve bu hücrelerden daha sonra meninksler, vertebral birimler ve paraspinal kaslar oluşur. Nörolasyon ile spinal kordun L1-L2 seviyesine kadar olan kısmı oluşmaktadır. Nörolasyon tamamlandıktan sonra Hensen nodu ve primitif çizgi, daha sonra sinir, ürogenital ve sindirim sistemi elemanlarının geliştiği farklılaşmamış bir hücre kitlesi oluştururlar. Bu dönemdeki bozukluklar, sayılan sistemlerin anomalileri ile sonuçlanabilir (1).



Şekil 5. 18-20. günlerde nöral plağın büyümesi şematize edilmiştir (4).



Şekil 6. 20. gününde olan bir embriyonun elektron mikroskopik görünümü. Nöral plak çok iyi görülmektedir. Oklarla gösterilen kıvrımlardan daha sonra beyin dokusu gelişecektir (4).



Şekil 7. Nörolasyon (a,c) Nörolasyon nöral kıvrımların oluşmasıyla oksipitoservikal bölgeden başlar, (d) Nöral kıvrımlar orta hatta birleşir ve yüzeyel ektodermden ayrılırlar, (d,e) Daha sonra yüzeyel ektoderm kenarları birleşir ve nöral tüpün üstünü kapatır (4).

1.1.3. Kanalizasyon

Gebeliğin 28-40. günleri arasındaki dönemdir. Spinal kanalın kaudal kısmı bu dönemde oluşmaktadır. Nörolasyon döneminin aksine, kanalizasyon sağlam ektoderm altında gelişir (1, 2).

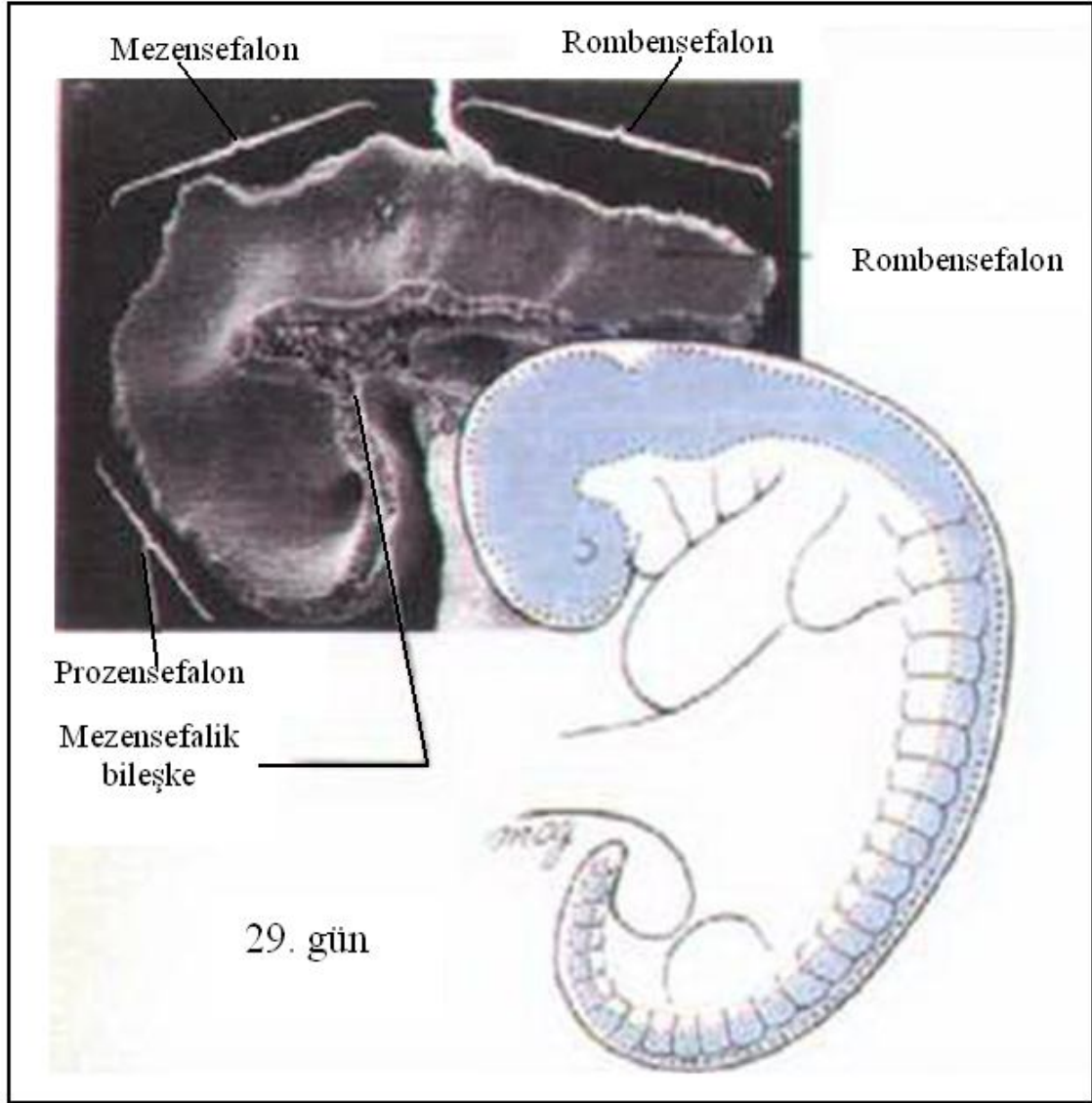
1.1.4. Regresyon

Gebeliğin 40. gününden sonraki embriyonik ve fetal yaşamın tümünü kapsar. Distal spinal korddan, pia-araknoid artık olan filum terminale gelişir. Vertebral kolon, spinal korddan daha hızlı uzadığından, konus medullaris doğumdan sonra, erişkin düzeyine yakın olan L1-L2 aralığına gelir.

1.1.5. Beynin Gelişimi

Silindir halini almış nöral tüpün kranyal kıvrımlarından beyin gelişir. Gebeliğin 25. gününde ön beyin (prozensefalon), orta beyin (mezensefalon) ve arka beyin (rombensefalon) ayırt edilebilir (Şekil 8). Gebeliğin 35. gününde ön beyin, telensefalon (gelecekteki serebral hemisferler) ve diensefalona (serebellum) ayrılır. Arka beyin ise metensefalon (gelecekteki pons) ve miyelensefalona (gelecekteki

medulla oblongata) ayrılır. Spinal kord anomalilerinin aksine, serebral anomalilerin çoğu fetal dönemde meydana gelen bozukluklara bağlı olarak gelişir (1, 2, 4).



Şekil 8. 29. gününde olan bir embriyoda SSS'nin görünümü (4).

1.2. Nöral Tüp Kapanma Defektleri

Nöral Tüp Kapanma Defektleri (NTKD)' ne tarihi belgelerde de rastlanmaktadır. Mısır'da bulunan bir mumyanın anensefalik olduğu saptanmıştır (5). NTKD'nin etiyopatogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. NTKD ile birlikte mono-allelik bozukluklar sıklıkla görülmesine karşın, bir çok çalışma etyolojinin multifaktöriyel olabileceğini desteklemektedir (3,6,7). Genetik ve çevresel faktörler suçlanmaktadır. Çevresel etken olarak, annenin valproik asit ve alkol kullanması,

diyabet, hipertermi ve folik asit eksikliği gibi beslenme bozukluklarının olması ileri sürülmektedir (8-12). Anne adayına özellikle folat gibi vitaminlerin verilmesinin, NTKD'li çocuk doğurma riskini azalttığı gösterilmiştir (11, 13, 14). NTKD'li çocukların annelerinde folat metabolizma bozukluğunu düşündüren, plazma folat düzeylerinde düşme ve homosistein düzeylerinde yükselme saptanmasıdır. Bu durumdan, 5,10-metilen tetrahidrofolat redüktazın enzimatik etkinliği yeterli olmayan bir varyantı sorumlu tutulmaktadır (3, 6).

Yapılan çalışmalarda, NTKD'lerin değişik toplumlardaki insidansı, % 0.001- % 1 arasında saptanmıştır (15-17). NTKD'ler siyah ırkta, beyaz ırka göre daha az görülmekte ve epidemiyolojisi coğrafi değişkenlik göstermektedir (18). Beslenme koşullarının düzelmesi ve anne sağlığına verilen önemin artmasından dolayı, son yıllarda NTKD insidansında dünya genelinde bir azalma görülmektedir (18, 19). Ülkemizde ise, çoğu anne adayının beslenme koşullarının halen kötü olması ve prenatal tanı yöntemlerindeki yetersizliklere bağlı olarak, NTKD insidansında belirgin bir azalma olmamıştır (20). Buna karşın, yenidoğan yoğun bakım ünitelerinin ve cerrahi tekniklerin gelişmesiyle, NTKD'li doğan bebeklerin yaşama şansı ve yaşam sürelerinde artış gözlenmiştir (19, 21). Bu nedenle, NTKD'li hasta popülasyonu ve bu hastalığın daha sonraki yaşlar için getirdiği sorunlar her geçen gün artmaktadır.

NTKD'ler kranyal ve spinal disrafizm olarak ikiye ayrılabilir.

1.2.1. Kranyal Disrafizm

1.2.1.1. Anensefali

Beyin ve onu çevreleyen kafatasının olmamasıdır. Bazı vakalarda, kısmi olarak supratentoriyal ya da daha sık olarak infratentoriyal yapılar yoktur. Çoğu bebekte ise beyin büyük bir kısmı bütün olarak yoktur (5).

1.2.1.2. Ensefalosel ve Kranyal Meningosel

Kafatasında açıklık vardır. Leptomeninksler, meningoselde tek başına, ensefaloselde ise alttaki beyin dokusu ile birlikte bu açıklıktan dışarı taşar. Ensefaloselin boyutları, küçük bir şişkinlikten, bebek başı büyüklüğüne kadar değişebilmektedir (5).

1.2.2. Spina Bifida

Myelodisplazi, miyelomeningosel, konjenital spinal kord defekti ve nöral tüp defekti (NTD) tanımların tümü spina bifidayı tanımlamada kullanılmaktadır. Spina

Bifida (SB) spinal kordun ve omurganın konjenital kapanma defektidir (22). Bir yüzyıldır bilinmesine karşın etyolojisi tam olarak gün ışığına çıkarılamamış, genetik ve çevresel faktörlerin kombinasyonu ile meydana geldiği düşünülmüştür. Çocuktaki spinal kord hasarı zamanla daha kötüye gitmez, fakat hayat boyu devam eder (23).

Spina bifida morbidite ve mortalite oranı yüksek, çoğunlukla folik asit eksikliği ile birlikte genetik faktörler veya gebelikte kullanılan bazı ilaçlardan kaynaklanan, alt ekstremitelerde paralizi, nörojen mesane ve barsak disfonksiyonu, hidrosefali gibi yaşam boyu kalıcı morbiditelere yol açan bir malformasyondur. Ailelerin ve sağlık kurumlarının bu çocukların tedavisi için gösterdiği çabalar tam tedavi edici sonuç verememekte, bu bireyler ömür boyu tıbbi bakıma ihtiyaç duymaktadır (24).

1.2.2.1. Spinal Defektin Patoembriyolojisi

Nöral tüpün ve beynin oluşumunun embriyolojik araştırmaları, SB'nin gestasyonun 22. ile 28. günleri arasında meydana geldiğini göstermiştir. Bu periyod esnasında spinal kord nörolasyon olarak adlandırılan süreçte şekillenir. Nöral tüpün kaudal kısmı yaklaşık olarak gestasyonun 26. gününde kapanır. Bu kapanma kaudal kenarın herhangi bir noktasında yetersiz kalırsa, miyelomeningosel veya SB aperta defektinin başlangıcını oluşturur (25).

1.2.2.2. Spinal Disrafizm Tipleri

Vertebral kolondaki kemik yapılarının bozukluğuna göre;

a- Spina Bifida Aperta

b- Spina Bifida Okulta olarak ikiye ayrılır (23, 26).

1.2.2.2.1. Spina Bifida Aperta (Açık spinal disrafizm)

Omurgadaki açıklıktan sadece meninkslerin herniye olması meningesel, meningesellerle birlikte spinal kolonun da herniye olması miyelomeningosel olarak tanımlanır. Spina bifida çoğunlukla spinal kordun lomber bölgesini tutar. Yerleşim seviyesine göre insidans dağılımı şöyledir: % 47 lumbosakral, % 26 lomber, % 20 sakral, % 5 torasik ve % 2 servikal bölgede (27). Kese çoğunlukla posteriora uzansa da nadiren anteriora uzanım görülebilir.

SB Apertada Görülen Anormallikler 4 Şekilde Sınıflanır

1. Meningosel: Nöral tüp normal olarak oluşur. Kese içinde beyin omurilik sıvısı (BOS) ve zarlar bulunur. Kese duvarı, sağlıklı bir cilt dokusu ile örtülüdür (20).

2. Meningomiyelosele: En sık görülen NTKD tipi olup yaklaşık bin canlı doğumda bir görülür (1). Bu malformasyonda, spinal kordun bir parçası yuvarlanarak nöral tüpü oluşturamaz. Nöral tüp kapanamadığı için ektoderm, nöral tüpü kaplayamaz ve ciltte bir açıklık gelişir. Açıkta kalan nöral plağı, ince bir cilt ve araknoid doku tabakası çevreler. Altında subaraknoid boşluk vardır. Meningomiyelosele ile hidrosefali ya da Chiari II malformasyonu gibi diğer bazı SSS anomalileri sıklıkla birlikte görülebilmektedir (1, 20).

3. Lipomeningomiyelosele: Kapanmamış nöral tüpün arka yüzeyinde daha sonra yağ hücrelerine dönüşen mezenkimal hücreler kalır (1).

4. Miyeloşizis: Erken embriyolojik dönemde gelişir. Geniş bir nörolasyon defektidir. Gebeliğin 28. günü civarında oluşur. Genellikle, torako-lomber bölgede görülür. Açıkta kalan nöral plağın yüzeyi düzdür ve genellikle tam epitelize değildir. Sıklıkla BOS sızıntısına bağlı olarak menenjit ve ventrikülit riski yüksektir. Açıkta kalan nöral dokunun amniyotik sıvıyla teması nedeniyle doku hasarı geliştiğinden, genellikle lezyon seviyesinin altında tam bir nörolojik defisit vardır (5).

Spina bifida apertalı çocuklarda hipospadias, kriptorşidizm, mesane ekstrofisi, imperfore anüs, çift üreter, at nalı böbrek gibi genito-üriner anomaliler normal çocuklara oranla daha sık görülmektedir (28). Spina bifidalı çocuklarda, doğumsal kalp hastalığı ve yarı damak gibi anomaliler de görülebilmekle beraber ancak bu anomalilerin spina bifidalı çocuklardaki insidansı, spina bifidası olmayan çocuklara oranla daha fazla değildir (5).

1.2.2.2.2. Spina Bifida Okült

Spina bifida okült daha çok lomber veya sakral bölgede meydana gelir. Bebeğin sırtı normal ciltle kaplıdır ve kese oluşumu gözlenmez. Çoğu zaman kemik anomalisi vardır ancak kas yapısı normaldir. Sırtta orta hatta genellikle bir yumru/şişlik, kıllanma, kızarıklık ve/veya nevuslardan herhangi biri görülebilir. Nörolojik disfonksiyon SB okültada başlangıçta genellikle bulunmaz. Fakat ilerleyen dönemde spinal kordun yapışmasına bağlı olarak problemler gelişebilir (25). Kutanöz ilişkisinin haricinde, yeni doğanda veya erken bebeklik döneminde anormalliklerin tespiti yaygın değildir. Fakat, tespit edildiği zaman, tek taraflı ayak deformitesi (pes kavus veya genellikle ayak deformitesi ile birlikte alt ekstremitelerde atrofi) içerir. Nörolojik bulgular çocuk yürüdükten sonra belirginleşir.

Birçok SB okültalı hasta hiçbir bulgu vermediğinden dolayı hastalıklarının farkına bile varmazlar. Basit radyografik tetkikte rastlantı eseri bulunabilir. SB okültalı, izole olarak 1. sakral ve 5. lomber vertebrada lokalizedir. SB okültaya medulla spinalisin diğer konjenital defektleri eşlik eder. Bunların çoğunluğu dermal sinüs (% 35), lipoid tümörler (% 29) ve filum terminaledeki anormalliklerdir (% 24) (29).

SB Okültada Görülen Anormallikler 5 Şekilde Sınıflanır

1-Split Kord Sendromu: Spinal kord iki parçaya ayrılır. Çocuk büyüdüğünde, korddaki ayrılma yarığın vertebral kolondan daha yavaş büyümesi sebebiyle daha da büyüyebilir. Bu durumda sfinkter bozuklukları ve alt ekstremitelerdeki nörolojik bulgulardaki artış ortaya çıkar. Bu bulgular genellikle 2 yaşından önce görülmez. Cerrahi tedavi gerektirir (30).

2-Dermoid Kist: Kesenin kapatılması esnasında, eğer herhangi bir dermal element spinal korddan ayrı bağlanırsa, dermoid kistler gelişebilir. Sonuç olarak nöral elementlerin üzerine direkt basıncın oluşmasıyla lumbosakral köklerin fonksiyonunda azalma meydana gelir (31).

3-Lipom: Lipom yağlı dokudaki toplanmadır, spinal kordun sonuna bağlıdır. Sırt üzerinde genellikle yumru veya gamze bulunur (24).

4-Dermal Sinüs: Santral sinir sistemi ile bağlı değildir. Genel olarak bu defektler lumbosakral ve oksipital bölgelerde görülür. Açık sinüs traktı varlığı serebrospinal sıvının drenajına veya bakteriyel enfeksiyonların girişine izin verir (29).

5-Filum terminale anormallikleri: Normal filum terminalenin kalınlığı 2 mm'dir. Filum terminale elastik yapıda bir oluşumdur. 2 mm'den daha kalın bir yapı sergilendiğinde bu elastisitesini yitirmektedir. Bazı olgularda ise filum terminale tamamen yağ dokusu karakterindedir (20). Bu anomalilerde spinal kord ve/veya sinir köklerinde basıya bağlı hasar oluşmakta, bu da gelişmekte olan nöral dokunun distorsiyonuna neden olmaktadır (32, 33).

1.2.2.3. İnsidans

Annenin iyi beslenmesi, anne sağlığına verilen önem ve gelişen prenatal tanı yöntemleriyle SB saptanan gebeliklere son verilmesiyle birlikte dünyada insidansı azalmaktadır (26). Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık olarak yılda 3000 SB'li bebeğin dünyaya geldiği bildirilmiştir. Bu bebeklerin yarıya yakını miyelomeningosel tip SB hastasıdır. İnsidansı Afrika ve Amerika insanlarında düşük, İngiltere, İrlanda

ve İspanya'nın güneyinde yüksektir (24). Amerika'da doğan 1000 bebeğin ikisinde SB vardır. Ancak Türkiye için yeterli istatistiksel veri olmaması nedeniyle insidans bilinmemektedir (34).

Türkiye, sağlık kayıt sisteminin iyi olmaması nedeni ile pek çok değişken gibi çeşitli konjenital malformasyonların sıklığının bilinmediği bir ülkedir. Türkiye'de NTD ile ilgili epidemiyolojik bulgular, prevalansın bölgesel ve demografik özelliklere göre değiştiğini göstermektedir. Bu konuda Türkiye'de çeşitli illerde yapılmış araştırmalarda NTD'nin sıklığı binde 3-5.8 arasında değiştiği tespit edilmiştir (35-46). NTD'lerin sıklığı ülkeler arasında önemli farklılıklar gösterir. Nöral tüp defektleri dünyada % 0,1 - % 0,4 ülkemizde ise % 0,3 oranında görülmektedir (24, 46, 47). İzmir'de yapılan bir çalışmada SB insidansı 1,5/1000 olarak tespit edilmiştir (48). Elazığ'da 2004 yılı verileri dikkate alındığında SB insidansı 2.6/1000 olarak tespit edilmiştir (49).

Yukarıda sunulan veriler ülkemizde NTD sıklığının Avrupa ve ABD verilerinden yüksek olduğunu göstermektedir (15). Bütün dünyada olduğu gibi bizde de NTD sıklığı ve dağılımındaki farklılıklar, etyolojik faktörler olarak beslenme, kültürel veya genetik nedenler gibi bazı özgün veya özgün olmayan nedenlerin incelenmesi gerektiğini göstermektedir.

1.2.2.4. Etiyoloji

Tam olarak bilinmemekle birlikte SB nedenleri hakkında çeşitli teoriler bulunmaktadır. Bunlar arasında genetik faktörler, çeşitli teratojenler, beslenme bozuklukları sayılmaktadır. Bilinen teratojenler maternal alkolizm ve valproik asit kullanımıdır. Annede folik asit yetersizliği bazı popülasyonlarda spinal disrafizme yol açabilecek önemli bir faktördür (26).

1.2.2.5. Tanı Yöntemleri

Gebelik sonrasında alfa-fetoprotein testi ve ultrasonla birlikte SB teşhis edilebilir. Gestasyonun 15-20. haftalarında amniyon sıvısında yüksek alfa-fetoprotein spinal kord defektinin varlığını gösterebilir. Bu seviye takibini daimi olarak ultrason muayenesi izler. İlerleyen çalışmalar prenatal anatomik lezyon derecesinin yüksek-rezolüsyonlu ultrason ile görülebileceğini ortaya koymuştur (23).

1.2.2.6. Korunma

Folik asit bir çok taze gıdada bulunan bir vitamindir. Gebeliğin oluşumundan en az bir ay önceden başlayarak gebeliğin 3. ayına kadar yeterli folik asit alan annelerde SB'li bebek doğurma riskinin % 70 azaldığı gösterilmiştir. Bebeğin SB'li olduğu saptandığı zaman aileye bilgi verilmeli, tıbbi kürtaj seçenek olarak sunulmalıdır (20, 28). Eğer gebeliğin ilerleyen dönemlerinde bebeğin SB'li olduğu tespit edilirse vajinal doğumun yaratacağı travma yerine sezeryan tercih edilerek bebeğin sinir fonksiyonlarının bazıları korunabilir. Bebek doğduğunda kese enfeksiyonu önlenerek ve mikro cerrahi teknikleriyle doğumun hemen sonrasında kese kapatılarak bazı nöral yapılar korunabilir (22,50).

1.2.2.7. Spina Bifidanın Klinik Önemi

Defektin anatomik ve nörolojik seviyesi, nörolojik hasarın derecesi tespit edilmelidir. Nöral tüp hasarıyla birçok vücut sistemi etkilenir. SB'li çocukların motor kayıp yanında pek çok problemleri vardır (24). SB' li hastalarda beyin veya beyin sapı tutulumu görülebilmektedir. Santral sinir sisteminin multifokal tutulumu nedeni ile bu çocuklarda travmatik omurilik yaralanmalı çocuklardan çok daha farklı problemlerle karşılaşmaktadır. Bu hasta grubu için en uygun yaklaşım, multidisipliner bir takım anlayışı içerisinde kapsamlı bir terapi planı çizilmesidir.

1.2.2.7.1. Ürolojik ve Nefrolojik Problemler

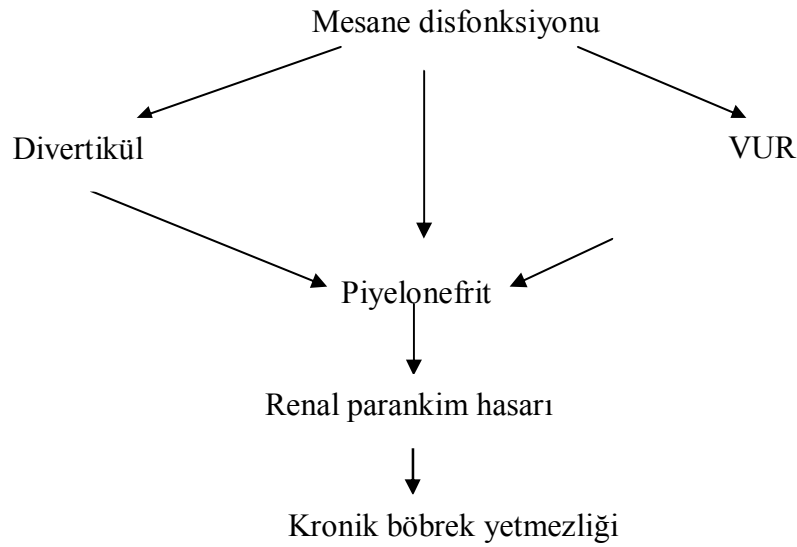
Günümüzde spina bifidalı çocukların gerek yaşam sürelerinin gerekse yaşam kalitelerinin artırılmasında multidisipliner yaklaşımın önemi kabul edilmiştir. Multidisipliner yaklaşım, değişik disiplinler arasında bilgi alış verişi ile hastalığın fizyopatolojisini daha iyi anlamamızı ve anlatmamızı sağlarken, değişken özelliği olan nörolojik tablonun kontrolünü ve komplikasyonların önlenmesini kolaylaştırmaktadır (51).

Bilindiği gibi spina bifidada klinik tablo, etkilenen sinirsel yapılara ve etkilenme derecesine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bu yüzden, patolojinin seviyesi, spinal kord yaralanmalarının tersine hastalığın kliniği ve geleceği hakkında bize fazla ipucu vermemektedir.

Bu olgularda görülen ürolojik patolojiler de oldukça değişkenlik göstermektedir. Bu çocuklarda görülen başlıca ürolojik ve nefrolojik problemler idrar inkontinansı, uyumsuz ve retrakte mesane, idrar yolu enfeksiyonları, idrar yolu taşları,

VUR ve kronik böbrek yetersizliğidir (31, 52, 53). Bu olgularda üriner sisteme ait kronik böbrek yetmezliği, vezikoüreteral reflü ve idrar inkontinansı gibi sorunlar mortalite ve morbidite nedenleri arasında başta gelmektedir (10, 54). Spina bifidalı çocuklarda kronik böbrek yetmezliğinin etiyolojisinde başlıca rolü kronik pyelonefrit ve VUR oynamaktadır (31, 53). Bu komplikasyonların önlenmesinde en önemli faktörler düşük basınçlı idrar depolanması ve boşaltılmasının sağlanması, yüksek rezidüel idrar ve idrar yolu enfeksiyonlarının önlenmesidir (20, 53).

Tablo 1. SB' ye bağlı nörojen mesanede kronik böbrek yetmezliği gelişmesi



1.2.2.7.2. Gastrointestinal ve Lokomotor Problemler

Spina bifidada uyarıların bozulması ile rektal veya rektosigmoid motilitenin yavaşlaması, anal veya rektal hissin kaybolması, bozulmuş eksternal anal sfinkter fonksiyonu, levator kasların değişen motilitesi, internal sfinkterin motor koordinasyonunun bozulması ve buna bağlı gaita inkontinansı veya konstipasyon şeklinde gastrointestinal problemler ortaya çıkar (55).

Eğer SB'li çocuğun kasları spontan hareket edemiyorsa, kontraktür veya kaslarda kısılma gelişebilir, gergin kaslar ekstremitayı normal pozisyonunun dışına çekerler ve eklemlerin uygun bir şekilde çalışmasını önlerler (30). SB'li çocukta düzelmeyen postür, eklem kontraktürleri, deformiteler, zayıflık ve ağrı ile sonuçlanır. Görülen başlıca postüral sorunlar arasında başın öne protrüzyonu, yuvarlak omuzlar, kifoz, skolyoz, hiperlordoz, kalça ve tibianın rotasyonel deformiteleri, kalça ve dizlerde fleksiyon, ayakta pronasyon sayılabilir. Spinal deformiteler daha çok yüksek seviyeli

lezyonlarda görülür ve yaş ilerledikçe prevalans artar (26). SB'li çocuklarda sinir hasarı sebebiyle bacaklarında çeşitli derecelerde paralizi mevcuttur (56). Lezyon seviyesinden bağımsız olarak bu olgularda üst ekstremitelerde güç kaybı da görülebilir. Motor seviye en alt intakt nöromusküler segment olarak tanımlanır (26, 34).

1.3. NTD Etyolojisinde Multifaktöriyel Kalıtımın Rolü

Canlıların özelliklerinin kalıtsal olduğunun bilinci ile, tarih öncesi çağlardan beri bitki ve hayvanlar araştırılmıştır. Bununla birlikte, kalıtsal aktarım mekanizmalarını anlamaya çalışan modern genetik bilimi ancak 19.yy.'ın ortalarında, Gregor Mendel'in çalışmasıyla başlamıştır (57). Mendel, kalıtımın fiziksel temelini bilemediyse de, bu özelliklerin ayrık (kesikli) bir tarzda aktarıldığını gözlemlemiştir; günümüzde bu kalıtım birimlerine "gen" adı verilmektedir.

Genler DNA'da belli bölgelere karşılık gelir. DNA dört tip nükleotitten oluşan bir zincir moleküldür, bu zincir üzerinde nükleotitlerin dizisi, organizmaların kalıp aldığı genetik bilgidir. Doğada DNA, iki zincirli bir yapıya sahiptir. DNA'daki her iplikçikteki nükleotitler birbirini tamamlar, yani her iplikçik, kendine eş yeni bir iplikçik oluşturmak için bir kalıp olabilmeye özelliğine sahiptir. Bu, genetik bilginin kopyalanması ve kalıtımı için işleyen fiziksel mekanizmadır (58).

Nükleotitlerin DNA'daki dizilişi, hücre tarafından aminoasit zincirleri üretmek için kullanılır, bunlardan protein oluşur. Bir proteindeki amino asitlerin sırası, gendeki nükleotitlerin sırasına karşılık gelir. Aradaki bu ilişkiye genetik kod denir. Amino asitlerin bir proteindeki dizilişi, proteinin nasıl bir üç boyutlu şekil alacağını belirler; bu yapının şekli de proteinin fonksiyonundan sorumludur. Hücrelerin yaşamaları ve üremeleri için gerekli hemen hemen tüm fonksiyonları proteinler yaparlar. DNA dizisindeki bir değişim, bir proteinin amino asit dizisini ve dolayısıyla onun şekli ve fonksiyonunu değiştirir: bu, hücrede ve onun bağlı bulunduğu canlıda önemli sonuçlara yol açabilir (58).

1.3.1. Polimorfizm

Organizmada gelişimsel planları belirleyen ve tüm hücrel aktivitelelerin yönetiminden sorumlu olan molekül DNA'dır. DNA dizilerindeki değişiklikler bireylerin birbirinden farklı olmasına yol açar (genetik çeşitlilik). Genom proteine dönüşecek olan genler ve çok miktarda protein kodlamayan dizilerinden oluşur.

Genlerin içinde de ekzon ve intron dediğimiz iki farklı kısım vardır. Bunlardan ekzonlar protein yapısına katılırken protein kodlamayan ve genomun %25'ini oluşturan intronlar RNA işlenirken kesilerek şifreden uzaklaştırılırlar. Diğer yandan genomun %60'ından fazlasını, çeşitli tipte tekrarlayan DNA dizileri, psödogenler, genler arasındaki tekrarlanmayan aralayıcı diziler ve mRNA'ların 5' ve 3' uçlarında bulunan, proteine çevrilmeyen diziler oluşturur. Böylece genetik çeşitliliğe yol açtığını var saydığımız değişikliklerin DNA'nın hangi kısmında olduğu önem kazanır (59).

Protein kodlayan ve oluşan proteinin işlevini önemli ölçüde sınırlayan DNA değişiklikleri mutasyon olarak adlandırılır ve hastalığa yol açarlar. Proteinlerde farklılık yaratmayan, ya da oluşan farklılıkların fenotipte değişikliğe yol açmadığı, DNA dizi değişiklikleri ise 'normal varyasyonlar' ya da polimorfizm kavramı altında ele alınır. Evrim boyunca seçici baskı altında olan mutasyonlar toplumda nadir gözlenen değişiklikler olmasına karşın polimorfizmler toplumda yaygın olarak bulunurlar (%1'in üzerinde). Oluş mekanizmalarına ve bulundukları yere göre farklı tipte polimorfizmler mevcuttur. Literatürde tespit edilen her yeni polimorfizmi genom veri bankalarına kaydedilmektedir. Bu işlem sırasında her bir polimorfizm için bir referans (rs) numarası verilmektedir. Böylece bu polimorfizmleri çalışacak araştırmacılar bu numaralardan yola çıkarak polimorfizmler hakkında ayrıntılı bilgilere ulaşabilmektedirler (60).

1.3.1.1. Kısa DNA Baz Tekrarları

(Short tandem repeat polimorfizm; STRP veya microsatellit): İnsan genom çalışmaları sırasında genomda şifreye dönüşmeyen bölgelerde iki baz (örneğin sitozin-adenin; CACACACA....gibi) ya da dört bazlık (Guanin-Adenin-Timin-Adenin; GATAGATAGATA.....gibi) tekrar bölgeleri olduğu görülmüştür. Bunların şu andaki bilgilerimize göre işlevsel herhangi bir görevleri yoktur, ancak bireylerin DNA'larının birbirinden farklı olmalarına neden olurlar ve toplumda yaygın bulunurlar. Bu bölgeler içerdikleri tekrar sayılarına göre DNA'da bölgeye özgü bireysel büyüklük farkları yaratırlar. Homolog kromozomlardan birisi babadan diğeri anneden gelmiş olduğu için ilgilendiğimiz tekrar bölgesi açısından bireyin iki kromozomu arasında fark olabilir. Böyle bir bireyin DNA'sının ilgili bölgesini polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) metodu ile çoğaltıp jelde yüksek elektrik akımı

altında yürütecek olursak, daha kısa olan DNA parçası daha hızlı ilerleyecek diğeri ise geride kalacaktır. Böylelikle jel üzerinde farklı bant görünümüleri oluşacaktır. İncelenen bireylere ait DNA'lar çoğaltılıp jelde yan yana yürütülecek ve jel görüntüleri karşılaştırılacak olursa bireysel DNA farklılıkları saptanabilir ve genetik gösterge olarak kullanılabilir (61).

1.3.1.2. Uzun DNA Baz Tekrarları

(Variable Number Tandem Repeats (VNTR); minisatellitler): DNA'nın bazı bölgelerinde blok halinde büyük DNA parçalarının (9-70 baz çifti ve daha uzun bölgeler) tekrarlandığı görülür. Bu tekrar bölgelerini içeren DNA parçaları bölgeyi içine alacak şekilde bölgenin dışından enzimler aracılığı ile (Restriksiyon enzimleri) kesilir. Daha sonra ilgili bölge nitroselülöz bir membrana aktarılır ve VNTR bölgelerine özgü işaretli DNA parçaları ile (probe) birleştirilir (Southern blotting yöntemi). Böylelikle bireyler arasında farklı uzunlukta olan DNA parçaları görünür hale getirilmiş olur. VNTR'lerin saptanması özellikle adli tıpta genetik parmak izi (genetic fingerprinting) dediğimiz işlemde geniş kullanım alanı bulmuştur (62).

1.3.1.3. DNA'nın Tek Bir Bazındaki Değişiklikler

Single nucleotid polymorphisms (SNP): Burada tek bir DNA bazında (Örneğin Adenin) başka bir baza değişme (Örneğin Guanin) söz konusudur. Bu değişiklik genomun şifreye dönmeyen kısımlarında meydana geldiği zaman yorumlanmaları tıpkı yukarıda anlatılan kısa ve uzun baz tekrarlarındaki farklılıklar gibidir (bireyler arasında genetik çeşitliliğe yol açar). Genetik materyaldeki normal varyasyonlar bazen gen içinde hatta ekzonlar içinde de olabilir. Proteinlerin yapısına katılan amino asitler 3'lü DNA baz dizilerini (codon) tanırlar. Örneğin GTT dizisi daima Valin amino asidini kodlar. Bu üçlü yapının ilk iki bazındaki değişiklikler amino asit yapısında değişikliğe yol açarken son bazdaki değişiklik (GTC;GTA;GTG gibi) yine valin amino asidini tanıyarak, sonuçta oluşan amino asit şifresinde bir farklılık yaratmaz. Bu tip değişiklikler gen içinde oldukları halde proteinde değişiklik yapmadıkları için "eş anlamlı" (synonymous) mutasyonlar olarak adlandırılırlar. Bazı durumlarda da oluşan DNA değişikliği amino asidi değiştirir ancak bu değişiklik proteinin fonksiyonunda etkili olmaz. Bu tip değişiklikler de "sessiz mutasyonlar" ya da eş anlamlı olmayan (nonsynonymous) değişiklikler olarak adlandırılır. Bütün bu değişiklikler polimorfizm kapsamı içinde ele alınır, toplumda yaygın olarak

bulunurlar ve bireylerin genetik materyalini birbirinden farklılaştırarak genetik gösterge olarak kullanılabilirler. SNP değişikliklerinin son yıllarda fark edilen önemli bir yararı da bu değişikliklerin pek çoğunun gen içinde yer almaları nedeni ile gen haritalama çalışmalarında hastalığın doğrudan çalışılan gene bağlantı gösterip göstermediğinin saptanabilmesine yardımcı olmasıdır. SNP'ler bugün özellikle DNA çip teknolojisinin gelişmesi ile ilgili hastalıklara genetik yatkınlıkların sınındığı en önemli gösterge haline gelmişlerdir (63).

SNP değişiklikleri ile çalışmak, DNA parçacığında büyüklük farkı yaratan diğer polimorfizmlerle (örneğin STRP) çalışmaktan farklıdır. Burada tek bir baz başka bir baza değişmektedir ve büyüklük farkı oluşmadığı için bu bölgeleri PZR metodu ile çoğaltıp jelde oluşturacağı büyüklük farkları açısından değerlendirmenin bir anlamı yoktur. Allellerden birinde oluşan bu baz değişikliğini tanıyacak ve çoğaltma sonrasında iki allel arasında büyüklük farkı yaratacak farklı primer kullanılmasına dayalı "allele özel amplifikasyon" bu amaçla kullanılan yöntemlerden biridir. Oluşan değişiklik belli DNA bölgelerini tanıyıp kesen enzim bölgelerinde oluşmuşsa, ilgili enzimin DNA'yı kesip kesmemesini denemeye dayalı DNA'yı kesen enzimlerin oluşturduğu uzunluk polimorfizmleri (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP) de kullanılabilir. Yine bu değişimi floresan işaretlerle tanıyan otomatik analizatörlerin kullanılması da bu amaçla kullanılan pahalı fakat etkin yöntemlerdir (61).

1.3.1.4. DNA'yı Kesen Enzimlerin Oluşturduğu Uzunluk Polimorfizmleri

(Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP): DNA'yı belli baz dizilerinden tanıyıp kesen enzimler "DNA kesim enzimleri (Restriction Endonucleases)" olarak isimlendirilirler. Bazı kesim enzimlerinin özgül tanıma bölgeleri genellikle 4-6 DNA bazından oluşur. Normalde enzimin tanıma bölgesi olan bu bazlarda bir değişiklik olduğunu var saydığımızda enzimin DNA'yı kesme kalıbı değişecektir. Yani genomik DNA'da oluşan dizi değişiklikleri, belirli kesim bölgeleri yaratır veya onları yok eder. Bu nedenden dolayı boyutları değişen bir veya birden fazla DNA fragment Southern blot ve klonlanmış DNA probu ile hibridizasyondan sonra görünür hale getirilebilir. Bu enzim kesim özellikleri polimorfik nitelikteki genetik göstergelerin bir diğer örneği olarak kabul edilebilir ve bağlantı ya da ilişkilendirme analizlerinde kullanılabilir (64).

Görülüyor ki altta yatan moleküler değişiklik ne olursa olsun polimorfizm dediğimiz zaman genetik materyalde bireyleri (hatta aynı bireyin farklı allellerini) birbirinden farklılaştıran ve toplumda yaygın olarak bulunan değişikliklerden söz edilmektedir.

1.3.2. Tıbbi Genetik’te Polimorfizmlerin Kullanımı

Polimorfizmler, tüm insan genetik araştırmalarında anahtar niteliğindeki elementlerdir. Polimorfizmler, genin farklı kalıtsal formlarını veya genomun farklı bölgelerini ayırt edebilmek için kullanılmaktadır. Genetik belirleyiciler olarak tıbbi genetikte kullanım için pratiklik sunar.

Multifaktöriyel kalıtım ile geçen hastalıkların, iki veya daha fazla sayıda minör mutant gen ile çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Poligenik kalıtımda, tek gen kalıtımı ve Mendelyan kalıtımla geçen hastalıklardan farklı olarak, çok sayıda minör mutant genin etkisi söz konusudur. Poligenik hastalıkların etyolojisindeki genetik komponent, genetik eğilimi (predispozisyonu) oluşturur. Bu hastalıklar ailevi olmakla birlikte, Mendelyan kalıtıma kıyasla kalıtım biçimleri çok daha karmaşıktır. Malformasyon oluşum eşiğı, hem genetik hem de çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Eşiğı aşan bireylerde fenotipik olarak hastalık ortaya çıkarken, eşiğı aşmayan bireyler fenotipik olarak normal olmaktadır (65, 66).

Canlı bir hücrede hergün binlerce DNA hasarı meydana gelmektedir. Serbest radikaller, deaminasyon, oksidasyon ve alkilenme reaksiyonları, ultraviyole ve iyonize edici radyasyon gibi çeşitli etkenler DNA hasarına yol açmaktadırlar (67, 68). Bu hasarlar tamir edilmezse, oluşan mutasyonlar ve kromozomal aberasyonlar hücrenin hem yaşamını hem de genetik stabilitesini tehdit eder (67, 69, 70). Bu nedenle etkin bir DNA tamiri fonksiyonel ve mutasyonsuz bir genomun varlığını sürdürmek için şarttır. DNA hasar onarımı ile ilişkili birkaç protein, DNA metabolizmasının çeşitli basamaklarında birbirleri ile etkileşerek DNA’nın bütünlüğünü ve doğruluğunu korur (69, 71).

NTD sıklığının gösterdiği büyük farklılıklar, olası genetik faktörlerin yanında başta beslenme olmak üzere değişik çevresel faktörlerin bu sıklık üzerinde çok etkili olduğunu düşündürmektedir. Dünyada şimdiye kadar yapılan çalışmalarda bazı toplumlarda genetik yatkınlığa neden olan bazı polimorfizmler gösterilmiş olmakla

beraber henüz bu konuda bilinmeyen genlerin olduğu ve bütün genetik faktörlerin belirlenmesinin günümüz şartlarında mümkün olmadığı düşünülmektedir.

1.3.3. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR)'ın Nöral Tüpün Kapanmasındaki Rolü

Son otuz yıldır çeşitli ülkelerde gebelerde folat eksikliğinin NTD'lerine neden olduğu konusunda araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Ardından yapılan gözlemler annenin hamileliğinde folat düzeylerinin desteklenmesiyle NTD'lerinin tekrarlamadığını veya sıklığının azaldığını göstermiştir (72,73). Folik asit, normal DNA yapımı için gerekli nükleotidlerin sentezi ve hücre içi metilasyon reaksiyonları için esansiyel olan bir maddedir. Hücresel folik asit metabolizmasında değişik enzimler rol almaktadır. Yapılan çalışmalar MTHFR enziminin bu metabolik yolda anahtar rol oynadığını göstermiştir. MTHFR, 5-10- metiltetrahidrofolatın 5-metiltetrahidrofolata, dönüşümünü sağlar. 5- metiltetrahidrofolat homosisteinin metionine remetilasyon basamağında görev yapan bir metil donorüdür. MTHFR aktivitesinde bir azalma, homosisteinin metionine remetilasyonu için gerekli folik asit ihtiyacının artmasına neden olur. Yeteri kadar folik asit bulunmadığı durumda hücre içinde homosistein birikir, metionin remetilasyonu sağlanamaz ve sonuçta DNA metilasyonu eksik olur. DNA hipometilasyonu da DNA'nın yapım ve onarım bozukluğuna neden olur (74).

1.3.3.1. MTHFR Enziminin Yapısı ve Görevi

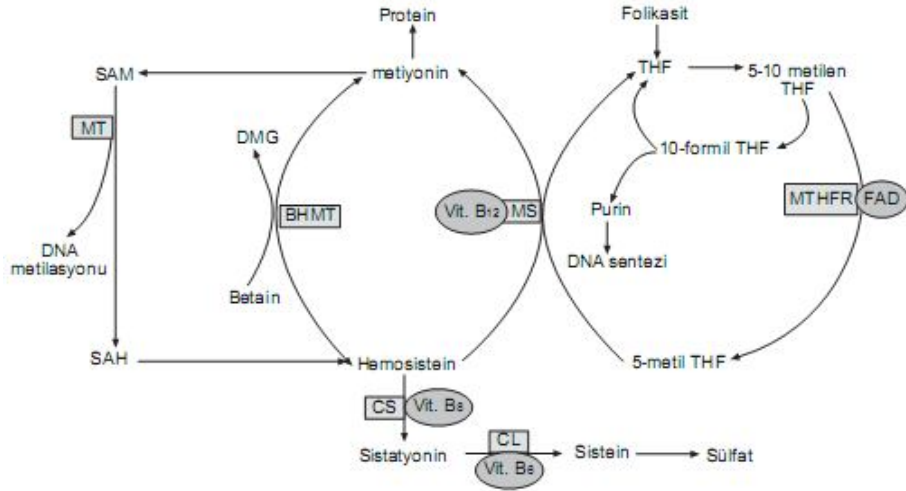
Memelilerde MTHFR'nin yapısı hakkındaki ilk bilgiler, domuz karaciğer enziminin saflaştırılması ile elde edilmiştir. Sitoplazmik bir protein olduğu ve iki alt birimden oluşan homodimer yapıda olduğu bilinmektedir (75). İki izoformu olduğu insanlarda yapılan Western blot analizler sonucu bulunmuştur (76). Bu izoformlar, 70 kilodaltonluk küçük alt birimlere sahip izoform karaciğerden, 77 kilodaltonluk büyük alt birimlere sahip izoform ise diğer dokulardan saflaştırılmış olup ve ikisinin de dokulara özgü olduğu rapor edilmiştir. Enzim, 77 kilodaltonluk alt birim 40 kilodalton ve 37 kilodaltonluk kısımlara tripsinle proteolize uğratıldığında ayrılmaktadır (76). Bu ayrılma sonucunda katalitik aktivitesi değişmeyip, S-adenozil metiyonin (SAM) inhibisyonu ortadan kalkmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda katalitik bölge olan 40 kilodaltonluk N-uç bölgenin substrat ve koenzim bağlama kısımlarına sahip olduğu, regülatör bölge olan 37 kilodaltonluk C-uç bölgesinin ise,

SAM bağlama kısmına sahip olduğu gösterilmiştir (76). Memeli enzimi kendisine nonkovalent olarak bağlı, NADPH'nın metilentetrahidrofolata transferini sağlayan FAD koenzimi içermektedir (77).

1.3.3.2. MTHFR Enziminin Tanımlanması ve Fonksiyonu

MTHFR Enziminin, folat metabolizmasında ve 5,10-metilentetrahidrofolatı 5-metiltetrahidrofolata dönüştürmede anahtar enzim olduğu bilinmektedir (78). Folatın bir formu olan 5,10-metilentetrahidrofolat, homosisteinin metionine tekrar metilasyonu için kullanılmaktadır. DNA metilasyonunun aktiflenmiş formu olan S-adenozil-metiyonin bu reaksiyonda metil vericisi olduğu için, DNA metilasyonu metiyonin sentezine bağlı bulunmaktadır (Şekil 9) (75, 79).

MTHFR geninde görülen bazı mutasyonlar, enzimde inaktivasyona neden olarak, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olan hiperhomosisteinemi ve homosisteinüri oluşmasına neden olmaktadır (75, 80). MTHFR enziminin eksikliği durumunda klinik semptomların geniş bir dağılım gösterdiği açıklanmıştır (75, 80). Hiperhomosisteinemi ve homosisteinürinin ortaya çıktığı ciddi MTHFR eksikliğinde, periferik nöropati, gelişme geriliği, tromboz gibi klinik belirtiler görülmektedir. MTHFR eksikliğinin hafif olduğu durumlara popülasyon genelinde oldukça sık rastlanılmaktadır (80, 81).



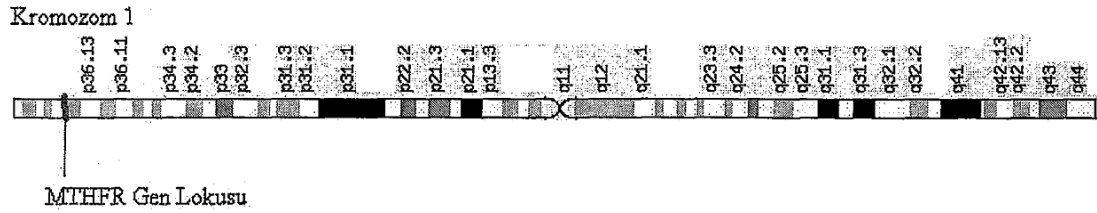
Şekil 9. Metil grubu metabolizmasını içeren anahtar enzimler yolağı. Homosistein'in transsülfürasyon ve remetilasyon metabolize yolları. (MTHFR: metilentetrahidrofolat redüktaz, MS: Metiyonin sentetaz CS: Sistatyonin (3 sentetaz, CL: Sistatyonin γ liyaz, BHMT: Betain homosistein metil transferaz, MT: Metil transferaz SAM: S-adenozilmetiyonin, SAH: S-adenozilhomosistein, THF Tetrahidrofolat, DMG: Dimetilglisin) (82).

1.3.3.3. MTHFR Geninin Yapısı ve Özellikleri

MTHFR geni kromozom 1'de lokalize olup, 656 nükleotidden meydana gelmektedir (Şekil 10). İnsan ve fare üzerine yapılan cDNA çalışmaları, her iki genin de 11 ekzondan oluştuğunu ve ekzonun sınırlarının benzer özellik gösterdiğini bildirmişlerdir (75, 81, 83). İki gende de kodlama sekansları, kodlanan aminoasitler açısından bakıldığında %85 benzerlik görülmektedir (75, 81).

İnsan MTHFR geninin kromozom 1p37.3'de lokalize olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (84, 85). N terminal bölgesi tam olarak açıklanamamıştır. Transkripsiyon faktörlerinin bağlanması açısından, MTHFR geninin promotör bölgesi belirli alanlar içermektedir. Değişik dokularda farklı MTHFR transkriptleri, gen bölgesinde alternatif kaynaşma (splicing) olayları meydana gelmesiyle oluşmaktadır (85).

İnsan genomik klonunun (17kb-kilobaz), 2.2 kb uzunluğundaki MTHFR cDNA sekansının tamamını içerdiği saptanmıştır. 11 ekzon bulunmaktadır. Bunların her biri 102-432 baz çifti içermektedir (75, 85).



Şekil 10. MTHFR geninin kromozom 1'deki yerleşimi.

1.3.3.4. MTHFR Enzim Polimorfizmleri

İnsan ve fare MTHFR geni üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda MTHFR geninde 33 farklı mutasyon belirlenmiştir (Tablo 2) (74, 86-89). Bu mutasyonlardan, vasküler hastalık, nöral tüp defektleri ve kolon kanseri ile yakından ilişkili olduğu açıklanan C677T polimorfizmi ile enzimin katalitik bölgesinde, özellikle nöral tüp defektlerinde etkili olan A1298C polimorfizmi enzimin düzenleyici bölgesinde ortaya çıkmaktadır (74, 86, 90, 91).

Tablo 2. MTHFR geninde bugüne kadar tespit edilen mutasyon tipleri ve sayıları

Mutasyon Çeşitleri	Toplam Mutasyon Sayısı
Nükleotid yer değiştirmesi (yanlış)	29
Nükleotid yer değiştirmesi (splicing)	2
Nükleotid yer değiştirmesi (düzenleyici)	0
Küçük delesyonlar	1
Küçük insersiyonlar	0
Büyük delesyonlar	0
Büyük delesyonlar/ duplikasyonlar	0
Kompleks düzenlemeler (insersiyon)	0
Tekrarlayan çeşitlilikler	0
Toplam	33

Tablo 3. MTHFR geninde tanımlanmış polimorfizmler.

Polimorfizm Adı	Nükleotid numarası ve değişim
MTHFR C677T	677 C → T
MTHFR A1298C (32)	1298 A → C
MTHFR ARG158GLN (29)	482 G → A
MTHFR ARG184TER (29)	559 C → T
MTHFR ASN324SER (34)	983 A → G
MTHFR TRP339GLY (40)	102 T → G
MTHFR 108C-T (40)	1084 C → T
MTHFR 1711C-T (40)	1711 C → T
MTHFR 1081C-T (76)	1081 C → T
MTHFR MET581ILE (8)	581 Met → I

1.3.3.5. MTHFR Genindeki C677T Polimorfizmi

C677T alleli 677. baz çiftinde, sitozinin timine değişimiyle meydana gelen ve MTHFR geninin ürünü olan proteinin 266. pozisyonda alanin amino asidinin valinamino asidi yerine geçmesine neden olan nokta mutasyonudur (85, 90) (Tablo

3). C677T polimorfizmi 4. ekzonda meydana gelmektedir, bu da MTHFR proteinin N terminal bölgesini etkilemektedir. Sonuç olarak MTHFR aktivitesi azalır ve azalan enzim aktivitesiyle 5-metiltetrahidrofolat seviyesinde azalmaya ve bunun sonucu olarak da homosisteinin metiyonine dönüşmemesi nedeniyle plazma homosistein seviyesinde artmaya neden olmaktadır (79, 92). Fonksiyonel olarak kodlanan protein 37°C üstü sıcaklıklarda düşük enzimatik aktiviteye sahip olmaktadır (93).

MTHFR'nin C677T polimorfizminde, CC (Alanin/Alanin) homozigot normal, CT (Alanin/Valin) heterozigot ve TT (Valin/Valin) homozigot mutant genotipler bulunmaktadır (74, 94).

MTHFR'nin C677T polimorfizminin, kardiyovasküler hastalıklar, nöral tüp kusurları, Down sendromu, meme kanseri ve endometrial kanser gibi hastalıklarda bir risk faktörü olduğu açıklanmıştır (86, 90).

C677T mutasyonunda, MTHFR aktivitesi, homozigot mutant TT genotipinde, heterozigot CT ve homozigot normal CC genotiplerine göre azalırken, homosistein seviyesi önemli oranda yükselmektedir (84). MTHFR eksikliğinde, homosisteinden metiyonin oluşumundaki bir bozukluk, organizmada hem metiyonin (S-adenozilmetiyonin) azalmasına hem de homosistein birikimiyle meydana gelen toksik etki oluşmasına yol açmaktadır (86, 95).

1.3.3.6. MTHFR C677T Polimorfizmi ve Nöral Tüp Kusurları

Homozigot 677C -T allelinin, kontrollerle karşılaştırıldığında nöral kusuru olan kişilerde daha yaygın olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar, MTHFR polimorfizmi ile birlikte oluşan folat eksikliğinin, nöronal gelişimi etkilediği ve nöral tüp kusuru oluşumunu arttırdığını göstermiştir (96).

1.3.4. PAX3 ve TEAD2'nin Nöral Tüpün Kapanmasındaki Rolü

DNA doğrudan protein sentezini yönetememektedir. Bu nedenle RNA moleküllerini aracı olarak kullanmaktadır. Hücrelerin özel bir proteine gereksinimi olduğunda doku ve hücre spesifik olacak şekilde RNA sentezi gerçekleştirilmektedir (97). PAX3 ve TEAD2 nöral tüpün kapanmasında görevli olan iki ayrı genidir. TEAD2 p53 bağımlı apopitozisi inhibe ederek nöral tüpün kapanmasını düzenleyebilmektedir. Farelerde yapılan deneylerde tek mutasyonlu allele sahip farelerde eksensefali insidansının arttığı bildirilmiştir. TEAD2 bağımlı eksensefalide

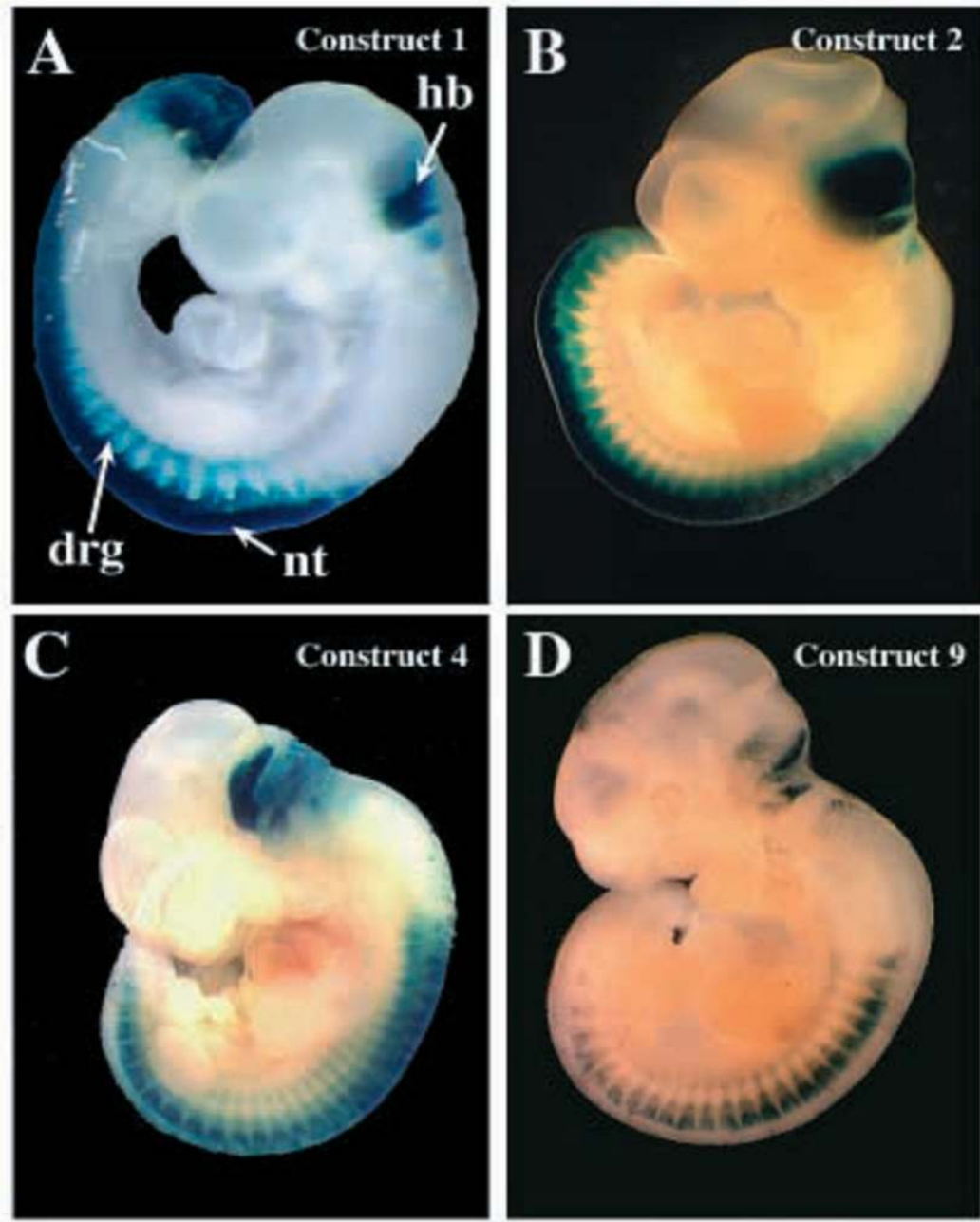
maternal etkinin folik asit metabolizmasına bağımlı olduğu ileri sürülmektedir. TEAD2'nin nöral krestde PAX3 ekspresyonunu düzenlediği bilinmektedir (98).

PAX3 adı verilen gen, beyinden nöronlara sinyal iletimini düzenlemektedir. Bu gende oluşacak bir mutasyon nöronun normal sinyal almasını engeller ve nöronun faaliyeti azalır (99). PAX3 dorsal nöral tüpte ve pre-migratör nöral krest hücrelerince E 8.5'te ilk gösterilen transkripsiyon faktörüdür (100). PAX3 eksikliği olan fare embriyolarında spina bifida oluşur ve anormal dorsal kök ganglionu, enterik ganglion eksikliği, kardiyak akış yolu anomalileri ve defektif melanosit gelişmesini de içeren birçok nöral krest ile ilişkili defektler gösterilmiştir (101). PAX3 nöral krest indüksiyonundaki en öncü belirteçlerden biridir. Nöral ektoderm ile epidermal dokular arasındaki doku-doku etkileşimini sağlar (102, 103).

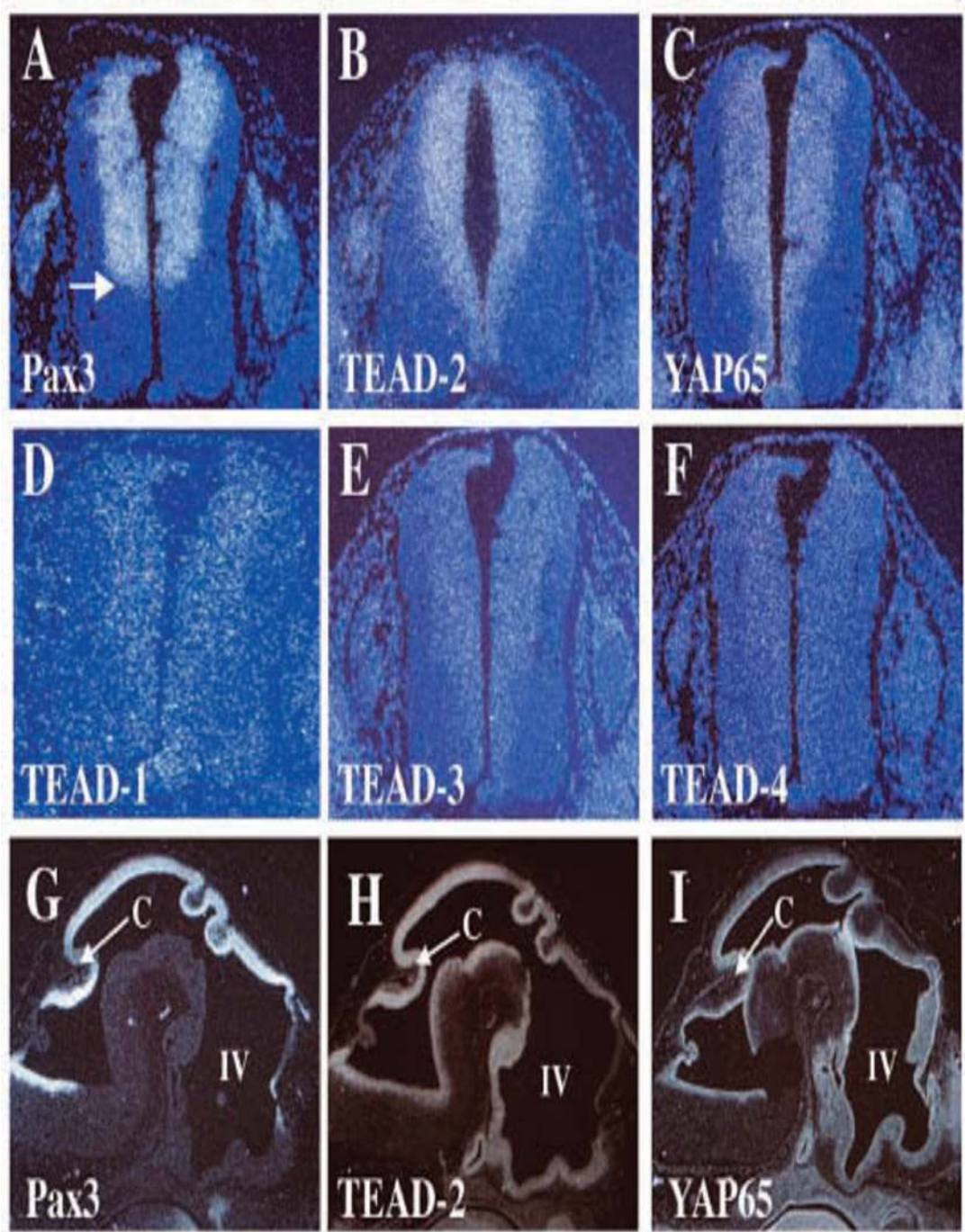
PAX3'ün nöral krest ekspresyonunu düzenleyen çeşitli bölgeleri mevcuttur (Şekil 11). İnsan ve fare genomlarının dizilimlerini kıyaslarken proksimal 1.6 kb'lık bölge içinde özellikle korunmuş iki bölge tanımlanmıştır. Bu bölgeler nöral krest destekleyici 1 ve 2 olarak işaretlenmiştir (NCE 1 ve NCE 2). TEAD2 PAX3'ün promotor bölgesinde yer alan enhancer'a bağlanarak PAX3'ün ekspresyonunu düzenlemektedir (Şekil 11) (102). TEAD2, DNA'ya bağlanma yerini kapsayan transkripsiyon faktör ailesine aittir (97). Bu bilgiler ışığında PAX3 ve TEAD2 genlerinin nöral gelişim sırasında etkili olduğu izlenmektedir. Ancak literatürde spina bifidalı hastalarda bu genlerdeki polimorfizm ile ilgili çalışmalar bulunmamaktadır.

PAX3 promotorundaki TEAD bağlayan bölgenin, nöral krest ve nöral tüp ekspresyonunda önemli olduğu ve TEAD2/YAP65 kompleksinin bu bölgeye bağlanabildiği ileri sürülmektedir (Şekil 12) (97, 104, 105).

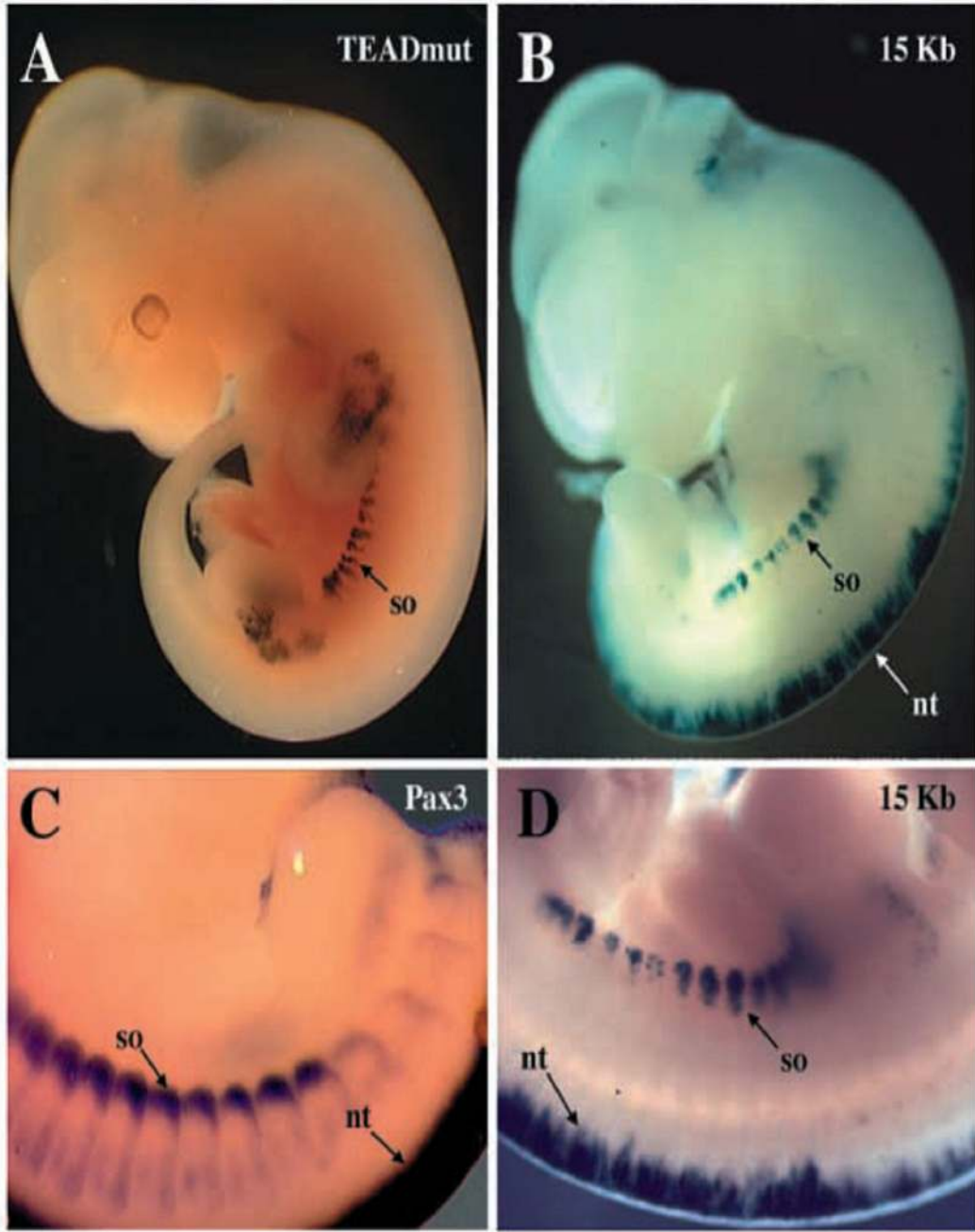
Ökaryotik sistem içinde TEAD2 ve onun ko-aktivatörleri YAP65, NCE2' yi aktive edebilir. NCE artırıcı üzerindeki TEAD2 bağlayan bölgenin mutasyonu nöral tüp ve nöral krestteki transgenik ekspresyonu iptal eder. Transgenik yapıların etkileşimi ve nöral tüplerin eksprese olmaları için TEAD2 bağlayan bölgeler gereklidir (Şekil 13).



Şekil 11. PAX3 transgenik farede β -galactosidaz ekspresyonu. (A) Proksimal PAX3 genomik sekansın üst 6.1 kb'lık kısmı (1. Oluşum) nöral tüpte (nt), arka kök ganglionlarda (drg), arka beyinde (hb) kısmen tekrarlanmıştır. (B) Üst 1.6 kb'lık bölüm ve intron 1'i içine alan 2. oluşum 1. oluşumda benzer bir ekspresyon paterni vermiştir. (C) 5' yukarı kısmının çıkarılması (4.oluşum) nöral krest ekspresyon paternini devam ettirmiştir. (D) 5' ve 3' sekansların NCE 1 ve NCE2 ye delesyonu, buna ilave olarak içeride 156 kb'lık kısmın delesyonu (9. Oluşum) A'dakine benzer bir ekspresyon paterni oluşumuna neden olmuştur, ancak arka beyin ve nöral tüpte biraz zayıf bir ekspresyon gözlenmiştir (98).

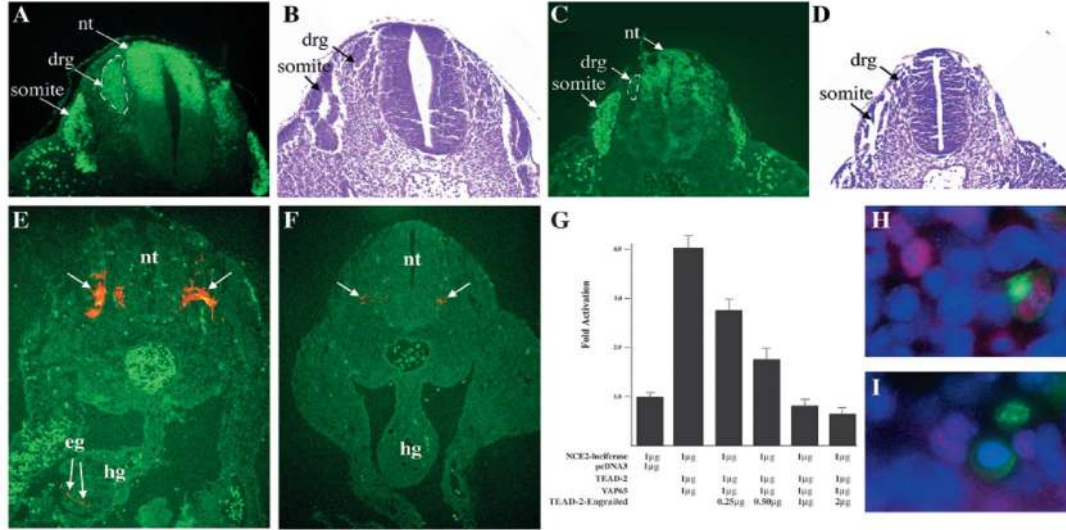


Şekil 12. TEAD2 ve PAX3 arka nöral tüpte birlikte eksprese edilir. E11.5 te hücre içi melezleştirme yapılmıştır. (A) PAX3 ekspresyonu nöral tübün arka kısmına sınırlanmıştır (ok). (B) TEAD2 ekspresyonu PAX3 ün üstüne gelir ve ön tarafa uzanır. (C) YAP65 ekspresyonu TEAD2 yi taklit eder. (D,E) TEAD1 (D) ve TEAD3 (E) nöral tüpte daha zayıf eksprese edilir. (F) TEAD4 ekspresyonu nöral tüpte saptanamamıştır. (G-I) Ventriküler zonda (G) sagittal bölümler beyne doğru PAX3 ekspresyonunu gösterirken, TEAD2 (H) ve YAP65 (I) inki üst üste biner. c, serebellar primordium; IV, dördüncü ventrikül (98).



Şekil 13. NCE2 nin kalitesini arttıran TEAD2 nin bağlandığı alandaki mutasyonlar nöral tüp ve nöral krestte transgenik ekspresyonu durdurur. (A) Somit-spesifik PAX arttırıcı ve nöral krest indükleyici yapıyı içeren transgenik embriyoda NCE2 deki bir TEAD mutasyonu gösterilmiştir. Somit ekspresyonu sağlanırken dorsal nöral tüpte veya nöral krestte herhangi bir ekspresyon gözlenmemiştir. (B) Proksimal 15kb ve proksimal PAX3 alanındaki bozulmamış somitler ve nöral krest indüksiyonları ile birlikte transgenik embriyo ve her iki somitte nöral krest zincirinin ekspresyonu ve nöral krest gösterilmiştir. (C) Wild-type PAX3 gen ekspresyonu gösteren in situ hibridizasyon (D) B deki transgenik emriyonun büyütülmüş hali (98).

Dominant negatif TEAD2, PAX3 ekspresyonunu zayıflatır ve nöral krest türevlerinin gelişimini etkiler (Şekil 14). PAX3'ün gelişim esnasında iki farklı etki alanında önemli etkileri vardır. PAX3 dorsal nöral tüpte nöral krestin uygun gelişimi ve somitlerde normal miyogenez için gereklidir.



Şekil 14. Dominant negatif TEAD2 ekspresyonunun PAX3 ekspresyonu üzerindeki etkisi. Bastırılmış engrailed domain içeren bir TEAD2 füzyon proteini nöral tüpte Wnt1 arttırıcısını kullanarak etkisini gösterir. (A) Wild-type embriyoda normal morfoloji PAX3 proteininin (yeşil) embriyodaki ve dorsal nöral tüpte, dorsal kök gangliyonlarında (nokta ile gösterilen) ve somitlerde görünüşü. (B) Resim A'nın Hematoksilen eozinle boyanmış görünümü. (C) Anormal dorsal tüplü ve küçük dorsal kök gangliyonlu transgenik embriyoda, küçük kök gangliyonla birlikte nöral tüpte ve dorsal kök gangliyonlarda PAX3 protein ekspresyonu belirgin azalmış ancak somitler etkilenmemiş. (D) Hematoksilen eozinle boyanmış transgenik bölüm. (E) Nöral tüpe yakın bölgelerde güçlü ekspresyon gösteren anti-nörofilament antikorlarıyla boyanmış Wild-type E10.5 embriyo ve dorsal kök gangliyon ve arka barsakta daha az ekspresyon gösteren enterik gangliyon. (F) Dorsal kök gangliyonun olduğu bölümlerde ve arka barsağın olmadığı alanlarda transgenik embriyoda nörofilament ekspresyonu daha azdır. (G) TEAD2-Engrailed, TEAD2 yi ve TEAD2 nin YAP65 in NCE2-lusiferazı (parlama olayına yardımcı olan enzim) aktive etmesini engeller. Bunu doza bağımlı olarak yapar. TEAD2-Engrailedi arttırdıkça doza bağımlı olarak NCE2-lusiferaz aktivitesi düşer. (H) [Green fluorescent protein](#) (GFP) vektörleriyle (yeşil) transfer edilen P19 hücrelerinde retinoik asit endojen PAX3 proteinini içerir (Kırmızı alanlar: immuno histokimya da saptanan alanlar). (I) TEAD2-Engrailed ekspresyon faktörü GFP ile birlikte transfer edildiğinde PAX3 geni inhibe olur. GFP eksprese eden proteinlerin PAX3 eksprese etmemesi gibi. Nukleoluslar mavi boyanmıştır (98).

Bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de NTD sıklığı ve dağılımındaki farklılıklar, etyolojik faktörler olarak beslenme, kültürel veya genetik nedenler gibi bazı özgün veya özgün olmayan nedenlerin incelenmesi gerektiğini göstermektedir.

Tıptaki gelişmelere paralel olarak ağır konjenital anomalisi olan çocuklarda yaşama oranı artmakta, fakat anomaliden doğan sorunlar aynı oranda düzeltilememektedir. Çalışmamızda, SB'li hastalarda MTHFR, TEAD2 ve PAX3 polimorfizmlerinin genotip ve allel sıklıklarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilecek verilerin SB'ye yatkınlık oluşturacak genetik durumların ortaya çıkarılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alındıktan sonra, Çocuk Cerrahisi polikliniğine başvuran ve spina bifida tanısı konulan 67 hasta incelendi. Yazılı ve sözlü onamları alınan olguların anamnez, fizik muayene ve rutin tetkikleri yapıldı. Sakral muayene bulgusu normal olan ve başka nedenlerle çocuk cerrahi polikliniğine başvuran çocuklardan yine onamları alınarak elde edinilen kan örnekleri ile 80 kişilik kontrol grubu hedeflendi. PAX3 gen kontrol grubu çalışmasında 8 hastada optimal sonuç alınmadığı için kontrol grubu 72 olgu olarak belirlendi. MTHFR ve TEAD2 gen polimorfizmlerinin değerlendirilmesinde “Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm” yöntemi ve PAX3 polimorfizminin değerlendirilmesinde ise “Amplifikasyon Spesifik Oligonükleotid” yöntemi kullanıldı. Çalışma ve kontrol grubunda MTHFR, TEAD2 ve PAX3 gen polimorfizmleri araştırmak üzere alınan kan örneklerinde genetik çalışmalar Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Her olgunun demografik özelliklerini ve klinik öykülerini içeren detaylı bir anket yapıldı (Ek 2). Olgulardaki defektin tipi kayıtlara geçirildi ve ailede benzer olgu, akraba evliliği olup olmadığı ve anne yaşı sorgulandı. Doğum anamnezleri yanında olası teratojen nedenleri ortaya çıkarmak için annelerin perikonsepsiyonel dönemde ilaç kullanımı sorgulandı. Ayrıca hastaların geldiği il kaydedildi. Anne yaşı ve olguların yaşları sorgulandı. Hastalar detaylı muayene edilerek minör ek anomali varlığı aranıp kaydedildi.

2.1. Polimorfizmlerin Tayininde Kullanılan Gereçler

Agaroz Jel Elektroforez Güç Kaynağı, Agaroz Jel Tankı ve Düzeneği (Consort N.V. Parklaan 36 B-2300 Turnhout, Belgium), Eppendorf Mastercycler Gradient (Netheler Mlnz GmbH, 23331 Hamburg, Germany), UV lambası ve ilgili okuma, kaydetme, fotoğraflama ünitesi (TCP-20-M, Vilber Lourmat, Cedex, France), Otomatik Mikropipetler, Eppendorf (France), Soğutmalı Mikrosantrifüj (Ole Dich Intrumentmakers APS, type 157.MP, Germany), Elektronik Hassas Teraziler (Shimadzu Corporation Libror AEG-320, Japan), Etüv, Nüve (NP 400, Türkiye), Elektro-Mag (Türkiye), Ph Metre (Hana Intruments HI8521 pH meter, Italy), Otoklav, Nüve (Türkiye), Buzdolabı, Arçelik (Türkiye), Derin Dondurucu -20 °C,

Uğur (Türkiye), Su Banyosu (Kötterman labortechnik type 3643, Germany), Vorteks (Labinco L46, The Netherlands).

2.2. Polimorfizmlerin Tayininde Kullanılan Kimyasallar

1. Borik asit (Merck, Frankfurt, Germany), EDTA (Sigma, Germany), Tris HCL 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 900 µl cell lizis solüsyonu eklendi.
2. Kan tüpü kanın tamamen karışması sağlanana kadar hafifçe sallandı, sonra 300 µl kan cell lysis solusyonu içeren mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Karışması için tüp 5-6 kez alt-üst edildi.
3. Kırmızı kan hücrelerinin lizisi için 10 dakika oda ısısında bekletildi, bu esnada tüp 2-3 defa alt-üst edildi. 13 000-16 000 rpm'de de 20 saniye santrifüj edildi.
4. Görünen beyaz pellete dokunmaksızın süpernatant yaklaşık 10-20 µl residüel sıvı bırakacak şekilde atıldı.
5. Beyaz kan hücreleri resüspanse olana dek tüp 10-15 saniye kadar hafifçe vortekslendi.
6. 300 µl Nuclei lysis solüsyonu resüspanse hücrelerin bulunduğu tüpe eklendi. Beyaz kan hücrelerinin lizisi için solüsyon 5-6 kere pipetlendi. Solüsyonun visköz bir hale geldiği gözlemlendi. Karıştırma sonunda hücre çökeltileri görünürse bunlar çözülene kadar solüsyon 37°C de inkübe edildi. Eğer 1 saat sonra hala çökeltiler görülüyorsa ek olarak 100 µl nuclei lysis solüsyonu ilave edilip inkübasyon tekrarlandı.
7. 1.5 µl RNase solüsyonu eklendi ve tüp 25 defa alt-üst edilerek karıştırıldı. Karışım 37°C de 15 dakika inkübe edildi. Devam etmeden önce karışımın oda sıcaklığına gelmesi beklendi.
8. Nükleer pellete 100 µl protein presipitasyon solüsyonu eklendi. 10-20 saniye vortekslendi. Vortekslemeden sonra küçük protein çökeltileri görüldü.
9. 13 000-16 000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Koyu kahverengi protein pelleti görüldü.
10. İçinde DNA bulunan süpernatant, içine 300 µl isopropanol konulmuş temiz bir 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak karıştırıldı.
11. Solüsyon alt-üst edilerek ağ şeklinde DNA kütlesi görülene kadar karıştırıldı.
12. 13 000-16 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. DNA küçük beyaz bir pellet şeklinde görüldü.

13. Süpernatant atılarak 300 µl %70 lik etanol eklendi ve -20°C’de saklandı.
(Sigma, Germany), Etidium Bromide (Sigma, Germany), Fikol (Serva, Germany),
Bromofenol Mavisi (Sigma, Germany), Xylene Cyanol (Sigma, Germany),
Mutlak Etanol (Kimetsan, Türkiye), 100bç’lik DNA boyur Markırı (Fermentas,
Litvanya), Agaroz (Sigma, Germany).

2.3. Polimorfizmlerin Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Agaroz jel yükleme tamponu (6X), %15 fikol, %0.05 bromofenol mavi, %0.05 ksilen siyanol, Tris-borik asit-EDTA tamponu (TBE) (10 X) (1L), 108 g Tris HCl, 55 g Borik asit, 20 ml 0.5 M EDTA, 1000 ml ddH₂O ile tamamlanır. EDTA Çözeltisi (0.5 M, 50 ml), 18.6gr EDTA tartılır. pH=8.0’e EDTA çözülünceye kadar NaOH eklenerek ayarlanır. Etidium bromüd(EtBr) çözeltisi (10mg/ml); 10mg EtBr tartılır, üzerine 1 ml ddH₂O eklenir. Karanlıkta +4°C’de saklanır.

2.4. DNA İzolasyon İşlemi

Hastalardan, yaklaşık 2 cc periferik venöz kan EDTA’lı biyokimya tüplerine alındı. Kandan standart DNA izolasyon protokolleri kullanılarak DNA izole edildi.

2.4.1. Kullanılan Solüsyon ve Gereçler

DNA purifikasyon kiti (Promega Cat.#1125), 1.5 ml’lik tüpler (Axygen scientific MCT-150-A), 100 ve 1000 µl’lik pipet (Eppendorf research series 2100 pipettes, Germany), pipet uçları (Deltalab 327-17), mikrosantrifüj, vorteks, izopropil alkol ve % 70’lik etil alkol.

2.4.2. İzolasyon Aşamaları

2.4.3. DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi

DNA konsantrasyonu ve saflık derecesinin belirlenmesi UV spektrofotometresi ile yapılabilmektedir. DNA örneğinin içerisinde bulunduğu solüsyon tarafından absorbe edilen UV miktarı örnekteki DNA miktarı ile doğru orantılıdır. Absorbans genellikle 260 nm dalga boyunda ölçülür. Bu dalga boyundaki ölçümlerde çift iplikli DNA için absorbans değeri 50 µg/ml’lik konsantrasyon değerlerine karşılık gelir. UV absorbansı DNA’nın saflığının belirlenmesinde de kullanılabilir (260 nm’de nükleik asitler, 280 nm’de de proteinler pik verir). Saf bir DNA örneğinin 260 ve 280 nm’deki absorbans oranı (A_{260nm}/ A_{280nm}) 1.8’dir. Bu değer elimizdeki DNA örneğinin verimini gösterir. Dolayısıyla bulduğumuz değer

1.8'e ne kadar yakınsa verim o kadar yüksektir. 1.8'den düşük değerler örnekte fenol ya da protein kontaminasyonu, 1.8'den büyük değerler ise RNA kontaminasyonu varlığını gösterir (106). Hasta ve kontrol grubuna ait DNA örnekleri ölçülerek konsantrasyonları ve saflıkları belirlendi. 1.8'e yakın olmayan değerlere sahip örneklerin DNA'ları tekrar izole edildi.

2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Çalışması

Polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda oluşan ampikonlar restriksiyon enzim kesimi sonrası horizontal jel elektroforez aletine yüklenerek ampikonların kesilip kesilmemesine bağlı olarak mutasyona sahip olan bireyler tanımlandı.

1. PZR materyalleri

Taq DNA polimeraz (5U/μl) Fermentas EP0402

10XPZR buffer (10mM) Fermentas EP0402

MgCl₂ (25mM) Fermentas EP0402

100mM dNTP set Fermentas R0186

Primerler İontek, İstanbul, Türkiye

2. Restriksiyon enzimleri

Hinfi (10u/μl) Fermentas ER0801

HindIII (10u/μl) Promega

2.6. Polimorfizmlerin Belirlenmesi

1. MTHFR genindeki rs1801133 polimorfizminin çalışılması

MTHFR için C677T(rs1801133) mutasyonunun tespiti Ulvik ve ark.nın (107) tarif ettiği yöntemle göre yapıldı. Restriksiyon enzim kesiminde Hinfi kullanıldı. MTHFR 1298A-C mutasyonunun tespiti ise Chango ve ark.na (108) göre yapıldı.

Forward (İleri) primer: 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'

Revers (Geri) primer: 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'

Restriksiyon enzimi: Hinfi

Restriksiyon enzim kesim sonrası CC genotipi için 198bp, CT genotipi için 198bp+175bp+23bp ve TT genotipi için 175+23bp'lik RFLP ürünleri elde edildi.

2. PAX3 genindeki rs16863657 polimorfizminin çalışılması:

PAX3 rs16863657, A→G, İntronik bir polimorfizminin belirlenmesi için primer dizayn edilmiştir (Tablo 4). Mutasyonların doğrulanması için DNA dizileme yapıldı (109).

Tablo 4. PAX3 genine rs16863657 polimorfizmi için dizayn edilen primerler.

A→G
GAGGGGGCAC AATTCCAATA AGAAGGCATC TGGGGCCCCA GACATATTTA GCTTTCCTTC
CTGTGGTCAG TGCCCCCTTGG CCTAGGCTTG TTAAGGGGTC CTCCCGATGG GGCTCCTCCT
GGGAGGAGTC CAGGGTGCGC TGATGTTCTT TTGTCTTCTC CGTCCGCAAG CGGGGCTAAT
GTGAAGCACA GGCAGCCGTC GCTAGGCCCA AGCACTCGTT AGTTGAAGGC TGGGGGTATG
GGGGAGGGTG CAGAA R
AAAACCTGGC TCCTCTTCTT GGTGTAAAAA CCGCTCTGGC AAGCTGCGGT TCTAAATCTC
TACATATAGA TCCCGATGC GTCGACAGAG ATGTGTCTGT ATGTTAAAGT TTTGCCCGGG
TTCAGCGTTT GTTCTCAGGA ATTTATTATG GCATTCAGAC TAAACTGCTG GAAAAATAAA
AGGAACGAAG TCTTGGCTAG GAGCTGAAGT GTCCCAGCA GGATATGACG CCAGGAGTGT
TGTAAAGACT GTCTG

A→G, İntronik bir polimorfiziminin belirlenmesi için ARMS primerleri dizayn edildi.

Primerler www.idtdna.com kullanılarak dizayn edildi.

A nükleotidi T ye dönüştürülür. Son nükleotid wild için A ve mutant için G'dir.

Forward primer yaklaşık 35-40 nükleotid uzunluğunda dizayn edilmelidir.

PAX3FC: 5-TCGTT AGTTGAAGGC TGGGGGTATG GGGGAGGGTG CAGATA-3

PAX3FM: 5-TCGTT AGTTGAAGGC TGGGGGTATG GGGGAGGGTG CAGATG-3

PAX3R1: 5-TACAGACACATCTCTGTCGACGCATCGGG-3

3. TEAD2 genindeki rs375306 polimorfizminin çalışılması

Tead2 genindeki variant gen rs375306 polimorfizmlerinin değerlendirilmesi için www.ensembl.org web adresi kullanılarak genlerin tam dizilerine ulaşıldı ve primer dizayn edildi (Tablo 5). Polimorfizmlerin değerlendirilmesinde RFLP yöntemi kullanılırken özellikle seçilen enzimin star aktiviteye sahip olmaması tercih edildi.

Tablo 5. TEAD2 genine ait rs375306 polimorfizimi için dizayn edilen primerler ve Hind III restriksiyon enzim kesim bölgesi.

C→G

```
ATCAGTTCATTCCGACCTGAAGATTCAAAGACGGAACAGAGTTAGTTAGACTTTCAACAG
AACTTCCCCACAGCATGGACACCAGGGAAGAAGAAAGCAGCATGGGTCCCCAAAGGTCTG
CAGCAAGTGGGCTGCCGGTCCCCCTCAGCTACGTGGAAGCCAGACTGCTTGGGTTCAAATC
CCAGCTCCATCACGCACTGGCTCTGTGCGACCATAAGCAAATCACTTAACCTAGCTGTGC
CTCAGTTTCCTCATCTGTGCAAATGGTGATGCTAGCTCCTACTTCAGAGTGCTCCATAAA
SCTTGGTTACTGTCAATTATTCATCAGTGGGGGCCAGGGCAAAGACAGAAGTAGACTCAC
CATACATCTTGCTTCATCAGACAAAATTATTTTCCGGCGGCCGAGGGTGGATAGATGG
CCAGGGCCTCCTGGAAGCTCTGCTCAATGTCTGGGCTCCACACCCCTCTGCATCCGGGC
CCCCGTCACCCCAGCCCCCTCACTGCCGCCGGTACCCTCCTCACTGCCTTCCTCACTGC
CCGTCCAGCCGCTGCCATCGTCCAGGGCGGCCCCAGCCCGGGTTCCCCCATCTGGGCCT
```

Primerler www.idtdna.com adresinden faydalanılarak dizayn edildi.

Forward (İleri) primer: 5'-GAAGCCAGACTGCTTGGGTTCAA-3'

Revers (Geri) primer: 5'-AGACATTGAGCAGAGCTTCCAGGAG-3'

Restriksiyon Enzimi: HindIII

Hind III Restriksiyon Enziminin özgün kesim bölgeleri aşağıda yer almaktadır

Hind III enzimi kesim bölgesi 5'-A[^]AGCTT-3'

3'-TTCGA[^]A-5'

Primerlerle PZR sonrası 240 bp'lik amplifikasyon ürünü elde edilmektedir. RFLP için HindIII restriksiyon enzimi kullanıldı. HindIII restriksiyon enzimi ile kesim yapıldıktan sonra 153 bp ve 145 bp'lik RFLP ürünleri elde edildi. RFLP ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülendi.

Wild: 240 (CC)

Heterozigot: 240bp+153bp + 145bp (CG)

Mutant: 153bp+145 (GG)

4. PZR Kurulması İşlemi

PZR 0.5 ml'lik tüplerde toplam hacim 30µl olacak şekilde gerçekleştirildi. Her bir tüpe 6 µl hasta DNA'sı ve üzerine 3 µl MgCl₂, 3 µl 10X buffer, 3 µl dNTP (2.5mM), 1 µl primer 1 (30 pmol), 1 µl primer 2 (30 pmol), 0.1 U Taq DNA

polimeraz ve 13 µl ddH₂O konuldu. Hazırlanan tüpler vortekslendi ve PZR cihazına önceden girilmiş olan programda PZR işlemi gerçekleşti. PZR sonrası ürünler agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

5. PZR koşulları

Değerlendirilen tüm polimorfizmler için aynı PZR koşulları kullanıldı.

94 °C de 5 dakika

55 °C de 1 dakika 1 döngü

72 °C de 1 dakika

94 °C de 1 dakika (denatürasyon)

60 °C de 1 dakika (eşleşme) 35 döngü

72 °C de 1 dakika (sentez)

94 °C de 1 dakika

55 °C de 1 dakika 1 döngü

72 °C de 7 dakika

2.7. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi

Kesim 25 µl üzerinden yapılmıştır. 20 µl PZR ürünü, 2,5 µl 10Xbuffer, 0.5 U restriksiyon enzimiyle toplam hacim 25 µl'ye tamamlanmıştır.

Kesim işlemi Hind III ve Hi nf I için 37° C'de 16 saat bekletilmek suretiyle gerçekleştirilmiştir. Tüm enzimler için aynı kesim protokolü uygulandı.

2.8. Agaroz Jel Elektroforezi

Yapılan bu çalışmada PZR ile çoğaltılmış ürünlerin tanımlanması için agaroz jel elektroforezi uygulandı. Elde edilen ürünlerin büyüklüklerini tanımlayabilmek için % 4'lük jel kullanıldı. Kullanılan elektroforez düzeneğine uygun hacim; toz halindeki agarozun 0.5X TBE tamponunda manyetik karıştırıcılı bir mikrodalga fırında kaynatılarak çözülmesi ile oluşturuldu. Ardından kaynamış çözelti 55–60 °C'ye soğutulurak 0.25 µg/ml EtBr ilave edildi. Kuyuları oluşturacak olan tarak, tabağına yerleştirildikten sonra hazırlanan jel, hava kabarcığı kalmayacak şekilde buraya döküldü. Jelin polimerizasyonu sonrası tarak dikkatlice çıkarılarak jel platformu 0.5XTBE tamponu ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi. Bu

tampondan jelin üzerini 1–2 mm geçecek kadar eklendi. Örnekler ve belirteç DNA, 6X yükleme boyası ile 5:1 oranında karıştırılarak kuyulara 15'er µl yüklendi. Güç kaynağı açılarak 90 V'a ayarlandı. Yaklaşık yarım saat sonra güç kaynağı kapatıldı. Jel görüntüleme sisteminde UV ışını altında incelendi (110, 111).

2.9. İstatistik Analizler

İstatistiklerin hazırlanmasında uygun bir bilgisayar istatistik programı kullanıldı. Parametreler arası ilişkiler Pearson korelasyon analizi kullanılarak değerlendirildi. Hasta ve kontrol gruplarında genotip ve allel sıklıklarının dağılımı ki-kare analizi ile yapıldı. Gruplar arası farkların değerlendirilmesinde Mann-Whitney-U testi kullanıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Değerlendirmelerde $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

Hasta grubunda (n= 67), 26 kız (%38.8), 41 erkek (%61.2) vardı ancak hastaların dört tanesi çalışma için kanları alındıktan sonra; üç tanesi yenidoğan döneminde ameliyat edildikten sonra enfeksiyon nedeni ile, bir hasta da KBY nedeni ile kaybedildi. Hastaların yaş ortalamaları 2.46 ± 3.22 yıl (1 ay ile 18 yaş arası), kızların yaş ortalaması 2.52 ± 3.80 yıl (1 ay ile 18 yaş arası), erkeklerin yaş ortalaması 2.42 ± 3.22 yıl (1 ay ile 14 yaş arası) dır. Annelerin yaş ortalamaları 28.15 ± 4.71 yıl (19 ile 44 yaş arası) idi (Tablo 6).

Tablo 6. Hastaların yaş, cinsiyet dağılımları ve anne yaşı

Cinsiyet (n)	Yaş Ortalama $\pm$ SD (yıl)	Minimum (yıl)	Maksimum (yıl)
Kız (26)	2.52 ± 3.80	0.1	18
Erkek (41)	2.42 ± 3.22	0.1	14
Toplam (67)	2.46 ± 3.22	0.1	18
Anne yaşı (67)	28.15 ± 4.71	19	44

Defekt tipi 65 hastada meningomiyelosel, 2 hastada meningosel idi. Hastaların %55'i Elazığ, %45'i çevre illerden gelmişti.

Hasta grubunun demografik özellikleri Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Hastaların demografik ve klinik özellikleri.

Demografik Özellikler	var (%)	yok (%)
NTD olan annelerde düşük	23.9	76.1
Akrabalık	26.9	73.1
Ailede başka konjenital anomalili bebek	20.9	79.1
Ailede başka NTD olan bebek	11.9	88.1
Gebelikte ilaç kullanımı	16.4	83.6

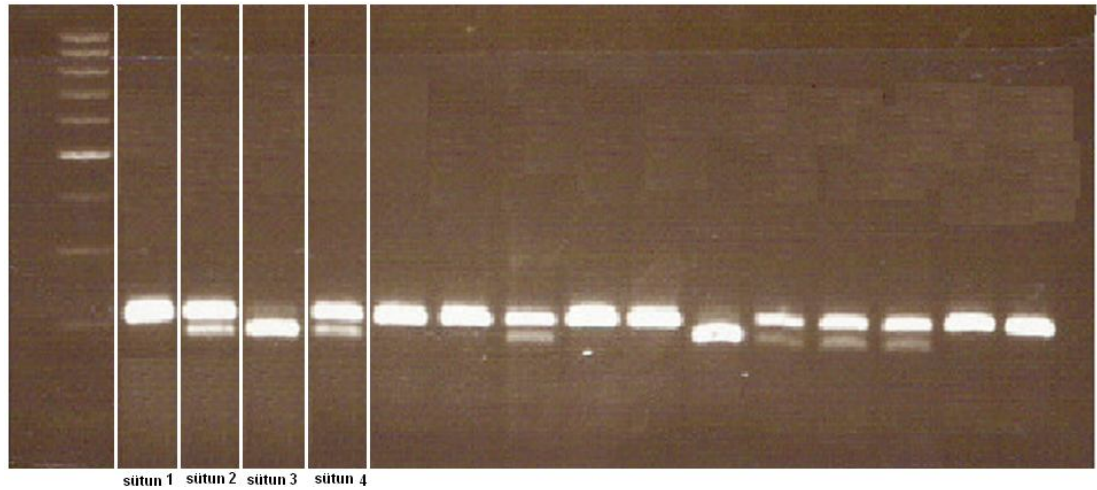
3.1. Hasta ve Kontrollerde MTHFR Polimorfizm Dağılımları

Tablo 8’de MTHFR polimorfizmlerinin hasta ve sağlıklı kontroldeki genotip dağılımları ve allel sıklıkları verilmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasında genotip sıklıkları açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($X^2= 0.4$, $df= 2$, $p= 0.8$). MTHFR allel sıklıkları kontrol ve hasta grubu arasında karşılaştırıldığında allel sıklıkları açısından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($X^2= 0.2$ $df= 1$, $p= 0.61$). Şekil 15’de MTHFR C677T polimorfizm genotiplerinin agaroz jel görüntüleri gösterilmektedir.

Hastaların demografik özellikleri ve MTHFR genotipleri arasında herhangi bir ilişki tespit edilemedi.

Tablo 8. MTHFR genindeki rs1801133 polimorfizm genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımları.

Genotipler	TT (n)	TC (n)	CC (n)	p
Hasta (n= 67)	32	25	10	$p>0.05$
Kontrol (n= 80)	40	31	9	$p>0.05$



Şekil 15. MTHFR genindeki (rs1801133) C677T polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun1: 100bp'lik DNA Boyut Markırı, Sütun 2: CC genotipi için 198bp, Sütun 3: CT genotipi için 198bp + 175bp + 23bp, Sütun4: TT genotipi için 175bp + 23bp.

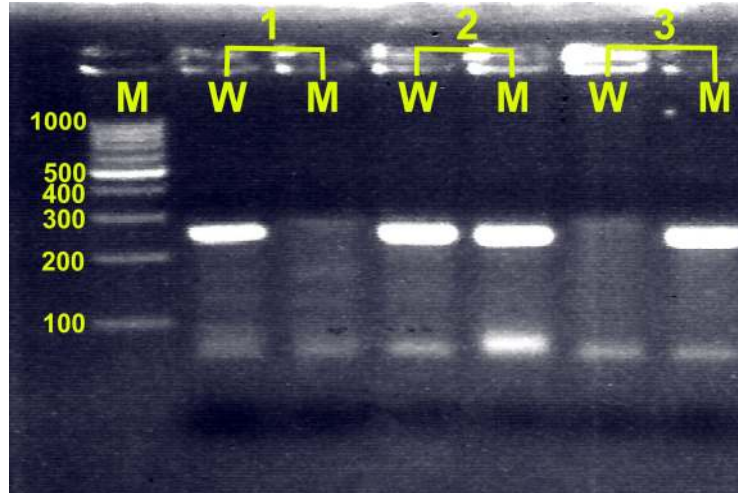
3.2. Hasta ve Kontrollerde PAX3 rs16863657 Polimorfizm Dağılımları

Tablo 9’da PAX3 polimorfizmlerinin hasta ve sağlıklı kontroldeki genotip dağılımları ve allel sıklıkları verilmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasında genotip ($X^2= 4.5$, $df= 2$, $p= 0.1$) sıklıkları açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. G allel sıklığının da hasta grubunda artmış olduğu belirlendi ($X^2= 4.4$, $df= 1$, $p= 0.03$). Şekil 16’da PAX3 genotiplerinin agaroz jel görüntüleri gösterilmektedir.

Hastaların demografik özellikleri ile PAX3 genotipleri arasında herhangi bir ilişki tespit edilmedi.

Tablo 9. PAX3 genindeki rs16863657 polimorfizm genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımları.

Genotipler	AA (n)	AG (n)	GG (n)	p
Hasta (n= 67)	52	13	2	$p>0.05$
Kontrol (n= 72)	64	8	0	$p>0.05$
Alleler	A	G		p
Hasta (n= 67)	0.873	0.126		$p<0.05$
Kontrol (n= 72)	0.943	0.056		



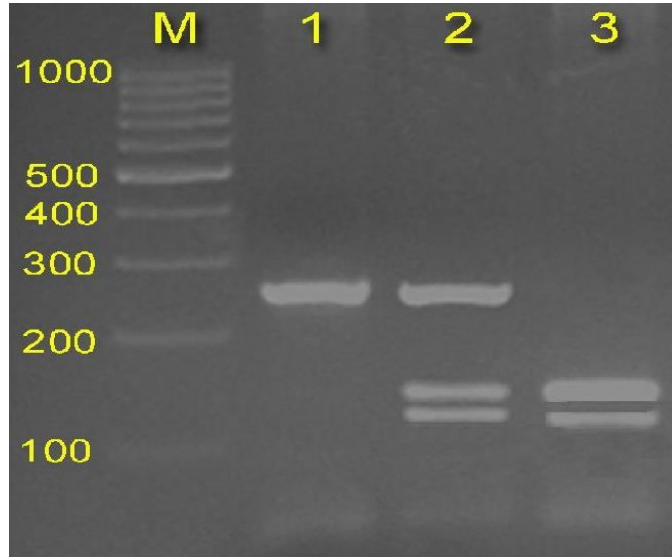
Şekil 16. PAX3 genindeki rs16863657 polimorfizmi için PZR’ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun1: 100bp’lik DNA Boyut Markırı, Sütun 2,3: AA genotipi için 159 bp, Sütun 4,5: AG genotipi için 159 bp, Sütun 6,7: GG genotipi için 159 bp.

3.3. Hasta ve Kontrollerde TEAD2 Genindeki rs375306 Polimorfizm Dağılımları

Hasta ve kontrol grubu arasında TEAD2 genotipleri açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($X^2= 0.7$, $df= 2$, $p= 0.68$) (Tablo 10). TEAD2 allel sıklıkları kontrol ve hasta grubu arasında karşılaştırıldığında allel sıklıkları açısından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($X^2= 0.9$, $df= 1$, $p= 0.42$). TEAD2 polimorfizmi ve düşük arasında pozitif bir ilişki bulundu ($p= 0.01$). Şekil 17’de TEAD2 genindeki rs375306 polimorfizmine ait agaroz jel resmi gösterilmektedir.

Tablo 10. TEAD2 genindeki rs375306 polimorfizm genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımları.

Genotipler	CC(n)	CG(n)	GG(n)	p
Hasta (n= 67)	45	21	1	$p>0.05$
Kontrol (n= 80)	59	20	1	$p>0.05$



Şekil 17. TEAD2 genindeki rs375306 polimorfizmi için PZR’ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun1: 100bp’lik DNA Boyut Markırı, Sütun 2: 240bp (CC), Sütun 3: 240bp + 153bp + 145bp (CG), Sütun4: 153bp + 145bp (GG)

4. TARTIŞMA

Nöral tüp defektleri dünyada % 0,1 - % 0,4 ülkemizde ise % 0,3 oranında görülmektedir (24, 46, 47). Kliniğimizde yapılan bir çalışmada ilimizde 2004 yılı verileri dikkate alındığında SB insidansı 2,6 / 1000 olarak saptanmıştır (49). İzmir’de yapılan bir diğer çalışmada ise SB insidansı 1,5 / 1000 olarak tespit edilmiştir (48).

Annenin yetersiz beslenmesi, yüksek ateş, hipertansiyon, diabetes mellitus, obezite gibi sağlık sorunları, gebelikte kullandığı bazı ilaçlar ve maruz kaldığı çevresel kirleticilerin farklı şekillerde etki göstererek nöral tüpün hatalı kapanmasına neden oldukları bildirilmektedir (83, 112, 113).

Embriyonun sinir dokusunun gelişmeye başladığı günlerde annenin yüksek ısıya maruz kalmasının NTD’lerin gelişiminde etkili olduğu öne sürülmüştür. Yüksek ısının teratojenik olduğu gözlenmiştir. Sinir dokularının geliştiği günlerde sauna benzeri ortamlarda bulunan ya da hastalık nedeniyle beden ısıları 24 saatten fazla süre 38.9 °C’den yüksek olan annelerin NTD’li bebek doğurma riskinin 3 kat arttığı saptanmıştır (114).

Annenin diabeti ile konjenital doğum defektleri arasında ilişki olduğu kesin olarak belgelenmiştir. Araştırmacılar insüline bağımlı diabetli annelerden doğan bebeklerde majör malformasyon riskinin 2-3 kez arttığı konusunda birleşmektedirler. Diabetik annelerin diabetik olmayan annelere kıyasla 15 kat daha fazla anensefali veya spina bifidalı bebek doğurma riski taşıdıkları vurgulanmaktadır (114). Bu nedenle gebelik planlayan kadınlarda özellikle perikonsepsiyonel dönemde kan glikoz düzeyi ne kadar iyi kontrol altına alınırsa, doğumsal defektlerin de o kadar azalacağı vurgulanmaktadır (115-117).

Araştırmacılar gebe kadının kilosu ile NTD’li bebek sahibi olma riski arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. NTD’li bebek sahibi olma riskinin 50-59 kg. ağırlığındaki kadınlarla kıyaslandığında, 80-89 kg. ağırlığındaki kadınlarda iki kat, 110 kg.ın üstündeki kadınlarda ise 4 kat arttığı saptanmıştır. 79 kg.dan az olan kadınlara günde 0.4 mg. folik asit yüklendiğinde NTD riski %40 azalırken, 79 kg.ın üzerindeki kadınlara bu vitaminin yüklenmesi ile riskin azalmadığı tespit edilmiştir. Şişmanlığa yol açan fizyolojik nedenler ve şişman annelerin bazı besin maddelerini eksik alma durumlarının, nöral tüp gelişiminde rol oynayan metabolik süreçleri

etkileyerek nöral tüp defektlerinin oluşma riskini arttırdığı belirtilmektedir (114, 117).

Bazı araştırmacılar evde veya işyerinde organik maddelerle karşılaşan ebeveynlerin NTD'li bebek sahibi olma riskinin arttığını öne sürmektedir. Yapılan bir araştırmada içme suyunun dezenfeksiyonu için kullanılan klorun suyun yüzeyinde bulunan organik maddelerle tepkimesi sonucu ortaya çıkan ikincil ürünlerden biri ve teratojen olan trihalometanları (kloroform, bromodiklormetan ve bromoform) içeren su içen annelerin NTD'li bebek doğurma riskinin üç kat arttığı saptanmıştır. Bunlardan bromodiklormetanın NTD relatif riskini 1.5'dan 5.1'e çıkardığı saptanmıştır. Kloroformun ise solunum yolu ile alındığı zaman kromozom anomalilerine yolaçtığı, bir başka klorlama ikincil ürünü olan haloasetonitrilin de embriyo ve fetus üzerinde toksik etkiye sahip olduğu öne sürülmüştür (118). Diğer bir çalışmada ise, annenin bir antikonvulsan ilaç olan valproik asit veya alkol kullanması durumlarında da NTD'li bebek sahibi olma riskinin arttığı belirtilmektedir (117).

1960'lı yıllarda yetersiz beslenmenin, özellikle B kompleks vitaminlerinden esansiyel bir besin maddesi olan Folik asit (B9 vitamini, Foliacin) eksikliğinin nöral tüp defektlerine neden olacağı hipotezi öne sürülmüştür. Folik asidin vücut içinde kullanılmak üzere girdiği değişik şekillere genel olarak folat adı verilmektedir. Folik asidin hücre bölünmesinde ve gelişmesindeki rolü kesin olarak belirlendikten sonra, bu vitaminin NTD oluşumu üzerindeki etkileri konusunda pek çok çalışma yapılmıştır. İngiltere Tıbbi Araştırmalar Birliği'nin (UK Medical Research Council) 1991'de yaptığı deneysel araştırmada, daha önce NTD'li bebek doğuran kadınlara perikonsepsiyonel dönemde günde 4 mg. folik asit verildiğinde yeniden NTD'li gebelik geçirme riskinin %60-72, doğurganlık dönemindeki kadınlara günde 0.4 mg. folik asit verildiğinde ise, ilk kez ortaya çıkacak NTD'li gebelik riskinin %50 azaldığı ortaya çıkmıştır (112, 113).

Yıllarca yapılmış gözlemler NTD'nin aile içi tekrarlarının olduğu, etiyolojisinde, hem çevresel hem de genetik faktörlerin yer aldığı multifaktöriyel kalıtımın sorumlu tutulmasına neden olmuştur. Bu kalıtım modeline göre bir karakteristik özelliğe olan genetik yatkınlık, çeşitli genlerce kontrol edilmekte ve malformasyon oluşum eşiği, hem genetik hem de çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Gelişen moleküler genetik

teknikler de multifaktöryel hastalıklardaki gen ilişkilerinin araştırmasını kolaylaştırmıştır. Yukarıda sayılan tüm olası etkenlere rağmen günümüzde NTD oluşumuna giden olaylar zinciri yine de tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu verilerden yola çıkarak sunulan bu çalışmada SB oluşumunda bilgi birikimini arttırmaya yönelik olarak genetik faktörlerin araştırılması amaçlanmıştır.

Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi ile tam genom dizilerinin belirlenmesi ve hücre davranışlarının genetik temelini açıklanabilmesi gibi heyecan verici gelişmeler yaşanmaktadır. Genom dizileme projelerinin gelişmesi ise genetik hastalıkların tanı ve tedavi yaklaşımları üzerine zengin bilgi kaynağı oluşturmuştur.

Günümüzde artık bireysel farklılıklar ön plana çıkmaktadır. Özellikle çeşitli hastalıklara genetik yatkınlıkların saptanması, gen-çevre etkileşiminin incelenmesi, enzim polimorfizmlerinin ilaca yanıtı, genetik kimliğe göre ilaç dozunun ayarlanması ve bireye özel tedavi stratejilerinin düşünülmesi DNA dizi polimorfizm çalışmalarının sonuçlarına dayandırılmaktadır. Genomun farklı bölgelerini veya genin farklı kalıtsal formlarını ayırt edebilmek için polimorfizmler anahtar niteliğinde pratiklik sunmaktadır.

Santral sinir sistemi anomalilerinin patogenezinde folik asit metabolizmasındaki bir bozukluğun rolü olabileceği Hibbard ve arkadaşları tarafından öne sürülmüştür. Çalışmalarında, 98 SSS malformasyonlu ve 54 sağlıklı çocuk doğurmuş kadınlara uyguladıkları bir folik asit metabolizmasının göstergesi olan formiminoglutamik asit (FIGLU) ekskresyon testinin sonucunda, malformasyonlu çocuk annelerinde ekskresyonu 5 kat daha bozuk olarak bulunmuştur (119). Buradan yola çıkılarak yapılan prospektif epidemiyolojik araştırmalar, perikonsepsiyonel folik asit suplementasyonun NTD'li çocuk doğurma sıklığını azalttığını kanıtlamıştır (19). Perikonsepsiyonel maternal günlük ek 400µg folik asitin yaygın kullanımı toplumdaki NTD insidansını %50-%60 oranında düşürmektedir (9, 10). Daly ve ark. (120) yaptıkları bir çalışmaya göre, düzenli olarak alındığı takdirde 200µg folik asit suplementasyonunun da NTD'yi önleyebileceği gösterilmiştir .

Folat eksikliğinin, diyetle yetersiz alımı yanı sıra, endojen folat üretimine neden olan metabolik yoldaki enzim polimorfizminden de kaynaklanabileceği düşünülmektedir. NTD etiyojisinde rol oynayan ilk genetik risk faktörü olan MTHFR genin C677T polimorfizmi, Van der Put ve arkadaşları tarafından tanımlamıştır (121).

MTHFR geninin nükleotid dizimindeki 677 pozisyonunda bulunan sitozinin yerine timidin (C->T) bazının gelmesi, termolabil ve düşük çalışma aktivitesine sahip MTHFR enziminin sentezlenmesine neden olmaktadır (122). MTHFR enzim aktivitesi 677C—>T mutasyon varlığı ile doğrudan ilişkilidir (121). Homozigot ('TT') bireylerde olduğu gibi, heterozigot ('CT') bireylerinde de MTHFR enzim aktivitesi göreceli olarak normalin altındadır (121).

Folat metabolizmasında önemli bir rolü olan MTHFR'nin aktivitesi DNA ve RNA sentezini direkt etkilemektedir. Embriyogenez döneminde, hücre yapımının normalden fazla ve daha hızlı gerçekleşmesi nedeniyle, nükleik asit sentezi de artmıştır. MTHFR 677 'TT' polimorfizmi enzim aktivitesini düşürerek plazma folat seviyelerinin azalmasına neden olur. Klinikte MTHFR'nin düşük çalışma kapasitesinin normal bireylerde hafif homosistinemi dışında bir bulgusu saptanmazken, embriyogenez sırasında, termolabil enzimin yetersiz çalışması hipometilasyon nedeni ile nükleik asit sentezini olumsuz etkilemektedir. Perikonsepsiyonel folat kullanımının termolabil MTHFR enziminin düşük aktivitesini düzelterek NTD oluşumlarını azalttığı kanıtlanmıştır (123).

Farklı ülkelerde yapılmış bazı çalışmalarda NTD'li olgu ve ebeveynlerin sağlıklı popülasyona göre daha sık homozigot mutant 'TT' genotipi taşıdıkları gösterilmiştir (121, 124, 125).

MTHFR geninin ikinci bir polimorfizmi olan A1298C mutasyonu ise tek başına plazma homosistein seviyelerini artırmazken, C677T mutasyonu ile kombine heterozigot durumunda plazma homosistein seviyeleri üzerine etkili olmaktadır (125). Özellikle NTD'li olgu ve babaların homozigot mutant 'CC' genotipine sahip olmalarının, NTD açısından risk oluşturduğu gösterilmiştir. Ayrıca NTD olguları arasında kombine heterozigot (677CT/1298AC) olanların sayısı, kontrol gruba göre anlamlı olarak yüksek saptanmış ve olguların kombine heterozigot olmasının NTD açısından risk oluşturduğu bulunmuştur (125). Çalışmamızın moleküler genetik aşamasında tüm bireylerin (hasta ve kontrol grubu) genotipleri MTHFR gen polimorfizimleri açısından analiz edilmiştir. Bunun sonucunda tüm NTD'li olgular arasında kontrol grubuna göre C677T polimorfizmi için 'TT' genotip ve allel sıklığı açısından anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir.

Çalışmamızda, bir diğer MTHFR polimorfizmi olan A1298C de incelenmiş tüm bireylerin homozigot mutant 1298 'CC' genotipi / 'C' alleli taşımaları açısından da anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir.

Van Rooij ve ark. (126) na göre olgulardaki MTHFR C677T ve MTHFR A1298C polimorfizimleri NTD için bağımsız risk faktörleri değildir (genotip/allel sıklıkları sırasıyla %6/0.26-%13/0.30).

Van der Put ve ark. bir çalışmalarında NTD olgularında MTHFR geni "kombine heterozigotluk" oranını kontrollere kıyasla daha yüksek saptanmıştır (125). Ayrıca MTHFR enzim aktivitesine baktıklarında kombine heterozigot olguların, tek bir mutasyon için homozigot (677TT veya 1298'CC) olanlara kıyasla daha düşük enzim aktivitesi gösterdiklerini bulmuşlardır (125).

Bizim çalışma popülasyonumuz "kombine heterozigotluk" açısından da değerlendirildiğinde, heterozigot 'TC' genotipi ve allel sıklığı taşımaları açısından da anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir.

PAX3 ve TEAD2 nöral tüpün kapanmasında görevli olan iki ayrı genidir. Literatürde NTD hastalarında PAX3 polimorfizmlerinin araştırıldığı çalışma sayısı oldukça sınırlıyken TEAD2 gen polimorfizmlerin incelendiği çalışmaya rastlanmamıştır. PAX3 eksikliği olan fare embriyolarında spina bifida olduğu ve anormal dorsal kök ganglionu, enterik ganglion eksikliği, kardiyak akış yolu anomalileri ve defektif melanosit gelişmesini de içeren birçok nöral krest ile ilişkili defektlerin ortaya çıktığı gösterilmiştir (76). PAX3 nöral krest indüksiyonundaki en öncü belirteçlerden biridir. Nöral ektoderm ile epidermal dokular arasındaki doku-doku etkileşimini sağlar (77). Bununla beraber PAX3 ekspresyonunun nöral krest indüksiyonuna etkisi detaylı olarak hala izah edilememiştir.

Lu ve ark. (109) spina bifidalı hastalarda yaptıkları çalışmada PAX3 rs16863657 polimorfizmi ile NTD arasında ilişki bulduklarını belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışmada PAX3 polimorfizmlerinin hasta ve kontrol gruplarındaki genotip dağılımları ($X^2= 4.5$, $df= 2$, $p= 0.1$) açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ancak G allel sıklığının da hasta grubunda artmış olduğu belirlenmiştir ($X^2= 4.4$, $df= 1$, $p= 0.03$). Sonuç olarak çalışmamızda, PAX3 genotip sıklıkları açısından anlamlı fark bulunmamasına karşın PAX3 allel sıklıkları açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir. Çalışmamızdakine benzer şekilde

yapılan bir başka çalışmada PAX3 geni polimorfizmi ile NTD arasında ilişki bulunamamıştır (109).

TEAD2 PAX3'ün promotor bölgesine bağlanarak PAX3'ün ekspresyonunu düzenlemektedir (74). Bu bilgiler ışığında PAX3 ve TEAD2 genlerinin nöral gelişim sırasında etkili olduğu izlenmektedir. Ancak literatürde spina bifidalı hastalarda bu genlerdeki polimorfizm ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır.

TEAD2 en çok embriyo gelişiminin ilk yedi günü boyunca eksprese edilir (124), bu genin postimplantasyon embriyonik ekspresyon paterni onun nöral gelişimde kritik rol oynadığını düşündürmektedir (127).

TEAD2, PAX3 ekspresyonunun regülasyonunda gerekli olmamasına rağmen, embriyonik nöral tüpün kapanışı boyunca önemli bir rol oynar (128, 129). p53 bağımlı apoptozisin bir inhibitörü olan Pifithrin- α 'nın (130) PAX3'ü eksik embriyolarda NTD gelişimini engellediği belirlenmiştir (131). Benzer şekilde, pifithrin- α aynı zamanda, folik asidin yaptığı kadar, TEAD2-bağımlı egzenesefaliyi önlemektedir. Bunu da TEAD2'nin nöral tüp spesifik gen ekspresyonunu indüklemekten ziyade p53 bağımlı apoptozisi inhibe ederek nöral tüpün kapanmasını regüle etmesi ile sağladığı düşünülmektedir (132).

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu arasında TEAD2 genotipleri açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($X^2= 0.7$, $df= 2$, $p= 0.68$). TEAD2 allel sıklıkları kontrol ve hasta grubu arasında karşılaştırıldığında ise, allel sıklıkları açısından da hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($X^2= 0.9$, $df= 1$, $p= 0.42$). Ancak TEAD2 polimorfizmi ve düşük arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur ($p= 0.01$). TEAD2 ile düşük arasında tespit edilen bu ilişkiye ait literatürde bir bilgiye rastlanmamıştır.

PAX3, TEAD2 ve MTHFR gen polimorfizmi tespit edilen kişilerde NTD için artmış riskten söz edilebilmesi için yeterli sayıda veri bulunmamaktadır. Daha kapsamlı yeni yapılacak çalışmaların bu alandaki literatür eksikliğini tamamlaması açısından oldukça önemli olacağı kanısındayız.

Literatür değerlendirmemize göre bu çalışma, TEAD2 polimorfizmlerin NTD'de araştırıldığı ilk çalışmadır. PAX3 ve TEAD2 genlerindeki polimorfizmlerin çalışılmasında gereç ve yöntemde ayrıntılı olarak anlatılan yöntemlerin yapılacak yeni çalışmalara referans oluşturacağı düşünülmektedir.

PAX3 ve TEAD2 polimorfizmleri hasta ve kontrol grubunda benzer sıklıklarda bulunmuş ve istatistiksel olarak hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında her iki polimorfizm için anlamlı bir farklılık elde edilememiştir. Her iki geninde NTD etyopatogenezinde önemli rolleri olabileceği düşünülmektedir. Bu genlerde yer alan diğer polimorfizmlerin hastalığa katkı sağlayıp sağlamadığının belirlenmesi için gerek Türk populasyonunda gerekse diğer populasyonlarda yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak:

- a) NTD etyopatogenezinde içinde genetik faktörlerin de bulunduğu multifaktöryel olaylar rol oynamaktadır.
- b) Yaptığımız bu çalışmada bölgemizde, NTD gelişiminde PAX3 allel sıklıklarındaki değişikliklerin etkili olabileceği düşünülmektedir.
- c) Bu allel sıklığının oluşmasında ise çevresel faktörler etkili olmuş olabilir.
- d) Bu açıdan SB nin etyolojisinin aydınlatılmasında daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

5. KAYNAKLAR

1. Fuchs HE. Congenital abnormalities. Sabiston DC (ed). Textbook of Surgery, 15. th edition, W.B. Saunders Company, Philedelphia, 1997: 1374-1381.
2. French BN. Midline fusion defects and defects of formation. Youmans JR (ed) Neurological Surgery, 3. th edition, W.B. Saunders Company, Philedelphia, 1990: 1081-1095.
3. Northrup H, Volcik KA. Spina bifida and other neural tube defects. Curr Probl Pediatr 2000; 30: 313-332.
4. Larsen WJ. The third week. Gastrulation, formation of the trilaminar germ disc and initial development of the somites and neural tube. Larsen WJ (ed). Human Embriology kitabından, 2. baskı, Churchill Livingstone Inc, United Kingdom, 1997: 49-72.
5. Golden JA, Bonnemann CG. Neural tube defects. Goetz CG (ed). Textbook of Clinical Neurology kitabından, 1. baskı, WB Saunders Company, Philedelphia, 1999: 515-518.
6. Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, Wasserman CR, Lammer EJ. Maternal vitamin use, genetic variation of infant methylenetetrahydrofolate reductase, and risk for spina bifida. Am J Epidemiol 1998; 148: 30-37.
7. Koch MC, Stegmann K, Ziegler A, Schröter B, Ermert A. Evaluation of the MTHFR C677T allele and the MTHFR gene locus in a German spida bifida population. Eur J Pediatr 1998; 157: 487-492.
8. Rosa FW. Spina bifida in infants of women treated with carbamazepine during pregnancy. N Eng J Med 1991; 324: 674-677.
9. Omtzig JG, Los FJ, Grobbee DE, Pijpers L, Jahoda MG, Brandenburg H, et al. The risk of spina bifida aperta after first-trimester exposure to valproate in a prenatal cohort. Neurology 1992; 42: 119-125.
10. American Academy of Pediatrics, Committee on Genetics. Folic acid for the

prevention of neural tube defects. *Pediatrics* 1999; 104: 325-327.

11. Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S. Prevention of neural tube defects with folic acid in China. *N Eng J Med* 1999; 341: 1485-1490.
12. Ehlers K, Stürje H, Merker HJ, Nau H. Valproic acid-induced spina bifida: a mouse model. *Teratology* 1992; 45: 145-154.
13. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: Results of the medical research council vitamin study. *Lancet* 1991; 338: 131-137.
14. Milunsky A, Jick H, Jick SS, Bruell CL, MacLaughlin DS, Rothman KJ, et al. Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *JAMA* 1989; 262: 2847-2852.
15. Himmetoğlu O, Tıraş MB, Gürsoy R, Karabacak O, Şahin I, Onan A. The incidence of congenital malformations in a Turkish population. *Int J Gynecol Obstet* 1996; 55: 117-121.
16. Ehara H, Ohno K, Ohtani K, Koeda T, Takeshita K. Epidemiology of spina bifida in Tottori Prefecture, Japan, 1976-1995. *Pediatr Neural* 1998; 19: 199-203.
17. Crowe CA, Heuther CA, Oppenheimer SG, Barth LD, Jeffrey E, Reinhart S. The epidemiology of spina bifida in South-Western Ohio 1970-1979. *Dev Med Child Neurol* 1985; 27:176-182.
18. Davis CF, Young DG. The changing incidence of neural tube defects in Scotland. *J Ped Surg* 1991; 26: 516-518.
19. Stevenson RE, Ailen WP, Pai S, Best R. Decline in prevalence of neural tube defects in a high-risk region of the United States. *Pediatrics* 2000; 106: 677-683.
20. Özaras N, Çabukoğlu C, Erol B. Genel kavramlar. Özek MM. Sinir sistemi sorunları. Tarcan T, İlker Y. Ürolojik sorunlar. Özaras N, Yalçın S (ed). *Spina Bifida Tedavi ve Rehabilitasyon*, 2000: 1-114.
21. Worley G, Schuster JM, Oakes WJ. Survival at 5 years of a cohort of newborn

infants with myelomeningocele. Dev Med Child Neurol 1996; 38: 816-822.

22. Ratliffe KT. Clinical Pediatric Physical Therapy. A Times Mirror Company, Philadelphia, 1998: 109-116.
23. Campbell SK. Decision Making in Pediatric Neurologic Physical Therapy. A Division of Harcourt Brace & Company, Philadelphia, 1999: 198-235.
24. Shutleff DB, Graaf WD. Overview of clinical issues in the management of myelomeningocele. In: Sarwak JF, Lubicky JP (eds): Caring for the Child with Spina Bifida. Illinois: Published by American Academy of Orthopaedic Surgeons 2001: 1.
25. Tecklin JS. Pediatric Physical Therapy. JB Lippincott Company, London, Chp 9, 1989: 68-105.
26. Kathleen A. Physical Therapy for Children. Ed: Campbell SK, WB Saunders Company, Philadelphia, 1994: 571-619.
27. Selzman AA, Elder JS, Mapstone TB. Urologic consequences of myelodysplasia and other congenital abnormalities of the spinal cord. Urol Clin North Am 1993; 20: 485-504.
28. Lutkenhoff M. Children with Spina Bifida A Parent's Guide. Bethesda 1999: 405.
29. Avery ME, Taeusch HW. Shaffer's Diseases of the Newborn. W.B.Saunders Company. 1984: 680-702.
30. Demirtürk Ç. Spina Bifidalı Hastalarda Denge ve Koordinasyonu Arttırıcı Egzersizler ile Bilgisayarlı Denge Eğitiminin Karşılaştırılması Marmara Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2002.
31. Morissy RT. Lovell and Winter's Pediatric Orthopaedics. Third Edition, Philadelphia, William& Wilkins 1990: 1; 507-538.
32. Galloway NT, Mekras JA, Helms M, Webster GD. An objective score to

predict upper tract deterioration in myelodysplasia. J Urol 1991; 145: 535-537.

33. Sutherland RS, Mevorach RA, Baskin LS, Kogan BA. Spinal dysraphism in children: an overview and an approach to prevent complications. Urology 1995; 46: 294-304.
34. Yılmaz İT. Spina Bifida Olgularında Vojta Yöntemi ile Rehabilitasyon. Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, İstanbul, 1999.
35. Say B, Tunçbilek E, Balcı S, Muluk Z, Gogus T, Saraclar M, Kocal C. Incidence of congenital malformations in a sample of the Turkish population. Hum Hered 1973; 23: 434-441.
36. Buckley WR, Erten S. The epidemiology of anencephaly and spina bifida in Izmir, Turkey. In the light of recent aetiological theses. J Epidemiol Community Health 1979; 33: 186-188.
37. İlter Ö, Atasü T, Aksu MP. Central nervous system abnormalities in Istanbul. Med Bull Istanbul 1978; 11: 160-166.
38. Çavdar AO, Babacan E, Asik S, Arcasoy A, Ertem U, Himmetoglu O, et al. Zinc levels of serum, plasma, erythrocytes and hair in Turkish women with anencephalic babies. Prog Clin Biol Res 1983; 129: 99-106.
39. Akar N, Çavdar AO, Arcasoy A. High incidence of neural tube defects in Bursa, Turkey. Pediatr Perinat Epidemiol 1988; 2: 89-92.
40. Akar N, Ata Y, Aytekin AF. Neural tube defects and Chernobyl? Pediatr Perinat Epidemiol 1989; 3: 102-103.
41. Çağlayan S, Kayhan B, Menteşoğlu S, Aksit S. Changing incidence of neural tube defects in Aegean Turkey. Paediatr Perinat Epidemiol 1989; 3: 62-65.
42. Mocan H, Bozkaya H, Mocan MZ, Furtun EM. Changing incidence of anencephaly in the Eastern Black Sea Region of Turkey and Chernobyl.

Paediatr Perinat Epidemiol 1990; 4: 264-268.

43. Mocan H, Aydemir V, Bozkaya H, Mocan MZ, Özbay G. Incidence of neural tube defects (NTD) in Ankara Turkey, prior to and after the Chernobyl disaster. *Pediatr Perinat Epidemiol* 1992; 6: 111-114.
44. Posacı C, Celiloğlu M, Karabacak O. The epidemiology of neural tube defects in Izmir, Turkey. *Int J Gynecol Obstet* 1992; 39: 135-138.
45. Güvenc H, Uslu MA, Güvenc M, Özekici U, Kocabay K, Bektaş S. Changing trend of neural tube defects in Eastearn Turkey. *Epidemiol Community Health* 1993; 47: 40-41.
46. Tunçbilek E, Boduroğlu K, Alikashişoğlu M. Neural tube defects in Turkey: Prevalence, distribution and risk factors. *Turk J Pediatr* 1999; 41: 299-305.
47. Peralta CF, Bunduki V, Plese JP, Figueiredo EG, Miguelez J, Zugaib M. Association between prenatal sonographic findings and postnatal outcomes in 30 cases of isolated spina bifida aperta. *Prenat Diagn* 2003; 23: 311-314.
48. Mandıracıoğlu A, Ulman İ, Lülecı E, Ulman C. The incidence and risk factors of neural tube defects in İzmir, Turkey: A nested case-control study. *Turk J Pediatr* 2004; 46: 214-220.
49. Saraç M, Özel ŞK, Kaplan M, Kazez A. Spina bifida: Doğu Anadolu'daki durum. XXV. Ulusal Çocuk Cerrahisi Kongresi, 22-27 Ekim 2007, Çeşme, İzmir.
50. Oğuz H. Tıbbi Rehabilitasyon. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1995: 664-669.
51. Bauer SB. Myelodysplasia: Newborn evaluation and management. In McLaurin RL (ed): *Spina Bifida: A multidisciplinary Approach*. New York, Praeger, 1984: 262-267.
52. Özel ŞK, Kazez A. Spina bifidada görülen ürolojik ve gastrointestinal problemler. *Klinik Çocuk Forumu - Pediatrik Cerrahi Özel Sayısı* 2005;

Temmuz-Ağustos: 72-76.

53. Brown S, Marshall D, Patterson D, Cunningham AM. Chronic pyelonephritis in association with neuropathic bladder. *Eur J Pediatr Surg* 1999; 9: 29-30.
54. Bauer SB. Vesico-ureteral reflux in children with neurogenic bladder dysfunction In Johnston, JH (ed). *International Perspectives in Urology*, Vol:10, Baltimore, Williams & Wilkins, 1984: 159-177.
55. Marte A, Cotrufo AM, Di Iorio G, De Pasquale M. Electromyographic and manometric anorectal evaluation in children affected by neuropathic bladder secondary to myelomeningocele. *Minerva Pediatr* 2001; 53: 171-176.
56. Dickstein R, Abulaffio N. Postural sway of the affected and non affected pelvis and leg instance of hemiparetic patients. *Arch Phys Med Rehabil* 2000; 81: 364-367.
57. Weiling F. Historical study: Johann Gregor Mendel 1822-1884. *Am J Med Genet* 1991; 40: 1-25.
58. Genetik, 2009, <http://www.tr.wikipedia.org/wiki>
59. Cooper GM, Hausman RE (2006) *Hücre: Moleküler Yaklaşım, Çeviri Editörleri: Sakızlı M, Atabey N. 3. Baskı İzmir Tıp Kitabevi 145-148.*
60. SNP, 2009, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
61. Akarsu AN, Çakır B. Psikiatrik genetik araştırmalarda kullanılabilecek genetik yöntemler: IV-A. Hastalık Geni Haritalanması, 2004; 3P Dergisi; Cilt; 12 Ek Sayı:1, 31-48.
62. Brock DJH. (1993) *Molecular Genetics for the Clinician*, Cambridge University Pres.
63. Akarsu AN. Genetik hastalıklara neden olan genlerin saptanmasında aile ağacı analizlerinin önemi. *Hacettepe Tıp Dergisi* 1999; 30: 85-91.
64. Dib C, Fauré S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, et al. A

comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*. 1996; 14: 152-154.

65. Gelehrter TD, Collins FS, Ginsburg D. *Principles of Medical Genetics* Second edition, Philadelphia: Lippincott William& Wilkins, 1998.
66. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Genetics of Disorders with Multifactorial Inheritance. Genetics in Medicine*. Thompson & Thompson 5th edition W.B. Saunders Company, Philadelphia 2001: 297-309.
67. Marintchev A, Mullen MA, Maciejewski MW, Pan B, Gryk MR, Mullen GP. Solution structure of the single-strand break repair protein XRCC1 N-terminal domain. *Nat Struct Biol* 1999; 6: 884-892.
68. Marnett LJ, Plastaras JP. Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genetics* 2001; 17: 214-221.
69. Moller P, Wallin H, Dybdahl M, Frentz G, Nexø BA. Psoriasis patients with basal cell carcinoma have more repair-mediated DNA strand-breaks after UVC damage in lymphocytes than psoriasis patients without basal cell carcinoma. *Cancer Lett* 2000; 151: 187-192.
70. Taylor RM, Thistlethwaite A, Caldecott KW. Central role for the XRCC1 BRCT I domain in mammalian DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 2556-2563.
71. Yoo H, Li L, Sacks PG, Thompson LH, Becker FF, Chan JYH. Alterations in expression and structure of the DNA repair gene XRCC1. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186: 900-910.
72. Aydın K, Çağdaş A, Kayserili H, Tükel T, Eriş H, Apak MY. The effect of preconceptional folic acid treatment on the recurrence risk of nonsyndromic neural tube defects. *Br J Med Genet* 1998; 1: 120-124.
73. Bailey LB, Rampersand GC, Kanwell GP. Folic acid supplements and fortification affect the risk for neural tube defects, vascular disease and cancer:

Evolving science. J Nutr 2003; 133: 1961-1968.

74. Molloy AM, Daly SF, Mills JL, Kirke PN, Whitehead AS, Ramsbottom D et al. Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: Implications for folate intake recommendations. Lancet 1997; 349: 1591-1593.
75. Goyette P, Rozen R. The thermolabile variant 677C~>T can further reduce activity when expressed in cis with severe mutations for human methylenetetrahydrofolate reductase. Hum Mutat 2000; 16: 132-138.
76. Brilakis ES, Berger PB, Ballman KV, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 6770T and methionine synthase reductase (MTRR) 66A>G polymorphisms: association with serum homocysteine and angiographic coronary artery disease in the era of flour products fortified with folic acid. Atherosclerosis 2003; 168: 315-322.
77. Sibani S, Christensen B, O’Ferrall E, Saadi I, Hiou-Tim F, Rosenblatt DS, et al. Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. Hum Mutat 2000; 15: 280-287.
78. Daly SF, Molloy AM, Mills JL, Lee YJ, Conley M, Kirke PN et al. The influence of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genotypes on enzyme activity in placental tissue. Br J Obstet Gynaecol 1999; 106: 1214-1218.
79. Duthie SJ. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. Br Med Bull 1999; 55: 578-592.
80. Dikmen M. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Enziminin Moleküler biyolojisi ve hastalıklarla ilişkisi. Kocatepe Tıp Dergisi, 2004; 5: 9-16.
81. Stern LL, Bagley PJ, Rosenberg IH, Selhub J. Conversion of 5-formyltetrahydrofolic acid to 5-methyltetrahydrofolic acid is unimpaired in folate-adequate persons homozygous for the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. J Nutr 2000; 130: 2238-2242.

82. Rady PL, Tying SK, Hudnall SD, Vargas T, Kellner LH, Nitowsky H, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): the incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Med Genet* 1999; 86: 380-384.
83. Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, Bostick R, et al. Lack of association between the C677T MTHFR polymorphism and colorectal hyperplastic polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 427-433.
84. Gaughan D J, Barbaux S, Kluijtmans LA, Whitehead AS. The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene* 2000; 257: 279-289.
85. Homberger A, Linnebank M, Winter C, Willenbring H, Marquardt T, Harms E, et al. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 725-729.
86. Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13217-13220.
87. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 862-877.
88. Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1258-60.
89. Shpichinetsky V, Raz I, Friedlander Y, Goldschmidt N, Wexler FD, Ben Yehuda A, et al. The association between two common mutations C677T and A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk for diabetic nephropathy in type II diabetic patients. *J Nutr* 2000; 130: 2493-2497.

90. Schmitz C, Lindpaintner K, Verhoef P, Gaziano JM, Buring J. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and myocardial infarction. A case-control study. *Circulation* 1996; 94: 1812-1814.
91. Ihde DC. How should we report results of clinical trials of combined chemotherapy and chest irradiation in limited stage small cell lung cancer? *Antibiot Chemother* 1988; 41: 65-69.
92. Sell SM, Lugemwa PR. Development of a highly accurate, rapid PCR-RFLP genotyping assay for the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Genet Test* 1999; 3: 287-289.
93. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998; 49:31-62.
94. Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassmann G. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol* 2000; 13: 20-33.
95. Piyathilake CJ, Macaluso M, Johanning GL, Whiteside M, Heimbürger DC, Giuliano A. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism increases the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Anticancer Res* 2000; 20: 1751-1757.
96. Motulsky AG. Nutritional ecogenetics: Homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defects, and folic acid. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 17-20.
97. Jacquemin P, Hwang JJ, Martial JA, Dolle P, Davidson I. A novel family of developmentally related mammalian transcription factors containing the TEA/ATTS DNA binding domain. *J Biol Chem* 1996; 271: 21775–21786.
98. Milewski RC, Chi NC, Li J, Brown C, Lu MM, Epstein JA. Identification of minimal enhancer elements sufficient for PAX3 expression in neural crest and implication of TEAD2 as a regulator of PAX3. *Development* 2004; 131: 829-837.
99. Hol FA, Hamel BC, Geurds MP, Mullaart RA, Barr FG, Macina RA et al. A

frameshift mutation in the gene for PAX3 in a girl with spina bifida and mild signs of Waardenburg syndrome. *J Med Genet* 1995; 32: 52–56.

100. Goulding MD, Chalepakis G, Deutsch U, Erselius JR, Gruss P. PAX-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *The European Molecular Biology Organization Journal* 1991; 10: 1135-1147.
101. Auerbach R. Analysis of the developmental effects of a lethal mutation in the house mouse. *J Exper Zool* 1954; 127: 305-329.
102. García-Castro M, Bronner-Fraser M. Induction and differentiation of the neural crest. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 695-698.
103. LaBonne C, Bronner-Fraser M. Molecular mechanisms of neural crest formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 81-112.
104. Davidson I, Xiao JH, Rosales R, Staub A, Chambon P. The HeLa cell protein TEF-1 binds specifically and cooperatively to two SV40 enhancer motifs of unrelated sequence. *Cell* 1988; 54: 931-942.
105. Xiao JH, Davidson I, Matthes H, Garnier J, Chambon P. Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell* 1991; 65: 551-568.
106. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989.
107. Ulvik A, Refsum H, Kluijtmans LAJ, Ueland PM. C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene determined in human blood or plasma by a method involving multiinjection capillary electrophoresis and laser induced fluorescence detection. *Clin Chem* 1997; 43: 267-272.
108. Chango A, Boisson F, Barbé F, Quilliot D, Drosch S, Pfister M, et al. The effect of 677C-->T and 1298A-->C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. *Br J Nutr* 2000; 83: 593-596.

109. Lu W, Zhu H, Wen S, Laurent C, Shaw GM, Lammer EJ, Finnell RH. Screening for novel PAX3 polymorphisms and risks of spina bifida. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol (Part A)* 2007; 79: 45–49.
110. Andrews AT. *Electrophoresis*, 2nd ed. Clarendon press, Oxford, UK, 1986.
111. Bottema CD, Sommer SS. PCR amplification of specific alleles: Rapid detection of known mutations and polymorphisms. *Mutat Res* 1993; 288: 93-102.
112. Daly S, Scott JM. The prevention of neural tube defects. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1998; 10: 85-89.
113. LeMone P. Vitamins and minerals. Clinical issues, *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 1999; 28: 520-533.
114. Tinkle MB, Sterling BS. Neural tube defects: A primary prevention role for nurses, *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 1997; 26: 503-523.
115. Laker MF. *Klinik Biyokimya*. Çeviri Editörü E Ulukaya, Ankara, Nobel & Güneş Yayınevi, 1996: 9.
116. Levine AB. Reproductive health in diabetic women. A report of two cases demonstrating the importance of preconception care. *J Reprod Med* 1998; 43: 691-692.
117. Lowdermilk DL, Perry SE, Bobak IM. *Maternity and Women's Health Care*. 7. baskı, St. Louis, Mosby Co. 2001: 359-1080.
118. Dodds L, King WD. Relation between trihalomethane compounds and birth defects. *Occup Environ Med* 2001; 58: 443-446
119. Hibbard ED, Smithells RW. Folic acid metabolism and human embryopathy (letter). *Lancet* 1965: 1254.
120. Daly S, Mills JL, Molloy AM, Conley M, Lee YJ, Kirke PN, et al. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects.

Lancet 1997; 350: 1666-1669.

121. Van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, Eskes TKAB, Van den Heuvel LP, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. Lancet 1995; 346: 1070.
122. Frosst P, Blom HJ, Miiros R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet 1995; 10: 111-113.
123. Shaw GM, Rozen R, Finnell RH, Todoroff K, Lammer EJ. Infant C677T mutation in MTHFR, maternal periconceptional vitamin use, and cleft lip. Am J Med Genet 1998; 80: 196-198.
124. Kirke PN, Mills JL, Whitehead AS, Molloy A, Scott JM. Methylenetetrahydrofolate reductase mutation and neural tube defects. Lancet 1996; 348: 1037-1038.
125. Van der Put NMJ, Gabreels F, Stevens EMB, Smeitink JAM, Trijbels FJM, Eskes TKAB, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects? Am J Hum Genet 1998; 62: 1044-1051.
126. Kaneko KJ, Cullinan EB, Latham KE, DePamphilis ML. Transcription factor mTEAD-2 is selectively expressed at the beginning of zygotic gene expression in the mouse. Development 1997; 124: 1963-1973.
127. Sawada A, Nishizaki Y, Sato H, Yada Y, Nakayama R, Yamamoto S, et al. TEAD proteins activate the Foxa2 enhancer in the node in cooperation with a second factor. Development 2005; 132: 4719-4729.
128. Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. Science 2002; 298: 597-600.
129. Zhao P, Caretti G, Mitchell S, McKeehan WL, Boskey AL, Pachman LM, et al. Fgfr4 is required for effective muscle regeneration in vivo. Delineation of a

MyoD–TEAD2–Fgfr4 transcriptional pathway. *J Biol Chem* 2006; 281: 429-438.

- 130.** Murphy PJ, Galigniana MD, Morishima Y, Harrell JM, Kwok RP, Ljungman M, Pratt WB. Pifithrin- α inhibits p53 signaling after interaction of the tumor suppressor protein with hsp90 and its nuclear translocation. *J Biol Chem* 2004; 279: 30195–30201.
- 131.** Pani L, Horal M, Loeken MR. Rescue of neural tube defects in PAX-3-deficient embryos by p53 loss of function: implications for PAX-3- dependent development and tumorigenesis. *Genes Dev* 2002; 16: 676–680.
- 132.** Kaneko KJ, Kohn MJ, Liu C, DePamphilis ML. Transcription factor TEAD2 is involved in neural tube closure. article, *Genesis* 2007; 45: 577–587.

6. EKLER

Ek 1: Bilgilendirilmiş Onam Formu

Spina bifida (SB)' lı hastalarda metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR), paired-box3 (PAX3) ve transkripsiyon faktör2 (TEAD2) gen polimorfizmlerinin araştırılması.

İnsan DNA'sının yaklaşık % 99.9'u iki insan arasında aynıdır ve insanlardaki genetik çeşitlilik DNA zincirindeki küçük farklardan kaynaklanmaktadır. Bazı DNA sekanslarındaki farklar insan fenotipini etkilememekle bazıları ise direkt hastalığa neden olmaktadır. Bir lokusta birden fazla allelin bulunması şeklindeki DNA nükleotid değişimlerine polimorfizm adı verilir. Allellerin genel popülasyondaki kromozomların %1'inden fazlasında bulunması genetik polimorfizmi oluşturur. Allelik sıklığı %1'den küçük ise buna nadir varyantlar denir. Genlerin regülatuar (düzenleyici) bölgelerinde bulunan polimorfik alleller genlerin transkripsiyonel regülasyonunu etkileyerek fenotipik değişikliklere neden olabilir .

Tıptaki gelişmelere paralel olarak ağır konjenital anomalisi olan çocuklarda yaşama oranı artmakta, fakat anomaliden doğan sorunlar aynı oranda düzeltilememektedir. Çalışmamızda SB gelişmesine neden olabilecek bazı genetik polimorfizmlerin araştırılması amaçlanmaktadır. Çalışma sonucunda elde edilecek veriler SB'ya yatkınlık oluşturacak genetik durumların ortaya çıkarılmasına katkı sağlayacaktır.

Araştırmanın ismi: Spina bifida'lı hastalarda metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR), paired-box3 (PAX3) ve transkripsiyon faktör2 (TEAD2) gen polimorfizmlerinin araştırılması.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni çocuğunuzda spina bifida tanısı veya spina bifida tanısı olmadan gen polimorfizminin bulunabilmesidir. F.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi ve Genetik Anabilim Dalı' nın ortak katılımı ile bu hastalığın tedavisi ve rutin kontrolleri yapılacaktır. Spina bifida morbidite ve mortalite oranı yüksek, tüm konjenital anomalilerin en ağır olanlarından biridir. Çoğunlukla folik

asit eksikliği ile birlikte genetik faktörler veya gebelikte kullanılan bazı ilaçlardan kaynaklanan, alt ekstremitelerde paralizi, nörojen mesane ve bağırsak disfonksiyonu, hidroşefali gibi yaşam boyu kalıcı morbiditelere yol açan bir malformasyondur. Ailelerin ve sağlık kurumlarının bu çocukların tedavisi için gösterdiği çabalar tam tedavi edici sonuç verememekte, bu bireyler ömür boyu tıbbi bakıma ihtiyaç duymaktadır. Bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de NTD sıklığı ve dağılımındaki farklılıklar, etyolojik faktörler olarak beslenme, kültürel veya genetik nedenler gibi bazı özgün veya özgün olmayan nedenlerin incelenmesi gerektiğini göstermektedir.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz.

Yapılacak araştırmanın getireceği olası yararlar: Bu çalışma sonucunda spina bifidalı hastaların TİT, idrar kültürü, Renal USG, VCUG, DMSA, Böbrek fonksiyon testlerinin düzenli kontrolleri yapılacaktır. Ayrıca nörojenik mesane, barsak disfonksiyonu ve böbrek yetmezliğinden korunmuş olacaktır. Bu çalışmayla alınacak bilgilerle ayrıntılı bir genetik danışmanlık hizmeti verilecektir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Dr.Mehmet SARAÇ tarafından çocuğunuzun spina bifida hastalığına yönelik tedavisi yapılacak ve aralıklı yapılacak kontrollerde alınacak rutin kan tahlilleri, idrar tahlilleri, Renal USG, DMSA, VCUG ile yapılan tedavinin takibi gerçekleştirilecek ve kayıt tutulacaktır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Dr.Mehmet SARAÇ tarafından Fırat Üniversitesi Tıp fakültesi Araştırma Hastanesi Çocuk Cerrahisi Kliniği ve Fırat Üniversitesi Tıp fakültesi Genetik Anabilim Dalı tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr.Mehmet SARAÇ, 23335555-2901 ve F.Ü Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Kliniğini arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, ünvanı:

Adres:

Tel:

İmza

Ayırt etme yeteneği söz konusu olan hastanın kendisinin rızası alınacaktır.

Hastanın

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza

Ek 2: Hastaların Demografik Verileri Anket Formu

Sıra No	Tamı	Düşük varmı?	Yaş	Cinsiyeti	Anne yaşı	Anne baba akrabalığı	Ailede konjenital anomali başka bebek	Ailede NTD öyküsü	Annenin kullandığı ilaç	Hastanın geldiği il
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										
21										
22										
23										

7. ÖZGEÇMİŞ

Adıyaman'ın Besni ilçesinde 1977 yılında doğdum. İlkokulu Yazıbeydilli Köyü İlkokulunda, ortaokulu Seyhan Şakirpaşa Ortaokulu ve liseyi Seyhan 19 Mayıs Lisesinde tamamladıktan sonra 1997 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tıp eğitimime başladım, 2003 yılında mezun oldum. On ay pratisyen hekim olarak Adıyaman ili Besni ilçesi Besni Devlet Hastanesinde görev yaptım. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalında 2004 yılında uzmanlık eğitimine başladım. Halen bu klinikte eğitimime devam etmekteyim.