



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNME HASTALARINDA METİLENTETRAHİDROFOLAT
REDÜKTAZ (MTHFR) GEN POLİMORFİZMİNİN ETKİSİ**

FİDAN GÖKÇEÇİÇEK GÜLYAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. YAVUZ TAGA

İSTANBUL - 2008

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Eğitim süresince gösterdiği yakın ilgi, değerli katkı ve yönlendirmelerinden dolayı sevgili danışmanım, kıymetli hocam ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı
Prof.Dr. Yavuz Taga' ya

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ;

Prof.Dr. Kaya Emerk' e
Prof.Dr. Nesrin Kartal Özer' e
Prof.Dr. Serpil Bilsel' e
Prof.Dr. Goncagül Haklar' a
Prof.Dr. Önder Şirikçi' ye
Prof.Dr. A. Süha Yalçın'a

Tezimde kullandığım inme hastalarına ait kanların sağlanmasında katkıda bulunan Marmara Üniversitesi Hastanesi Nöroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden ;

Dr. İpek Midi' ye
Dr. Mesrure Köseoğlu'na

Çalışmanın tüm aşamalarında desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım ;

Dr. Şebnem Tekin Neijman'a
Hümeysra Turan'a

Yüksek lisans eğitimim süresince her zaman yardım ve desteklerini gördüğüm **aileme** ve bir baba gibi gördüğüm **Dr. Hüseyin Aydın'a** sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Teşekkür	I
İçindekiler	II
Simgeler ve Kısaltmalar	IV
Şekil, resim ve tabloların listesi	V
i. şekillerin Listesi	VI
ii. resimlerin listesi	
iii.tabloların listesi	
1. Özet	1
2. Summary	2
3. Giriş ve Amaç	3
4. Genel Bilgiler	5
4.1. İnme	5
4.1.1 İnme tanımı	5
4.1.2 İnmede Etyoloji ve Sınıflandırma	5
4.1.3 İnmede Risk Faktörleri	10
4.1.4 İnmede Tanı Yöntemleri	11
4.1.5 İnme Tedavisi	12
4.2 Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) ve İnme	12
4.2.1 MTHFR Enziminin Yapısı ve Görevleri	12
4.2.2 MTHFR Geninin Yapısı ve Özellikleri	14
4.2.2.1 MTHFR Gen Varyantları	15
4.2.2.2 MTHFR C677T Gen polimorfizmi	16
4.2.3 C677T Gen Polimorfizmi ve İnme	17
4.3. MTHFR C677T Gen Polimorfizmi Ölçme Yöntemleri	18
4.3.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Polimorfizmi (PCR)	18
4.3.1.1 Gerçek Zamanlı PCR (RealTime PCR)	20
4.3.1.2 Light Cyclus Sistemi için Kullanılan Floresan Boyalar ve Ölçüm Kanallar	23
4.3.1.2.1 Erime Eğrisi Analizi	23
5. Gereç ve Yöntem	27
5.1 Kontrol ve Çalışma grubu	27

5.2 MTHFR C677T Gen Polimorfizminin Analizi	27
5.2.1 DNA izolasyonu ve Gen Polimorfizminin Analizi Sırasında Kullanılan Cihazlar	27
5.2.2 DNA izolasyonu ve Gen Polimorfizminin Analizi Sırasında Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
5.2.3 DNA izolasyonu ve Gen Polimorfizminin Analizi Sırasında Kullanılan Hazır Kitler	28
5.2.3.1 High Pure PCR DNA izolasyon Kiti	28
5.2.3.2 LightCycler MTHFR C677T Mutasyon belirleme Karışımı	28
5.3 MTHFR C677T Polimorfizmi Analizi İçin Çalışma Protokolü	29
5.3.1 DNA İzolasyon aşamaları	29
5.3.2 MTHFR C677T Termal Profili	30
5.3.2.1 Denaturasyon	30
5.3.2.2 Amplifikasyon	31
5.3.2.3 Erime Eğrisi (melting curve)	31
5.3.2.4 Soğutma (cooling)	32
5.3.3 MTHFR C677T Polimorfizmi Belirlemek için Master Mix Hazırlanması	32
5.3.4 Sonuçların Değerlendirilmesi	33
5.3.4.1 MTHFR C677T Analiz Sonucu	33
5.3.4.2 İstatiksel Analiz Yöntemleri	34
6. Bulgular	35
7. Tartışma ve Sonuç	38
8. Ekler	41
9. Kaynaklar	45
10. Özgeçmiş	51
11. Etik kurul onayı	52

KISALTMALAR

BDH	Beyin damar hastalığı
TOAST	Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment
CADASIL	Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukocephalopathy
BT	Beyin Tomografisi
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
EKG	Elektrokardiografi
AF	Atriyal fibrilasyon
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoproteinler “High Density Lypoproteins”
LDL	Düşük yoğunluklu lipoproteinler “Light Density Lypoproteins”
GIA	Geçici iskemik atak
SAM	S-adenozil metionin
NADPH	Nicotinamide adenin dinucleotid phosphate
MTHF	Metilentetrahidrofolat
MTHFR	Metilentetrahidrofolat redüktaz
FAD	flavoadenindinükleoti
TATA	timin adenin timin adenin
LC	Lightcycler
LED	Light Emitting diode
FRET	Fluoresance Resonance Energy Transfer

ŞEKİL, RESİM VE TABLOLARIN LİSTESİ

i. ŞEKİLLERİN LİSTESİ

- Şekil 4.1. Serebral damarda yırtılma sonucu kan beyinin heryanını sarması ve ikinci kısımda cerrahi müdahale olarak damar yırtığının boynuna klips takılması
- Şekil 4.2. Küçük arterlerin patlaması ve patlamasıyla beraber kan beyi dokusuna yayılması
- Şekil 4.3. İskemik inme; beyin damarlarının tıkanması
- Şekil 4.4. Oksijensiz ve besinsiz kalması
- Şekil 4.5. Tetrahidrofolatın kimyasal yapısı
- Şekil 4.6. MTHFR enziminin rolünü gösteren mekanizma. Enzim iki döngü arasında metil transferinde rol oynaması
- Şekil 4.7.A. Hibridizasyon problemlerinin işaretlenmesini anlatan şekil
- Şekil 4.7.B. Annealing basamağında, problemler hedef DNA dizisine yan yana bağlanması
- Şekil 4.7.C Annealing basamağından sonra gerçekleşen elongation (uzama) basamağının başlamasıyla sıcaklık artışı gerçekleşmesi
- Şekil 4.7.D. Uzama basamağının ardından çift iplikli amplikonların oluşmasıyla hibridizasyon problemleri serbest hale gelmesi
- Şekil 4.8. LC cihazının optik kanallarının ölçüm yaptığı dalga boyları, kanallar arasındaki etkileşimler ve kullanılan floresan boyalar.
- Şekil 4.9. Hibridizasyon problemlerinin wild type ve mutant DNA ipliğine bağlanması
- Şekil 5.1. Kanal 2’de C677T polimorfizmi için MTHFR geninin 677. pozisyonunda görülebilecek üç muhtemel genotipinin erime eğrisi
- Şekil 6.1. Kontrol ve Hasta Grubundaki MTHFR C677T Gen Polimorfizminin Genotip göre Dağılımı

ii. RESİMLERİN LİSTESİ

- Resim 4.1. Lightcycler Cihazı resmi

iii. TABLOLARIN LİSTESİ

Tablo 4.1. İnme risk faktörleri

Tablo 5.1. Kullanılan Cihazlar

Tablo 5.2. Kimyasal Malzemeler

Tablo 6.1. Cinsiyet ve yaş ortalamaları dağılımı

Tablo 6.2. Cinsiyet dağılımı

Tablo 6.3. Genotip dağılımları

1. ÖZET

İnme, kalp hastalığı ve kanserden sonra dünyada en sık görülen üçüncü ölüm nedenidir, morbiditenin ise en sık sebebidir. Son on yıl içerisinde, inme nedeniyle ölüm oranları tüm dünyada oldukça azalmıştır ve bu nedenle morbiditeye neden olan inme risk faktörlerinin tespiti önem kazanmıştır. Hiperhomosistein inme için bir risk faktörüdür.

Metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi plasmadaki homosistein düzeylerini ayarlama da önemli bir rol oynar. Metilentetrahidrofolat redüktaz gen C677T polimorfizmi enzim aktivitesinde azalmaya neden olur. Tartışmalara rağmen, önceden yapılan çalışmalar inme hastalarında MTHFR gen polimorfizmlerin birer sebep olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmada, inme hastalarında metilentetrahidrofolat geni C677T polimorfizmi genotip ve allel sıklıklarını belirlemek amaçlanmıştır. Çalışma 40 inme hasta ve 38 sağlıklı kişide yapılmıştır.

Tüm araştırma grubu bireylerinin periferik kan örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapılarak LC cihazında RT PCR yöntemi uygulanarak MTHFR enzimi kodlayan genin C677T polimorfizminin genotipleri tayin edildi.

Kontrol grubunda *MTHFR C677T* %63.15 CC, %34.21 CT, %2.63 TT ve hasta grubunda %35 CC, %52.5 CT, %12.5 TT genotipleri analiz edilmiştir. Sonuç olarak istatistiksel farklılık gözlenmiştir.

Sonuç olarak, MTHFR C677T gen polimorfizmlerinin inme hastalarında risk faktörü oluşturduğu saptanmıştır. Ancak olgu sayısının az olması ve homosistein ölçümlerinin yetersiz olması nedeniyle araştırmamızın genişletilesinin uygun olacağı düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler : İnme , C677T, metilentetrahidrofolat redüktaz, RT PCR

2. SUMMARY

The Effect Of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gen Polymorphism In Stroke Patients

Stroke, after heart diseases and cancer, is the third most common cause of mortality and of morbidity in the world. In the past decade, the mortality rate from stroke has declined, but the risk factors which may cause morbidity have increased. Hyperhomocysteinemia is also a risk factor for stroke.

The enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) plays a critical role in modulating the levels of plasma homocysteine. The C677T polymorphism, in the methylenetetrahydrofolate reductase gene causes reduced enzyme activity. Although controversial, previous studies have shown that there was evidence MTHFR gene polymorphisms may cause strokes.

This study was performed to observe the MTHFR C677T genetic polymorphism and alleles. In this study we enrolled 40 stroke patients and 38 healthy controls.

DNA was extracted from peripheral blood samples of the patients and controls. C677T genotype and alleles in the MTHFR gene were identified in LC device by RT PCR methods.

We analyzed *MTHFR C677T* genetic polymorphism. We found %63.15 CC, %34.21 CT, %2.63 TT genotypes in the control groups and %35 CC, %52.5 CT, %12.5 TT genotypes in the patient groups. For that reason we concluded that statistically difference was observed between patients and controls.

In conclusion, we may say that MTHFR C677T polymorphism is a risk factor in stroke patients. Since the number of patients were not enough and the levels of homocystein were not determined in all patients we think that this study should be performed in a larger group of patients.

Keywords : Stroke, C677T, methylenetetrahydrofolate reductase, RT PCR

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnme (stroke) beyni besleyen damarlardan birinin tıkanması veya kanaması sonucu ortaya çıkan hastalık tablosudur. Her iki durumda da beynin kan akımı bozulmaktadır. Tıkanan veya kanayan damarın beslediği beyin bölgesine oksijen ve gerekli besin maddeleri ulaşamaz. Sonuçta beynin bu bölgesinin vücut üzerindeki kontrolü ortadan kalkar. İnmeli hastada bu bölgelerden biri etkilenmiştir ve hastalığın bulguları etkilenen bölgeye göre değişiklik gösterir.

İnme pek çok ülkede en fazla ölüme yol açan ve en fazla sakat bırakan hastalıklar arasındadır (60). Hastaya olduğu kadar, çevresine ve topluma maliyeti çok yüksek bir hastalıktır. İnmelerin büyük bir bölümü beyni besleyen damarların tıkanıklığına bağlıdır. İnme'li hastaların yaklaşık %20-50'sinde, orta şiddette hiperhomosisteinemi ortaya çıkabilir (23, 60).

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi, folat siklusunda önemli bir rol oynar ve homosistein aminoasitinin metabolizmasına katkıda bulunur(48,29). MTHFR genindeki bazı mutasyonlar, MTHFR enzim aktivitesinde azalmaya neden olur. MTHFR enzim eksikliği, plazma homosistein düzeyindeki artış da vasküler hastalıklarla ilişkilidir. MTHFR geninde görülen bazı mutasyonlar, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olan hiperhomosisteinemi ve homosisteinüri oluşmasına neden olmuştur (12, 52).

C677T mutasyonunda, MTHFR aktivitesi, homozigot mutant TT genotipinde, heterozigot CT ve homozigot normal CC genotiplerine göre azalırken, homosistein seviyesi önemli oranda yükselir. MTHFR eksikliğinde, homosisteinden metiyonin oluşumundaki bir bozukluk, organizmayı hem metiyonin ve (S-adenozilmetiyonin) azalmasına hem de homosistein birikiminden doğan toksik etkilere maruz bırakır. İnme'li 900 hastayı içeren ve 1994'ten beri 24 çalışmanın yer aldığı bir meta-analiz çalışmasında, kontrollere göre strok'lu hastaların, artan homosistein düzeylerine sahip olduğu belirlenmiştir (16).

Yine Morita ve arkadaşlarının 256 strok'lu hasta ve 325 kontrol ile yaptığı bir çalışmada, TT genotipi ile strok arasında önemli derecede ilişki olduğu ileri sürülmüştür(39). Bu çalışmada plazma homosistein seviyelerinin, CC veya CT genotipli hastalara göre, TT genotipli hastalarda daha yüksek olduğu belirlenmiştir (39).

Gen mutasyonların tespiti ve gen seviyesi ölçümleri serebrovasküler hastalıkların ilerlemesi tedaviye cevap ve dirençte bilgi sağlamakta ve hastalığın seyri hakkında daha iyi bilgi sahibi olmamızı sağlamaktadır.

MTHFR genindeki mutasyonlar RT Floresan PCR ile kısa sürede kolayca tespit edilebilmektedir. Kantitatif Real Time PCR teknolojisi son zamanlarda duyarlılığı, doğruluğu ve pratikliği sebebiyle onkolojik araştırmalarda gen mutasyonlarının tespitinde günümüzde yaygın kullanılmaya başlanmıştır. İnme hastalığı gibi serebrovasküler hastalıkların çok yaygın görülen hastalıkların genetik mutasyonların tanımlanması erken tanı ve tedavi stratejileri belirlenmesi önemli olacaktır.

Bu çalışmalara dayanarak, strok hastalarında metilentetrahidrofolat redüktaz polimorfizmi ilişkisi araştırılacaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İnme (Stroke)

4.1.1. İnme Tanımı

Beyin damar hastalığı terimi; arterler, arterioller, kapillerler, venler ya da sinüslerdeki kan damarlarının patolojik süreci sonucu oluşan anormallikleri belirtmektedir. BDH'ndaki patolojik olay, oklüziv damar hastalığında olduğu gibi damar trombozu ve embolizmini, kanayıcı damar hastalığında olduğu gibi damar rüptürünü içerebilir. Beyinde iskemik veya hemorajik tipte anormallikler oluşabilir. Beyin damar hastalığının kendine özgü tarzı olan inme, ani yada akut konvülfif olmayan fokal nörolojik defisit olarak tanımlanır (2, 32).

Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımına göre ise inme; 24 saatten uzun süren ya da ölümle sonlanan, vasküler neden dışında gösterilebilir başka bir nedeni olmayan, hızlı gelişmiş, serebral işlevin fokal ve bazen de global olan bozukluğudur (37).

İnme, ölüm nedenleri arasında kalp hastalığı ve kanserden sonra dünyada üçüncü sırada yer alırken, erişkin nörolojik hastalıkları içerisinde görülme sıklığı ve önemi açısından ilk sırada yer almaktadır (37, 20). Yaşlara göre yıllık inme insidansı; 55-64 yaş aralığında binde 1.7- 3.6 kişi, 65-74 yaş aralığında binde 4.9-8.9 kişi, 75 yaş üstünde binde 13.5-17.9 kişidir. 45 yaş altı inme insidansı, tüm inmelerin ancak %3-5'ini oluşturmaktadır. Kadınlarda 55-64 yaş arası inme insidansı, erkeklere göre 2-3 kat daha azdır. 85 yaşa doğru bu fark azalmaktadır. Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, inmeye bağlı ölüm oranının düştüğünü göstermektedir. İnme sonrası ölüm oranının azalmasında olasılıkla tedavi yöntemlerinin ve bakım koşullarının gelişmesi etkindir (34).

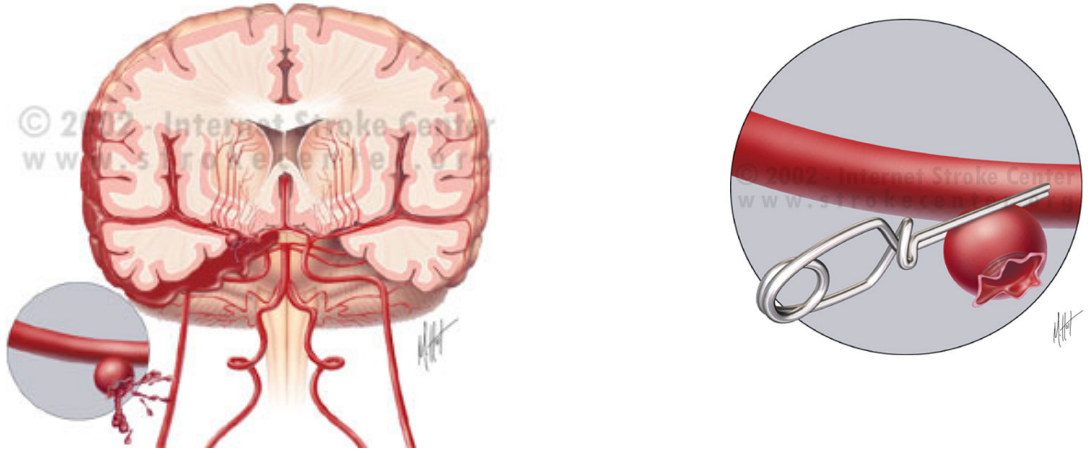
Gelişmiş ülkelerde ortalama 4 yaşam süresinin artması, bu grup hastalıkların görülme sıklığını artırmıştır. Bu sebeple; risk faktörlerinin tespiti, primer ve sekonder profilaksi, erken tanı, komplikasyonların önlenmesi, inme rehabilitasyon ünitelerinin devreye girmesi, mortalite ve morbitiyi azaltmada önem kazanmıştır (5).

4.1.2. İnmede Etyoloji Ve Sınıflandırma

İnme etyolojisine yönelik ilk sınıflandırmalar genellikle lezyonun patolojisine göre yapılmış ve tüm inmeler "iskemik" ve "hemorajik" olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda ise, ileri nöroradyolojik, kardiyolojik,

hematolojik ve biyokimyasal tetkiklerin kullanılmasıyla, lezyonun patolojisi ile birlikte, lezyon lokalizasyonu ve oluş mekanizması göz önüne alınarak sınıflandırmalar yapılmıştır. Buna göre inme alt gruplarının görülme sıklığı; %3-10 subaraknoid kanama, %10-15 intraserebral hemoraji ve %60-80 serebral iskemi şeklindedir (56, 28).

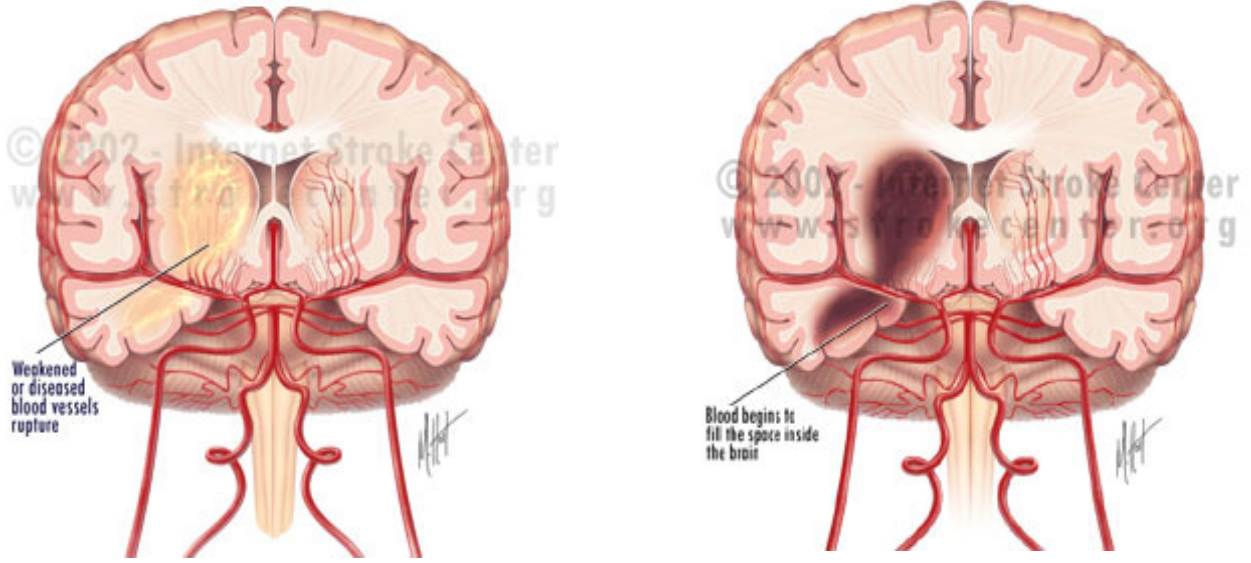
Subaraknoid kanama: Subaraknoid kanama araknoid zar ile pial zar arasında kalan bölgeye kanamanın neden olduğu bir sendrom olup, spontan veya travmaya sekonder gelişebilir. Spontan subaraknoid kanama ventriküler sisteme açılan ve daha sonra subaraknoid bölgeye geçiş gösteren intraserebral kanamadan da kaynaklanabilir. Ayrıca anevrizma rüptürüne bağlı olarak gelişen malformasyon nedeniyle olan kanama, primer subaraknoid kanamanın en sık karşılaşılan nedenleridir. Primer subaraknoid kanama akut serebrovasküler olayların %9'unu oluşturur. En sık görüldüğü yaşlar 55 ve 65 yaşlar arasındadır (21, 35). Klinik bulgular; ani başlangıçlı şiddetli baş ağrısı, bulantı, kusma ve bilinç bozukluğu olup, fokal nörolojik defisit genellikle bulunmaz (56).



Şekil 4.1. Serebral damarda yırtılma sonucu kanın, beyinin her yanını sarması ve cerrahi müdahale olarak damar yırtığının boynuna klips takılması.

İntraserebral hemoraji: İntraserebral hemorajide kanamanın kaynağı beyin parankiminde olup, sıklıkla küçük penetran arterlerin kanaması ile bazal ganglion, talamus, pons gibi beyin derin bölgelerinde hematomlar meydana gelir. Primer intraserebral kanamalar genellikle kronik hipertansiyonlu hastalarda görülür (10). Diğer nadir nedenler ise arteriyovenöz malformasyonlar, amiloid anjiyopati, kanama diyatezleri, tümör kanamaları, travma, antikoagülasyon, Moyamoya hastalığı ve

sempatomimetik ilaç kullanımınıdır (56). Hastaların çoğunda, akut başlangıçlı baş ağrısı ve hızla gelişen stuporu takiben, koma gelişir. Belirti ve bulgular kitle lezyonu gibi davranan hematomun lokalizasyonuna bağlıdır. Hayatta kalan hastaların birkaç günlük bir dönemde yavaşça bilinçleri açılabilir. Temporal ve frontal hematomu olan hastalar, ani gelişen nöbeti takiben kontralateral hemiparezi ile prezente olabilirler (7).



Şekil 4.2. Küçük arterler patlaması ve patlamasıyla beraber kan beyin dokusuna yayılması

Serebral infarkt: Serebral infarktlarda etyolojiye göre sınıflama, akut iskeminin tedavisi ve prognozunu yanı sıra, ikincil koruma açısından da çok önemlidir. Buna karşılık, klinik ve nöroradyolojik bulguların bazı inme alt gruplarında benzerlik göstermesi nedeniyle, etyolojik sınıflandırma oldukça güçtür.

Bamford ve ark (6), 1991 yılında klinik bulguları ön planda tutarak bir sınıflandırma yapmışlar ve serebral infarktları dört alt gruba ayırmışlardır:

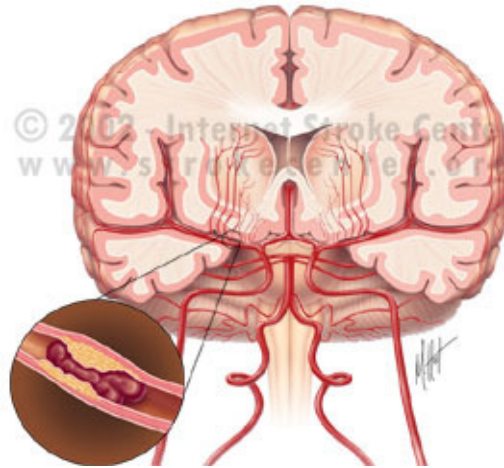
1. Total anterior sirkülasyon infarktları
2. Parsiyel anterior sirkülasyon infarktları
3. Laküner infarktlar
4. Posterior sirkülasyon infarktları

Bu sınıflandırmada etyolojiye yer verilmemiş olması, bu sınıflandırmanın günümüzdeki kullanımını sınırlamıştır (56).

1993 yılında yayınlanan Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) çalışmasında kullanılan sınıflandırma, klinik bulguların yanı sıra etiolojiye de yer verdiği için günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (1). İskemik stroklar, Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) çalışmasında kullanılan sınıflamaya göre beş gruba ayrılırlar:

- 1- Geniş arter ateroskleroza (tromboz veya emboli)
- 2- Kardiyoembolizm
- 3- Küçük damar oklüzyonu (lakün)
- 4- Diğer belirlenen etiolojiler
- 5- Nedeni belirlenemeyenler

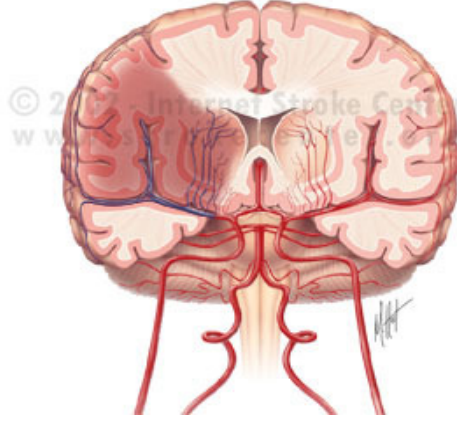
Geniş arter ateroskleroza: Tüm iskemik inmelerin %50'si geniş arter ateroskleroza bağlıdır. Bu iskemi alt grubu özellikle ekstrakraniyal ve daha nadir olmak üzere intrakraniyal damarlarda ve bunların bifurkasyon bölgelerinde, yıllar içerisinde gelişen ateroskleroz plaklarının stabilizasyonlarının bozulmasıyla ortaya çıkan trombozlarla ilişkili olarak gelişir. Nörolojik defisit olarak, ekstremitelerde distal veya proksimal ağırlıklı kuvvet kayıpları ve özellikle arterden artere embolizm vakalarında fokal kortikal bulgular ortaya çıkar (56).



Şekil 4.3. İskemik inme; beyin arter damarlarının tıkanması

Kardiyoembolizm: Tüm iskemik inmelerin %15-20'sini oluşturan kardiyoembolizmde, arteriyel oklüzyonun sebebi kalpten kaynaklanan embolilerdir. Başlıca klinik bulgu; ani

gelişen, bazen bilinç bozukluğunun eşlik ettiği inmelere. Sıklıkla başlangıçta epileptik nöbetler inme ile birliktelik gösterir. Bazı vakalarda ise ilerleyen saatlerde nörolojik defisit hızla düzelmeler gözlenir (8).



Şekil 4.4. Oksijensiz ve besinsiz kalması

Küçük damar oklüzyonu (laküner infarktlar): Erkeklerde kadınlara göre daha sık rastlanan laküner infarktlar, 58-72 yaş aralığında en sık görülürler (4). Laküner infarktlar; beynin derin bölgelerine veya beyin sapına lokalize olan penetran arterlerin oklüzyonuna bağlı olarak gelişen 15 milimetreden küçük iskemik lezyonlardır (34). Fransa’da yapılan topluma dayalı bir çalışmada laküner infarkt oranı kadınlarda 30 yaşından önce yüz binde 2.8 olup, 85 yaşında yüz binde 186 oranlarındadır. Erkeklerde ise bu oran 40 yaşından önce yüz binde 12.3 olup 85 yaşında yüz binde 398 olarak tespit edilmiştir (22). Başlıca bazal ganglionlar, lentiküler nükleus ve özellikle putamen, talamus, internal kapsül, pons ve sentrum semiovalede oluşan laküner infarktlar daha az sıklıkta serebellum, serebral giruslar ve spinal kordda görülebilir (44).

Diğer belirlenen etiolojiler: Bu grupta, santral sinir sisteminin primer ve sekonder vaskülitleri, Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) ve serebral amiloid anjiyopati gibi nadir küçük damar hastalıkları, konjenital damar hastalıkları, mitokondriyal hastalıklar, travma, disseksiyon ve kan hastalıkları yer alır. Tüm iskemik inmelerin %5’inden az yer tutarlar (56).

Sebebi belirlenemeyenler: Bu grupta, ayrıntılı tetkiklere rağmen etiolojisi bulunamayan serebral infarktlar ve yeterli tetkik edilemeyen vakalar yer alır. Ayrıca, yapılan tetkiklerde birden fazla etiolojik neden bulunan vakalar da bu grupta değerlendirilirler (56).

4.1.3. İnmede Risk Faktörleri

Bir hastalığın oluşmasında yatkınlık yaratan etkenler risk faktörü olarak tanımlanır. İnme risk faktörleri; inmenin subtipi, risk faktörünün değiştirilebilirliği, ve inme ile ilişkisinin bilimsel kesinliği dikkate alınarak sınıflanabilir. Tablo 4.1’de iskemik inme ile ilişkili risk faktörleri sıralanmış, izleyen metinde ise bunların önemlilerinden ve bizim çalışmamıza yön gösteren homosistein ile ilişkisi gösterilmiştir (11).

Kan **homosistein** düzeyi genetik faktörler ile B6, B12 vitaminleri ve folik asit alımı tarafından belirlenir. Yüksek kan homosisteininin hem aterojenik hem de tromboza meyil yaratan etkileri vardır. Hiperhomosisteinemi varlığında koroner kalp hastalıkları ve iskemik inme sıklığı artar. B6, B12, ve folik asit suplementasyonu ile kan homosistein değerleri düşürülebilir. Ancak bu girişim ile iskemik inme veya miyokard infarktüsü sıklığında azalma henüz gösterilmiş değildir (11,13,51,53,58,36,19).

Tablo 4.1. İnmede risk faktörleri

A- İNME İLE İLİŞKİSİ KESİN RİSK FAKTÖRLERİ	
I-	Değiştirilemeyen risk faktörleri <ul style="list-style-type: none">• Yaş• Cins• Aile öyküsü• Irk
II-	Değiştirilmesiyle inme önlenmesinde değeri kanıtlanmış risk Faktörleri <ul style="list-style-type: none">• Hipertansiyon• Kalp hastalıkları (atriyal fibrasyon, infektif endokartit, mitral stenoz, yakın tarihli geniş miyokard infarktüsü)• Sigara• Yüksek kan kolesterolü ve lipitler• Orak hücreli anemi• Geçici iskemik ataklar• Asemptomatik karotis stenozu
II-	Değiştirilmesiyle inme önlenmesinde olası (henüz kanıtlanmamış) yararı olan risk faktörleri <ul style="list-style-type: none">• Diabetes Mellitus• Hipermosisteinemi• Sol ventrikül hipertrofisi (EKG ile)
B- İNME İLE İLİŞKİSİ KESİN OLMAYAN RİSK FAKTÖRLERİ	
	<ul style="list-style-type: none">• Alkol kullanımı• Obesite• Beslenme alışkanlıkları• İlaç kullanımı ve bağımlılığı• Fiziksel inaktivite• Hormon tedavisi• Hiperinsülinemi ve insülin rezistansı• Stres• Hiperkoagülabilitate ve inflamasyon (fibrin oluşumu ve fibrinoliz, fibrinojen, antikordiyolipin antikorları)• Subklinik hastalıklar (artmış intima-media kalınlığı, aort aterom plakları, azalmış bilek kol kan basıncı oranı , manyetik rezonans görüntüleme (MRI)/ bilgisayarlı tomografi (BT) görüntülemelerde infarkt benzeri lezyonlar)

4.1.4. İnmede Tanı Yöntemleri

İskemik inme geliştiği düşünülen hastalarda tam kan sayımı yapılmalı, eritrosit sedimentasyon hızı ölçülmeli, parsiyel tromboplastin zamanı, plazma glukoz seviyesi, kan üre nitrojeni ve serum kreatinini değerlendirilmeli, lipid analizi, sifiliz serolojisi,

idrar analizi, göğüs filmi ve elektrokardiyografiyi içeren temel bir tarama yapılmalıdır (4, 39).

Kanamamanın ilk birkaç saatinde bilgisayarlı beyin tomografisi intraserebral hemoraji için en duyarlı tetkiktir. Manyetik rezonans görüntüleme, kanamadan birkaç saat sonra intraserebral hematomu ve yaşını gösterir. Manyetik rezonans görüntüleme bulgularındaki değişiklikler hemoglobin yıkımının evrelerine bağlıdır (2, 9, 43).

4.1.5. İnme Tedavisi

Akut iskemik inme tedavisi acildir. İskemik inmenin tedavisinde amaçlanan hedefler, hasarlaştıran beyin dokusu miktarını en alt düzeye indirmek, ilk iskemiye veya tekrarlayan iskemik olaylara ikincil meydana gelebilecek ek beyin dokusu hasarını engellemek ve hastanın fonksiyonel iyileşmesini kolaylaştırabilecek önlemleri almaktır. Bu hedeflerin yerine getirilebilmesinin en önemli gereklerinden biri de akut dönemde hasta için en uygun tedavi seçeneklerinin oluşturulması ve bu dönemde oluşabilecek komplikasyonların önüne geçmektir. Antiagregan, antikoagulan, trombolitik, antiödem ve sitoprotektif tedaviler bu yaklaşımların ana başlıklarını oluşturmaktadır (17, 49).

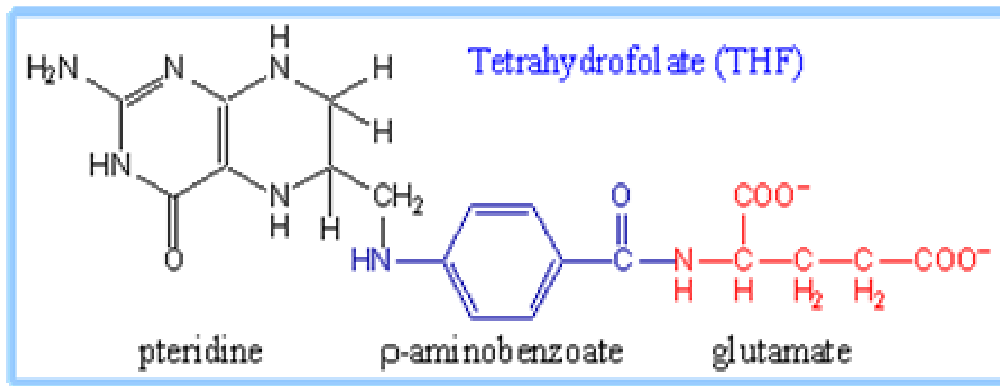
Intraserebral hemorajinin tedavisinin ana amacı kan basıncını kontrol etmek, solunum sistemini desteklemek, intrakranyal basıncı düzeltmek ve gerekirse cerrahi girişim yolu ile kanı boşaltmak esasına dayanmaktadır. Antiödem tedavinin yanı sıra, kan basıncı ortalama değerinin 90-130 mmHg arasında tutulması önerilmektedir. Arteriyel kan basıncı değerinin %25'ten daha fazla düşürülmemesi önemlidir (31, 42).

4.2. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) ve İnme

4.2.1. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Enziminin Yapısı ve Görevi

5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi (*MTHFR*), bir flavoprotein olup *MTHFR* familyasının bir üyesidir. Memelilerde *MTHFR*'ın yapısı hakkındaki ilk bilgiler, domuz karaciğer enziminin saflaştırılması ile elde edilmiştir. Enzim sitoplazmik bir enzim olup, iki alt birimden oluşan homodimer yapıdadır. İnsanlarda yapılan Western Blot analizleri sonucunda 2 izoformu bulunduğu açıklanmıştır. Bu izoformlar dokulara özgü olup, 70kDa'luk küçük alt birimlere sahip izoform karaciğerden, 77 kDa'luk büyük alt birimlere sahip izoform ise diğer dokulardan izole

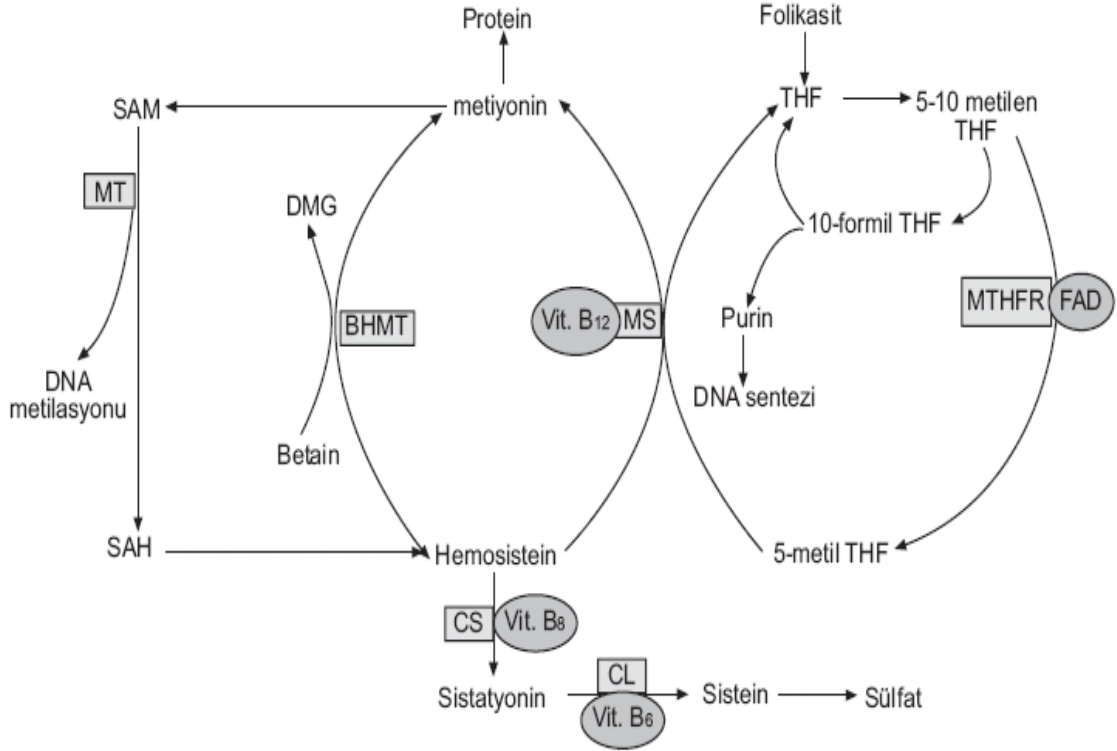
edilmiştir. Enzim tripsinle proteolize uğratıldığında, 77 kDa' luk alt birim 40 kDa ve 37 kDa'luk kısımlara ayrılmaktadır. Bu ayrılma sonucunda S-adenozil metiyonin (SAM) inhibisyonu ortadan kalkar, ancak enzimin katalitik aktivitesi değişmez. Yapılan çalışmalar sonucunda katalitik bölge olan 40 kDa'luk N-terminal bölgenin substrat ve koenzim bağlama kısımlarına sahip olduğu, regülatör bölge olan 37 kDa'luk C-terminal bölgesinin ise, SAM bağlanma kısmına sahip olduğu gösterilmiştir. Memeli enzimi kendisine nonkovalent olarak bağlı bulunan FAD koenziminini içerir. Bu koenzim, NADPH'ın metilentetrahidrofolata (MTHF) transferini sağlar (15).



Şekil 4.5. Tetrahidrofolatın kimyasal yapısı

MTHFR, folat metabolizmasının düzenleyici bir enzimi olarak homosisteinin metionine, B₁₂-bağımlı remetilasyonunda metil-grup donörü, 5,10-metilentetrahidrofolatın 5-metiltetrahidrofolata değişimini katalizleyerek homosistein metabolizmasında önemli rol oynar (40, 46). MTHFR, 5,10-metilen THF geri dönüşümsüz olarak 5-metil THF dönüştürür (Şekil 4.6).

5-metil tetrahidrofolat; DNA metilasyonu ve metiyonin sentezi için metil grubu sağlar. Bunun için 5-metil THF, metil grubunu vererek homosisteinin değişiminde rol oynar. 5,10-metilen THF ise deoksiüridilatın timidilata dönüşümünde kullanılırken bir taraftan da pürin sentezi için 10-formil THF'a okside olmaktadır (25).



Şekil 4.6: MTHFR enziminin rolünü gösteren mekanizma. Enzim iki döngü arasında metil transferinde rol oynar.

4.2.2. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Geninin Yapısı ve Özellikleri

İnsan MTHFR geninin, kromozom 1p36.3’de lokalize olduğu bulunmuştur (46). Bu genin N-terminal ucunun yapısı tamamen açıklanamamış, promotör bölgesinin transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için belirli dizilere sahip olduğu belirlenmiştir. MTHFR geninin 1. ekzonunda alternatif kaynaşma (splicing) bölgesi bulunmakta ve meydana gelen bu alternatif kaynaşma olayları sonucunda değişik dokularda, farklı MTHFR transkriptleri (3 transkript) oluşmaktadır (15, 24). Bu genin kompleks gen regülasyonu ile ilişkili olabilecek uzun UTR dizileri bulunduğu saptanmıştır.

İnsan genomik klonunun (17 kb), 2.2 kb uzunluğundaki MTHFR cDNA sekansının tamamını içerdiği belirlenmiştir. Bu MTHFR cDNA, her biri 102-432 bp uzunluğunda toplam 11 ekzon ve 250 bp’den 1.5 kb’a kadar değişen farklı uzunluklardaki intronlardan oluşmuştur. Ekzon 1, ATG başlama kodonunu taşır ayrıca 5’ ve 3’ kaynaşma bölgelerinde GT ve AG dinükleotidlerinden oluşan dizileri yer alır. Ekzon 11’in 3’ ucu, cDNA’da poliadenilasyon bölgesiyle sonlanır. Poliadenilasyon sinyali (AACCTA), bu bölgenin 15 bp önünde yer alır (25).

İnsan ve fare MTHFR geni üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, MTHFR geninde 15 farklı mutasyon ve polimorfizm belirlenmiştir. Bu mutasyonlardan en çok çalışılanlardan vasküler hastalıklar, nöral tüp defektleri ve kolon kanseri ile yakından ilişkili olduğu açıklanan C677T polimorfizmi enzimin katalitik bölgesinde ve özellikleri nöral tüp defektlerinde etkili olan A1298C polimorfizminin ise enzimin regülatör bölgesinde yer aldığı bildirilmiştir (15).

4.2.2.1. MTHFR Gen Varyantları

C677T alleli, MTHFR geninin 677.sıradaki sitozinin (C) timine (T) dönüşmesiyle meydana gelen bir nokta mutasyon ile karakterizedir. Bu mutasyon sonucunda enzimde, alanin aminoasiti valin aminoasidine dönüşmektedir (15). C677T alleli genellikle “termolabil mutasyon” olarak adlandırılır bunun nedeni; normal olarak kodlanamayan enzimin 37⁰C ve üstü sıcaklıklarda aktivitesinin azalmasıdır (3). Bu yüzden C677T homozigot bireylerin %50-60 arasında MTHFR enziminin aktivitesi 37⁰C de oldukça düşüktür. Yaklaşık %65 oranında ise 46⁰C’de kontrol grubuyla kıyaslandığında daha düşük aktivite gözlenmiştir.

Heterozigot bireylerin enzimleri yukarıda verilen değerler arasında bir ortalamaya sahiptir (36). Homozigot C677T alleleline sahip bireyler yeterli düzeyde folat alınmaması gibi durumlarda kanda homosistein düzeyini artmasına eğilimli bireylerdir. Bu durumda kandaki homosistein seviyesi diyet yada destek yoluyla yeteri miktarda folat alımıyla normal değerlere çekilebilmektedir (36).

A1298C allelinde 7. ekzonda glutamat amino asidini alanin amino asidine çeviren bir nokta mutasyonu saptanmıştır(6). Bu allel aynı zamanda C1298A olarak da adlandırılmaktadır (52). Kodlanan enzimin aktivitesi C677T allelindekine nazaran düşüktür. A1298C alleli bakımından homozigot olan bireyler kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında daha yüksek serum homosistein seviyelerine sahip olmadıkları gözlenirse de, her iki allel (C677T ve A1298C) bakımından heterozigot olan bireylerin homozigot C677T bireylerinde görülen düşük folat seviyesi ve yüksek serum homosistein seviyesi gibi benzer biyokimyasal profillere sahip oldukları gözlenmiştir (18).

T1059 allelinin klinik bir fenotipin ortaya çıkmasından sorumlu olduğuna dair bulgular yoktur. Bu allel ile bugüne dek yapılan çalışmalar bu mutasyonun sesiz bir

mutasyon olduğu ve A1298C mutasyonunun kalıtımına yardımcı bir mutasyon olduğunu ortaya koymuştur (52).

4.2.2.2. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) C677T Gen Polimorfizmi

MTHFR C677T polimorfizminde, MTHFR proteinin N-terminal katalitik bölgesini etkileyen 4.ekzonda 677.nükleotid olan C (Sitozin) → T (Timin)'e değişimi sonucu bir nokta mutasyonu oluşmaktadır. Bu mutasyon, genin ürünü olan proteinin 226.pozisyonunda Ala→Val aminoasit değişimine neden olmaktadır. Bunun sonucu MTHFR aktivitesi azalmakta, bu da 5-metil tetrahidrofolat seviyesinde azalmaya ve bunun sonucu olarak da homosisteinin metiyonine dönüşmemesi nedeniyle plazma homosistein seviyesinde artışa neden olmaktadır.

MTHFR C677T polimorfizminde, CC (Alanin/Alanin) homozigot normal, CT (Alanin/Valin) heterozigot ve TT (Valin/Valin) homozigot mutant genotipler görülmektedir.

MTHFR'ın C677T polimorfizminin, kardiyovasküler hastalıklar, nöral tüp defekti, **inme**, Down sendromu, meme ve endometrial kanser gibi hastalıklarda görülen bir genetik risk faktörü olduğu bilinmektedir. Yapılan çeşitli araştırmalarda, MTHFR 677TT genotipli bireylerin akut lösemi, kolorektal ve akciğer kanserlerine yakalanma riskinin azaldığı, endometrial kanserlerine yakalanma riskinin ise arttığı ileri sürülmektedir.

MTHFR aktivitesini homozigot mutant 677TT genotipine sahip bireylerde heterozigot 677CT ve homozigot normal 677CC genotipine sahip bireylere nazaran azalırken, homosistein seviyesinde önemli oranda artış gösterdiği görülmektedir. MTHFR eksikliğinde, homosisteinden metiyonin oluşumundaki bozukluk, organizmada hem metiyonin (ve S-adenozilmetiyonin) azalmasına hem de homosistein birikiminden kaynaklanan toksik etkilerin ortaya çıkmasına zemin hazırlar (15).

Yapılan bir çalışmada, MTHFR C677T polimorfizminin metabolik ve hastalıklar üzerindeki etkileri ile ilaç tedavisi üzerindeki etkisinin önemi yeniden gözden geçirilmiştir (18, 55).

Metabolik etkileri

Homosistein ve Folat

Bir çok çalışma tutarlı bir şekilde, homozigot C677T allelinin yüksek plazma homosistein seviyesiyle ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Homosistein konsantrasyonu ve folat seviyeleri üzerine etkisi homozigot TT durumlarında meydana gelmektedir (55). Bu durum, TT genotipli bireylerle CC genotipli bireyler arasında karşılaştırma yapıldığında plazma homosistein miktarları ve folat düzeyleri arasındaki ters ilişkiyi daha da güçlü kılmaktadır (18). C677T genotipinin geçişi durumunda verilecek en iyi yanıt folat seviyelerini yüksek tutma ve folat alımıdır. Günlük 0,5-2,0 mg folik asit alımı TT homozigot bireylerin total homosistein düzeylerinde belirgin bir azalmaya neden olmuştur ki bu seviye homozigot CC genotipli bireylerdeki seviyeler ile hemen hemen aynı seviyelerde seyredabilmektedir. Genotipe bağlı olarak eritrositlerin folat konsantrasyonları da değişmektedir (55).

4.2.3. C677T Gen Polimorfizmi ve İnme

Gen mutasyonların tespiti ve gen seviyesi ölçümleri serebrovasküler hastalıkların ilerlemesi tedaviye cevap ve dirençte bilgi sağlamak ve hastalığın seyri hakkında daha iyi bilgi sahibi olmamızı sağlamaktadır.

İnmelerin büyük bir bölümü beyni besleyen damarların tıkanıklığına bağlıdır. MTHFR enzim eksikliği, plazma homosistein düzeyindeki artış da vasküler hastalıklarla ilişkilidir. MTHFR geninde görülen bazı mutasyonlar, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olan hiperhomosisteinemi ve homosisteinüri oluşmasına neden olmuştur (16, 52).

C677T mutasyonunda, MTHFR aktivitesi, homozigot mutant TT genotipinde, heterozigot CT ve homozigot normal CC genotiplerine göre azalırken, homosistein seviyesi önemli oranda yükselir(3,36). MTHFR eksikliğinde, homosisteinden metiyonin oluşumundaki bir bozukluk, organizmayı hem metiyonin ve (S-adenozilmetiyonin) azalmasına hem de homosistein birikiminden doğan toksik etkilere maruz bırakır. İnme'li hastaların yaklaşık %20-50'sinde, orta şiddette hiperhomosisteinemi ortaya çıkabilir.

MTHFR genindeki bu polimorfizmin anlaşılmasıyla çalışılması günümüzde ve gelecekte söz konusu metabolik mekanizma ile etkili olan ilaçların terapisi ve geliştirilmesi açısından oldukça önem kazanmıştır (16, 52).

4.3. MTHFR C677T Gen Polimorfizim Ölçüm Yöntemleri

MTHFR gen polimorfizmlerinin belirlenmesinde, diğer polimorfizmlerin belirlenmesinde olduğu gibi, çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. MTHFR gen polimorfizmlerinin analiz edilmesinde ilk defa uygulanan ve hala günümüzde yaygın olarak kullanılmakta olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu/ Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism = RFLP) yöntemidir. Günümüzde bu yöntemin yanı sıra LightCycler (LC) gibi gerçek zamanlı PCR (realtime-PCR) cihazları ve floresan boyalarla işaretli hibridizasyon problemlerinin geliştirilmesi ile Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET) yöntemi de kullanılmaya başlanmıştır.

4.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction = PCR), herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'da dizisi bilinen herhangi bir bölgenin in vitro şartlarda enzimatik olarak çoğalmasına (amplifikasyon) olanak veren DNA sentez yöntemidir. PCR, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere uygun oligonükleotid primerlerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. PCR, tekrarlanan 3 basamaktan oluşan bir yöntemdir.

Bu basamaklar:

1. Çoğaltılmak istenen DNA'nın yüksek sıcaklıkta denatüre edilerek tek zincirli hale getirilmesi (denatürasyon) (90 - 95°C)
2. Özgül hibridizasyonun gerçekleşmesini sağlayacak sıcaklıkta (T_m değerinin 3 – 5°C altındaki sıcaklık), primerlerin hedef bölgeye bağlanması (annealing) (37 - 65 °C)
3. Taq DNA polimeraz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği 72°C'de zincirin primerlerden itibaren uzama (elongation) (70 -75°C) basamaklarından oluşur.

PCR'da gerekli olan bileşenler;

1. Amplifiye edilecek hedef DNA dizisini içeren kalıp DNA,
2. Çoğaltılacak DNA molekülündeki hedef dizilere hibridize olabilen, 15–20 nükleotidden oluşan sentetik oligonükleotid primer çifti,
3. Zincirin uzama reaksiyonunu gerçekleştiren DNA polimerazın ısıya dayanıklı bir şekli olan *Taq* DNA polimeraz enzimine ihtiyaç duyulmaktadır.

Polimeraz zincir reaksiyonu, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere uygun iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanmaktadır. Oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere hibridize olurlar. Bu nedenle hedef bölgeye özgül uygun primer çiftinin seçimi çok önemlidir. Primerlerin özgül olarak hedef diziye bağlanmaları düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşmektedir. Denatürasyonu ardışık primerin bağlanması aşamasındaki T_m /bağlanma sıcaklığının oranının saptanması, PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi açısından büyük bir öneme sahiptir.

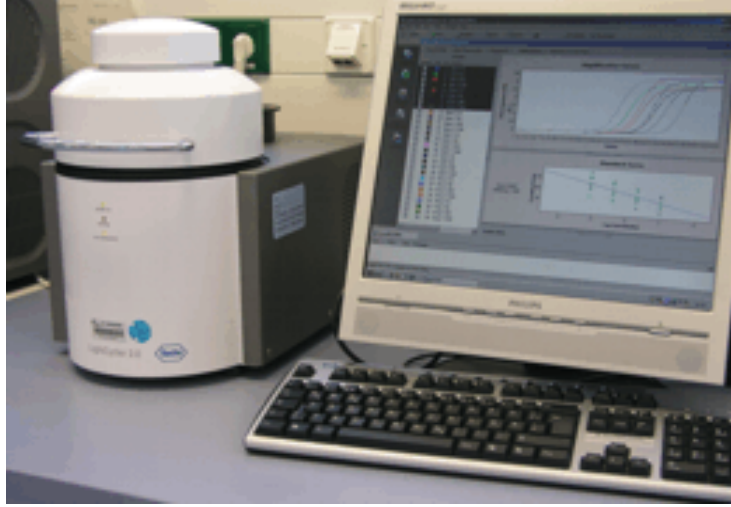
$$T_m = [4^\circ\text{C}(\text{G}+\text{C}) + 2^\circ\text{C}(\text{A}+\text{T})]$$

Zincirin uzama reaksiyonu, *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen, optimal 72°C sıcaklıkta aktivite gösteren ve 94°C'de hala aktivitesini kaybetmeyen *Taq* DNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. DNA polimeraz enzimi, MgCl_2 ve dört çeşit deoksiribonükleotid trifosfat (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) varlığında primerin 3'hidroksil ucundan uzamasını sağlamaktadır. Mg^{+2} iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluşturmakta, polimeraz aktivitesini stimüle etmekte ve çift iplikli DNA'nın T_m derecesini arttırmaktadır. Bu nedenle MgCl_2 , PCR'ın özgüllüğü ve ürün verimi üzerinde önemli bir etki göstermektedir.

Düşük Mg^{+2} konsantrasyonu, azalan ürün oluşumuna, yüksek Mg^{+2} konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün artışına neden olmaktadır. Zincirin uzama aşamasının tamamlanmasından sonra tek iplikli DNA, çift iplikli DNA haline gelmektedir. 1. döngü sonunda 2 yeni DNA zinciri oluşmakta ve her döngü sonunda DNA miktarı 2 katına çıkmaktadır. Böylece, 30-45 döngü sonunda hedef DNA'nın milyonlarca kopyası oluşturulmuş olacaktır (54).

4.3.1.1. Gerçek- Zamanlı PCR (Real-Time-PCR)

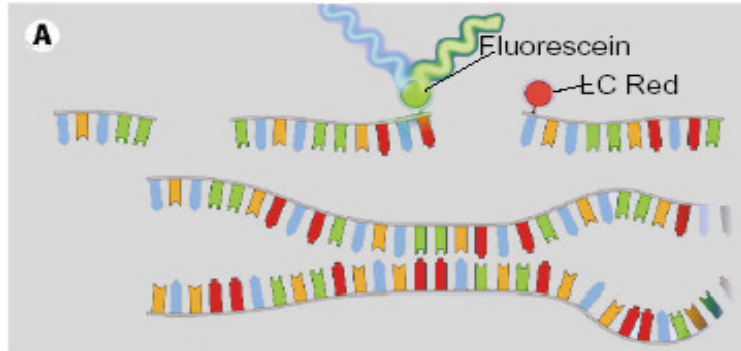
LightCycler cihazı (resim 4.1), kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PCR reaksiyonu, moleküler genetikte bir reaksiyonda polimorfik DNA bölgelerinin kantifikasyonunun ve tek nükleotid polimorfizm genotiplendirilmelerinin yapılabildiği yeni bir tekniktir(47). Bu teknik kullanılarak nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalinin ölçülmesiyle kısa sürede kantitatif değerler elde edilebilmektedir. Hızlı ısıtma ve soğutma özelliğine sahip olan LightCycler cihazı, 20-30 dakika içinde 30-40 PCR döngü gerçekleştirdiğinden çalışmalarda oldukça avantaj sağlamaktadır (37, 47). Gerçek zamanlı-PCR cihazı yüksek hızı yanında, kontaminasyon riskini de minimuma indirmektedir. Ayrıca, amplifikasyon işlemi eş zamanlı olarak bilgisayarda görüntülenebildiği için PCR döngüsü başarısız olduğunda, reaksiyon çok geçmeden sonlandırılabilen veya döngü artışı yapılabilmektedir (47). Elektroforeze gerek kalmadan amplifikasyon ürünlerinin gözlenmesi en büyük kolaylığı sağlamaktadır.



Resim 4.1. LightCycler Cihazı

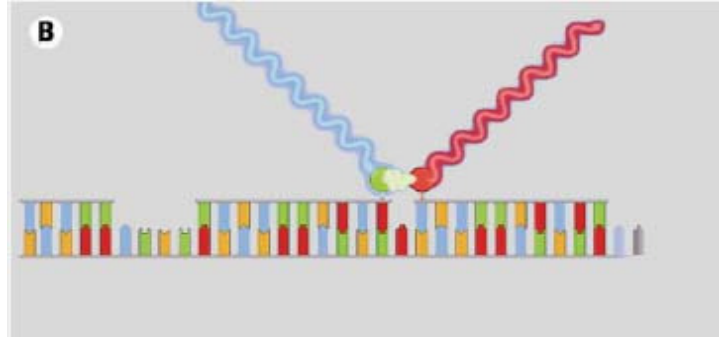
LightCycler cihazı ile genotipleme çalışmalarında özgün primerlerin yanında testin özgüllüğünü arttırmak amacıyla hedefe özgü hibridizasyon problemleri kullanılmaktadır. Bu hibridizasyon problemleri, Floresans boyalarla işaretlenen diziyeye özgü oligonükleotid problemleridir. DNA zincirine baş ve kuyruk pozisyonunda hibridize olacak şekilde dizayn edilen bu problemler, DNA zincirindeki polimorfik bölgeyi örten *sensor hibridizasyon probu* ile bu proba yakın bir bölgeye bağlanan *anchor problemlerden* oluşmaktadır (Şekil 4.7.A) (47).

Hibridizasyon problemleri amplifikasyon süresi boyunca DNA segmentine bağlıdır. Problemler hedef DNA dizisi üzerinde birbirine 1-5 nükleotit uzaklıktaki mesafede bağlanmakta ve floresan boya ile işaretlenmiş olan uçlar yan yana gelmektedir. LC cihazının ışık kaynağından (LED= Light Emitting Diode) yayılan 470 nm'deki mavi ışık, fluorescein ile işaretlenmiş olan sensör problemlerini uyararak daha uzun dalga boyundaki (530 nm) yeşil floresans ışığının yayılmasına neden olmaktadır.

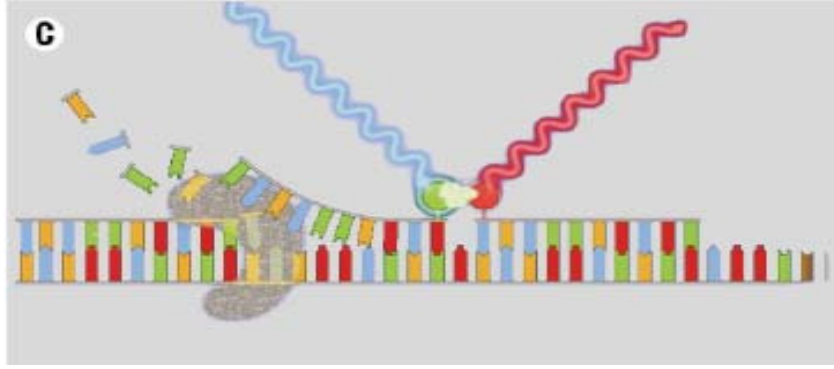


Şekil 4.7.A Bu hibridizasyon problemlerinden sensör prob 3' ucundan Fluorescein (donör boya) ile anchor prob ise 5' ucundan LC Red 640 (alıcı boya) ile işaretlenmiştir. Denatürasyon basamağında hibridizasyon problemleri solüsyon içerisinde ayrı ayrı durmaktadırlar.

İki floresan boya ile işaretlenmiş olan problemlerin yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji, ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmakta ve yeşil ışığın enerjisi LC Red 640 boyası içinde farklı bir dalga boyundaki (640 nm) kırmızı floresan ışığının yayılmasına neden olmaktadır. İki prob arasında meydana gelen bu enerji transferi, "Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)", olarak adlandırılmaktadır. Bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine diğer bir ifadeyle PCR siklusuna süresince oluşan ampliconların miktarına bağlı olarak artmaktadır (57). LC cihazının optikle ilgili birimi olan F2 kanalı, 640 nm'deki kırmızı ışığın yoğunluğunu ölçmektedir. Ölçüm, ışımanın maksimum olduğu annealing fazı sonunda yapılabilmektedir (Şekil 4.7.B).

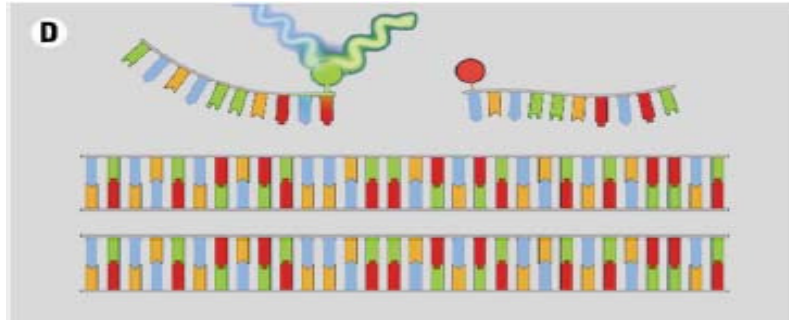


Şekil 4.7.B Annealing basamağında, probler hedef DNA dizisine yan yana bağlanır. Birinci boyanın emisyon enerjisi ikinci boyayı eksite eder. Eksite olan ikinci boya da emisyon enerjisi yayar.



Şekil 4.7.C Annealing basamağından sonra gerçekleşen elongation (uzama) basamağının başlamasıyla sıcaklık artışı gerçekleşmekte ve sıcaklık artışıyla hibridizasyon probuları hedef DNA dizisinden ayrılmaya başlamaktadır.

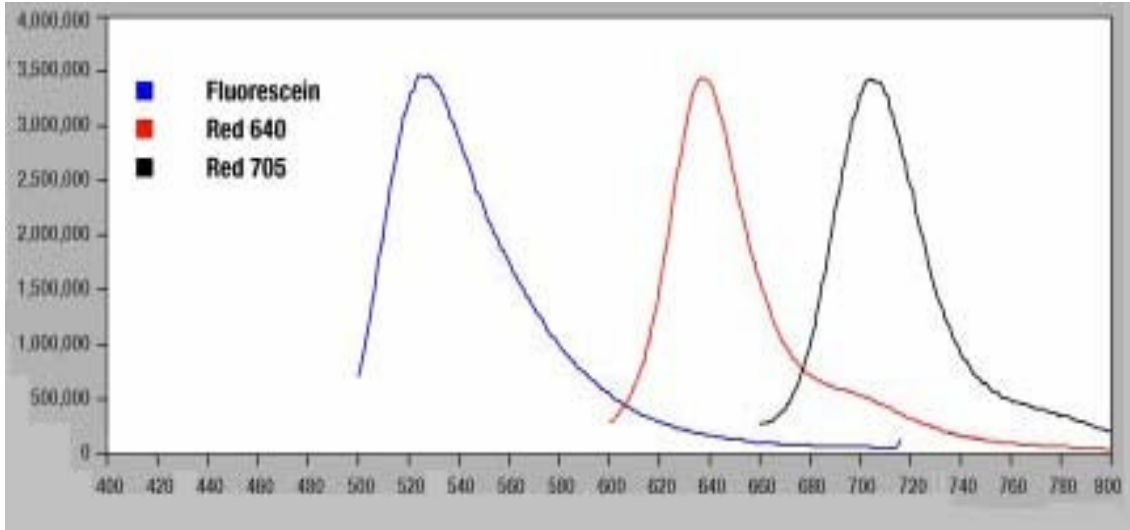
Annealing fazından sonra, sıcaklık artar ve hibridizasyon probuları başlayan uzama (elongation) aşaması sırasında amplikondan ayrılırlar. Elongation aşamasından sonra oluşan amplikonlar çift iplikli olduklarından hibridizasyon probuları ile hibridize olamazlar. Bu durumda, iki prob birbirlerinden uzakta ve serbest halde oldukları için FRET gerçekleşemez (Şekil 4.7.D).



Şekil 4.7 D Uzama basamağının ardından çift iplikli amplikonların oluşmasıyla hibridizasyon problemleri serbest hale gelmekte ve birbirlerinden uzakta bulunmaktadır.

4.3.1.2. LightCycler Sistemi için Kullanılan Floresan Boyalar ve Ölçüm Yapılan Kanallar

LC cihazının optik ünitesi, 3 farklı kanal ile aynı zamanda floresans ölçümü yapabilmektedir. 530 nm’de Kanal 1 (F1) SYBR Green I ve fluorescein boyaalarını kullanarak, 640 nm’de LC Red 640 boyasını kullanarak Kanal 2’de (F2), 705 nm’de LC Red 705 boyası kullanarak Kanal 3’de (F3) sinyalleri ölçer (Şekil 4.8.) (41).



Şekil 4.8. LC cihazının optik kanallarının ölçüm yaptığı dalga boyları, kanallar arasındaki etkileşimler ve kullanılan floresan boyalar.

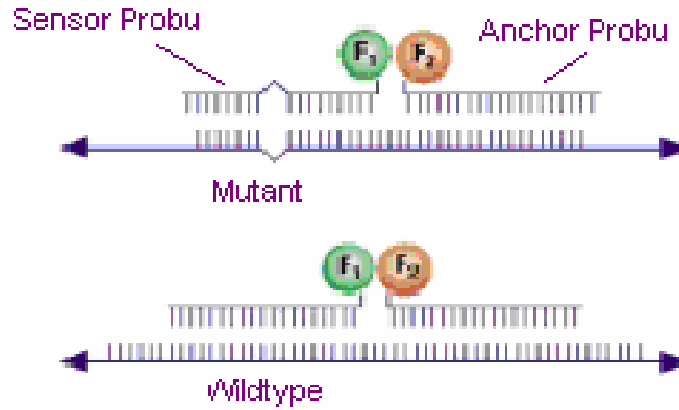
4.3.1.3.1. Erime Eğrisi (melting curve) Analizi

Amplifikasyon metodunun online olarak görüntülenmesine ek olarak amplifikasyondan sonra erime eğrisi analizi aşamasında diziye özgü hibridizasyon

problarının tek iplikli DNA'ya hibridizasyonu ile mutasyonların, SNP'lerin belirlenmesini ve online olarak görüntülenmesi gerçekleştirilmektedir.

Her çift sarmal DNA (dsDNA), kendine özgü %50'sinin tek zincirli hale geçmesi için gerekli olan erime sıcaklığı (melting temperature= T_m) değerine sahiptir. Bu erime sıcaklıkları öncelikle çift sarmal DNA'nın uzunluğuna (Zincirin uzunluğu arttıkça T_m sıcaklığı artar), GC içeriğinin derecesine (GC' den zengin fragmentlerde T_m sıcaklığı yüksektir), zincirler arasındaki bütünlüğün derecesine (Zincirlerden bir tanesinin farklı bir baz içermesi T_m sıcaklığını düşürür) bağlı olarak belirlenmektedir (30).

Bu aşamada sıcaklık yavaş yavaş 40°C 'den 75°C 'ye yükselir. Hibridizasyon problemlerinin DNA zincirine hibridizasyonunu sağlayan kritik sıcaklık (T_m), mutasyon veya SNP'nin var olup olmadığının belirleyicisidir (47). Herhangi bir baz değişikliğinin oluşmadığı bir durumda, hibridizasyon probu DNA kalıbı ile tam olarak eşleşir. Baz değişikliğinin söz konusu olduğu durumlarda ise hibridizasyon probu DNA kalıbı ile tam olarak eşleşemez (Şekil 9). İki eşleşme karşılaştırıldığında baz değişikliğini içermeyen DNA kalıbı, baz değişikliğini içeren DNA kalıbına göre daha yüksek erime sıcaklığı derecesine sahip olmaktadır. İki T_m derecesi arasındaki fark ile DNA zincirinde mutasyon olup olmadığı belirlenebilmektedir.



Şekil 4.9. Hibridizasyon problemlerinin wild type ve mutant DNA ipliğine bağlanması

Bu erime eğrisi analizi sonucunda, floresan şiddetinin düşüşüne neden olan sıcaklık derecesine göre değerlendirilerek hastanın o gen için genotiplendirilmesi yapılmaktadır. Buna göre homozigot wild type genotipler yüksek sıcaklıkta tek pik,

homozigot mutant genotipler düşük sıcaklıkta tek pik, ve heterozigot genotipler ise düşük ve yüksek sıcaklıkta 2 pik oluşturmalarına göre 3 farklı genotip belirlenebilmektedir.

LightCycler'in Avantajları :

1 . Real Time PCR'daki esnekliği

Kantitatif PCR mutasyon tespit etme olanağı ile tek bir cihazla kombine edilebilir. Yeni hedefler için PCR rahatlıkla optimize edilebilir. Çift sarmal DNA'ya özgü SYBR Green boyası ve diziyeye özgü hibridizasyon problemleri arasında seçim yapma imkanı bulunur.

2. Hızlı PCR Performansı

LC sisteminin yeni dizaynı, çok kısa bir diliminde sonuç alınmasını sağlar. Termal blok yerine havanın kullanılması yüksek hızda termal döngü özelliğini getirir. Kabillerin kullanımı ise yüksek hızdaki verimli ısı transferini sağlar. PCR Real-Time floresans ile denetlerdir.

3. Gün içerisinde daha fazla sonuç alma imkanı

Tek bir PCR çalışmasından sonra kinetik analiz yeni değerlendirme algoritmalarıyla büyük miktarda bilgi edinilebilir. Amplifikasyonu ve değerlendirmeyi dakikalar içerisinde yapan LC cihazıyla verim artar. Kolayca kullanılabilen tespit teknikleriyle hemen sonuç alınabilir.

4. LCD'nin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği

Düzenli siklus şartları ve sinyallerin toplanması LC'nin tekrarlanabilirlik özelliğini doğrular. PCR eş zamanlı denetlenebilir. Her bir PCR siklusunun sonuçları gerçekleştiği anda izlenebilir.

5. Sonuçların bir zaman diliminde elde edilmesi

Yüksek hızdaki termal siklus özelliği sayesinde bir siklus zamanı 30 saniyeye iner. 20-40 amplifikasyon siklusu 20-30 dakikada tamamlanır. Konvansiyonel PCR'daki jel elektroforezi ve jel boyaması gibi zaman alıcı uygulamalara gerek kalmaz.

6. Bilinen PCR metodlarının sınırlarını aşma imkanı

Özgüleştirilmiş reaktifleri ve yeni dizaynı ile PCR'ı güçlendirir. Araştırılan hedef dizisi, çoğaltılmış ürünün erime özelliğine bakılarak incelenebilir. Özgül ve özgül olmayan ürünler birbirinden ayırtedilebilir. Hedef dizinin farklı genotipleri sekanslamaya gerek kalmadan saptanabilir.

7. Her türlü laboratuarda çalıştırılmak üzere tasarlanmış dizaynı

Kompakt ve kolayca kontrol edilebilen LC cihazı ile yerden tasarruf edilebilir. Çok az ses ve ısı düzeyleri oluşturulduğundan herhangi bir spesifik donanıma ihtiyaç yoktur. Amplifikasyon ve değerlendirme için kapalı kapillerin kullanılması kontaminasyon riskini düşürür.

8. Bir çok hedefi aynı anda inceleme imkanı

Bir çok hedefi fazla dizi tespit edilebilir. İnternal kontrol kullanımına izin verir. Komplike mutasyon çeşitleri incelenebilir. Ayrıca internal amplifikasyon standartlı deneylerin geliştirilebilmesi için temel sağlar (41).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Kontrol ve Çalışma Grubu

Bu çalışma için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulundan onay alınmıştır (B.30.2.MAR.0.01.00 02/AEK-928 sayı ve MAR-YÇ-2006-0197 protokol nolu). Retrospektif yapılan çalışmada Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Nöroloji Anabilim Dalına 2007 senesinde gelen 24'ü kadın, 16'sı erkek olmak üzere toplam 40 inme hastasıyla, kendilerinden yazılı onay alınmış (bkz. hasta onay formu) şekilde çalışma yürütüldü. Sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu 18'u kadın, 20'i erkek olmak üzere toplam 38 olgu ile çalışılmıştır.

Kontrol ve hasta grubuna ait bireylerden, EDTA'lı tüplere alınmış olan periferik kan örneklerinden DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

5.2. MTHFR Gen Polimorfizmlerinin Analizi

Çalışma amacımıza uygun olarak seçilmiş olan hasta ve kontrol grubundan elde edilen kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra LC cihazı kullanılarak real-time online PCR yöntemi ile MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmlerinin analizleri gerçekleştirilmiştir.

5.2.1.DNA İzolasyonu ve Gen Polimorfizmlerinin Analizi Sırasında Kullanılan Cihazlar (Tablo 5.1)

Tablo 5.1. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı	Arçelik
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik
LightCycler real-time PCR cihazı	Roche
Otomatik mikropipetler	Eppendorf (10, 20, 100, 200, 1000 µl'lik)
Mikrosantrifüj	Hettich Zentrifugen Micro 22
Termomikser	Eppendorf
Biyokimya Cihazı	Olympus

5.2.2. DNA İzolasyonu ve Gen Polimorfizmlerinin Analizi Sırasında Kullanılan Kimyasal Maddeler (Tablo 5.2)

Tablo 5.2. Kimyasal Malzemeler

DNA İzolasyon Kiti (High pure PCR template preparation kit)	Roche
Ethanol	J. T. Baker
İsopropanol	AppliChem
MTHFR C677T Mutasyon Belirleme Kiti (LightCycler MTHFR mutation detection kit)	Roche

5.2.3. DNA İzolasyonu ve Gen Polimorfizmlerinin Analizi Sırasında Kullanılan Hazır Kitler

5.2.3.1 High Pure PCR DNA İzolasyon Kiti İçeriği:

1. Binding Buffer: 6 M guanidine-HCl, 10 Mm urea, 10 Mm Tris –HCl, 20% Triton X-100 (v/v), pH 4.4 (25°C)
2. Proteinaz K (4,5 mL steril distile su ile çözülüp alikotlanarak -20°C’de çalışılmak üzere saklandı.)
3. Inhibitor Removal Buffer: 5 M guanidine–HCL, 20 mM Tris– HCL, pH 6.6, 25°C (20 ml ethanol ilave edildikten sonra kullanılmıştır)
4. Wash Buffer: 20 mM NaCl, 2 mM Tris–HCl, pH 7.5, 25°C (80 ml ethanol ilave edildikten sonra kullanılmıştır)
5. Elution Buffer: 10 mM Tris, pH 8.5, 25°C
6. High Pure filtreli tüpler
7. Toplama (Collection)tüpleri

5.2.3.2. LightCycler MTHFR C677T Mutasyon belirleme karışımı

MTHFR geninin C677T polimorfizmine özgül primerleri ve hibridizasyon prob karışımını içermektedir.

Primerler:

Forward:5´- CGAAGCAGGGAGCTTTGAGGCTG -3´ (23 mer)

Reverse: 5´- AGGACGGTGCGGTGAGAGTG -3´ (20 mer)

Problar:

Fluorescein:5´-TGACCTGAAGCACTTGAAGGAGAAGGTGTC -F3´ (30 mer)

LCRed640: 5´ LCRed640 - CGGGAGCCGATTTTCATCAT -P3´ (19 mer)

Reagent mix (primerler ve problar)

2. FastStart mix
- 3.MgCl₂
- 4.H₂O
- 5.Pozitif Kontrol
- 6.Negatif Kontrol

5.3. MTHFR C677T Polimorfizminin Analizi İçin Çalışma Protokolü

5.3.1. DNA İzolasyon Aşamaları

1. EDTA'lı tüp içerisine alınan kan örneğinden 200 µl steril bir eppendorf tüp içerisine alınır.
2. Üzerine 200 µl Binding Buffer ve 40 µl Proteinaz K pipetlenir.
3. Karışım, pipet ile iyice karıştırıldıktan sonra daha önce 72°C' ye getirilmiş olan 'thermomixer' cihazında 10 dakika inkübasyona bırakılır.
4. İnkübasyonun sonunda karışıma 100 µl isopropanol eklenir ve pipet ile iyice karıştırılır.
5. Karışım bir toplama (collection) tüpün içine yerleştirilmiş filtreli tüp içine pipetlenir.
6. 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
7. Altta biriken sıvı toplama tüpü ile birlikte atılır. Filtre temiz bir toplama tüp içine yerleştirilir.
8. Filtreli tüpün üzerine 500 µl inhibitör removal buffer pipetlenir. 8.000 rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
9. Altta biriken sıvı toplama tüp ile birlikte atılır. Filtre temiz bir toplama tüp içine yerleştirilir. Filtreli tüpün üzerine 500 µl wash buffer pipetlenir.
10. 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
11. Altta biriken sıvı toplama tüpü ile birlikte atılır. Filtre temiz bir toplama tüp içine yerleştirilir.
12. Filtreli tüpün üzerine tekrar 500 µl wash buffer pipetlenir.
13. 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
14. Toplama tüpte biriken sıvı dökülür ve filtreli tüp aynı collection tüp içine yerleştirilir.
15. 8.000 rpm' de 10 saniye santrifüj edilir.
16. Altta biriken sıvı toplama tüp ile birlikte atılır. Filtre temiz bir eppendorf tüp içerisine yerleştirilir.
17. Önceden Thermomixer' de 70°C' de 10dk ısıtılmış elution buffer' dan 200 µl filtreli tüp içine pipetlenir.
18. 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir
19. Filtreli tüp atılır. İzole DNA içeren eppendorf tüp üzerine hasta adı-soyadı ve numarası yazılır.

MTHFR C677T mutasyon belirleme kitlerinin içinde bulunan termal profil; denatürasyon, amplifikasyon, erime eğrisi analizi ve soğutma programlarından oluşmaktadır ve LightCycler cihazının software'ine çalışma protokolü olarak kaydedilmiştir.

5.3.2. MTHFR C677T Profili

Protokol şu programları içerir:

- Program 1 : Örneklerin denatürasyonu ve enzimlerin aktivasyonu
- Program 2 : Hedef DNA'nın PCR-Amplifikasyonu
- Program 3 : Gentotiplerin belirlenmesi için Erime eğrisi (melting curve) analizi
- Program 4 : Soğutma (cooling)

5.3.2.1. Denatürasyon

PARAMETRE	DEĞER
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	Yok
	<i>1.Segment</i>
Hedef Isı (°C)	95
İnkübasyon Zamanı [dk]	10
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0
Okuma Modu	Yok

5.3.2.2. Amplifikasyon:

PARAMETRE	DEĞER		
Döngü Sayısı	40		
Analiz Modu	Quantification		
	<i>1.Segment</i>	<i>2.Segment</i>	<i>3.Segment</i>
Hedef Isı (°C)	94	55	72
İnkübasyon Zamanı [sn]	0	10	15
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0	20.0	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0	0	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0	0.0	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0	0	0
Okuma Modu	Yok	Tek	Yok

5.3.2.3. Erime Eğrisi (melting curve) Analizi:

PARAMETRE	DEĞER		
Döngü Sayısı	1		
Analiz Modu	Erime Eğrileri		
	<i>1. Segment</i>	<i>2.Segment</i>	<i>3.Segment</i>
Hedef Isı (°C)	94	40	80
İnkübasyon Zamanı [sn]	0	5	0
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	0.0	20.0	0.6
İkinci Hedef Isı (°C)	0	0	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0	0.0	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0	0	0
Okuma Modu	Yok	Yok	Basamaklı

5.3.2.4. Soğutma (cooling):

PARAMETRE	DEĞER
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	Yok
	<i>1.Segment</i>
Hedef Isı (°C)	40
İnkübasyon Zamanı [sn]	30
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0
Okuma Modu	Yok

5.3.3. MTHFR C677T Polimorfizmi için Master mix hazırlanması

H ₂ O	7.4 µl
MgCl ₂	1.6 µl
Reagent mix	4.0 µl
FastStart Mix	<u>+2.0 µl</u>
Master mix hacmi	15.0 µl
Genomik DNA	<u>+ 5.0 µl</u>
Toplam hacim	20 µl

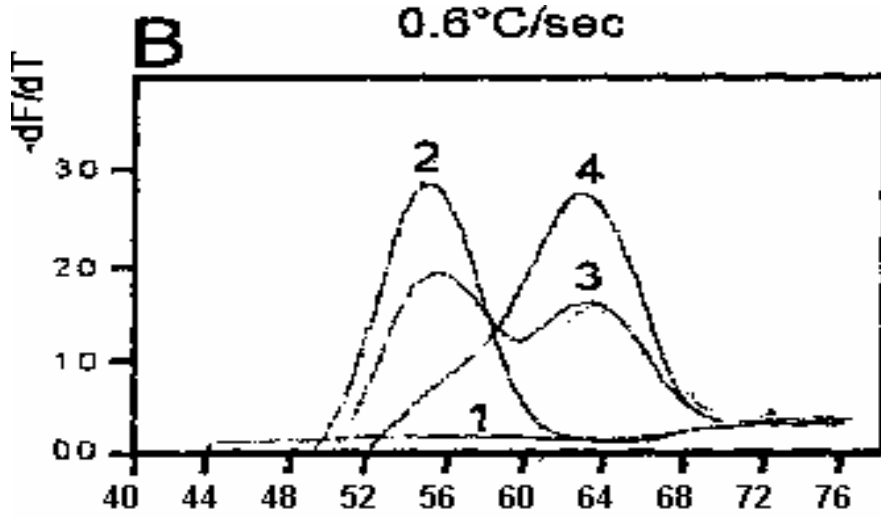
Her bir hasta örneği MTHFR C677T polimorfizmini belirlemek için yukarıdaki karışımlara göre ayrı ayrı hazırlandıktan sonra, LightCycler cihazına ait özel camdan yapılmış 20 µl'lik kapiller tüp içerisine kondu. Kapiller tüpler 4.000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi. Reaksiyon karışımının her bir kapiller tüpün dibine çöktüğü kontrol edildi. Tüpler reaksiyon tepsinde dizildikten sonra tepsi ile birlikte LightCycler cihazına yerleştirildi. Real-time online PCR'a başlandı ve yaklaşık bir saat sonra sonuçlar elde edildi. MTHFR C677T polimorfizminin belirlenmesi için yapılan çalışmada kanal 2'den floresan ölçümü yapıldı.

5.3.4. Sonuçların Değerlendirilmesi

Çalışma sonunda oluşan erime eğrisi pik derecelerine göre hasta ve kontrol grubuna ait bireylerin genotiplendirilmeleri homozigot, wild type, homozigot mutant ve heterozigot olarak belirlendi.

5.3.4.1. MTHFR C677T Analiz Sonucu

MTHFR 677CC Homozigot Wild type (62,5°C) ve Homozigot Mutant genotiplerde (55°C) tek sıcaklık derecesinde erime piki oluşurken, Heterozigot genotipde (55°C ve 62,5°C) ise iki farklı sıcaklık derecesinde erime piki oluşmaktadır (Şekil 5.1)



Şekil 5.1. Kanal 2'de C677T polimorfizmi için MTHFR geninin 677. pozisyonunda görülebilecek üç muhtemel genotipinin erime eğrisi analiz sonuçları;

- | | |
|----------------------|--------------------|
| 1.H ₂ O | 2.homozigot mutant |
| 3.heterozigot mutant | 4.wild tip |

5.3.4.2. İstatiksel Analiz Yöntemleri

İnme hastalarında MTHFR C677T polimorfizmlerinin PCR cihazı ile analizleri yapıldıktan sonra elde edilen bulguların değerlendirilmesinde istatistik analiz için SSPS-windows 11 programında Ki-kare Testi ve t-test analiz testleri kullanılmıştır.

Ki-Kare Testi; Bağımsız grup oranlarının karşılaştırılmasında, uygunluk, varyans, homojenlik ve bağımlı grup testlerinde sıklıkla ve iki veya daha fazla veri seti arasında önemli farkın olup olmadığını belirlemede kullanılan bir istatistiksel analiz yöntemidir. Bu yöntemde gözlenen değerler ile beklenen değerler kıyaslanır. Anlamlılık değeri $p<0.05$ ' dir.

t-testi ; İki'den çok bağımsız grup verilerinin değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi kullanılmaktadır. Buradaki tek yön ifadesi, grupları birbirinden ayıran tek özellik olduğu, ya da grupların tek değişkeninin değerleri ile ayrıldığı anlamına gelmektedir. Anlamlılık değeri $p<0.05$ ' dir.

6.BULGULAR

6.1. Kontrol ve Çalışma Gruplarının Genel Özelliklerinin Karşılaştırılması ve İstatistiksel Analizleri

Çalışma Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında 40 çalışma grubu olgusu ve 38 kontrol grubu olgusu olmak üzere toplam 78 kişi üzerinde yapılmıştır. İnme hastaları olguları, bulgular içerisinde “Çalışma Grubu” olarak tanımlanmışlardır. Laboratuvar aşamasında, kontrol ve hasta grubuna ait bireylerden, EDTA’lı tüplere alınmış olan periferik kan örneklerinden DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra MTHFR C677T polimorfizm analizi Real-time online PCR yöntemi kullanılarak LightCycler cihazında gerçekleştirilmiştir. Çalışma ve kontrol grubuna ait elde edilmiş olan tüm genel veriler, bulgular ve istatistiksel analiz sonuçları sırasıyla aşağıda belirtilmiştir.

6.1.1. Kontrol Grubu

Sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubunu oluşturan toplam 38 olgu yaş açısından incelendiğinde yaş ortalaması 57.23 ± 7.31 olarak saptanmıştır. 18’si kadın olan bu olguların yaş ortalaması 57.05 ± 9.35 , 20 erkek olgunun ise 57.40 ± 5.09 olarak hesaplanmıştır.

6.1.2. Çalışma Grubu

İnme tanısı çalışma grubuna ait toplam 40 olgu yaş açısından incelendiğinde yaş ortalaması 65.65 ± 14.4 olarak saptanmıştır. 24’ü kadın olan bu olguların yaş ortalaması 62.50 ± 16.18 , 16 erkek olgunun ise 70.37 ± 10.00 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 6.1. Cinsiyet ve yaş ortalamaları dağılımı

	Kontrol Grubu n=38	Çalışma Grubu n=40
Cinsiyet		
Kadın	18 (% 70)	24 (% 64)
Erkek	20 (% 30)	16 (% 36)
Yaş ortalaması	57.23 ± 7.31	65.65 ± 14.43
Kadın	57.23 ± 7.31	62.50 ± 16.18
Erkek	$57.05 \pm 9,35$	$70,37 \pm 10,00$

Çalışmaya alınma doğrultusunda ; cinsiyet ($X^2 : 1.251 p > 0.05$) ve yaş yönünden gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (Tablo 6.1- Tablo .2)

Tablo 6.2. Cinsiyet dağılımı

Çalışma grubu	Cinsiyet		Toplam
	Erkek	Kadın	
Hasta	16	24	40
Kontrol	20	18	38
Toplam	36	42	78

5.1.2. MTHFR C677T Analiz Sonuçları

MTHFR C677T polimorfizmi için wild type genotip erime eğrisi analizinde (CC) 62.5°C’ de tek pik, homozigot genotipi (TT) 55 °C’de tek pik ve heterozigot genotip (CT) 55°C ve 62.5°C’lerde iki piki oluşması ile belirlenmiş ve Şekil 8’de gösterilmiştir.

5.1.2.1. Kontrol Grubu: Bu grupta MTHFR C677T polimorfizmi için 24 (% 63.15) olgunun wild type (CC), 13 (% 34.21) olgunun heterozigot (CT), 1 (% 2.63) olgunun homozigot (TT) genotipte oldukları saptanmıştır.

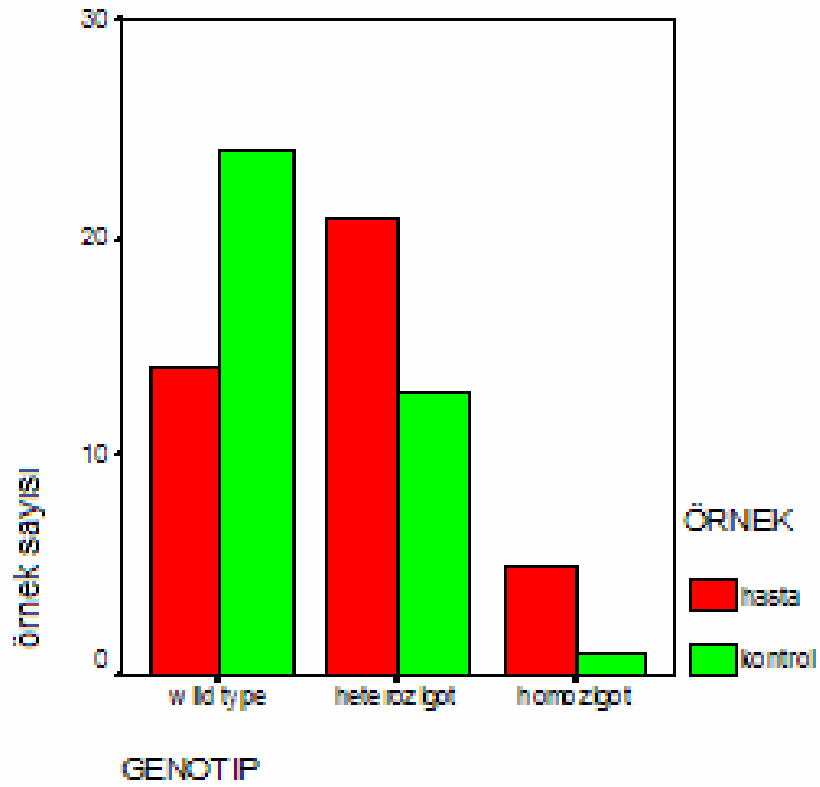
5.1.2.2. Çalışma grubu: Bu grupta ise 14 (%35) olgunun wild type (CC), 21 (% 52.5) olgunun heterozigot (CT),5 (% 12.5) olgunun homozigot (TT) genotipe sahip oldukları belirlenmiştir (Tablo 6,3, Grafik 6.1).

5.1.2.3. İstatistiksel Analiz: Kontrol ve çalışma grubundaki olgular MTHFR C677T polimorfizmi taşıyıcılığı açısından karşılaştırıldıklarında, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($X^2 = 4.462 p < 0,05$).

Tablo 6.3. Genotip dağılımları

Çalışma grubu	Genotip			Toplam
	Wild type	Heterozigot	Homozigot	
Hasta	14	21	5	40
Kontrol	24	13	1	38
Toplam	38	34	6	78

Çalışmamızda yan etkiler olarak hipertansiyon ($p > 0.05$) ve sigara kullanımı değerlendirilmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).



Şekil 6.1. Kontrol ve Hasta Grubundaki MTHFR C677T Gen Polimorfizminin Genotipe göre Dağılımı

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnme, ölüm nedenleri arasında kalp hastalığı ve kanserden sonra üçüncü sırada yer alırken, erişkin nörolojik hastalıkları içerisinde görülme sıklığı ve önemi açısından ilk sırada yer almaktadır (20, 28).

Gelişmiş ülkelerde ortalama yaş süresinin artması inme görülme sıklığını arttırmıştır. Bu sebeple inme olgularında risk faktörlerinin tespiti mortalite ve morbiditenin azaltılmasında önem kazanmıştır (5).

5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi (MTHFR), bir flavoprotein olup MTHFR familyasının üyesidir. MTHFR enzimi folat metabolizmasının düzenleyici bir enzimi olarak homosisteininin metionine, B12 bağımlı remetilasyonunda metil-grup donörü, 5-10 metilentetrahidrofolatın 5- metilentetrahidrofolata değişimini katalizleyerek homosistein metabolizmasında önemli rol oynar (25, 40).

Artan homosistein düzeyi, koagülasyonda görev yapan faktör V, X ve XII'nin aktivasyonunu hızlandırarak arterial tromboza katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. Büyük ve küçük damarlarda ateroskleroza yatkınlık meydana getirerek serebrovasküler hastalıklara neden olduğu anlaşılmıştır (12, 16).

MTHFR geninde görülen bazı mutasyonlar; C677T alleli , MTHFR geninin 677. sıradaki sitozinin (C) timine (T) dönüşmesiyle meydana gelen bir nokta mutasyonu ile karakterizedir. Bu mutasyon sonucunda enzimde, alanin aminoasiti valin aminoasidi ile yer değiştirmektedir. Bu yer değiştirme enzim aktivitesinde azalmaya yol açmakta ve plazma homosistein düzeyinde artış meydana getirerek serebrovasküler hastalıklar için önemli risk faktörü olan hiperhomosisteinemi ve homosisteinüri oluşmasına neden olmaktadır (29, 48).

Günümüzde MTHFR C677T polimorfizminin tespit edilmesi inme hastalarında giderek önem kazandığından MTHFR C677T polimorfizminin ölçüm yöntemleri geliştirilmektedir (37, 47).

Real Time PCR; nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede kantitatif sonuç veren PCR yöntemidir. Kantitatif RT PCR teknolojisi son zamanlarda duyarlılığı, doğruluğu ve pratikliği sebebiyle araştırmalarda gen seviye ölçümlerinde kullanılmaya başlanmıştır. Gen mutasyonlarının tespiti ve gen seviyesi ölçümleri serebrovasküler hastalıkların ilerlemesi, tedaviye cevap ve dirençte bilgi sağlamakta ve hastalığın seyri hakkında daha iyi bilgi

almamızı sağlamaktadır.

İnmeli hastalar ile sağlıklı bireyler arasında yapılan çalışmalarda bizim sonuçlarımıza paralel olarak, C677T genotip dağılımları bakımından önemli fark bulunurken (36), Dikmen ve arkadaşları ise 677 T allel sıklığının inme hastalarında önemli derecede yüksek olmadığını açıklamışlardır.

Çalışmamızda, inme hastalarında MTHFR C677T gen polimorfizmi bakımından 14 (%35) olgunun normal (CC), 21 (% 52.5) olgunun heterozigot (CT), 5 (% 12.5) olgunun homozigot (TT) genotip bulguları elde ettik.

Bizim çalışmamıza da uygunluk gösteren, Morita ve arkadaşları (39) yaptıkları çalışmada elde ettikleri DNA örneklerinden MTHFR C677T gen polimorfizmini PCR ile kantitatif ölçmüşler ve polimorfizmi ile arasında önemli derecede ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Biz de çalışmamızda ölçüm yöntemi olarak bu çalışmaya benzerlik bakımından Light Cycler RT PCR'ı kullandık.

Visy JM. ve arkadaşları (59) ise yaptıkları çalışmada ise hasta ve sağlıklı bireyler arasında C677T genotip dağılımı ve allel sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda ise p değerini 0.028 olarak hesapladık ve buna göre inme hastaları ile sağlıklı bireyler arasında C677T genotip dağılımı yönünden anlamlı bir ilişki olduğunu tespit ettik.

Harmon DL. ve arkadaşları (27) yaptıkları çalışmada, kontrollere göre inme hastalarının artan homosistein düzeylerine sahip olduklarını ve bunun da MTHFR C677T gen polimorfizmiyle ilişkili olduğu göstermişlerdir.

İnme hastaları ile yapılan bazı çalışmalarda hasta MTHFR C677T gen polimorfizminin TT (homozigot) genotipinde, CT (heretozigot) ve CC (normal) genotiplerine göre total homosistein düzeyinin daha yüksek olduğu rapor edilmiş olup, kontrol grubunda ise C677T genotipleri arasında homosistein değeri bakımından farklılık bulunmadığı belirtilmiştir (3, 50, 59). Biz de çalışmamızda homosistein düzeyleriyle MTHFR genotipleri karşılaştırmayı planladık ancak elimizdeki verilerin yetersizliği nedeniyle tüm olguları karşılaştıramadık. Elimizde olan verilere göre homozigot ve heterozigot genotiplerinde normal genotip sahip bireylere göre yüksek seviyeler gözlenmiştir. Böylece daha önce yapılan çalışmalarla uyum sağladığı saptanmıştır.

Çalışmamızda MTHFR C677T gen polimorfizmi inme için bir risk faktörü olduğu saptanmış ancak; olgu sayısı azlığından ve yeterli homosistein ölçümleri olmadığından,

olgu sayısının genişletilmesi ve homosistein seviyelerinin ölçümü ile bir ilişki kurularak değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, Light Cycler RT PCR yöntemi duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle inmede gen seviye ölçümlerinde kullanılabilir. Bunun yanında, inme geçirmiş olsun ya da olmasın, MTHFR gen polimorfizminin 677 TT homozigot mutant genotiplerine sahip bireyler serebrovasküler, kardiyovasküler olaylara yatkındırlar. Dolayısıyla, bu gen polimorfizmine sahip bireylerin inme oluşumuna yatkınlığından dolayı, yaşam süresince homosistein düzeylerini etkileyecek olan risk faktörlerini kontrol altında tutmaları gerektiğini söyleyebiliriz.

8. EKLER

Marmara Üniversitesi Tıp fakültesi araştırma etik kurulu **MAR-YÇ-2006-0197** **protokol nolu** onayı ile çalışmaya katılan kişiler Ek-I'deki form ile çalışma hakkında bilgilendirildi. Ek-II'deki onayları alındı. Sonuçlar Ek-III'deki tabloya kaydedildi.

Ek-I

HASTA BİLGİLENDİRME FORMU

Projenin adı : "İNME HASTALARINDA METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ C677T GEN POLİMORFİZMİNİN REAL TIME FLORESAN PCR İLE TESPİTİ VE MUTASYONLARIN SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI "

Araştırmacılar: Fidan Gökçeçiçek Gülyaz

Gen mutasyonlarının tespiti ve gen seviyesi ölçümleri serebrovasküler hastalıkların ilerlemesi tedaviye cevap ve dirençte bilgi sağlamak ve hastalığın seyri hakkında daha iyi bilgi sahibi olmamızı sağlamaktadır.

İnme hastalığının büyük bir bölümü beyni besleyen damarların tıkanıklığına bağlıdır. İnme'li hastaların yaklaşık %20-50'sinde, orta şiddette hiperhomosisteinemi ortaya çıkabilir. Hastaya olduğu kadar, çevresine ve topluma maliyeti de çok yüksek bir hastalıktır.

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi, folat siklusunda önemli bir rol oynar ve homosistein aminoasitinin metabolizmasına katkıda bulunur. MTHFR genindeki bazı mutasyonlar, MTHFR enzim aktivitesinde azalmaya neden olur.

MTHFR eksikliğinde, periferal nöropati, gelişme geriliği, hipotoni, inme, tromboz gibi klinik özellikler görülür. MTHFR eksikliğinin hafif olduğu durumlara popülasyon genelinde oldukça sık rastlanmakta olup, özellikle arteriyel hastalıkların oluşumunda bir risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir. Plazma homosistein düzeyindeki artış da vasküler hastalıklarla ilişkilidir. Düşük homosistein düzeylerinin iskemik kalp hastalığı ve inme riskinde azalma ile orta derecede ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

İsimlerinizin kaydı ve araştırmamızla ilişkili sonuçlar bizde saklı tutulmak suretiyle, sizlerden alınan kan örnekleri ile, inme hastalığının Metilentetrahidrofolat redüktaz geni C677T polimorfizmi ile ilişkisinin saptanması amaçlanmıştır.

Ek – II

HASTA ONAY FORMU

Projenin adı : İNME HASTALARINDA METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ C677T GEN POLİMORFİZMİNİN REAL TIME FLORESAN PCR İLE TESPİTİ VE MUTASYONLARIN SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Araştırmacılar : Fidan Gökçe çiçek Gülyaz

Hasta bilgilendirme formunu okudum. Çalışmaya katılmayı kabul ediyorum.

Çalışmaya Katılanın

Adı Soyadı :

Tarih:

İmza:

Tanık

Adı Soyadı :

Tarih :

İmza:

Proje Yürütücüsünün

Adı Soyadı :

Tarih:

İmza:

EK - III

TARİH

HASTA BİLGİ FORMU

ADI SOYADI	
CİNSİYET	
DOĞUM TARİHİ	
KİLO(kg)	
BOY	
KULLANDIĞI İLAÇLAR	
SİGARA KULLANIM DURUMU (paket veya adet/günde)	
ALKOL KULLANIMI	
SİSTOLİK BASINÇ	
DİASTOLİK BASINÇ(mmHg)	

LİPİD PROFİLİ	
TOTAL KOLESTEROL	
HDL-C	
LDL-C	
VLDL-C	
TRİGLİSERİD	
KAN GLUKOZ DÜZEYİ	
HEMOGLOBİN A1C	
HOMOSİSTEİN DÜZEYLERİ	

9. KAYNAKLAR

1. Adams HP Jr, Bendixsen BH, Kapelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of ORG10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*, 24:35-41, 1993.
2. Adams RD, Victor M, Ropper AH. *Principles of Neurology*. 7th ed. New York: Mc Graw Hill Comp, 821–924, 2001.
3. Akar N, Akar E, Özel D,. Common mutations at the homocysteine metabolism pathway and pediatric stroke. *Thrombosis Research*, 102:115-120, 2001.
4. Arauz A, Murillo L, Cantu C, Barinagarrem enteria F, Higuera J. Prospective study of single and multiple lacunar infarcts using magnetic resonance imaging: Risk factors, recurrences and outcome in 175 consecutive cases. *Stroke*, 34:2453-8, 2003.
5. Bakar M, Oğul E. Tıkayıcı Tip Beyin Damar Hastalıkları (Nörovasküler sendromlar). Balkan S (Editör). *Serebrovasküler Hastalıklar'da*. Ankara Güneş Kitabevi, 83- 101, 2005.
6. Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J, Warlow C. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. *Lancet*, 337: 1521-6, 1991.
7. Berger AR, Lipton RB, Lesser ML, Lantos G, Portenoy RK. Early seizures following intracerebral hemorrhage: implications for therapy. *Neurology*, 38:1363-5, 1988.
8. Biller J, Love BB. Ischemic cerebrovascular disease. In: Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Marsden CD (Eds.). *Neurology in Clinical Practice*. 3 rd ed. Woburn: Reed Elsevier Group, p.1125-66, 2000.
9. Bradley WG Jr. MR appearance of hemorrhage in the brain. *Radiology*, 189:15-26,1993.
10. Brott T, Thalinger K, Hertzberg V. Hypertension as a risk factor for spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 17:1078-83. 1986.
11. Çoban O. Serebrovasküler hastalıklar. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji A.D. Nöroloji S.S.S Hastalıklar e-ders kitabı, 193-197,2004.

12. Daly SF, Molloy AM, Mills JL, et al. The influence of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase genotypes on enzyme activity in placental tissue. *Brit J Obstet Gynaec*, 106: 1214-1218, 1999.
13. Dermirkıran M. Kemal. Homosistein ve serebral vasküler hastalıklar. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 1:08-13. 2003.
14. Devenport RJ, Dennis MS, Wellwood CP. Complications after acute stroke. *Stroke*, 27:415-24, 1996.
15. Dikmen M. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Enziminin Moleküler Biyolojisi ve Hastalıklarla İlişkisi, *Kocatepe Tıp Dergisi The Medical Journal of Kocatepe* 5, 2004.
16. Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassman G. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol*, 13(1): 20-33, 2000.
17. Futrell N, Millikan CH. Stroke is an emergency. *Dis Mon*, 42:199-264, 1996.
18. Gasparoviç J, Raslova K, Basistova Z, Zacharova M, Wsolova L, Avdicov M, Blazícek P, Lietava J, Sıvakova D. , Effect of C677T Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism on plasma homocysteine levels in ethnic groups. *physiol. Res*, 53: 215-218, 2004.
19. Genç M.F., Karda S., Özer F., Döventa Y., Kolda M. İnmeli populusyonda akut dönemde plasma homosistein, folat, vitamin B12, protein C ve protein S düzeyleri. *Türk Nöroloji Dergisi*, 9;1:23-33, 2003.
20. Gilroy J (Çeviri: R. Karabudak). *Temel Nöroloji*. Ankara Güneş Kitabevi, 225-53, 2002.
21. Gilroy J (Çeviri: R. Karabudak). *Temel Nöroloji*. Ankara Güneş Kitabevi, 279-95, 2002.
22. Giroud M, Gras P, Milan C. Natural history of lacunar syndromes. Contribution of the Dijon registry of cerebrovascular complications. *Rev Neurol*, 147:566-72, 1991.
23. L.B. Goldstein, R. Adams. K. Becker, C.D. Furberg, P.B. Golrelick, G. Hademenos, M.Hill, G. Howard, B. Jacobs, S.R. Levine, L. Mosca, R.L. Sacco, D.G. Sherman, P.A. Wolf, G.J. del Zoppo, Primary prevention of ischemic stroke: a statement for haelthcare professionals from the Stroke Council of the American Heart Association, *Circulation*, 103: 163-182., 2001.

24. Gos M., Szpecht-Potocka A. Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine, 2002.
25. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) Mamm Genome, 9:652-6, 1998.
26. Hanson N. Q, Aras Ö, Yang F and Tsai M. Y., C677T and A1298C Polymorphisms of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: Incidence and Effect of Combined Genotypes on Plasma Fasting and Post-Methionine Load Homocysteine in Vascular Disease *Clinical Chemistry*, 47:661-666, 2001.
27. Harmon DL, Doyle RM, Meleady R, et al. Genetic analysis of the thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for ischemic stroke. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 19:208-211, 1999.
28. Hendricks HT, Zwartz MS, Pkat EF, Van Li mbeek S. Systematic review for the early prediction of motor and functional outcome after stroke by using motor evoked potentials. *Arch Phys Med Rehabil*, 83:1303-8, 2002.
29. Homberger G, Linnebank M, Winter C,. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet*, 8: 725-729, 2000.
30. Durmaz R, Gunal S, Yang Z, Ozerol IH, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Press in CMI*; 9: 000-000,2003.
31. Kase CS. Intracerebral hemorrhage. In: Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Marsden CD (Eds.). *Neurology In Clinical Practice*. 3 rd ed. Woburn: Reed Elsevier Group, p.1167-83, 2000.
32. Katirji MB, Wilbourn AJ. Common peroneal mononeuropathy: a clinical and electrophysiologic study of 116 lesions. *Neurology*, 38:1723-8, 1988.
33. Kelly PJ, Barron M, Furie KL. Hyperhomocysteinemia, MTHFR C677T polymorphism and stroke. *Stroke*, 33:1452-1453, 2001.
34. Kumral E. İnme epidemiyolojisi. Balkan S (Editör). *Serebrovasküler Hastalıklar'da*. 2.baskı. Ankara :Güneş Kitabevi,.39-56, 2005.
35. Leblanc R, Carpenter S, Stewart J, Pokrupa R. Subacute enlarging cerebral hematoma from amyloid angiopathy: case report. *Neurosurgery*, 36:403-6,1995.
36. Lindgren A, Brattström I, Norrving B, et al. Plasma Homocysteine in Acute and

- Convalescent Phases After Stroke. *Stroke*, 26:795-802, 1995.
37. Lohmann S, Lehmann L, Tabiti K. Fast and Flexible Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Detection with the LightCycler System, *Biochemica*, 4: 23-28, 2000.
 38. Mazzoni P, Rowland LP (Çeviri: M. Özmenoğlu). *Merritt's Nöroloji El Kitabı*. Ankara: Güneş Kitabevi, 121-55, 2003.
 39. Morita H, Kurihara H, Tsubaki S, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and ischemic stroke in Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18:1465-1469, 1998.
 40. Narayanan S, McConnell J, Little J, Sharp L, Piyathilake C. J , Powers H, Basten and Duthie S. J. Associations between Two Common Variants C677T and A1298C in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Measures of Folate Metabolism and DNA Stability (Strand Breaks, Misincorporated Uracil, and DNA Methylation Status) in Human Lymphocytes In vivo *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention Vol.*, 13:1436-1443, 2004.
 41. Ortiz Z, Shea B, Suarez-Almazor ME, Moher D, Wells GA, Tugwell P. The efficacy of folic acid and folinic acid in reducing methotrexate gastrointestinal toxicity in rheumatoid arthritis. A metaanalysis of randomized controlled trials. *J Rheumatol*. Jan; 25(1):36-43, 1998.
 42. Özdemir G, Özbabal D. İntraserebral Hemoraji. Balkan S (Editör). *Serebrovasküler Hastalıklar'da*. Ankara: Güneş Kitabevi, 167-79, 2005.
 43. Öztürk Ş İnmede biyolojik ve elektrofizyolojik tan özellikleri. Balkan S (Editör). *Serebrovasküler Hastalıklar'da*. Ankara: Güneş Kitabevi, 263-88, 2005.
 44. Papamitsakis NIH, Saver JL, Talavera F, Kirshner H, Benbadis SL, Lutsep HL. *Lacunar syndromes (serialonline)*. 2003.
 45. Peng F, Labelle L. A, Ramey B.J. And Tsong G. J. Single nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are common in US Caucasian and Hispanic American opulations. *International Journal Of Molecular Medicine*, 8: 509-511, 2001.
 46. Radha Rama Devi A, Govindaiah V, Ramakrishna G. and Naushad S.M. Prevalence of methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism in South Indian population *Current Science*, 86:3, 2002.

47. Reuter M, Küpper Y, Schmitz A, Breuer J .P, Wend U, Hennig J. Detection of new single nucleotide polymorphisms by means of real time PCR Journal of Genetics, 84: 3, 2005.
48. Rosenblatt DS. Methylenetetrahydrofolate reductase. Clin Invest Med, 24:56-59, 2001.
49. Sarba O, Topçuoğlu MA, Arsava EM. Akut iskemik inmede tedavi yaklaşımlar. Balkan S (Editör). Serebrovasküler Hastalıklar'da. Ankara:Güneş Kitabevi, 289-311, 2005.
50. Shpichinetsky V, Raz I, Friedlander Y, 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, 130: 2493-2497, 2000.
51. Söğütçü T., Kaplan Aİ, Akut koroner sendromlu hastalarda plazma homosistein düzeylerinin akut dönemde seyri. (Tıpta uzmanlık tezi) Dicle Ü. Tıp F. Diyarbakır, 7-14, 2002.
52. Stern LL, Bagley PJ, Rosenberg IH, et al. Conversion of 5-formyltetrahydrofolic acid is unimpaired in folate- adequate persons homozygous for the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. J Nutr, 130: 2238-2242, 2000.
53. Temel İ., Özerol E. Homosistein metabolizma bozukluklar ve vasküler hastalıklarla ilişkisi, 9(2): 149-157, 2002.
54. Temizkan G, Arda N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. ISBN : 9754203474., 73-111, 2004.
55. Ueland P.M, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset S.E. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. Trends Pharmacol Sci, 22(4):195-201, 2001.
56. Utku U, Çelik Y. Strokta Etyoloji, Sınıflandırma ve Risk Faktörleri. Balkan S (Editör). Serebrovasküler Hastalıklar'da. Ankara Güneş Kitabevi, 57-72, 2005.
57. Van Der Put N. M. J, Gabree Ls F, Stevens E. M. B, Smeitink J. A. M, Trijbels F. J. M, Eskes T. K. B, Van Der Heuvel L.P. and Blom H. J. A Second Common mutaton In The Methyleenetetrahydrofolate Reductase Gene : An Additional Risk Factor For Neural – Tube Defects. Am. J. Hum. Genet., 62:1,

1998.

58. Velioglu Sibel K, Boz C, Ar N, Uydu Hüseyin A, Özmenoglu M. İskemik strokta akut ve subakut dönemde homosistein düzeyleri. Türk Serebrovasküler Hastalıklar Dergisi, 9: 1-5,2003.
59. Visy JM, Le Coz P, Chadeaux B, et al. Homocystinuria due to 5,10-methylenetetra-hydrofolate reductase deficiency revealed by stroke an adult siblings. Neurology, 1:1313-1315, 1991.
60. Warlow C.P., Epidemiology of stroke, Lancet 352 (Suppl. 3) SIII1-SIII4, 1994.
61. WHO, The world Health Report, Reducing risks, promoting healthy life.1-6, 2002.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : FİDAN GÖKÇEÇİÇEK GÜLYAZ
Doğum yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 21 Nisan 1980
Medeni Hali : Bekar
Uyruğu : T.C.
Yabancı dil : İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU

1986 – 1991 İlkokul
Güven İlkokulu
1991 – 1994 Ortaokul
Yahya Kemal Beyatlı Lisesi
1994 – 1998 Lise
İncirli Süper Lisesi
1998 – 2002 Lisans
Selçuk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
2005 – 2008 Yüksek lisans
Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

AKTİVİTELER

12-13 Haziran 2007 Cerrahpaşa Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı'nda düzenlenen HPLC ve Uygulama alanları konulu çalışmaya katıldım.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ARAŞTIRMA ETİK KURULU

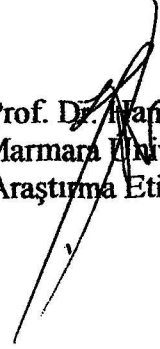
Sayı : B.30.2.MAR.0.01.00.02/AEK-928

Konu:

02.03.2007

Sayın : Prof. Dr. Yavuz TAGA

MAR-YÇ-2006-0197 protokol nolu "İnme hastalarında Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) gen polimorfizminin etkisi" isimli projeniz Fakültemiz Araştırma Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ayhan DİRESKENELİ
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Araştırma Etik Kurul Başkanı



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TUTANAK

Enstitümüz Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Fidan GÖKÇEÇİÇEK GÜLYAZ'ın, 28.02.2008 tarihinde saat 10.00'da yapılan tez savunma sınavı .60.. dakika sürmüş adı geçen adayın tezinin Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği Hükümlerine göre **KABUL/RED** / **DÜZELTME** olduğuna **oybirliği/oyçokluğu** ile karar verilmiştir.

Danışman

Prof.Dr.Yavuz TAGA

Üye

Prof .Dr.Nesrin KARTAL ÖZER

Üye

Prof.Dr. Beki KAN

Anabilim Dalı Başkanı

Prof.Dr. Yavuz TAGA



Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 28 / 02 / 2008

İMZA

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Yavuz TAGA
Üniversitesi : Marmara

.....

Üye : Prof .Dr.Nesrin KARTAL ÖZER
Üniversitesi : Marmara

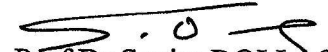
.....

Üye : Prof.Dr. Beki KAN
Üniversitesi : (M.Ü. Tıp Fak. Biyofizik A.Dalı)

.....

ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..06 / 03 / 2008 tarih ve ..03 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof.Dr.Sevim ROLLAS
Müdür