

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

PRENATAL DÖRTLÜ TARAMA TESTİNDE DOWN SENDROMU
RİSKİ EŞİK DEĞERİN ÜSTÜNDE ÇIKAN GEBELERİN
SERUMLARINDA OKSİDAN/ANTİOKSİDAN DURUMUN
ARAŞTIRILMASI

Dr. Oğuz Han EDEBAL

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Erdinç DEVRİM

ANKARA

2012

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan “Prenatal Dörtlü Tarama Testinde Down Sendromu Riski Eşik Değerin Üstünde Çıkan Gebelerin Serumlarında Oksidan/Antioksidan Durumun Araştırılması” başlıklı, Dr. Oğuz Han EDEBAL’a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10/10/2012



Prof. Dr. Kadirhan SUNGUROĞLU

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

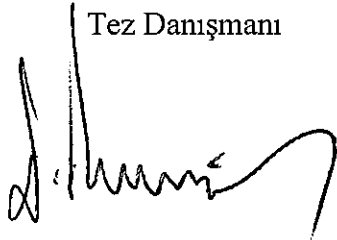
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Erdinç DEVRİM

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı



Doç. Dr. B. İmge ERGÜDER

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye



ÖNSÖZ

Tıpta uzmanlık eğitimimin süresince ve tez çalışmalarımın her aşamasında rehberliği, derin bilgi birikimi ve nesnel yaklaşımıyla yolumu aydınlatan, kişiliği ve akademik duruşuyla daima örnek aldığım değerli tez danışmanı hocam Doç. Dr. Erdiç Devrim'e, tez çalışmamda ve akademik faaliyetlerde daima rehberliklerine başvurduğum değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. İlker Durak'a ve Sayın Prof. Dr. H. Serdar Öztürk'e, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Kadirhan Sunguroğlu'na, Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Serenay Elgün Ülkar'a, Sayın Prof. Dr. Aslıhan Avcı'ya ve Sayın Doç. Dr. B. İmge Ergüder'e;

Sonsuz sevgisini ve koşulsuz desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim Zehra'ya ve hayatımın neşesi canım oğlum Mete Han'a;

Beni yetiştiren eğitimime yön veren ve bugünlere gelmemi sağlayan anneme, babama ve ağabeyime;

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuvarlar Koordinatörü Sayın Prof. Dr. Hüseyin Tutkak'a;

Kendilerinden çok şey öğrendiğim ve benden yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen araştırma görevlisi arkadaşlarım Dr. Mehmet Namuslu'ya, Dr. Ebru Gürleyik'e, Dr. Neriman Sevinç'e, Dr. Şebnem Korkmaz'a, Dr. Süleyman Büber'e, Dr. Özkan Özer'e, Dr. Seda Bahsi'ye, Dr. Pınar Koyuncu'ya ve Dr. Metin Genç'e;

Anabilim Dalımızın değerli çalışanları Ömer Savran, Sema Öztürk, Nurdan Torunoğlu, Nurhan Gödelekoğlu, Kadime Kızılırmak ve İsmail Çaylan'a;

Uz. Dr. Esra Elmalı'ya, Uz. Dr. Zihni Karaeren'e ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Araştırma ve Uygulama Hastanesi ve Cebeci Hastanesi Merkez Laboratuvarı çalışanlarına;

Teşekkürlerimi, saygılarımı ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Oğuz Han EDEBAL
Ankara, 2012

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Down Sendromu	3
2.1.1. Down Sendromunun Tarihçesi	3
2.1.2. Epidemiyoloji, Genetik ve Patogenez.....	4
2.2 Prenatal Tanı ve Tarama Yöntemleri	8
2.2.1. Dörtlü Test.....	11
2.2.1.1 Alfa Fetoprotein	11
2.2.1.2. Beta <i>Human Chorionic Gonadotropin</i>	11
2.2.1.3. Dimerik İnhibin A.....	12
2.2.1.4. Serbest Estriol	13
2.2.2. <i>Multiples of Median</i>	13
2.2.3. Diğer Tarama Testleri.....	14
2.3. Oksidatif Stres	16
2.3.1. Serbest Radikaller	16
2.3.1.1. Süperoksit Radikali	16
2.3.1.2. Hidroksil Radikali	17
2.3.1.3. Oksidatif Hasara Neden Olan Diğer Maddeler	18
2.3.2. Lipit Peroksidasyonu	19
2.4. Antioksidan Savunma	20
2.4.1. Enzim Yapısındaki Antioksidanlar	22
2.4.1.1 Süperoksit Dismutaz	22
2.4.1.2 Katalaz	22
2.4.1.3 Glutasyon Peroksidaz	23
2.4.1.4. Glutasyon Redüktaz	24

2.4.1.5. Diğer Antioksidan Enzimler	24
2.4.2. Enzim Yapısında Olmayan Antioksidanlar	24
2.4.2.1. Karotenoidler	24
2.4.2.2. E Vitamini	24
2.4.2.3. Askorbik Asit	25
2.4.2.4. Vücutta Sentezlenen Antioksidan Bileşikler	26
2.4.2.5. Fenolik Bileşikler.....	26
2.4.2.6. Glutasyon.....	26
2.5. Down Sendromu ve Oksidatif Stres.....	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	28
3.1. Gönüllü Seçimi.....	28
3.2. Gereçler	29
3.2.1. Cihazlar.....	29
3.2.2. Kimyasal Maddeler.....	30
3.3. Dörtlü Test	31
3.3.1. Alfa Fetoprotein.....	31
3.3.2. Total Beta <i>Human Chorionic Gonadotropin</i>	32
3.3.3. Dimerik İnhibin A.....	32
3.3.4. Serbest Estriol.....	32
3.3.5. Down Sendromu Riskinin Hesaplanması	33
3.4. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Ölçülmesi.....	33
3.4.1. Malondialdehit Düzeyinin Belirlenmesi.....	33
3.4.2. Ksantin Oksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	35
3.4.3. Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	37
3.4.4. Enzimatik Olmayan Süperoksit Radikali Temizleyici Aktivitenin Belirlenmesi	39
3.5. İstatistiksel Değerlendirme Yöntemleri.....	41
4. BULGULAR.....	42
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇLAR	56
ÖZET.....	57
SUMMARY	58
KAYNAKLAR	59

EKLER

EK 1: Etik Kurul Kararı	68
EK 2: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	70
EK 3: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Prenatal Tarama Testleri Bilgi ve İstem Formu	72

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Derece Celsius
β hCG	: İnsan koryonik gonadotropininin beta alt birimi
Δ OD	: Delta optik dansite
μ L	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
μ mol	: Mikromol
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AFP	: Alfa fetoprotein
C	: Derişim
CuCl ₂	: Bakır (II) klorür
CuZn-SOD	: Bakır çinko süperoksit dismutaz
ÇDYA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
d	: Yoğunluk
DCR	: Down Sendromu kritik bölgesi (<i>Down Syndrome Critic Region</i>)
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DİA	: Dimerik İnhibin A
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DR	: Tespit oranı (<i>detection rate</i>)
DS	: Down Sendromu
e ⁻	: Elektron
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
F	: Faktör
Fe	: Demir
FPR	: Yanlış pozitiflik oranı (<i>false positive rate</i>)
FSH	: Folikül stimüle edici hormon
<i>g</i>	: <i>gravity</i>
g	: gram
GS-SG	: Okside glutatyon
GSH	: Redükte glutatyon
GSH-PO	: Glutatyon peroksidaz
H	: Hidrojen

H ₂ O	: Su
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
hCG	: İnsan koryonik gonadotropini (<i>human chorionic gonadotropin</i>)
HCl	: Hidroklorik asit
hsCRP	: Yüksek duyarlı C reaktif protein
IL-6	: İnterlökin 6
IU	: İnternasyonal ünite
kg	: Kilogram
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
KO	: Ksantin oksidaz
L	: Litre
<i>l</i>	: Işığın kat ettiği yol (santimetre olarak)
L [•]	: Lipit radikali
LH	: Luteinleştirici hormon
LOO [•]	: Lipit peroksil radikali
LOOH	: Lipit hidroperoksit
M	: Molarite (mol/L); molar
M1	: Mayoz 1 (maternal)
M2	: Mayoz 2 (maternal)
MA	: Molekül ağırlığı
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
Mn-SOD	: Mangan süperoksit dismutaz
MoM	: <i>Multiples of Median</i>
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum hidrojen fosfat
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
NBT	: <i>Nitro Blue Tetrazolium</i>
nm	: Nanometre

NSSA	: Enzimatik olmayan süperoksit radikali temizleyici aktivite
O ₂	: Oksijen
O ₂ ^{•-}	: Süperoksit radikali
OH ⁻	: Hidroksil iyonu
OH [•]	: Hidroksil radikali
P1	: Mayoz 1 (paternal)
P2	: Mayoz 2 (paternal)
PAPP-A	: Gebelikle ilişkili plasenta (plazma) proteini – A
<i>rpm</i>	: dakikada dönüş sayısı (<i>revolutions per minute</i>)
sE ₃	: Serbest Estriol
SOD	: Süperoksit dismutaz
TEP	: Tetraetoksipropan
TSH	: Tiroid stimüle edici hormon
TBA	: Tiobarbitürik asit
TCA	: Triklor asetik asit
v/v	: Hacim/hacim
vb	: ve benzerleri
w/v	: Ağırlık/hacim

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1:	2500 yıllık bir heykelde Down Sendromu	4
Şekil 2.2:	Normal gebelikte dörtlü test Down Sendromu risk hesabında kullanılan biyokimyasal belirteçlerin ikinci trimesterde gebelik haftasına göre değişimleri	14
Şekil 2.3:	Lipit peroksidasyonunun aşamaları	20
Şekil 3.1:	Çalışma ve kontrol gruplarının seçimi	30
Şekil 4.1:	MDA kutu grafiği	43
Şekil 4.2:	KO kutu grafiği	44
Şekil 4.3:	GSH-PO kutu grafiği	45
Şekil 4.4:	NSSA kutu grafiği	46

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1: Trizomi 21'in kökeni	6
Tablo 2.2: Down Sendromunda gözlenen temel fenotipik bileşenler	10
Tablo 3.1: Araştırmaya dahil olma ve olmama ölçütleri	29
Tablo 3.2: MDA düzeyi ölçüm protokolü	35
Tablo 3.3: KO enzim aktivitesi ölçüm protokolü	37
Tablo 3.4: GSH-PO enzim aktivitesi ölçüm protokolü	39
Tablo 3.5: NSSA ölçüm protokolü	41
Tablo 4.1: Gönüllülerin yaş, vücut ağırlığı ve gestasyonel yaş değerleri	42
Tablo 4.2: Malondialdehit düzeyi	43
Tablo 4.3: Ksantin oksidaz enzim aktivitesi	44
Tablo 4.4: Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi	45
Tablo 4.5: Enzimatik olmayan süperoksit radikali temizleyici aktivite	46
Tablo 4.6: Yüksek risk grubunda oksidan/antioksidan parametrelerin istatistiksel olarak anlamlı korelasyonları	47
Tablo 4.7: Tüm gönüllüler birlikte ele alındığında oksidan/antioksidan parametrelerin istatistiksel olarak anlamlı korelasyonları	48

1. GİRİŞ

Down Sendromu (DS) insanda 21. kromozomun tamamının veya bir parçasının triploidisi, translokasyonu veya mozaisizmi sonucunda gelişen, yaklaşık olarak her 700 canlı doğumda bir görülen bir hastalıktır (1). DS entelektüel bozukluğun en sık genetik nedenidir. Hastalığın seyri süresince erken yaşlanma, kalp ve damar sistemi sorunları, mental retardasyon, Alzheimer benzeri demans gibi çok çeşitli sağlık sorunları gözlenmektedir (2). Genetik temellere dayanmakla birlikte, DS’de görülen bu semptom ve malformasyon çeşitliliği, hastalığın multifaktöryel olduğunu düşündürmektedir (3,4). DS riski normal popülasyona göre yüksek olan gebelikleri tanımlamak için çeşitli prenatal tarama testleri geliştirilmiştir. İkinci trimesterde 15 ile 22. gebelik haftaları arasında maternal serumda iki, üç ya da dört biyokimyasal parametrenin düzeylerinden faydalanarak hesaplanan tarama testleri vardır (5,6). Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarında ikinci trimesterdeki gebelikleri DS riski açısından taramak için dördümlü test uygulanmaktadır. DS’den etkilenen bireylerin oksidatif stres belirteçlerinin yükseldiği çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir (7–9). Ayrıca, DS’de gözlenen bu oksidatif stres artışının prenatal dönemde başladığı da bildirilmiştir (10,11). Süperoksit Dismutaz (SOD) enziminin alt tiplerinden birisi olan bakır çinko SOD (CuZn–SOD) 21. kromozomda kodlanmaktadır ve DS’den etkilenmiş fetüs taşıyan gebelerde SOD aktivitesinin arttığı da bildirilmiştir (12). Prenatal tarama testlerinde bildirilen DS riskiyle maternal serumdaki oksidan/antioksidan durum arasındaki ilişki hakkında güncel literatür taranmış fakat yeterli bilgiye ulaşılammıştır. Bu nedenle prenatal dördümlü tarama testinde DS riski eşik değerin üstünde çıkan gebelerin serumlarında oksidatif parametrelerde herhangi bir değişiklik olup olmadığının, oksidatif durumda değişiklikler gerçekleşmişse bunun antioksidan sistemde ne gibi yanıtlara yol açtığının ortaya konması amaçlanmıştır.

Bu amaçla Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarında dördümlü tarama testi çalışılan gebelerin DS’li fetüse sahip olma riski hesaplandıktan sonra DS’li fetüse sahip olma açısından yüksek ve düşük riskli gebelerden oluşan 30’ar kişilik iki grup oluşturuldu. Bu gruplarda yer

alan gebelerin dörtlü test için alınmış olan serumlarında oksidan durumu gözlemek amacıyla lipid peroksidasyonu göstergesi olarak kabul edilen malondialdehit (MDA) düzeyi ve süperoksit oluşumuna neden olan ksantin oksidaz (KO) enziminin aktivitesi ölçüldü. Antioksidan savunmayı ortaya koymak amacıyla da hidroperoksitleri indirgeyerek antioksidan savunmaya katkıda bulunan glutatyon peroksidaz (GSH-PO) enzim aktivitesi ve enzimatik olmayan süperoksit radikali temizleyici aktivite (*non-enzymatic superoxide radical scavenger activity*; NSSA) lmleri gerçekleştirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Down Sendromu

2.1.1. Down Sendromunun Tarihçesi

Down Sendromunu ilk olarak İngiliz hekim John Langdon Down tarafından, bazı çocuklarda zihinsel engele sahip diğer çocuklardan ayrı görülen ortak fenotipik bulguları yazılı hale getirmesiyle 1866 yılında tanımlanmıştır (13). “Mongoloid” nitelenmesi de ilk defa yine aynı kişi tarafından kullanılmıştır. Sendrom, hekimin soyadına ithafen “Down Sendromu” olarak anılmaya başlanmıştır. DS’ye ait olduğu düşünülen en eski kanıtlar ise günümüzden yaklaşık 2500 yıl önce Kolombiya dolaylarında yaşamış bir kavimden kalan arkeolojik kalıntılardır (14). Bu bölgede yapılan arkeolojik çalışmalarda genetik uzmanları da yer almış ve çömlek heykellerde Down Sendromlu bir çocuğa ait tasvir keşfedilmiştir (Şekil 2.1).

Pek çok arkeolojik eserde ve tarihi resimlerde Down Sendromlu insanlara ait tasvirlerle rastlamak mümkündür (15–17). Yirminci yüzyılın ortalarına kadar DS’nin nedeni gizemini korumuştur. Hastalığın genetik temelde geliştiği öne sürülmüş olsa da (18) bu hipotez ancak 1959 yılında kanıtlanabilmiştir. Lejeune ve ark. dokuz mongoloid çocukta yaptıkları çalışmada “mongoloid” çocukların 47 kromozoma sahip olduğunu ve 21. kromozomlarının 3 adet olduğunu göstermişlerdir (19). Takip eden yıllarda genetikçilerin önerileriyle “mongolizm” terimi terk edilerek, sendromun ismi “Down Sendromu” veya Lejeune ve ekibini büyük buluşları nedeniyle onurlandırmak amacıyla “Trizomi 21” olarak anılmaya başlanmıştır. Bundan sonraki büyük keşif, 1989 yılında 21. kromozomda hastalığın semptomlarının büyük kısmından sorumlu tutulan Down Sendromu Kritik Bölgesinin (*Down Syndrome Critic Region*; DCR) tanımlanmasıdır. 21. kromozomun Hattori ve ark. tarafından sekanslanması DS’de görülen semptomların ve bulguların neden–sonuç ilişkilerinin anlaşılmasında büyük aşama kaydedilmesini sağlamıştır (20).



Şekil 2.1: 2500 yıllık bir heykelde Down Sendromu. Kolombiya – Ekvator sınırında yapılan arkeolojik çalışmalarda bulunan bu heykelde Down Sendromlu bir çocuğun tipik morfolojik özelliklerinin yanında davranış örüntüsü de betimlenmiş. – Bernal ve ark. (14)’dan alınmıştır.

2.1.2. Epidemiyoloji, Genetik ve Patogenez

DS, insanlarda 21. kromozomun trizomisi sonucunda ortaya çıkan bir semptom ve bulgular bütünüdür (4). Çeşitli kaynaklarda görülme sıklığı yaklaşık 600 ile 800 canlı doğumda 1 olarak bildirilmiştir (4,21,22). Aslında, konsepsiyonda DS çok daha sık

görülmektedir fakat DS'li embriyo ve fetüslerin büyük çoğunluğu 1. ve 2. trimesterde kaybedilmektedir (23,24). Canfield ve ark. Amerika Birleşik Devletleri'nde geniş çaplı bir prevalans çalışması gerçekleştirmişlerdir (25). Bu çalışmada 1999–2002 yılları arasında ABD'de meydana gelen tüm canlı doğumlar, fetal kayıplar, spontan ve indüklenmiş abortuslar değerlendirilmiştir. Anne yaşına göre düzeltilmiş DS prevalansı her 10.000 canlı doğumda 13,65 olarak hesaplanmıştır. Bu oran 1/733'e karşılık gelmektedir. Aynı çalışmada beyaz ırka göre DS prevalans oranları hispaniklerde 1,12; afro-amerikanlarda 0,77 olarak bildirilmiştir. Avrupa'da 1990–2009 yılları arasında 6,1 milyon canlı doğumu kapsayan bir çalışmadaysa DS prevalansı 10.000 canlı doğumda 22 (1/455) olarak bulunmuştur (26). Burada DS prevalansının görece yüksek bulumasının nedeninin çalışma tasarımına göre 20. hafta sonrasında DS nedeniyle fetal kayba uğrayan ya da prenatal tanı olanaklarıyla DS olduğu kesinleştiği için terapötik abortus yapılan fetüslerin de düzeltme faktörü kullanılarak bu orana dâhil edilmesi olduğu öne sürülmüştür. Zaman içinde DS insidansında artış görüldüğü, bazı ülkelerde bu artışın 3 kata yakın olduğu da belirtilmiştir. Bu artışın temek sorumlusu olarak ileri yaşta gebeliklerin yükselmesi gösterilmiştir. Irving ve ark.'ın İngiltere'nin kuzey sağlık bölgesinde 1985–2004 yıllarını kapsayan çalışmasında, yaklaşık 700bin gebelikte DS'den etkilenmiş gebelik sayısı 1188 (1/581) olarak saptanmıştır (27). 748 DS'li bebek canlı olarak dünyaya gelmiştir (1/923). Antenatal tanıyla tespit edilen 477 gebelikten 389'u DS nedeniyle terminasyona uğramış, 51 tanesiyse ölü doğum olarak gerçekleşmiştir. Bu araştırmanın çarpıcı sonuçlarından birisi de DS'den etkilenmiş gebelik sayısının zaman içinde yaklaşık 2 kat artmış olmasına karşın canlı doğum oranının değişmemesidir. Ülkemizde DS prevalansı hakkında kapsamlı bir araştırmaya ya da Sağlık Bakanlığı verilerine ulaşılamamıştır.

DS'den etkilenmiş fetüslerin % 95'inde mayotik *nondisjunction* nedeniyle ya da gamet oluşumu sırasında kromozomların anormal segregasyonu sebebiyle fazladan bir 21. kromozom bulunmaktadır. Kalan % 5'in içinde genetik mozaisizmin oranı % 1 kadardır, diğer vakalar 21. kromozom translokasyonu soncunda gerçekleşmektedir (28). Trizomi 21'in temelindeki *nondisjunction* sebeplerini aydınlatmak amacıyla Freeman ve ark. yaptığı geniş çaplı bir çalışmada *nondisjunction*ların ebeveyn

kökenleri ve hatanın türü sınıflandırılmıştır (29). Buna göre *nondisjunction*ların % 93'ü oosit kökenlidir ve en çok mayozun 1. safhasında (% 75) gerçekleşmektedir. Mitoz bölünmede kaynaklanan hatalar tüm *nondisjunction*ların % 3'ünü oluşturmaktadır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Trizomi 21'in kökeni – Freeman ve ark. (29)'dan alınmıştır.

Köken	Sayı	Oran	%
Maternal			
Mayoz I (M1)	529	$M1/(M1+M2) = 529/708$	74,7
Mayoz II (M2)	179	$M2/(M1+M2) = 179/708$	25,3
Evre Belirsiz	21		
Ara Toplam	729	M/Tüm Vakalar = 729/782	93,2
Paternal			
Mayoz I (PI)	13	$P1/(P1+P2) = 13/31$	41,9
Mayoz II (PII)	18	$P2/(P1+P2) = 18/31$	58,1
Evre Belirsiz	1		
Ara Toplam	32	P/Tüm Vakalar = 32/782	4,1
Mitotik	21	Mitotik/Tüm Vakalar = 21/782	2,7
Tüm Vakalar	782		

DS risk etkenlerinden en önemlisi ilerlemiş anne yaşıdır. İlerlemiş anne yaşının yol açtığı risk artışının sadece maternal kaynaklı *nondisjunction*larla sınırlı olduğu bildirilmiştir. M1 evresinin arreste uğrayıp 10–50 yıl sonra devam ettiği, M2 evresinin ise ovulasyon sırasındaki 3–4 günü kapsadığı ve fertilizasyonla tamamlandığı göz önünde bulundurulursa ileri yaşın yol açtığı risk artışının sadece M1'i etkilemesi daha olası gibi gözükmemektedir. Fakat ilerlemiş anne yaşı hem M1 hem de M2 evrelerinde *nondisjunction* riskini arttırmaktadır (30). Bu durumun nedenleri arasında M1 arresti sırasında oositte çevresel toksik etkenlerin birikmesi, arrest sırasında duraksamış olan mayoz düzeneğinde degradasyon meydana gelmesi, hormon sinyalindeki değişimler nedeniyle over işlevlerinin yeniden düzenlenmesi sayılabilir (28). Maternal *nondisjunction* ile ilişkisi gösterilmiş olan diğer risk faktörü ise bozulmuş rekombinasyon örgüsüdür (30,31). Anne yaşı haricinde öne

sürülmüş pek çok olası çevresel DS risk etkeni vardır. Annenin sigara kullanımı, alkol, radyasyon maruziyeti, oral kontraseptifler, düşük sosyoekonomik düzey gibi olası risk etkenleri araştırılmıştır, ancak hiçbirinin DS riskine anlamlı olarak etki ettiği kanıtlanamamıştır.

Genetik risk faktörleri arasında belki de en önemlisi ebeveynlerin translokasyon taşıyıcısı olmasıdır. Anne yaşı translokasyon taşıyıcılığını etkilememektedir (23). Özellikle taşıyıcı olan anne olduğunda DS riski oldukça artmaktadır. Özel bir translokasyon çeşidi de 21q21q translokasyonudur. Bu durumda taşıyıcı olan kişinin tüm gametleri ya çift doz 21. kromozoma sahip olmakta ya da 21. kromozomu hiç içermemektedir. Bu taşıyıcının normal çocuk sahibi olma olasılığı bulunmamaktadır, tüm gebelikler ya DS'den etkilenmiş olacak ya da hayatla pek bağdaşmayan monozomi 21'li olacaktır (32).

DS patogenezinin temel noktası, DS'nin birden çok genin neden olduğu bir bozukluk olmasıdır. İnsan 21. kromozomunun sekanslanmasından sonra, bu kromozomda 220 kadar gen ve 65 psödogen olduğu bildirilmiştir (20). Bunların hepsi normal genlerdir ve kodladıkları proteinler de normaldir. Fakat gen miktarı arttığından gen ürünleri de gereğinden fazla üretilmektedir. Yani trizomi 21 durumu bir gen kusuru değil, gen dozajı sorunudur. En yalın ifadeyle, genlerin % 50 daha fazla eksprese olması beklenmektedir. Bu çıkarımın doğru olduğunu bildiren (33) çalışmaların yanında, karşıt sonuç bildiren çalışmalar mevcuttur (34). DS patogenezinde sorumlu tutulan bir diğer etkense protein kodlamayan işlevsel deoksiribonükleik asit (DNA) öğelerinin katkısıdır. Sekans çevrimi, adı geçen bölgelerin işlevsel olduğunu göstermekle birlikte kesin işlevleri ortaya konamamıştır. Bu öğelerin bazılarının 3 kopya halinde bulunmasının DS patolojisine katkıda bulunması olasıdır (35).

DS, bir çoklu sistem bozukluğudur ve çeşitli fenotipik bozukluklarla seyreder. Bu fenotipik bozuklukların gelişmesinde altta yatan patolojik mekanizmalar henüz kesin olarak ortaya konamamıştır. DS'li bireylerin gen ekspresyonlarındaki farklılıklara ek olarak, etkilenen genetik kodun büyüklüğü ve çeşitliliği de DS'de görülen belirti, bulgu ve klinik seyir çeşitliliğine katkıda bulunmaktadır. Etkilenen sistemler arasında

merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler sistem ve bağışıklık sistemi öne çıkmaktadır. Hastalığın seyri boyunca çeşitli hormonal dengesizlikler de izlenmektedir (35).

2.1.3. Down Sendromunun Klinik Özellikleri ve Tanısı

DS pek çok morfolojik kusur, büyüme ve gelişme geriliğiyle kendini gösterir. DS'ye bağlı gelişen temel fenotipik değişiklikler tablo 2.2'de gösterilmiştir. DS'li bireylerde doğuştan kalp hastalıkları, gastrointestinal kusurlar, çölyak hastalığı, beyin kusurları, Alzheimer hastalığı, böbrek bozuklukları, ekstremita kusurları ve işitme bozuklukları topluma göre daha fazla görülmektedir. Doğumda en dikkat çekici bulgular hipotoni, küçük ve basık burun, lenfödem, çekik gözler, epikantal katlantı, orta hat hipoplazisi mikrosefali gibi fenotipik özelliklerdir. Bütün fenotipik özellikler her zaman her hastada görülmeyebilir. Klinik olarak DS'den şüphelenildiğinde, zaman kaybetmeden kromozomal analiz yapılarak tanı kesinleştirilmeli ve aileye uygun danışmanlık hizmetinin verilmesi sağlanmalıdır (32).

2.2 Prenatal Tanı ve Tarama Yöntemleri

Tarama, bir hastalık açısından belirlemiş eşik değerden daha yüksek risk taşıyan bireyleri belirlemek amacıyla özgün bir belirteç veya belirteçler grubu kullanılarak gerçekleştirilen popülasyon incelemesidir. Her klinik durum tarama için uygun olmayabilir. Bir hastalığın toplumda taranabilmesi için ilgili bozukluk toplumun önemli bir kısmını ilgilendiriyor olmalıdır. Yol açtığı bozukluk sağlığı ciddi olarak etkilemelidir. Tarama için kullanılan belirteçler, risk altındaki bireyleri uygun bir özgüllük ve duyarlılıkla belirleyebilmelidir. Tarama sonucu pozitif çıkan bireyler için kabul görmüş bir kesin tanı yöntemi bulunmalıdır ve etkilenen bireyler için geçerli tedavi yöntemleri bulunmalıdır. Ayrıca, testin maliyeti de düşük olmalıdır. Tarama işlemi sadece test uygulamak demek değildir, kapsamlı bir programdan oluşmalıdır. Tarama programında hem hastalar hem de uygulayıcılar işlemle ilgili gerekli ve yeterli bilgiye hızlıca ulaşabilmeli, tarama testi toplumun tamamı tarafından erişilebilir olmalı, test öncesi ve sonrasında düzenli takip gerçekleştirilebilmeli, tarama sonucu pozitif bulunanlara uygun danışmanlık hizmeti

verilebilmeli ve hasta eğer isterse bu basamakların herhangi bir aşamasında programdan sorunsuzca ayrılabilmelidir. Ek olarak, tarama programının yerel başarımı kolayca izlenebilmeli ve program yeni teknolojilerin uyarlanmasına izin verecek yapıda olmalıdır (36). Testlerin başarımı sıklıkla tespit oranı (*detection rate*; DR: Tüm DS gebeliklerinde pozitif sonuç verme oranı) ve yalancı pozitiflik oranı (*false positive rate*; FPR: DS'den etkilenmemiş gebeliklerde pozitif sonuç verme oranı) ile takip edilmektedir.

Fetal kromozomal anomalilere yönelik ilk tarama uygulaması anne yaşı ve ailede fetal kromozomal anomali öyküsü bulunmasıydı. DS ile anne yaşı arasında ilişki olmasına karşın çoğu DS'li bebeğin 35 yaş altı annelerden dünyaya gelmesi tarama testlerine olan gereksinimi arttırmıştır. İkinci trimesterde tarama testi olarak kullanılan ilk biyokimyasal belirteç Alfa Fetoprotein (AFP) düzeyidir (37,38). Daha sonra insan koryonik gonadotropininin beta alt biriminin (β hCG) düzeyinin DS'li gebeliklerde yükseldiği ortaya konmuştur (39). Bunu DS'den etkilenmiş gebeliklerde serbest estriol (sE_3) düzeyinin azaldığının ve dimerik inhibin A (DIA) düzeyinin yükseldiğinin gösterilmesi takip etmiştir (40–42).

Kromozomal anomalilerin prenatal tanısında en çok kabul gören temel yöntemler koryonik villus örnekleme, amniyosentez ve fetal kan örneklemesidir. Her üç yöntem de fetal kayıp riski taşıdığından riskli popülasyonda ve seçilmiş vakalarda uygulanması doğru olacaktır. Amniyosentezin 15. hafta öncesinde güvenilir olarak uygulanması güçtür. Bu nedenle ilk trimesterde koryonik villus örnekleme daha çok tercih edilmektedir. Her iki yöntemle de fetal kayıp riski uygulama yapılan merkeze ve işlemi gerçekleştiren hekime göre değişmektedir ve risk ortalama olarak 1/200–1/1000 arasındadır (43). Fetal kayıp riski nedeniyle son yıllarda yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir. En çok umut vadeden gelişmeler gebenin kanında dolaşan fetal hücreleri tespit edip ayrıştırılması ve maternal kanda dolaşan, hücreden arınmış fetal DNA'nın tespit edilerek genetik inceleme gerçekleştirilmesidir (44–46).

Tablo 2.2: Down Sendromunda gözlenen temel fenotipik bileşenler – Antonarakis ve ark. (35)’dan alınmıştır.

DOĞUM	İNFAnt VE ÇOCUK	ERİŞKİN
Yapısal		
Dismorfik görünüm *	Büyüme geriliği ve obezite	
Doğumsal kalp hastalığı		
Duodenal stenoz veya atrezi		
İmperfore anüs		
Hirschprung hastalığı		
Merkezi Sinir Sistemi		
Hipotoni	Büyüme geriliği ve mental retardasyon	Bilişsel işlevlerde azalma
	Azalmış ağrı hassasiyeti	Alzheimer hastalığı
İmmün ve hematopoetik sistem		
Geçici miyeloproliferatif bozukluk	Lösemi	
	İmmün bozukluklar ve enfeksiyon	
Diğer		
	Tiroid işlev bozukluğu	Erkek sterilitesi
		Kısalmış yaşam beklentisi

* Görülme sıklığına göre sırasıyla; Yukarı çekik palpebral fissür, boyun kökünde gevşek deri, daralmış damak, brakisefali, basık burun kökü, ilk ve ikinci ayak parmaklarının arası genişlemiş, kısa boyun, anormal diş yapısı, epikantal katlantı, kısa ve içe kıvrık serçe parmak, dışa sarkmış dil, transvers palmar çizgi (Simian çizgisi), displastik kulaklar.

2.2.1. Dörtlü Test

Dörtlü test 1990'lı yıllarda AFP, β hCG ve sE₃ ölçümüyle uygulanan üçlü teste DİA'nın eklenmesiyle ortaya çıkmıştır. Ultrasonografik olarak ölçülen fetal bipariyetal çap kullanılarak gebelik haftası belirlendikten sonra maternal serumda her bir belirteç ölçülerek sonuçlar bilgisayar ortamına aktarılmaktadır. Daha sonra bilgisayar ortamında çeşitli yazılımlar aracılığıyla algoritmalar kullanılarak risk hesabı gerçekleştirilmektedir. Test sonucunda 15 ile 22. gebelik haftaları arasındaki bir gebenin DS'li, Trizomi 18'li ve nöral tüp defektli fetüse sahip olma riski ayrı ayrı hesaplanmaktadır. DİA'nın eklenmesiyle üçlü testin % 5 FPR'yle % 70 civarında olan DR başarımı % 80'in üstüne çıkmıştır (47). Dörtlü testin dezavantajlarından birisiye çoğul gebeliklerde yakalama oranının oldukça azalmasıdır. Bu nedenle çoğul gebeliklerde farklı tarama yaklaşımları önerilmektedir (48). Dörtlü testte kullanılan biyokimyasal belirteçler aşağıda kısaca açıklanmıştır.

2.2.1.1 Alfa Fetoprotein

AFP 70.000 dalton ağırlığında ve tek zincirden oluşan glikoprotein yapıda bir moleküldür. Albumine büyük oranda benzemektedir ve bu iki molekül fetal dolaşımın temel proteinleridir (49). AFP temel olarak fetal karaciğerde ve yolk kesesinde üretilmekle birlikte, başka organlarda da düşük miktarda üretilir (50). AFP'nin fetal dolaşımında belirmesi konsepsiyondan 30 gün sonrasında gerçekleşmektedir. On üçüncü haftada fetal dolaşımında tepe düzeyine ulaştıktan sonra doğuma kadar yavaşça azalır. Normal kişilerin dolaşımlarında AFP düzeyi 2 yaşına gelindiğinde eser miktarlardadır (51). AFP düzeyi, erişkinlerde bazı malign hastalıklarda ve hamilelikte tekrar yükselmektedir. DS'li fetüse sahip gebelerin serumlarında AFP düzeyinin azaldığı bildirilmiştir (5).

2.2.1.2. Beta Human Chorionic Gonadotropin

İnsan koryonik gonadotropini (*human chorionic gonadotropin*, hCG) plasenta tarafından üretilen bir hormondur. Folikül stimüle edici hormon (FSH), Tiroid

stimüle edici hormon (TSH) ve Luteinleştirici hormon (LH) ile yapısal olarak benzerlik gösterir ve iki alt birimden oluşan bir glikoprotein yapısındadır. Alfa alt birimi tüm bu hormonlarla aynıdır. β alt birimi ise molekülün özgünlüğünü sağlayan parçasıdır. Dolayısıyla laboratuvar analizlerinde özgül olan β alt ünitesinin ölçülmesiyle düzeyi belirlenmektedir (52). Fertilize bir yumurtanın uterus duvarına implantasyonundan kısa bir süre sonra trofoblastlar β hCG üretmeye başlarlar. Placenta steroid salgılama görevini devralana dek, steroid salgısı β hCG etkisiyle korpus luteumdan gerçekleşir (53). Normal bir hamilelikte serum β hCG düzeyi konsepsiyondan bir hafta sonra 50 IU/L dolaylarındadır ve takip eden 6 hafta boyunca her 48 saatte ikiye katlanarak artar (54). β hCG düzeyi ilk trimesterin sonuna dek artmaya devam eder, hamileliğin geri kalan kısmındaysa aşamalı olarak daha düşük seviyelere geriler. Doğum sonrasında β hCG 5 IU/L'nin altına iner ve doğumdan birkaç gün sonra tespit edilemeyecek düzeye geriler. DS'li fetüse sahip gebelerin serum total β hCG düzeylerinin normal popülasyona göre anlamlı olarak yükseldiği bildirilmiştir (5).

2.2.1.3. Dimerik İnhibin A

İnhibinler placenta, overler ve gonadlardan salgılanan glikoprotein yapıda dimerik hormonlardır. İnhibin A (DIA) ve inhibin B olmak üzere inhibinlerin iki moleküler alt tipini bulunmaktadır (55). İnhibin A maternal dolaşımdaki temel türdür ve FSH'yi baskılama özelliğiyle öne çıkmaktadır (56). İnhibin A'nın salgılanması gebelikte birlikte artmaya başlar. Dolaşımda gebelik sürecindeki tepe düzeyine 8. haftada ulaşır ve 16. haftaya kadar sabit bir hızla azalır. Düzeyi 16 – 18. haftalar arasında görece sabit kaldıktan sonra tekrar yükselmeye başlar ve 36. haftaya kadar artmaya devam eder (55). Gebelik haricinde postmenapozal kadınlarda inhibin A düzeyinin yükselmesi granüloza hücreli over kanserini düşündürürken (57), erkeklerde testiküler stromal tümörlerde yüksekliği gösterilmiştir (58). DS'ye sahip fetus taşıyan gebelerin ilk trimesterin sonunda ve ikinci trimesterde, artmış serum inhibin A düzeylerine sahip oldukları gösterilmiştir (59).

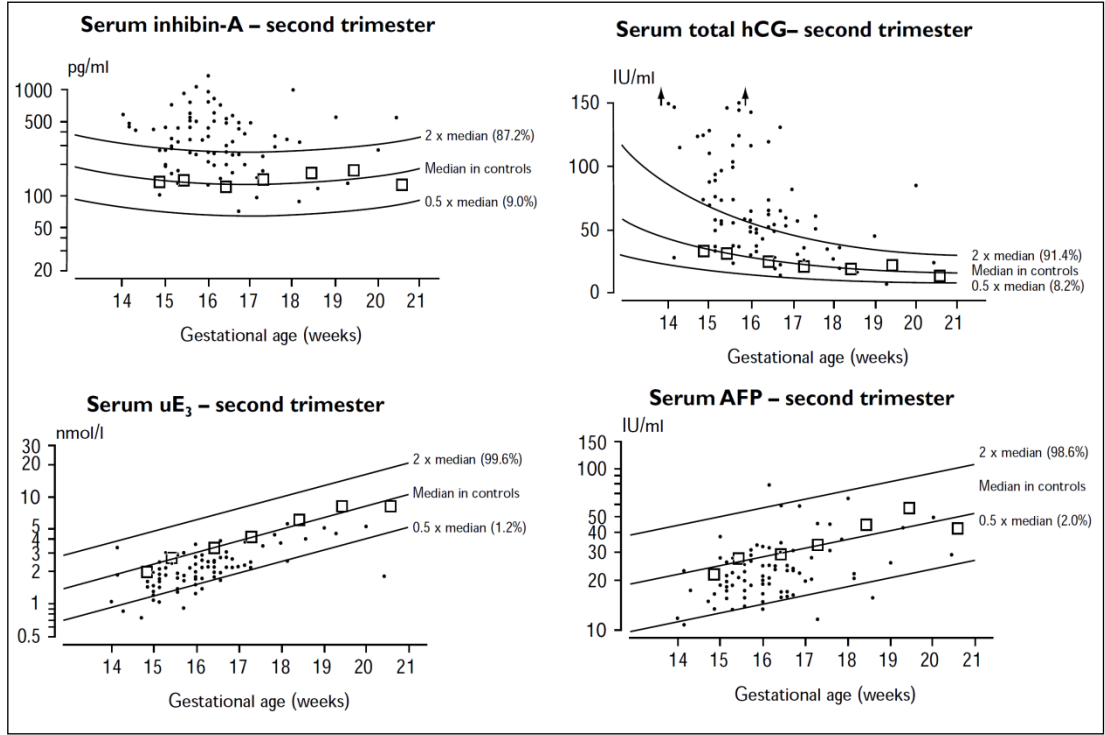
2.2.1.4. Serbest Estriol

Anne serumunda bulunan serbest estriol (1, 3, 5 (10)–Estratrien–3, 16 α , 17 β –triol; unkonjuge estriol; sE₃) temel olarak fetal karaciğer ve plasentadan kaynaklanmaktadır. Estriolün öncü molekülleri olan kolesterol ve pregnenolon anneden ve plasentadan fetüse geçer. Fetal adrenal bezler pregnenolonu dehidroepiandrosterona (DHEA) dönüştürür, bu da fetal karaciğerde 16–OH–DHEA–sülfata çevrilir. Sülfatlanmış bu bileşik plasentaya ulaştıktan sonra estriole dönüştürülerek maternal plazmaya katılır (60).

Estriol normal bir gebelikte dolaşımdaki östrojenlerin % 90’lık kısmını oluşturur. Serbest estriol tek başına ölçülüp değerlendirildiğinde fetal iyilik halinin ve plasental işlevlerin hassas bir göstergesi olarak kullanılabilir (61). DS’den etkilenmiş fetüs taşıyan gebeliklerde maternal serum sE₃ düzeyinin azaldığı bildirilmiştir (5).

2.2.2. *Multiples of Median*

Dörtlü testte kullanılan biyokimyasal parametreler Şekil 2.2’de gösterildiği üzere gebeliğin seyrinde ikinci trimester boyunca artışlar ve azalmalar göstermektedirler. Bu değişim gebenin yaşından bağımsızdır. Yani bu belirteçlerin gebelerde karşılaşılan normal değerleri gebelik haftasına göre değişkenlikler sergilemektedir. Bir gebenin risk hesabında kullanılan belirteçlerinin eşik değerlerinin belirlenmesini ve normal gebelerin ortalamalarıyla karşılaştırılmasını kolaylaştırmak için tarama testinde kullanılan belirteçler, o belirteç için kendi gebelik haftasına ve gününe karşılık gelen medyan değerine bölünerek, ortancanın kaç katı olduğu (Multiples of Median, MoM) hesaplanır. Her laboratuvar kullandığı testlerin medyan değerlerini hesaplamalıdır. MoM’nin bir diğer avantajı da farklı laboratuvarlarda farklı yöntemlerle gerçekleştirilen testlerin MoM cinsinden birbiriyle karşılaştırılmasına olanak sağlamasıdır. Risk algoritmalarında hesaplamalar MoM değeri kullanılarak yapılmaktadır.



Şekil 2.2: Normal gebelikte dörtlü test DS risk hesabında kullanılan biyokimyasal belirteçlerin ikinci trimesterde gebelik haftasına göre değişimleri. Çizgiler yukarıdan aşağıya sırasıyla ortancanın 2 katını, ortancayı ve ortancanın yarısını göstermektedir. Grafikteki her bir siyah nokta DS’li fetüslerin maternal serumlarında adı geçen belirteçlerin düzeylerini MoM cinsinden göstermektedir – Wald ve ark. (5)’dan alınmıştır.

2.2.3. Diğer Tarama Testleri

Fetüse DS tanısını ikinci trimesterde koymanın bazı sorunlar ortaya çıkarması (terminasyonun teknik olarak zorluğu, annenin bebeğe bağlanması, etik tartışmalar vb.) ilk trimester tarama testlerinin 1990’ların başında önem kazanmasına yol açmıştır. Serumda gebelikle ilişkili plasenta (plazma) proteini – A (PAPP–A) düzeyine ve serbest β hCG düzeyine ek olarak, fetüsün ense saydamlığının ve nazal kemik varlığının ultrasonografiyle ölçülmesi DS riskini hesaplamada kullanılmış ve “ikili test” olarak kabul görmüştür (62–64). Yıllar içinde risk hesabında kullanılan belirteçleri etkileyen çeşitli faktörler (ırk, maternal vücut ağırlığı ve kan grubu, yardımcı üreme tekniğiyle gerçekleşmiş gebelikler, sigara kullanımı gibi) ortaya

konulmuş ve risk hesabına düzeltme faktörleri de eklenerek daha iyi hale getirilmeye çalışılmıştır (65,66).

Günümüzde prenatal tarama testlerini geliştirmek için birinci ve ikinci trimester tarama testlerinin çeşitli birliktelikleri oluşturulmuş ve entegre, ardışık ve koşullu tarama testleri ortaya çıkmıştır (67,68). Entegre taramada 1. ve 2. trimester tarama testleri birleştirilerek tek bir risk verilir, yani 1. trimesterde risk hesabı yapılmaz. Bu yöntemde DR % 85'e yükselse de, test 1. trimesterde başlayıp sonucu 2. trimesterde verildiğinden sonuç bekleme süresinin oldukça uzun olması ve tarama sonucu pozitif bulunan gebelerde 1. trimesterdeki prenatal tanı seçeneklerinin kullanılamayacak olması yöntemin önemli sorunlarından. Ardışık taramanın entegre taramadan farkı ilk trimester taramasında risk hesabının yapılarak hastaya bildirilmesi ve ek seçenekler sunulmasıdır. Gerektiğinde bu test entegre hale dönüştürülebilmektedir. Koşullu taramadaysa 1. trimester taraması sonucunda düşük riskli gebeliklere 2. trimesterde tarama uygulanmaz ve risk olduğu gibi kabul edilir. Yüksek riskli gebelere ise 2. trimester beklenerek entegre test uygulanır. DS riski yine yüksek çıkarsa ek işlemler gündeme alınır. Koşullu tarama yöntemiyle % 5 FPR ile DR % 93 dolayındadır. Prenatal taramada kullanılmak üzere yeni biyokimyasal belirteçler tanımlamak için araştırmalar da devam etmektedir.

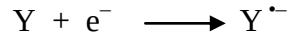
Biyokimyasal taramanın yanında ultrasonografik tarama da prenatal kromozomal anomalilerin tespitinde önemli yer tutmaktadır. Ultrasonografik taramanın en önemli avantajı kromozomal anomali dışındaki doğumsal kusurları da (konjenital kap defektleri vb.) belirlemeye olanak sağlamasıdır. Sık kullanılan ultrasonografik belirteçlerden bazıları nazal kemik varlığı, ense saydamlığı, femur uzunluğu, brakisefali, umbilikal kord çapı ve tek umbilikal arterdir. Bunların yanında son yıllarda duktus venozus kan akımı örneklemesi, frontomaksiller kemik açığı ölçümü, triküs pit regürjitasyonunun izlenmesi gibi yeni belirteçler de tanımlanmaya devam etmektedir (69,70).

2.3. Oksidatif Stres

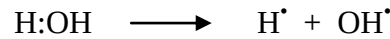
Oksidatif stres, organizmadaki oksidanlar ve antioksidan savunma arasındaki dengenin hasara yol açma olasılığı oluşturacak şekilde oksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanmıştır. Oksidan maddeler normal koşullarda aerobik metabolizmanın bir ürünü olarak meydana gelseler de bazı patofizyolojik durumlarda artmış miktarlarda üretilirler (71).

2.3.1. Serbest Radikaller

Serbest molekül halinde bulunup son yörüngesinde bir ya da daha fazla sayıda eşlenmemiş elektron (e^-) içeren moleküllere serbest radikal denir. Bir atomik ya da moleküler orbitali tek başına dolduran elektron, eşlenmemiş elektrondur ve serbest radikalin artmış tepkimeye girme eğiliminden sorumludur. Radikaller, radikal olmayan bir maddenin bir e^- kazanması ya da kaybetmesiyle meydana gelebilirler.



Bir kovalent bağın yüksek enerjiyle ortasından kırılması sonucu oluşan her iki molekül birer eşlenmemiş e^- paylaşırlar. Bu duruma homolitik fizyon denir ve radikal oluşum yolları arasında yer alır.



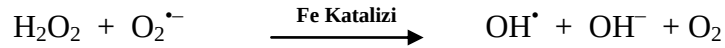
2.3.1.1. Süperoksit Radikali

Temel durumdaki oksijen molekülüne (O_2) 1 e^- eklenirse süperoksit radikali (O_2^{*-}) oluşur. Organizmada pek çok yolla O_2^{*-} oluşabilmektedir:

- Ksantin oksidaz enzimi süperoksit oluşumuna yol açar.

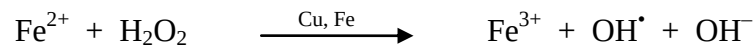
- Gliseraldehid, FMNH₂, FADH₂, L-DOPA, noradrenalin, adrenalin, dopamin, sistein, Russel reaksiyonu oksijeni yavaş şekilde O₂^{•-} haline dönüştürür.
- Hem proteinlerine Demir(II) bağlanırken Demir(III) haline dönüştürülür ve O₂^{•-} açığa çıkar.
- Mitokondriyal e⁻ taşınması sırasında açığa çıkan süperoksit belki de en önemli mekanizmadır. Sitokrom oksidaz öncesi basamaklarda bazı elektronlar doğrudan oksijene sızarlar.

O₂^{•-} sulu çözeltilerde, sanılanın aksine çok reaktif değildir. İlginç şekilde, e⁻ alıcısı olarak indirgen görev de üstlenebilir. Sitokrom c'de Demir (III)'ü Demir(II)'ye indirger. *Nitro blue tetrazolium*'u (NBT) formazana indirger. Fizyolojik pH'da sulu çözelti içinde DNA, aminoasitler ve diğer bileşiklerle tepkime hızı çok düşüktür, bazen sıfırdır. Biyolojik sistemlerde yol açtığı toksisitenin ana mekanizması, hidroksil radikali oluşumunu arttırmasıdır (72). Demir(III)'ün süperoksit tarafından indirgenmesi Fenton tepkimesini hızlandırabilir ve süperoksit yardımcı Fenton tepkimesi meydana gelir:



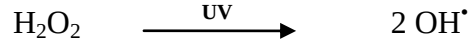
2.3.1.2. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali (OH[•]) canlılarda iki yolla oluşur. Birincisi iyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle sulu ortamda su molekülünün iyonlaşması sırasında OH[•] meydana gelmesidir. Diğeriyse hidrojen peroksitin (H₂O₂) homolitik fizyondur ve vücutta OH[•]'nin en önemli oluşum mekanizmasıdır. H₂O₂'nin bir e⁻ ile indirgenmesi sonucunda OH[•] meydana gelir. İndirgenme demir, bakır gibi geçiş metallerince katalizlenmektedir.



Askorbik asit, süperoksit gibi indirgeyici bileşiklerin de bulunduğu bir ortamda, oksitlenen metal iyonu tekrar indirgendiğinden H₂O₂'den OH[•] yapımı sürekli hale

gelir. $O_2^{\bullet-}$ hem H_2O_2 'nin öncülü hem de metalleri indirgeyici bir tür olduğundan ve proteinlere bağlı metallerin indirgenip serbest kalmasına da neden olabildiğinden, biyolojik koşullarda $O_2^{\bullet-}$ oluşumunun arttığı her ortamda $OH^{\bullet}$ üretimi kaçınılmazdır. Bir diğer hidroksil radikali kaynağı, ultraviyole ışınların uyardığı homolitik fizyon sonucu H_2O_2 'nin yıkılması ve $OH^{\bullet}$ oluşumudur.



İyonize radyasyona maruz kalan hücrelerde su ve H_2O_2 gibi moleküllerden yüksek miktarda $OH^{\bullet}$ açığa çıkar. Radyasyon toksisitesinin başlıca sorumlusu $OH^{\bullet}$ 'dir.

Hidroksil radikali başlıca 3 tür tepkimeye katılır:

- Elektron transferi tepkimeleri
- Hidrojen çıkarma tepkimeleri: Organik moleküllerden Hidrojen atomu alarak su oluşturur.
- Katılma tepkimeleri: Özellikle elektronca zengin moleküllere (pürin ve primidin bazları, aromatik aminoasitler) katılır.

Bütün bu tepkimelerin temelinde $OH^{\bullet}$ 'nin eşlenmemiş e^- içeren dış yörüngesinin e^- alma ilgisi yer almaktadır (72).

2.3.1.3. Oksidatif Hasara Neden Olan Diğer Maddeler

Süperoksit ve hidroksil radikalleri haricinde pek çok radikalik yapıda olan ve olmayan bileşik oksidatif hasara neden olabilmektedir. Peroksil, alkoksil ve hidroperoksil radikallerine ek olarak hidrojen peroksit, hipoklorik asit, ozon, singlet oksijen peroksinitrit bileşikleri çeşitli mekanizmalarla oksidatif hasara neden olmaktadır. Örneğin peroksil ve alkoksil radikalleri organik bileşiklerden hidrojen atomu alarak lipid peroksidasyonunda rol oynamaktadırlar. Nitrik oksit molekülü de son yörüngesinde taşıdığı eşlenmemiş elektron sayesinde radikalik özellik göstermektedir. İnsanda fizyolojik görevleri arasında nörotransmitter, vazodilatör,

anti agregan, anti mikrobiyal olarak işlev göstermesi sayılabilir. Fakat septik şok, transplant reddi, epilepsi, astım gibi hastalıkların patogeneğinde de aşırı üretimi sonucunda zararlı etkiler göstererek anahtar rol üstlenmektedir. Bunların haricinde çeşitli azotlu bileşikler ve sülfür bileşikleri de oksidatif hasarda rol oynayabilir.

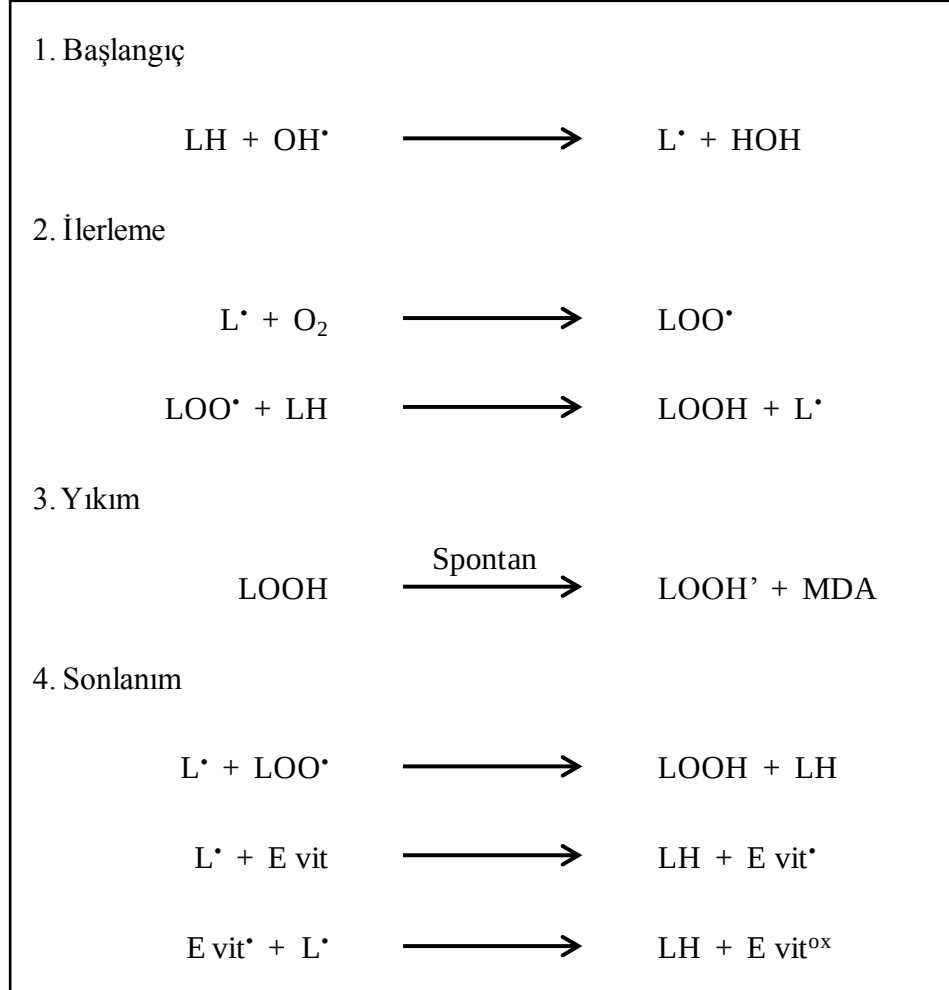
2.3.2. Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu başlangıç, ilerleme, yıkım ve sonlanım olmak üzere 4 temel aşamada meydana gelir (Şekil 2.3). Çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) bir hidrojen atomu kaybettiklerinde lipit radikali ($L^{\bullet}$) meydana gelir. Karbon temelli bu molekül O_2 'yle tepkimeye girdiğinde lipit peroksidasyonunu başlatan lipit peroksil radikali ($LOO^{\bullet}$) oluşur. Lipit peroksil çok uzun ömürlü bir moleküldür. Biyomembranlar ve hücre içi organeller (mitokondri, endoplazmik retikulum, vb.), membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitleri nedeniyle oksidatif ataklara oldukça duyarlıdır. Lipit peroksil ÇDYA'dan bir hidrojen alarak lipit hidroperoksite ($LOOH$) dönüşürken yeni bir lipit radikali oluşumuna yol açar. Nonenzimatik oksidatif lipit peroksit ayrışması sonucunda MDA ve degrade lipit hidroperoksit açığa çıkar.

Lipit peroksidasyonu tepkimelerinin sonlanması antioksidan bileşiklerin hidrojenlerini kaybetmesi ya da iki peroksil radikalının birleşmesiyle radikalik olmayan bileşiklerin oluşumuyla gerçekleşir. Lipit peroksidasyonu zincirleme bir tepkimedir ve "Serbest Radikal Otooksidasyonu" şeklinde gerçekleşmektedir. Bu zincirleme tepkimeyi başlatan etkenin $OH^{\bullet}$ olduğu öne sürülmektedir. Lipit peroksitlerinin derişimleri arttıkça membranların akışkanlıkları azalır, kalsiyum gibi iyonların hücre içine geçişi kolaylaşır ve hücre işlevlerinde bozukluklar ortaya çıkmaya başlar.

Aldehitler lipit peroksidasyonu sırasında oluşan bileşikler arasında en toksik olanlarındandır ve diğer hücre bölümlerine de yayılarak hasara neden olurlar. MDA temel olarak ikiden fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonundan ve eikozanoid sentezinde serbestleşen endoperoksitlerden köken almaktadır.

Proteinlerin amino gruplarına, fosfolipitlere ve nükleik asitlere bağlanarak toksik etki gösterir. Membran bileşenlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona yol açar. Membranlardan kolaylıkla difüze olarak, DNA yapısında yer alan bazlarla reaksiyona girer ve mutajen, karsinojen, genotoksik etkiler gösterir (72).



Şekil 2.3: Lipit peroksidasyonunun aşamaları.

2.4. Antioksidan Savunma

Okside edilebilen bir substrata oranla ortamda çok daha düşük oranda bulunduğu zaman substratın oksidasyonunu belirgin olarak geciktiren veya inhibe eden “herhangi” bir maddeye antioksidan denmektedir (71). Bu ifade hem enzim dışı maddeleri hem de enzimleri kapsamaktadır.

Antioksidan etkinin ilk basamağı önlemedir. DNA'nın kromatinle paketlenerek oksidan maddeler için farklı hedefler oluşturulması ve genetik materyalin korunması önlemeye güzel bir örnektir. Ayrıca, katalizledikleri tepkimelerin sonucunda radikalik bileşiklerin oluşumuna neden olan enzimlerin üç boyutlu yapısı, oluşan radikalik maddenin ortama salıverilmesini önleyici veya yavaşlatıcı şekildedir. Yine ultraviyole ışınları absorbe ederek hücreyi koruyan melanin ve elektriksel olarak uyarılmış singlet oksijen gibi moleküllerden hücreyi koruyan karotenoidler de benzer etki göstermektedirler. Koruyucu etki bazen bütün bir hücreyi kapsayacak şekilde uygulanıyor olabilir. İntestinal mukoza hücreleri sürekli olarak pek çok oksidatif hasara maruz kalmakta ve bu etki birikerek devam etmektedir. İntestinal hücrelerin hızlı yaşam döngüsü ve eliminasyonu, ileride daha büyük sorunlar çıkarabilecek birikmiş oksidatif hasar taşıyan hücrelerden organizmanın korunmasını sağlamaktadır (71).

İkinci antioksidan etkinlik aşaması, durdurmadır. Bu etki birkaç farklı yöntemle gerçekleştirilebilir. Enzimatik olmayan antioksidanlar zararlı maddeyle tepkimeye girerek zararsız ve reaktif olmayan türler oluşturmaya çalışırlar. Buradaki asıl sorun da radikalik tepkimelerin genelde zincirleme şekilde ilerlemesidir. Yani radikalik bileşikteki eşlenmemiş elektron alınıp uzaklaştırılırken başka bir moleküle aktarılır ve onu radikalik hale getirebilir. Bundan dolayı, antioksidan madde zincir kırıcı etkinlik gösterebilmelidir. Bu noktada önemli biyolojik aktivitelerden birisi de, oksidan maddeyi tehlikeli kompartmandan uzaklaştırmaktır. Örneğin hücre membranında lipit peroksidasyonuna yol açacak bir maddeden eşlenmemiş elektron alınarak az önce anlatılan transfer işlemiyle sitoplazmaya aktarılır. Bu sayede membrandaki antioksidan da rejenere olur. Bu uzaklaştırma işlemiyle radikalik bileşikler potansiyel hedeflerinden uzaklaştırılmış olurlar. Bu tarz antioksidan etkinlik genelde fenolik bileşenlerde karşımıza çıkmaktadır (71,72)

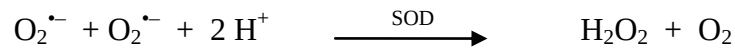
Ökaryot organizmaların hücreleri gelişmiş antioksidan enzim sistemleriyle donatılmıştır. Bu enzimler süperoksit dismutazlar, katalazlar ve glutatyon peroksidazlar olmak üzere üç ana başlıkta incelenebilirler. Bazı enzimlerse dolaylı olarak antioksidan etkinliğe katkı sağlarlar. Glutatyonu disülfid halinden dönüştüren

glutatyon redüktaz buna iyi bir örnektir. Önleme ve durdurma yetersiz kaldığında DNA, proteinler ve lipitlerde oksidatif hasar meydana gelecektir. Bu hasarın tamir edilmesi de oksidanların etkilerinin engellenmesi olarak ele alındığında antioksidan bir etkinlik olarak karşımıza çıkmaktadır. DNA tamir enzimleriyle hasarlı proteinleri ve lipitleri yıkıma uğratan sistemler bu bağlamda yeniden yapılanma ve yenilenme sağlayarak antioksidan etkinlik gösterirler (71,72). Bu da antioksidan etkinin üçüncü ve son basamağıdır.

2.4.1. Enzim Yapısındaki Antioksidanlar

2.4.1.1 Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD) enziminin katalizlediği tepkime aracılığıyla süperoksit radikali hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülmektedir (73). SOD enzimi bakır-çinko, mangan ve demir içeren üç tip izoenzime sahiptir. Bakır ve çinko içeren CuZn-SOD sitoplazmada, mangan içeren Mn-SOD mitokondride etkinlik göstermektedir. CuZn-SOD ve Mn-SOD'nin etki mekanizmaları aynıdır fakat Mn-SOD pH 7nin üzerinde aktivitesini kaybederken CuZn-SOD'nin aktivitesi pH 5,5–10 aralığında değişmez. Demir içeren SOD izoenzimiye ökaryotlarda bulunmamaktadır.

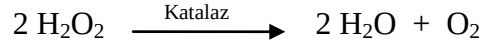


Bu tepkimede süperoksit radikallerinden biri indirgenirken diğeri yükseltgenmektedir. SOD'nin katalizi sayesinde tepkime normalden yaklaşık 4.000 kat daha hızlı gerçekleşmektedir. SOD etkinliği oksijen kullanımının yüksek olduğu dokularda fazlayken hücre dışı sıvılarda oldukça düşüktür.

2.4.1.2 Katalaz

Katalaz hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene çevrildiği reaksiyonu katalizleyen enzimdir. Enzim bir hemoproteindir ve hücre içinde peroksizomlarda

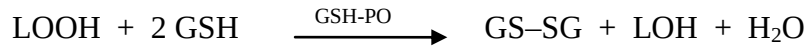
yerleşmiştir. Dört alt birime sahiptir ve her alt birim hem yapısında olup ferik demir ve NADPH içerir.



Bu tepkime hidrojen peroksit derişimi yükseldiğinde önem kazanmaktadır. Katalaz, özellikle granüloamatöz dokuları solunum patlamasının olası hasarından korumaktadır (73).

2.4.1.3 Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz (GSH-PO) redükte glutatyon ile hidrojen peroksitin tepkimeye girip okside glutatyon ve su oluşturduğu reaksiyonu katalizleyen enzimdir. Aktivite gösterebilmek için selenyuma ihtiyaç duyar. Hidrojen peroksit haricinde lipit peroksitleri de substrat olarak kullanabilir.

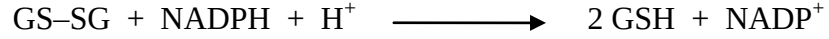


Bu tepkimelerde açığa çıkan yükseltgenmiş glutatyon, glutatyon redüktaz enzimiyle tekrar kullanıma hazır hale getirilir (72).

Katalaz ve Glutatyon peroksidaz enzimleri, süperoksit dismutazın ürettiği H_2O_2 'yi dengeli bir şekilde ortamdan uzaklaştırabilecek bir hızda çalışıyor olmalıdır. SOD aktivitesinde bir artış meydana gelirse ve bu durum katalaz ve GSH-PO tarafından karşılanamazsa H_2O_2 derişimi artacak ve normalde antioksidan özelliğe sahip SOD enziminin aktivitesi sonucunda oksidatif stres meydana gelecektir. Bu olay, oksidan/antioksidan sistemin dengesinin önemine güzel bir örnek oluşturmaktadır.

2.4.1.4. Glutasyon Redüktaz

GSH-PO aktivitesi sonucunda oluşmuş okside glutasyonun redükte hale çevrilmesi glutasyon redüktaz enziminin gerçekleştirdiği tepkimenin gerçekleşmesi için NADPH'a gereksinim duyulur (72).



2.4.1.5. Diğer Antioksidan Enzimler

Tiyoredüksinler, glutasyon-S-transferaz ve sitokrom oksidaz da antioksidan aktivite gösteren enzimler arasında yer almaktadır (72).

2.4.2. Enzim Yapısında Olmayan Antioksidanlar

2.4.2.1. Karotenoidler

Karotenoidler genellikle sarı, turuncu veya kırmızı renkte olan ve bitkilerde yaygın olarak bulunan renkli bileşiklerdir. Karotenoid yapısının en çarpıcı özelliği molekülün merkezini oluşturan ve değişkenlik gösteren çift bağ sistemidir. Bu sistem tüm zincir boyunca elektron değişimine olanak tanır. En önemli görevleri, yağda çözünen bir vitamin olan A vitamininin (Retinol) öncü maddesi olmalarıdır. Singlet oksijen ve reaktif oksijen türevleri için iyi birer temizleyici olsalar da lipid peroksidasyonunu ve LDL oksidasyonunu engellemede çok etkili değildir. İn vivo antioksidan etkinlikleri sınırlıdır (72).

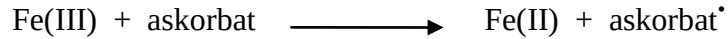
2.4.2.2. E Vitamini

E vitamini tek bir molekül değil, bir beslenme etkeninin genel ismidir. Peroksil radikali temizleyicisi olarak işlev gördüğünden en önemli lipid peroksidasyonu engelleyicilerinden biridir. 8 farklı molekülün E vitamini aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir; $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ tokoferoller ve tokotrienoller. İnsanda en aktif E vitamini türü

d- α -tokoferoldür. E vitamininin lipit peroksidasyonunu engelleyici etkisi, lipit peroksil radikallerini lipit yan zincirleriyle ya da zar proteinleriyle tepkimeye girmeden hızla temizlemesinden kaynaklanır. α Tokoferol yüksek düzeylerde, antioksidan etkisinden bağımsız olarak membran stabilize edici etki de gösterir (72).

2.4.2.3. Askorbik Asit

Askorbik asit (askorbat, C vitamini) beyaz, suda oldukça iyi çözünen bir kristaloiddir. İki adet iyonize olabilen -OH grubu içerir. Bitkilerin ve hayvanların büyük bir kısmı askorbat sentezleyebilirler, fakat insanlar askorbat sentezinin son basamağını katalizleyen L-gulonolakton oksidaz enzimine sahip olmadıklarından askorbatı diyetle almak zorundadırlar. C vitamininin en önemli özelliklerinden birisi indirgen bir madde olmasıdır. Diyetle alınan nitrozo bileşiklerinin inaktif formlara indirgenmesini sağlar.



C vitamini in vitro prooksidan etkinlik de gösterebilir. Askorbatın demir veya bakır karışımları süperoksit radikali oluşumuna yol açabilmektedir. İn vitro prooksidan etkinin C vitaminine has olmadığı bilinmelidir. E vitamini, GSH ve bitki fenolleri de dâhil olmak üzere pek çok indirgen madde geçiş metalleriyle prooksidan etki gösterebilmektedir. Prooksidan etkide asıl önemli nokta katalitik geçiş metali iyonlarının varlığıdır. Hastalık durumunda hasarlı dokulardan açığa çıkan demir ve bakır iyonlarının fazlalığı, C vitamininin prooksidan etkisini tetikleyebilir. Fakat askorbatın bu koşullardaki prooksidan etkinliği, antioksidan etkinliği tarafından fazlasıyla karşılanmaktadır (72).

2.4.2.4. Vücutta Sentezlenen Antioksidan Bileşikler

Organizmada üretilen ve genelde protein yapıda olan çeşitli bileşiklerin antioksidan etkinliğe sahip oldukları gösterilmiştir. Bunlar arasında bilirubin, seks hormonları, melatonin, lipoik asit, koenzim Q ve ürik asit başlıcalarıdır. Bilirubin albuminle bağlanarak radikal hasarına karşı koruyucu etki gösterir. İn vitro olarak peroksil ve singlet oksijen radikallerini temizler. Östrojenler lipit peroksidasyonunu inhibe etmektedir. Yalnız bu etkileri için fizyolojik orandan daha fazla bulunmaları gerekmektedir. Ayrıca, östrojenlerin fazlalıkları çeşitli istenmeyen etkilere de yol açabilmektedir. Melatonin in vitro hidrojen grubu alarak antioksidan etki göstermektedir. Yüksek melatonin düzeyi, GSH-PO gibi enzimleri dolaylı olarak indüklemektedir. Koenzim Q lipit peroksidasyonunu inhibe eder ve reaktif oksijen türleri üzerine antioksidan aktivite gösterir. Ürik asit solunum yollarında antioksidan etkinliğe sahiptir. OH^{*}, reaktif oksijen türleri ve nitrojen dioksit üzerinde antioksidan etki gösterir. Ayrıca, proteinlerin zarar görmesine karşı da koruyucu rol oynamaktadır (72).

2.4.2.5. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler bitkilerde sentezlenen, diyetle alınan ve genellikle düşük molekül ağırlığına sahip bileşiklerdir. Oldukça basit ya da karmaşık yapıya sahip olabilirler. Benzen halkasına hidroksil grubu eklenmesiyle oluşan hidroksibenzen yani fenol, en basit fenolik bileşiktir. Fenolik bileşikler karbon sayılarına göre sınıflandırılırlar. Antikanserojen, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antihipertansif, antioksidan etkinlik gibi çok çeşitli in vitro ve in vivo etkinliklere sahiptirler. Çeşitli hastalıklarda fenolik bileşiklerin gösterdiği antioksidan etkinlikler sayesinde koruyucu ve/veya tedavi edici etkinlikleri bildirilmiştir.

2.4.2.6. Glutasyon

Glisin, glutamat ve sisteinden sentezlenen glutasyon, hücre içinde önemli bir antioksidan ve tiyol-disülfid redoks tamponu olarak işlev görür. Glutasyon doğrudan

radikal temizleyici etkinliğe sahip olmasına ek olarak glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzimlerinin katalizlediği tepkimelerde de önemli görev üstlenir (70).

2.5. Down Sendromu ve Oksidatif Stres

DS'den etkilenen bireylerin oksidatif strese maruz kaldıkları pek çok araştırmada bildirilmiştir (2,8,9,70,74). DS'de görülen komplikasyonlardan erken yaşlanma, beyinde Alzheimer benzeri değişimlerin gerçekleşmesi, katarakt gibi patolojilerde, oksidatif stresin rol oynadığı gösterilmiştir. SOD enziminin alt türlerinden CuZn-SOD 21. kromozomda kodlandığından DS'de ekspresyonu ve aktivitesi artmaktadır. DS'de SOD enzim aktivitesinin artması sonucu açığa çıkan aşırı miktarda H_2O_2 , GSH-PO ve katalaz enzimlerinin uzaklaştırabileceğinden fazla olduğundan ciddi bir oksidatif stres meydana gelmektedir. Sonuç olarak hücrelerde oksidatif hasar oluşmakta ve MDA, 8-hidroksi-2-deoksiguanozin gibi oksidatif DNA hasarı belirteçlerinin düzeylerinde artış meydana gelmektedir (8,9). DS'de gerçekleşen bu oksidatif stresin fetal hayatta meydana gelmeye başladığı da gösterilmiştir. DS olduğu amniyosentezle kanıtlanmış fetüslerin amniyotik sıvılarında lipit peroksidasyonunun normale göre artmış olduğu bildirilmiştir (10,11). İn vitro olarak DS'li bireylerin nöronlarının bozulmuş yaşayabilirliklerinin basit antioksidanlarla düzeltilebildiği gösterilmişse de in vivo araştırmaların yetersiz olduğu öne sürülmektedir (8).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gönüllü Seçimi

Bu araştırma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan gerekli izin alındı (Ek 1). Araştırmaya katılan tüm gönüllülerin aydınlatılmış onamları alındı (Ek 2). Araştırma kapsamında 17 Şubat 2012 tarihinden itibaren dörtlü test çalışılması amacıyla prenatal tarama formu (Ek 3) doldurulan gebeler arasında araştırmaya katılmayı kabul etmiş olanların dörtlü testleri yapıldıktan sonra kalan serumları ayrılarak -80 °C’de biriktirildi ve çalışma gününe kadar saklandı.

Araştırmaya dâhil olma ve olmama ölçütleri tablo 3.1’de gösterildi. Bu ölçütlere göre araştırmaya dâhil edilen gönüllüler arasında dörtlü test DS riskleri eşik değerin üstünde olanların, araştırma için hedeflenmiş olan 30 sayısına ulaştığı 20 Haziran 2012 tarihinde örnek toplama aşaması sonlandırıldı. Bu zaman aralığında 764 gönüllünün serum örneği saklandı. Gönüllüler arasında diyabetik olan, sigara kullanan, gebeliği yardımcı üreme teknikleriyle gerçekleşmiş olan, Trizomi 18 veya Nöral Tüp Defekti riski yüksek bulunan toplam 109 kişi araştırma dışında tutuldu.

Dörtlü testte DS riski için belirlenmiş olan 1/270 eşik değeri sadece anne yaşı göz önüne alındığında 37,1 yaşa karşılık gelmekteydi (75). Geriye kalan 655 gönüllü içinde pozitif sonuç verilmiş olan 39 gönüllüden 9 tanesi ve negatif sonuç verilmiş 616 gönüllüden 25 tanesi 37,1 yaşın üstündeydi ve yaşa bağlı riskleri belirlenmiş olan eşik değerden yüksek olduğundan araştırmaya dâhil edilmediler. On sekiz ile 37,1 yaş arasında kalan gönüllülerden pozitif sonuç verilmiş olan 30’u yüksek risk grubunu (çalışma grubu) oluşturdu. Negatif sonuç verilmiş gönüllüler arasından yaş ve gebelik haftası bakımından çalışma grubuyla eşleştirilen 30 gönüllü rastgele seçilerek düşük risk grubu (kontrol grubu) oluşturuldu (Şekil 3.1). Yüksek risk ve düşük risk gruplarını oluşturan gönüllülerin serumlarında MDA düzeyi, GSH-PO ve KO enzim aktiviteleriyle NSSA ölçümleri yapıldı. GSH-PO enzim aktivitesi ve

NSSA ölçümleri, yüksek risk ve düşük risk grubundan 15'er serum alınarak 2 ardışık günde çalışıldı. MDA ve KO ölçümlerinin tamamı aynı gün içinde gerçekleştirildi.

Tablo 3.1: Araştırmaya dâhil olma ve olmama ölçütleri.

Araştırmaya Dâhil Olma	Araştırmaya Dâhil Olmama
18 yaşın üstünde olma	Dâhil olma ölçütlerine uymama
37,1 yaşın altında olma	Sigara kullanma
Tekil gebeliğe sahip olma	İnsülin kullanımını gerektiren Diyabet hastalığına sahip olma
	Gebeliğin yardımcı üreme teknikleriyle gerçekleşmiş olması
	Down sendromu riski haricinde Nöral Tüp Defekti, Trizomi 18 ya da diğer bozukluklarla ilgili risk düzeyi eşik değerinin üstünde olma

3.2. Gereçler

3.2.1. Cihazlar

Beckman Coulter DxI 800 Immunoassay oto analizör

Sanyo Ultra Low MDF-U4086S derin dondurucu (-80 °C)

Altus AL380 Derin Dondurucu (+4 °C)

Unicam Helios-α UV-Vis Spektrofotometre

Harrier 18/80 soğutmalı santrifüj

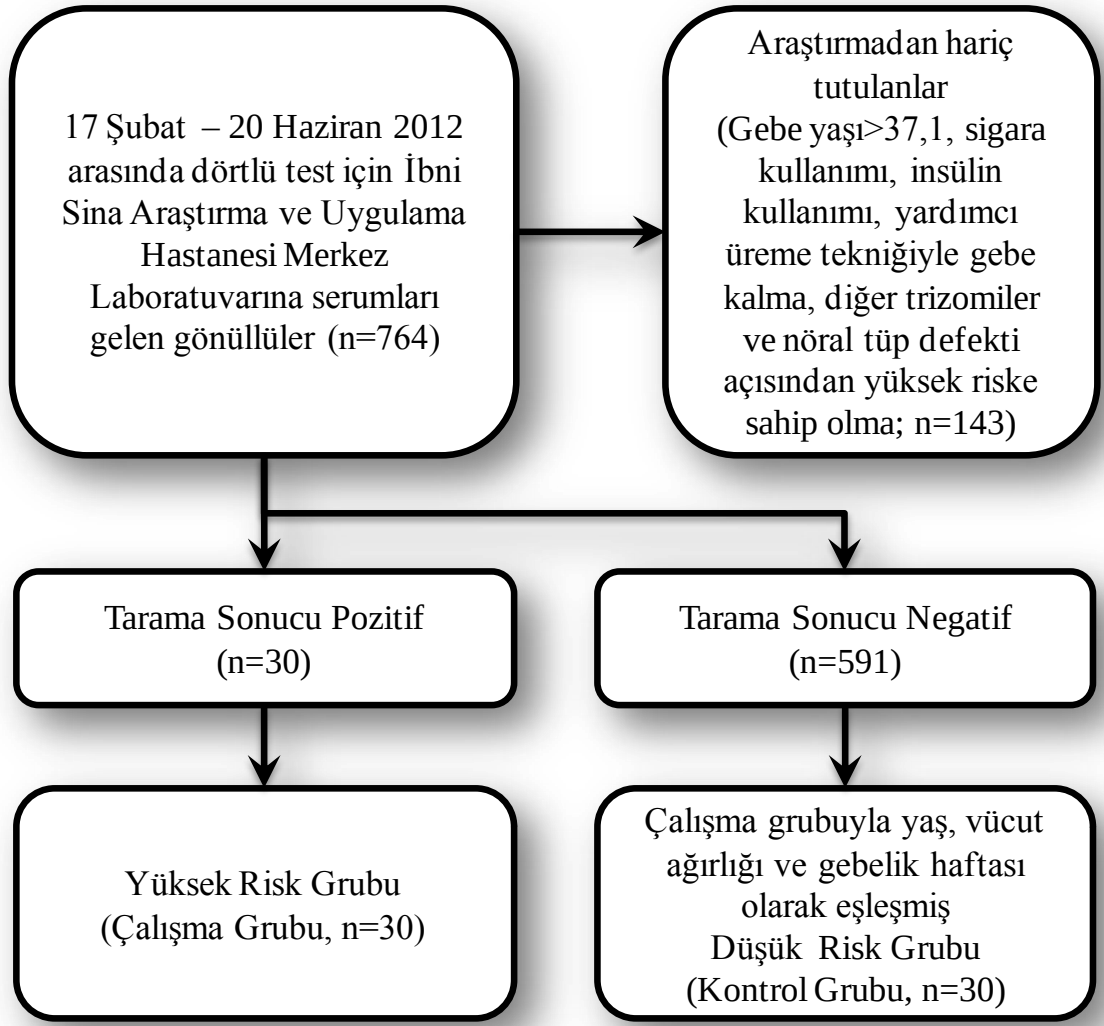
Sorvall RMC 14 santrifüj

Sartorius Basic hassas terazi

Whirlmix 20 W vorteks

Çeşitli hacimlerde ayarlanabilir hacimli otomatik pipetler ve cam pipetler

Çeşitli boyutlarda cam ve polipropilen deney tüpleri ve Eppendorf tüpleri



Şekil 3.1: Çalışma ve kontrol gruplarının seçimi.

3.2.2. Kimyasal Maddeler

Dördlü testte kullanılan AFP, total β hCG, DİA ve sE₃ belirteçlerini ölçmek için Beckman–Coulter Inc. immunoassay kitleri kullanıldı. Oksidan ve antioksidan belirteçlerin ölçülmesinde kullanılan tüm kimyasal maddeler Sigma–Aldrich ve Merck Kimya şirketlerinden sağlandı.

3.3. Dörtlü Test

Dörtlü test Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarında yapıldı. Test kapsamında prenatal tarama formundaki demografik ve ultrasonografik verilerin yanı sıra serum AFP, total β hCG, sE₃ ve DİA düzeyleri bilgisayar ortamına aktarıldı. Bilgisayar ortamında Benetech Prenatal Risk Assessment (Benetech PRA) paket programı kullanılarak hastaların DS'li bir fetüse sahip olma olasılıkları belirlendi (76). Benetech PRA yazılımı, gebeye ait çeşitli demografik verileri ve ultrason ölçümlerini (Ek 3), hastanın serumunda ölçülen biyokimyasal parametrelerle birleştirerek içinde yerleşik olarak bulunan algoritmalar aracılığıyla DS, nöral tüp defektleri, Trizomi 18 ve Trizomi 13 risklerini hesaplamakta kullanılan bir paket programdır. Paket programda kullanılan SURUSS algoritmasına göre bir annenin termde DS'li bebeğe sahip olma riski için eşik değer 1/270 olarak seçilmiştir (5). Bu eşik değer, DS risk etkeni olarak sadece anne yaşı ele alındığında 37,1 yaşa karşılık gelmektedir (75). Risk hesabında kullanılan biyokimyasal parametrelerin ölçüm yöntemleri aşağıda açıklanmıştır.

3.3.1. Alfa Fetoprotein

AFP düzeyi iki bölgeyi sandviç immünoenzimatik yöntemiyle belirlendi. Bu yöntemde ilk olarak fare monoklonal anti-AFP-alkalen fosfataz konjugatı ve ikinci bir fare monoklonal anti-AFP antikoruyla kaplanmış paramanyetik parçacıklar içeren tepkime kuyucuğuna örnek eklenir. Örnekteki AFP katı fazdaki sabitlenmiş anti-AFP antikorlarıyla tepkimeye girerken aynı zamanda monoklonal anti-AFP alkalen fosfataz konjugatları da örnekteki AFP'nin değişik antijenik bölgeleriyle tepkimeye girer. İnkübasyonun sonunda paramanyetik parçacıklara tutunmuş maddeler manyetik alan sayesinde tutulurken diğer maddeler yıkanarak uzaklaştırılır. Daha sonra ortama kemiluminesan madde olarak Lumi-Phos 530 eklenir ve açığa çıkan ışımaya luminometreyle ölçülür. Analit miktarı daha önce oluşturulmuş çok noktalı kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplanır (77).

3.3.2. Total Beta *Human Chorionic Gonadotropin*

Total β hCG düzeyi iki bölgeli sandviç immünoenzimatik yöntemiyle belirlendi. Bu yöntemde tavşan monoklonal anti- β hCG-alkalen fosfataz konjugatı içeren bir tepkime kuyucuğuna örnekle birlikte keçi anti-fare IgG:fare monoklonal anti-kompleksleriyle kaplanmış paramanyetik parçacıklar eklenir. Örnekteki hCG katı fazdaki sabitlenmiş anti- β hCG'yle tepkimeye girerken aynı zamanda tavşan anti- β hCG alkalen fosfataz konjugatları da örnekteki hCG'nin değişik antiijenik bölgeleriyle tepkimeye girer. İnkübasyonun sonunda paramanyetik parçacıklara tutunmuş maddeler manyetik alan sayesinde tutulurken diğer maddeler yıkanarak uzaklaştırılır. Daha sonra ortama kemiluminesan madde olarak Lumi-Phos 530 eklenir ve açığa çıkan ışımaya luminometreyle ölçülür. Analit miktarı daha önce oluşturulmuş çok noktalı kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplanır (77).

3.3.3. Dimerik İnhibin A

DİA düzeyi sıralı iki basamaklı immünoenzimatik sandviç yöntemle belirlendi. Bu yöntemde anti-inhibin A monoklonal antikorlarıyla kaplanmış paramanyetik parçacıkların bulunduğu tepkime kuyucuğuna örnek eklenir. Artan örnek ve maddeler yıkanarak uzaklaştırılır. Bir önceki inkübasyonda bağlanan inhibin A moleküllerini belirlemek için tepkime karışımına anti-inhibin A monoklonal antikoru-alkalen fosfataz konjugatı eklenir. İnkübasyon sonrasında katı fazdaki maddeler manyetik alan uygulanarak tutulurken yıkamayla diğer maddeler ortamdan uzaklaştırılır. Daha sonra ortama kemiluminesan substrat Lumi-Phos 530 eklenerek açığa çıkan ışımaya luminometreyle ölçülür. Analit miktarı daha önce oluşturulmuş çok noktalı kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplanır (77).

3.3.4. Serbest Estriol

Serbest Estriol düzeyi yarışmalı bağlanmalı immünoenzimatik yöntemle belirlendi. Estriol-alkalen fosfataz konjugatı içeren tepkime kuyucuğuna örnek, keçi anti-tavşan IgG ile kaplanmış paramanyetik parçacıklar ve poliklonal tavşan anti-estriolü

eklenir. Örnekteki estriol sınırlı miktardaki özgün anti–estriol antikorları üzerindeki bağlanma bölgelerine bağlanmak için estriol–alkalen fosfataz kompleksiyle yarışır. Sonuçta oluşan antijen:antikor kompleksleri katı fazdaki yakalayıcı antikorlarla bağlanır. İnkübasyon sonrasında katı fazdaki maddeler manyetik alan uygulanarak tutulurken yıkamayla diğer maddeler ortamdan uzaklaştırılır. Daha sonra ortama kemiluminesan substrat Lumi–Phos 530 eklenerek açığa çıkan ışıma luminometreyle ölçülür. Analit miktarı daha önce oluşturulmuş çok noktalı kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplanır (77).

3.3.5. Down Sendromu Riskinin Hesaplanması

Elde edilen AFP, total β hCG, DİA ve sE₃ sonuçları, fetal bipariyetal çap temel alınarak hesaplanmış olan gestasyonel haftaya ait medyan değerlerine bölünerek her bir parametreye ait MoM değeri hesapladı. MoM değerleri gebenin vücut ağırlığı, sigara kullanımı, insülin kullanımını gerektiren diyabet, IVF gebeliği ve ırka göre çeşitli düzeltme faktörleriyle çarpılarak düzeltme uygulandı. Düzeltilmiş MoM değerleri risk hesaplama formülünde yerine konarak o fetüse ait DS riski hesaplandı. Yazılım DS riskini ölçüm anında ve termde olmak üzere iki farklı şekilde hesaplayabiliyordu, ancak gebelerin sınıflandırılmasında rutinde de kullanılmakta olan termdeki risk oranı kullanıldı. Bu işlemler Benetech PRA yazılımı aracılığıyla bilgisayar ortamında gerçekleştirildi. DS risk hesabına ek olarak, aynı belirteçlerle fetüsün Trizomi 18 (Edwards Sendromu) ve nöral tüp defekti riskleri de hesaplanmıştı. Trizomi 18 ve nöral tüp defekti risk oranlarının yükseklikleri, araştırmaya dâhil olmama ölçütü olarak işlev gördüler.

3.4. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Ölçülmesi

3.4.1. Malondialdehit Düzeyinin Belirlenmesi

MDA lipit peroksidasyonu sonucunda oluşan ürünler arasında yer alır ve oksidatif stres belirteci olarak sıklıkla kullanılmaktadır. MDA Tiyobarbitürik asit (TBA) ile yüksek sıcaklık altında asidik ortamda tepkimeye girerek pembe renkli bir bileşik

oluşturmaktadır. Bu bileşiğin optik dansitesi 532 nm dalga boyunda ölçülerek MDA düzeyi hesaplanmaktadır (78). MDA dışında çeşitli maddeler de bu tepkimeyi verebileceğinden TBA ile tepkimeye giren maddeler anlamında TBARS olarak da isimlendirilmektedir (79). Bu ölçüm yönteminde kullanılan reaktifler ve hazırlanışları aşağıda belirtilmiştir:

- Fosfat tamponu (pH 6; 100 mM): 2,13 g Na_2HPO_4 ve 11,56 g KH_2PO_4 tartılarak distile suda çözüldükten sonra hacim distile suyla 1 L'ye tamamlandı.
- Trikloroasetik asit (TCA; % 20 w/v): 500 mL 0,6 N HCl içinde 100 g katı TCA çözümlenerek hazırlandı.
- TBA çözeltisi (% 2 w/v): 200 mg katı TBA 10 mL distile suda çözüldü.
- Etil alkol (%95; v/v).

Ölçüm için tablo 3.2'de gösterilen deney düzeneği hazırlandı. Yüksek risk ve düşük risk grupları için üçer adet reaktif körü hazırlandı. Deney tüpleri 30 dakika boyunca kaynar suda inkübe edildikten sonra 20 dakika boyunca 4000 x g'de santrifüj edildi. Ölçüm sırasında kör tüplerine 0,33 mL TBA eklendikten sonra tüm örnek ve kör çözeltilerinin optik dansitesi 532 nm dalga boyunda distile suya karşı okundu.

Hesaplamada MDA standardının verdiği absorbanstan yararlanıldı. Tetraetoksipropan (TEP) MA: 220,3; d=0,92; % 96 (Fluka) MDA standardı olarak kullanıldı. Tetraetoksipropan molaritesinin hesaplanması: Yoğunluğu (d) 0,92 olduğundan 1 litresi 920 g'dir ve % 96'lık bir çözelti olmasından dolayı 883,2 gramı TEP'dir. Molekül ağırlığı 220,3 olduğu için 1 litre TEP stok çözeltisinde 4 mol TEP mevcuttur, bu durumda molaritesi 4 M'dir. Stok çözelti etil alkolle 400.000 kat seyreltilip 10 μM MDA standardı elde edildi. Bu standart çözeltiden 100 μL ve diğer tüm reaktiflerden 1'er mL kullanılarak deney protokolü uygulandı. Standartın OD'si 0,152 ve standart körünün OD'si de 0,090 ölçüldü. Sonuçta $\Delta\text{OD}(\text{Standart})$ 0,062 bulundu. Numunenin OD'sinden körün OD'si çıkarılarak $\Delta\text{OD}(\text{Numune})$ hesaplandıktan sonra aşağıdaki formül yardımıyla MDA düzeyi hesaplandı:

$$\Delta OD(\text{Standart}) / \Delta OD(\text{Numune}) = C(\text{Standart}) / C(\text{Numune})$$

$$C(\text{Numune}) = \Delta OD(\text{Numune}) \times C(\text{Standart}) / \Delta OD(\text{Standart})$$

$$C(\text{Numune}) = \Delta OD(\text{Numune}) \times 10 \mu\text{M (MDA)} / 0,062$$

$$C(\text{Numune}) = \Delta OD(\text{Numune}) \times 161,3 \mu\text{M (MDA)}$$

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/L}) = \Delta OD \times 80,65 \times 1/3(\text{Seyreltme Oranı})$$

Tablo 3.2: MDA düzeyi ölçüm protokolü.

	Örnek	Reaktif Körü
Serum	200 μL	—
Etil Alkol	0,33 mL	0,33 mL
Fosfat Tamponu	0,33 mL	0,33 mL
TCA	0,33 mL	0,33 mL
TBA	0,33 mL	—
30 dakika kaynatma		
20 dakika 4000 x g’de santrifüj		
TBA	—	0,33 mL

3.4.2. Ksantin Oksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

KO enzimi ksantini yıkıma uğratarak ürik asit meydana getirmektedir. Bu ölçüm yönteminin prensibi KO enzim aktivitesi sonucunda açığa çıkan ürik asitin optik dansitesinin 293 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanmaktadır (80). Bu ölçüm yönteminde kullanılan reaktifler ve hazırlanışları aşağıda belirtilmiştir:

- Fosfat Tamponu (pH 7,5; 50 mM fosfat; 0,5 mM Etilendiamintetraasetik asit [EDTA]): 0,5 g KH_2PO_4 , 3 g Na_2HPO_4 ve 93 mg EDTA (Disodyum tuzu, dihidrat) tartılıp distile suda çözülerek toplam hacim 500 mL’ye tamamlandı.
- Ksantin çözeltisi (2 mM): 7,6 mg katı ksantin tartılarak 100 μL 1 N NaOH yardımıyla 25 mL fosfat tamponunda çözüldü.

Tablo 3.3’te gösterilmiş olan deney protokolü hazırlandıktan sonra deney tüpleri oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Örneklerin optik dansitesi 293 nm dalga boyunda kuvars küvet kullanılarak distile suya karşı ölçüldükten sonra oda sıcaklığında inkübasyona devam edildi. İlk okumadan 150 dakika sonra örneklerin optik dansiteleri tekrar okundu. İki ölçüm arasındaki optik dansite farkı ve ürik asitin molar absorpsiyon katsayısından faydalanılarak aşağıdaki formüle göre KO enzim aktivitesi hesaplandı:

$$\epsilon_{\text{ürik asit}}: 10^4 \text{ L x mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$$

$$\Delta OD_{\text{ürik asit}} = \epsilon_{\text{ürik asit}} \times C_{\text{ürik asit}} \times \ell$$

$$C_{\text{ürik asit}} = \Delta OD_{\text{ürik asit}} / (\epsilon_{\text{ürik asit}} \times \ell)$$

$$C_{\text{ürik asit}} = \Delta OD_{\text{ürik asit}} / (10^4 \text{ L x mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1} \times 1 \text{ cm})$$

$$C_{\text{ürik asit}} = \Delta OD_{\text{ürik asit}} / 10^4 \text{ L/mol} = \Delta OD_{\text{ürik asit}} \times 10^{-4} \text{ mol/L}$$

$$C_{\text{ürik asit}} = \Delta OD_{\text{ürik asit}} \times 10^2 \text{ } \mu\text{mol/L}$$

1 IU KO aktivitesi, IU’nun tanımı gereği 1 $\mu\text{mol/dk}$ ürik asit oluşmasını sağlayan enzim aktivitesi olduğundan 1 IU/L KO = 1 $\mu\text{mol}/(\text{dk} \times \text{L})$ ürik asit oluşumuna karşılık gelmelidir.

$$\text{KO (IU/L)} = \Delta OD_{\text{ürik asit}} \times 10^2 \text{ } \mu\text{mol/L} \times [1/t(\text{dakika}^{-1})] \times 30 \text{ (Seyreltme Oranı)}$$

Tepkime süresi 150 dakika olduğundan;

$$\text{KO (IU/L)} = (\Delta OD/150) \times 3000$$

$$\underline{\text{KO aktivitesi (IU/L)} = \Delta OD \times 20}$$

Tablo 3.3: KO enzim aktivitesi ölçüm protokolü.

	Örnek
Fosfat Tamponu	2,8 mL
Ksantin çözeltisi	0,1 mL
Serum	0,1 mL

3.4.3. Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Bu ölçüm yönteminin ilkesi indirgenmiş glutasyon (GSH) ile H_2O_2 'nin GSH-PO enziminin katalizlediği tepkime sonucunda yükseltgenmiş glutasyon (GS-SG) ve H_2O 'ya dönüşmesini takiben GSH redüktaz enziminin GS-SG'yi tekrar indirgerken ortamdaki NADPH'yi NADP'ye yükseltgemesi temeline dayanmaktadır (81). GSH-PO aktivitesiyle GS-SG oluşukça NADPH'nin ortamdaki miktarı azalacağından 340 nm dalga boyunda NADPH absorbansındaki azalma GSH-PO enzim aktivitesiyle doğru orantılıdır. Bu ölçüm yönteminde kullanılan reaktifler ve hazırlanışları aşağıda belirtilmiştir:

- Fosfat tamponu (pH 7; 50 mM fosfat; 5,6 mM EDTA): 4,2 gr Na_2HPO_4 ile 2,72 gr KH_2PO_4 ve 2,08 gr EDTA (Disodyum tuzu, dihidrat) distile suda çözülerek hacim 1 L'ye tamamlandı.
- GSH çözeltisi: 250 mg katı GSH 5 mL fosfat tamponunda çözülerek hazırlandı.
- NADPH: 15 mg tartılıp 2,5 mL fosfat tamponunda çözülerek hazırlandı.
- GSH Redüktaz enzim çözeltisinden 10 μ L alınıp 1 mL 3,2 M amonyum sülfatta seyreltildi.
- Sodyum azid 65 mg tartılıp 5 mL fosfat tamponunda çözüldü.
- H_2O_2 stok çözeltisinden (% 30 v/v) 15 μ L alınıp 5 mL fosfat tamponunda çözüldü.

Spektrofotometre kuvars küvet kullanılarak fosfat tamponuyla 340 nm dalga boyunda sıfırlandı. Hazırlanan reaktifler tablo 3.4'te belirtildiği sırayla küvete

konulduktan sonra 1 dakika süreyle absorbans spektrofotometrenin “rate” modunda izlendi. Elde edilen değer kör değeri idi. Aynı küvete 100 µL H₂O₂ eklenerek 1 dakika daha izlendi. İkinci izlemde elde edilen değer örnek değeri idi. Enzim aktivitesinin hesaplanmasında örnek ve kör değerlerinin farkıyla NADPH’nin molar absorpsiyon katsayısı kullanıldı.

$$\epsilon_{\text{NADPH}}: 6220 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

$$\Delta\text{OD}_{\text{NADPH}} = \epsilon_{\text{NADPH}} \times C_{\text{NADPH}} \times \ell$$

$$C_{\text{NADPH}} = \Delta\text{OD}_{\text{NADPH}} / (\epsilon_{\text{NADPH}} \times \ell)$$

$$C_{\text{NADPH}} = \Delta\text{OD}_{\text{NADPH}} / (6220 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm})$$

$$C_{\text{NADPH}} = \Delta\text{OD}_{\text{NADPH}} / 6220 \text{ L/mol} = \Delta\text{OD}_{\text{NADPH}} \times 1,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$$

$$C_{\text{NADPH}} = \Delta\text{OD}_{\text{NADPH}} \times 1,6 \cdot 10^2 \text{ µmol/L}$$

1 IU GSH–PO aktivitesi, IU’nun tanımı gereği NADPH’nin 1 µmol/dk azalmasını sağlayan enzim aktivitesi olduğundan 1 IU/L GSH–PO = 1 µmol/(dk x L) NADPH değişimine karşılık gelmelidir.

$$\text{GSH–PO (IU/L)} = \Delta\text{OD}_{\text{NADPH}} \times 1,6 \cdot 10^2 \text{ µmol/L} \times [1/t(\text{dakika}^{-1})] \times 30 \text{ (Seyreltme Oranı)}$$

Tepkime süresi 1 dakika olduğundan;

$$\underline{\text{GSH–PO aktivitesi (IU/L)} = \Delta\text{OD} \times 4800}$$

Tablo 3.4: GSH–PO enzim aktivitesi ölçüm protokolü.

	Örnek
Fosfat Tamponu	2,55 mL
GSH	100 µL
NADPH	50 µL
GSH Redüktaz	100 µL
Sodyum Azid	100 µL
Serum	100 µL

3.4.4. Enzimatik Olmayan Süperoksit Radikali Temizleyici Aktivitenin Belirlenmesi

Bu yöntemim esası serumdan protein yapıdaki bileşenler uzaklaştırıldıktan sonra kalan radikal temizleyici bileşenlerin, ksantin – ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan süperoksit radikalının tepkime ortamındaki *nitro blue tetrazolium* (NBT) tuzunu indirgemesini engellemesidir (82,83). Süperoksit radikali tarafından indirgenen NBT mor renkli formazan oluşumuna yol açmakta ve bu bileşiğin optik dansitesi en iyi 560 nm dalga boyunda ölçülmektedir. Ortamda süperoksit radikalini temizleme gücüne sahip maddelerin varlığında bu rengin oluşumunu önlenecektir. Buna göre enzimatik olmayan süperoksit radikali temizleyici aktivite (NSSA) birimi (1 U), NBT'nin indirgenmesini % 50 oranında inhibe eden madde miktarı olarak tanımlanmaktadır. Bu ölçüm yönteminde kullanılan reaktifler ve hazırlanışları aşağıda belirtilmiştir:

- Reaktif 1 (Toplam hacim 490 mL):
 - Ksantin 9,1 mg alınıp distile suda birkaç damla 1 N NaOH ile çözüldü ve toplam hacim 200 mL'ye tamamlandı.
 - NBT: 12,3 mg alınıp distile su ile çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.
 - EDTA (Disodyum tuzu, dihidrat): 25 mg alınıp distile suda çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.
 - Na₂CO₃: 2,54 g alınıp distile suyla 60 mL'ye tamamlandı.

- Bovin albümin: 30 mg alınıp distile suyla çözülerek hacim 30 mL'ye tamamlandı.

Hazırlanan tüm çözeltiler hazırlanış sırasıyla karıştırılarak reaktif tamamlandı.

- Ksantin oksidaz: 26 µL alınarak 6,5 mL 3,2 M amonyum sülfat içinde çözüldü.
- CuCl₂ çözeltisi: 108 mg CuCl₂ tartıldıktan sonra 100 mL distile suda çözülerek hazırlandı.

Serumların içerdiği protein yapıları uzaklaştırmak için 300 µL örnek Eppendorf tüpüne aktarıldıktan sonra üzerine 75 µL % 10 (w/v) TCA eklendi. Örnekler vortekslenildi ve 10.000 *rpm*'de 10 dakika santrifüj edildi. Deney tüpleri tablo 3.5'te gösterildiği şekilde hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Daha sonra örnek ve kör tüplerine CuCl₂ eklendi. Kör tüplerine süpernatant da eklendikten sonra 560 nm dalga boyunda distile suya karşı örneklerin ve körlerin optik dansiteleri ölçüldü. Aşağıdaki formül kullanılarak NSSA hesaplandı:

$$\text{NSSA (U/mL)} = [(\text{Kör OD} - \text{Örnek OD}) / \text{Kör OD}] \times F$$

NSSA aktivite birimi NBT'nin indirgenmesini % 50 oranında inhibe eden madde miktarı olarak ifade edildiğinden $(\text{Kör OD} - \text{Örnek OD}) / \text{Kör OD} = \% 50 = 0,5$ olduğunda NSSA 1 U/mL olacaktır. Yani;

$$1 \text{ U/mL NSSA} = 0,5 \times F$$

F = 2 olarak bulunmuştur. 1 mL'deki aktivite için faktörü 2 olduğundan ve örnek hacmi 0,1 mL olduğundan;

$$F = 2 / 0,1 = 20 \text{ olarak bulundu.}$$

$$\text{NSSA (U/mL)} = [(\text{Kör OD} - \text{Örnek OD}) / \text{Kör OD}] \times F \times 1,25(\text{Seyreltme Oranı})$$

$$\text{NSSA (U/mL)} = [(\text{Kör OD} - \text{Örnek OD}) / \text{Kör OD}] \times 25$$

Tablo 3.5: NSSA ölçüm protokolü.

	Örnek	Kör
Reaktif 1	2,75 mL	2,75 mL
Süpernatant	100 µL	—
Ksantin Oksidaz	50 µL	50 µL
Oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyon		
CuCl₂	100 µL	100 µL
Süpernatant	—	100 µL

3.5. İstatistiksel Değerlendirme Yöntemleri

Elde edilen veriler SPSS 15.0 for Windows yazılımıyla değerlendirildi (84). Yüksek risk ve düşük risk gruplarında, normal dağılım gösteren ve varyansları homojen olan ölçütlere ait sonuçlar (yaş, vücut ağırlığı ve gestasyon haftası) ortalama ve standart sapma olarak belirtildi. Bu değerlerin karşılaştırılmasında iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi (*Student's t-test*) kullanıldı. Parametrik test varsayımlarını karşılamayan ölçütlere ait sonuçlar (MDA, GSH-PO, NSSA, KO) ortalama, ortalamanın standart hatası, ortanca, en düşük ve en yüksek değerler olarak belirtildi. Bu değerlerin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Grupların demografik verilerinin ve dörtlü testte kullanılan biyokimyasal belirteçlerinin MDA, GSH-PO, KO ve NSSA'yla uyumlarını gözlemek amacıyla Spearman korelasyon analizi uygulandı. P<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Prenatal tarama testi uygulanmış ve DS riski eşik değerin üstünde bulunmuş 30 gebe, riski düşük bulunan 30 gebeyle eşleştirildi. Ölçülen belirteçleri etkilemesini engellemek adına, çalışma ve kontrol grubunun yaş, maternal vücut ağırlığı ve gebelik haftası açısından eşleşmesi sağlandı. Gönüllülerin yaş, vücut ağırlığı ve gestasyonel yaş bakımından karşılaştırılmasından elde edilen sonuçlar tablo 4.1’de gösterildi. İstatistiksel değerlendirme *Student’s t-test* ile yapıldı. Yüksek ve düşük risk grupları arasında bu ölçütler bakımından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Gönüllülerin dosyaları incelendiğinde, araştırmanın gerçekleştirildiği süre boyunca hiçbir gebede gebeliğe bağlı komplikasyonlara (gestasyonel diyabet, preeklamps vb.) rastlanmadı. Yüksek risk grubundaki 30 gebeden sekizine, tanısal amniyosentez uygulandığı ve karyotip analizi sonucunda hiçbirinde kromozomal anomali saptanmadığı belirlendi. Ayrıca, gebelerden 6 tanesinin araştırma sona ermeden normal doğumla ya da sezaryen operasyonu ile sağlıklı bebeklere sahip olduğu tespit edildi. Diğer 16 yüksek riskli gebeliğin sonucu hakkında yeterli bilgi elde edilemedi.

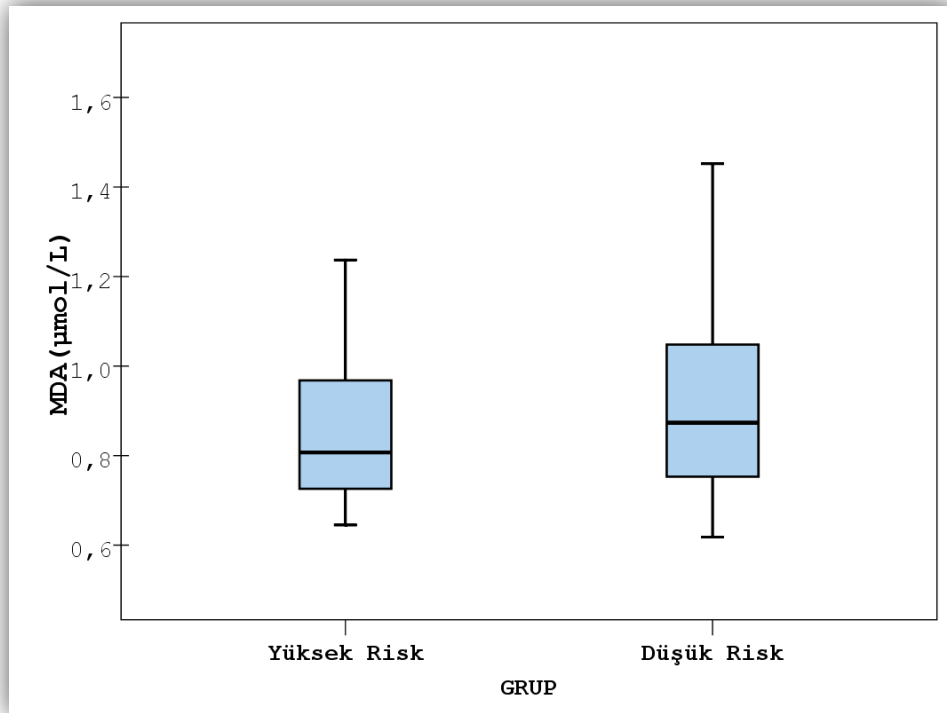
Tablo 4.1: Gönüllülerin yaş, vücut ağırlığı ve gestasyonel yaş değerleri.

	Yüksek Risk Grubu n = 30		Düşük Risk Grubu n = 30		<i>Student’s t-test P değeri</i>
	Ortalama	Standart sapma	Ortalama	Standart sapma	
Yaş (yıl)	30,4	4,5	30,2	4,5	> 0,05
Vücut ağırlığı (kg)	62,9	9,5	63,4	9,8	> 0,05
Gestasyonel yaş (hafta)	17,2	1,2	17,2	1,1	> 0,05

Yüksek risk grubunda MDA düzeyi düşük risk grubuna göre daha düşüktü fakat bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi (0,807–0,874 $\mu\text{mol/L}$; $p>0,05$). İki grubun karşılaştırılmasında Mann–Whitney U testinden yararlanıldı (Tablo 4.2; Şekil 4.1).

Tablo 4.2: Malondialdehit düzeyi.

	MDA ($\mu\text{mol/L}$)		Mann–Whitney U testi P değeri
	Yüksek Risk Grubu	Düşük Risk Grubu	
Ortalama	0,879	0,945	
Ortalamanın standart hatası	0,037	0,046	
Ortanca	0,807	0,874	> 0,05
En düşük – En yüksek değerler	0,645 – 1,479	0,618 – 1,559	

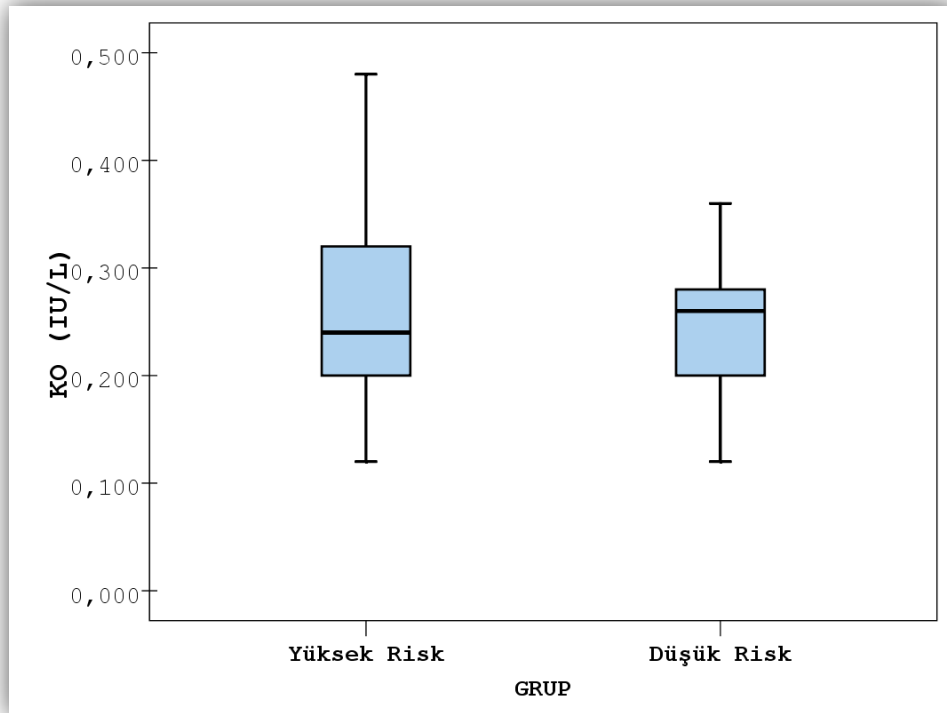


Şekil 4.1: MDA kutu grafiği.

KO enzim aktivitesi, yüksek risk ve düşük risk grupları arasında anlamlı bir farklılık göstermedi. İki grubun karşılaştırılmasında Mann–Whitney U testi kullanıldı (Tablo 4.3; Şekil 4.2).

Tablo 4.3: Ksantin oksidaz enzim aktivitesi.

	KO (IU/L)		
	Yüksek Risk Grubu	Düşük Risk Grubu	Mann–Whitney U testi P değeri
Ortalama	0,269	0,253	
Ortalamanın standart hatası	0,017	0,011	
Ortanca	0,240	0,260	> 0,05
En düşük – En yüksek değerler	0,120 – 0,480	0,120 – 0,420	

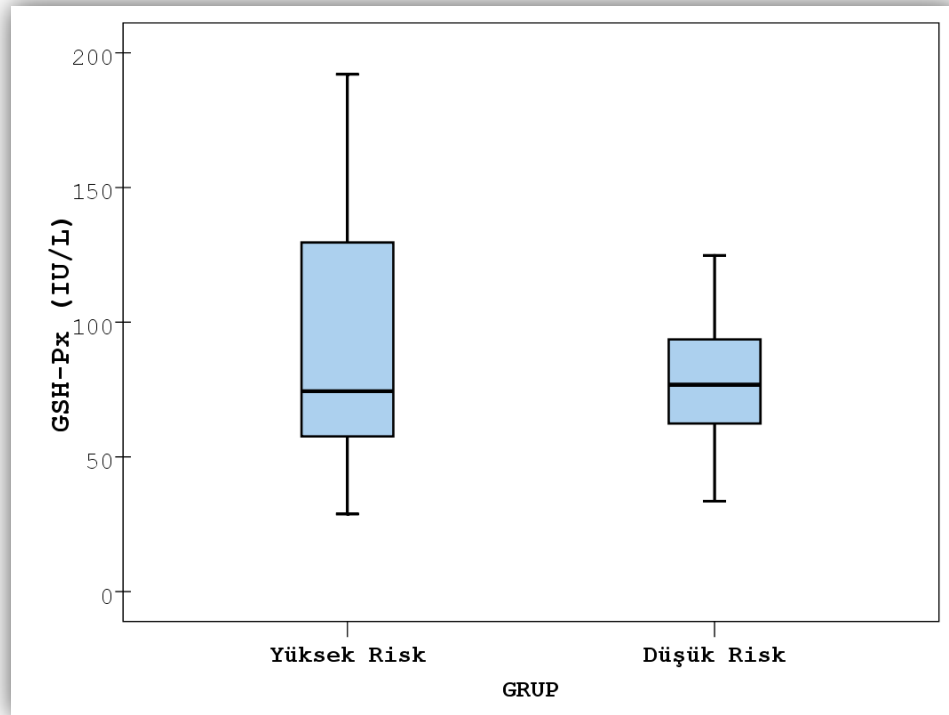


Şekil 4.2: KO kutu grafiği.

Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi yüksek risk ve düşük risk grupları arasında anlamlı bir farklılık göstermedi. Karşılaştırmada Mann–Whitney U testi kullanıldı (Tablo 4.4; Şekil 4.3)

Tablo 4.4: Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi.

	GSH-PO (IU/L)		
	Yüksek Risk Grubu	Düşük Risk Grubu	Mann–Whitney U testi P değeri
Ortalama	88,5	77,5	
Ortalamanın standart hatası	7,7	4,1	
Ortanca	74,4	76,8	> 0,05
En düşük – En yüksek değerler	28,8 – 192,0	33,6 – 124,8	

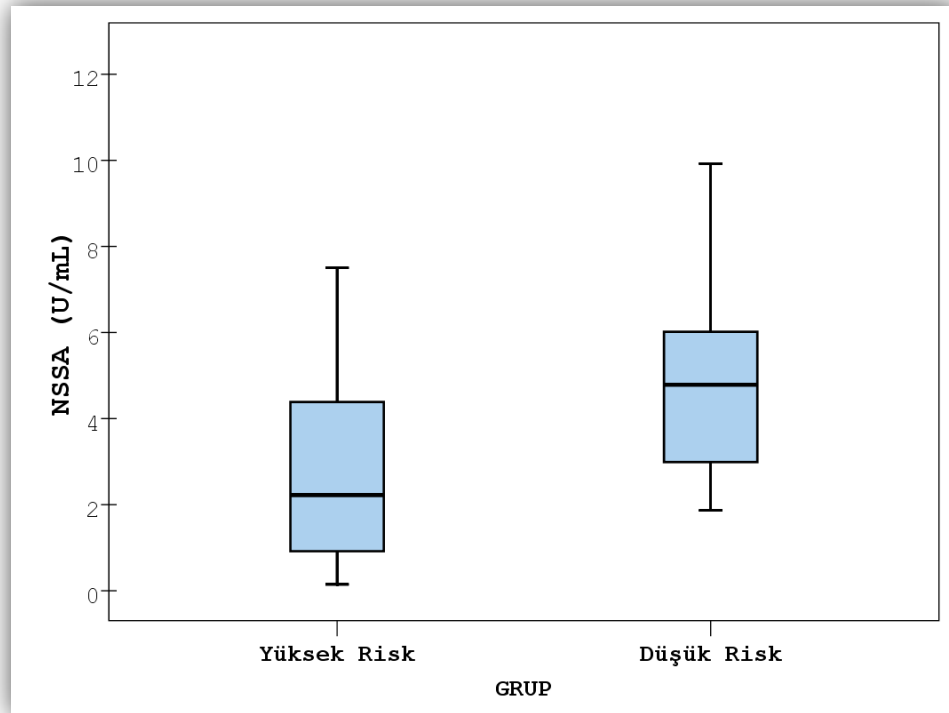


Şekil 4.3: GSH-PO kutu grafiği.

Düşük risk grubunda NSSA, yüksek risk grubuna göre daha yüksekti (4,786–2,224 U/mL; $p=0,006$). İki grubun karşılaştırılmasında Mann–Whitney U testi kullanıldı (Tablo 4.5; Şekil 4.4)

Tablo 4.5: Enzimatik Olmayan Süperoksit Radikali Temizleyici Aktivite.

	NSSA (U/mL)		
	Yüksek Risk Grubu	Düşük Risk Grubu	Mann–Whitney U testi P değeri
Ortalama	3,114	4,784	
Ortalamanın standart hatası	0,788	0,386	
Ortanca	2,224	4,786	0,006
En düşük – En yüksek değerler	0,148 – 12,207	1,869 – 9,923	



Şekil 4.4: NSSA kutu grafiği.

Çalışmaya katılan tüm gönüllülerin verilerine Spearman korelasyon analizi uygulanarak oksidatif stres belirteçleri ve antioksidan sistem bileşenleriyle gönüllülerin demografik verileri ve dörtlü test parametreleri arasındaki ilişkiler araştırıldı.

Çalışma grubunda MDA düzeyinin vücut ağırlığı arttıkça ve gestasyon haftası ilerledikçe yükseldiği (sırasıyla p değerleri 0,017 ve 0,042; r değerleri 0,47 ve 0,37), yine KO enzim aktivitesinin gestasyon haftası ilerledikçe yükseldiği (p=0,002, r=0,56) görüldü (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: Yüksek risk grubunda oksidan/antioksidan parametrelerin istatistiksel olarak anlamlı korelasyonları.*

	MDA		KO	
	<i>Spearman Test</i> P değeri	<i>Korelasyon katsayısı</i> r	<i>Spearman Test</i> P değeri	<i>Korelasyon katsayısı</i> r
Vücut Ağırlığı	0,017	0,47	—	—
Gestasyon Haftası	0,042	0,37	0,002	0,56

* istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan ilişkiler belirtilmedi.

Çalışma ve kontrol grupları birlikte ele alınarak yapılan korelasyon analizinin sonuçları tablo 4.7’de gösterildi. Gestasyon haftasıyla MDA düzeyi ve KO enzim aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı, aynı yönde orta derecede bir ilişki tespit edildi (sırasıyla p<0,001 ve p=0,007; r=0,52 ve r=0,35). Total β hCG düzeyiyle MDA düzeyi ve NSSA arasında istatistiksel olarak anlamlı, ters yönde zayıf bir ilişki tespit edildi (sırasıyla p = 0,046 ve p = 0,013; r = -0,26 ve r = -0,38)

Tablo 4.7: Tüm gönüllüler birlikte ele alındığında oksidan/antioksidan parametrelerin istatistiksel olarak anlamlı korelasyonları.*

	MDA		KO		NSSA	
	<i>Spearman Test</i> P değeri	<i>Korelasyon katsayısı</i> r	<i>Spearman Test</i> P değeri	<i>Korelasyon katsayısı</i> r	<i>Spearman Test</i> P değeri	<i>Korelasyon katsayısı</i> r
Total βhCG	0,046	-0,26	—	—	0,013	-0,38
Gestasyon Haftası	< 0,001	0,52	0,007	0,35	—	—

* istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan ilişkiler belirtilmedi.

Bulguları özetleyecek olursak;

1. Gruplar arasında yaş, vücut ağırlığı ve gebelik haftası bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi.
2. NSSA, yüksek risk grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu.
3. MDA düzeyi, KO ve GSH-PO enzim aktiviteleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi.
4. Çalışma ve kontrol grupları birlikte değerlendirildiğinde, total β hCG düzeyiyle MDA ve NSSA arasında istatistiksel olarak anlamlı, ters yönlü bir ilişki bulundu. Total β hCG – MDA ilişkisi zayıfken total β hCG NSSA ile orta düzeyde ilişkiliydi.
5. Hem çalışma grubunda hem de iki grup birlikte ele alındığında gestasyon haftası arttıkça oksidatif belirteçlerden MDA düzeyinin ve KO enzim aktivitesinin arttığı tespit edildi.
6. Yüksek riskli gebelerin MDA düzeyleriyle vücut ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı aynı yönlü bir ilişki saptandı.

5. TARTIŞMA

Down Sendromu insanlarda mental retardasyonun en sık karşılaşılan genetik nedenidir. Yaklaşık her 700 canlı doğumdan birinde görülmektedir, konsepsiyonda bu oran daha da yüksektir. DS'nin yol açtığı mental sorunların yanında etkilenen organ ve sistemlerde ortaya çıkan belirtiler de mücadele edilmesi gereken sorunlara eklenmektedir (Tablo 2.2). Yıllar içinde DS'den etkilenmiş bir fetüs taşıma olasılığı yüksek olan gebeliklerin belirlenmesi ve bu gebelere erken aşamada çeşitli seçenekler sunulabilmesi adına zaman içinde farklı prenatal tarama yöntemleri geliştirilmiş ve uygulanmıştır (5,36,37,39,41,67).

Gebelikte oksidatif stres, çeşitli klinik durumlarla ilişkili bulunmuştur. Bunlar arasında intrauterin gelişme geriliği, gestasyonel hipertansiyon, pre-eklampsi, gestasyonel diyabet başlıcalarıdır (85–87). Ayrıca, DS'den etkilenmiş gebeliklerde meydana gelen oksidatif stresle ilgili çeşitli veriler mevcuttur. Bildiğimiz kadarıyla, prenatal tarama testleri sonucunda DS'den etkilenmiş fetüs taşıma riski eşik değerin üstünde bulunan annelerin serumlarındaki oksidasyon belirteçlerini ve antioksidan savunma elemanlarını inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

Ognibene ve ark. 1999 yılında yayınladıkları bir bildiride, SOD enziminin alt tiplerinden CuZn-SOD'yi kodlayan genin 21. kromozomda yerleşmiş olması ve DS'de aşırı eksprese edilmesinden yola çıkarak, DS'den etkilenmiş gebeliklerde anne serumunda SOD enzim aktivitesini irdelemişlerdir. Amniyosentezle DS tanısı konulmuş gebeliklerde geriye dönük olarak maternal serumları incelemişler ve DS'den etkilenmiş fetüs taşıyan 9 annenin ortalama serum SOD enzim aktivitesini kontrol grubunu oluşturan 80 annenin ortalamasına göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Yazarlar SOD enzim aktivitesinin maternal serumda neden yüksek bulunduğuyula ilgili bir öngöründe bulunmazken bu testin ek bir prenatal tarama belirteci olarak kullanılabileceği yönünde görüş bildirmişlerdir (12). Daha sonra Cuckle ve ark. benzer bir çalışmada DS olduğu amniyosentezle kesinleştirilmiş 4 anneden aldıkları serumlarda SOD aktivitesini 15 kişilik kontrol grubuyla karşılaştırmışlar ve DS'den etkilenmiş gebeliklerin ortalama SOD enzim

aktivitelerinin anlamlı olarak yükseldiğini bildirmişlerdir. Yazarlar bu aktivite artışının olası nedeninin fetüsteki oksidatif stres artışına verilen maternal yanıt olduğu ve bu tepkinin gebeliğin devam ettirilmesine katkısı olduğunu öne sürmüşlerdir (88).

Perrone ve ark. ileri anne yaşı nedeniyle amniyosentez yapılan 89 kişi üzerinde yapılan bir çalışmada, 56 normal gebeliği, 23 fetal gelişme geriliği ve 10 DS gebeliğiyle karşılaştırarak amniyosentez sırasında elde edilen amniyotik sıvı örneklerinde serbest radikal aracılığıyla gerçekleşen lipid peroksidasyonunun belirteçlerinden olan izoprostan düzeylerini karşılaştırmışlardır. İzoprostan düzeyinin DS'den etkilenmiş gebelerin amniyotik sıvılarında normal gebeliklerle karşılaştırıldığında 9 kat daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (10). Perluigi ve ark. 10 DS gebeliğinden ve 10 normal gebelikten elde ettikleri amniyon sıvılarında yaptıkları çalışma sonucunda, DS'li gebeliklerden elde edilmiş amniyon sıvılarında protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu belirteçlerinin belirgin olarak yükseldiğini bildirmişlerdir (11).

Meguid ve ark. yaptıkları bir çalışmada daha önceden DS'li bebek dünyaya getirmiş annelerin serumlarında TBARS düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Buna ek olarak DS'li bebek dünyaya getirmiş annelerin in vivo antioksidan özelliklere sahip oldukları bilinen E ve C vitamini düzeyleri ile yine SOD aktivitesinde yardımcı görev üstlenen bakır ve çinko düzeyleri düşük bulunmuştur. Bu annelerin homosistein düzeylerinin de kontrole göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir. Yazarlar bu verilerden yola çıkarak anormal folat ve homosistein metabolizmasının DS için risk faktörü olduğunu ve DS'li bebek dünyaya getiren annelerin oksidan/antioksidan dengesinin bozulduğunu öne sürmüşlerdir (89).

Sulthana ve ark. 31 DS'li çocuk üzerinde yaptıkları araştırmanın sonucunda enzimatik olmayan antioksidanlar arasında yer alan redükte glutatyonun ve total antioksidan statusun DS'li çocuklarda, yaş ve cinsiyet bakımından eşleştirilmiş kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bu

düşüklüğün DS'li çocuklarda oksidatif strese neden olduğunu öne sürmüşlerdir. Ortaya çıkan oksidatif stresin önüne geçmek adına DS'li çocuklara antioksidan desteğin mümkün olan en erken zamanda verilmeye başlanması gerektiğini bildirmişlerdir (90).

Czeizel ve ark.ın Macaristan'da yaptığı 1980 – 1996 yıllarını kapsayan bir vaka–kontrol çalışmasında doğum kayıtları incelenerek 781 DS'li gebelik, eşleşmiş kontrol grubuyla, 38151 kişilik sağlıklı toplum grubuyla ve 22843 kişilik konjenital anomaliye sahip hasta grubuyla karşılaştırılarak incelenmiştir. Bu araştırmanın sonuçlarına göre ilk trimesterde folik asit ve demiri birlikte kullanan annelerin DS'li bebek sahibi olma riski azalmaktadır (düzeltilmiş odds oranı 0,4 [% 95 güven aralığı 0,2–0,7]). İlk trimesterde antioksidan vitamin desteği alma oranıysa çok düşük olarak bildirilmiştir (91).

Araştırmamızın bulguları arasında DS'den etkilenmiş bir fetüse sahip olma açısından yüksek risk taşıyan gebelerin serumlarındaki enzimatik olmayan süperoksit radikali temizleyici aktivitenin (NSSA) düşük risk taşıyan gebelere göre anlamlı olarak düşük bulunması öne çıkmaktadır. Azalmış NSSA, çalışma grubundaki gebelerin daha fazla oksidatif strese maruz kaldığını ve antioksidan kapasitede azalma meydana geldiğini düşündürmüştür. NSSA'nın hangi fizyopatolojik mekanizmaya bağlı olarak azaldığı veya enzimatik olmayan antioksidanlardan hangilerinin bu azalmadan esas olarak sorumlu olduğu hakkında elimizde veri bulunmamaktadır. Gebelikte oksidatif stresin artışı daha önce de belirtildiği gibi pek çok klinik durumla ilişkilendirilmiştir (85–87). Fakat antioksidan kapasitenin azalmasının temelde neyi ifade ettiğiyle ilgili kayda değer bir bilgiye rastlanılamamıştır. NSSA'nın azalması, yüksek risk grubunda oksidatif stres oluştuğunu düşündürmektedir, fakat yüksek risk ve düşük risk gruplarının MDA düzeyleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiş olması lipid peroksidasyon ürünlerinin serumda gözlenebileceği kadar ileri düzeyde oksidatif stres oluşmadığına işaret etmektedir. Meguid ve ark. tıbbi geçmişlerinde DS'li bebek dünyaya getirme öyküsü olan annelerin serumlarında, enzimatik olmayan antioksidanlar arasında saydığımız vitaminlerden α tokoferol ve askorbik asit düzeylerinin belirgin derecede düşük olduğunu göstermişlerdir (89). Dolayısıyla

enzimatik olmayan antioksidanların düzeyindeki azalma, DS'li bebek sahibi olma riskinin artmasıyla paralel seyretmektedir. Araştırmamızda DS'li fetüs sahibi olma riski yüksek olan grupta NSSA'nın azalmış olması, enzimatik olmayan antioksidan kapasitedeki azalmayı göstermektedir ve bu bulgu Meguid ve ark.ın çalışmasıyla uyumludur. Meguid ve ark. konsepsiyon dolaylarında annelerin folik asit ve antioksidan besinlerle desteklenmesini kuvvetle önermektedir. NSSA serumun enzimatik aktivite haricinde sahip olduğu antioksidan kapasiteyi gösterdiğinden, azalması halinde dışarıdan antioksidan besin desteği verilerek antioksidan kapasitedeki bu eksiklik giderilebilir. Bulgularımız enzimatik olmayan antioksidan kapasitede gözlenen bu azalma nedeniyle gebelik süresince dışarıdan besinsel antioksidan desteği verilmesinin faydalı olabileceğini düşündürmüştür. Bu öngörümüz Czeizel ve ark.'ın gebelikte özellikle ilk trimesterde antioksidan vitamin desteği verilmesinin faydalı etkileri olabileceği yönündeki görüşüyle ve Meguid ve ark. konsepsiyon dolaylarında annelerin antioksidan besinlerle desteklenmesi gerektiğini bildiren görüşleriyle örtüşmektedir (91). Czeizel ve ark. folat metabolizmasında çekirdekdeki gen mutasyonlarına ek olarak mitokondriyal gen mutasyonlarıyla DS insidansı arasında kurulan ilişkilerin geçerli olduğunun kabul edilmesi halinde gebelik öncesinde yüksek doz folik asit desteğiyle birlikte antioksidanların kullanılmasının, DS'nin primer önlenmesine yardımcı olabileceğini öne sürmüşlerdir (91). DS vakalarının büyük çoğunluğunun maternal gametogenezin mayoz I aşamasında gerçekleşen *nondisjunction* nedeniyle oluştuğu ispatlanmıştır. Fakat *nondisjunction*ın oositler henüz fetal hayattayken mayoz I'e girdiğinde mi, yoksa ovulasyon gerçekleşirken mayoz I'in tamamlanması sırasında mı gerçekleştiği hakkında çelişkili bilgiler mevcuttur (92,93). Bu nedenle perikonsepsiyonel dönemde antioksidan desteği sağlanmasının, DS'nin primer olarak engellenmesini sağlayacağını bildirilmesi akıllara soru işaretleri gelmesine neden olmaktadır. Antioksidanların DS üzerindeki bu olası rolünü tam olarak ortaya koymak için daha geniş çalışmalar gerekmektedir. Yine de yüksek riskli gebelerin azalmış antioksidan kapasiteleri bu popülasyonun antioksidan besin desteğinden fayda göreceğini düşündürmüştür. Araştırmamızda NSSA ile ilgili ek bir bulgu da total β hCG ile aralarında anlamlı bir negatif korelasyon saptanmış olduğudur ve aralarındaki ilişkinin orta derecede kuvvetli olduğu görülmüştür. Bu veriye göre total β hCG

yükseldikçe NSSA azalmaktadır. Total β hCG düzeyi yükseldikçe DS riskinin arttığı bilinmektedir (5). Yani DS riski yüksek gebelerdeki NSSA DS riskiyle ters orantılıdır. Fakat çalışmamızda her iki grupta da DS risk oranıyla NSSA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Bunun olası nedenlerinden birisi, DS riskinin sadece total β hCG değerine göre hesaplanmıyor olması olabilir. Çalışmamızda dörtlü testte kullanılan diğer biyokimyasal ve demografik belirteçler de DS risk hesabında kullanılmakta ve çok sayıda parametrenin birlikte değerlendirilmesiyle ortaya tek bir DS riski çıkmaktadır. Bir diğer olası nedense, DS risk hesabının MoM değerleri üzerinden yapılmasına karşın, NSSA için elimizde gebelik haftalarına göre ortanca değerleri bulunmadığından NSSA'nın MoM değerinin hesaplanamamış olması olabilir. Pek çok biyokimyasal parametre gebelik haftası ilerledikçe değişimler göstermektedir ve araştırmamızda NSSA'nın gebelik haftasıyla nasıl değişim gösterdiğini irdelemek için yeterli miktarda veri elde edilmemiştir (Şekil 2.2). Eğer araştırmamızın tasarımı NSSA'nın normal şekilde seyreden gebeliklerde haftalık değişimini ortaya koyacak ve gebelik haftalarına göre ortanca değerlerini hesaplayacak genişlikte yapılmış olsaydı bu değerlendirme de yapılabilirdi.

Çalışma ve kontrol grupları arasında MDA düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. GSH-PO ve KO enzim aktivitesi de iki grup arasında anlamlı farklılık göstermemektedir. Çalışma grubunda enzimatik olmayan süperoksit radikali temizleme gücünün azalmış olması, antioksidan kapasitede bir düşüşe işaret etmektedir. Fakat MDA düzeyinin, GSH-PO ve KO enzim aktivitelerinin belirgin bir değişikliğe uğramamış olması oksidatif stresin enzim aktivitelerini etkileyecek düzeyde ve antioksidan savunma engellerini aşarak lipid peroksidasyonu ürünlerinin anlamlı derecede yükselmesine neden olacak şiddette olmadığına işaret edebilir. Oksidatif stres gebeliğin seyri sırasında karşılaşılabilen çeşitli komplikasyonlara da eşlik edebilmektedir. Örneğin preeklampside serum MDA düzeyi artmakta, SOD ve GSH-PO enzim aktiviteleriyle antioksidan vitaminlerden C ve E vitamini düzeyleri azalmaktadır (94). Jakovljevic ve ark. sigara içmeyen komplikasyonsuz 31 ilk trimester gebeliğini 29 kişilik gebe olmayan kontrol grubuyla kıyaslamışlardır. Gebe olmayan sağlıklı kontrol grubunun tamamı sigara

içiyor olmasına karşın gebe grubunun ortalama serum MDA düzeyinin anlamlı olarak yüksek olduğunu bildirmişlerdir (95). Dosya taramalarımıza göre çalışma ve kontrol gruplarında gestasyonel diyabet, preeklampsi gibi komplikasyonlarla seyreden bir gebelik bulunmamaktadır. Araştırmamızda DS açısından yüksek riskli ve düşük riskli gebe grupları arasında serum MDA düzeyleri, GSH-PO ve KO aktiviteleri arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir fakat bu etkenlerin gebe olmayanlara göre anlamlı derecede değişikliğe uğrayıp uğramadığı incelenmemiştir. Yüksek risk ve düşük risk gruplarında serumda MDA düzeyi, KO ve GSH-PO enzim aktivitesiyle NSSA değişkenlerini yaş ve vücut ağırlığı bakımından eşleştirilmiş sağlıklı ve gebe olmayan bir kontrol grubunda da test edilmiş olsaydı, düşük risk grubunda gözlenen düzeylerin ve aktivitelerin anlamlı derecede değişim gösterip göstermediği de belirlenebilirdi.

Araştırmamızın bulgularına göre hem çalışma grubunda hem de iki grup birlikte ele alındıklarında, MDA düzeyi ve KO enzim aktivitesi gebelik haftası ilerledikçe artmaktadır. KO enzim aktivitesinde görülen artış yüksek risk grubunda daha belirgindir. Her iki grup ele alındığında MDA düzeyi gebelik haftasıyla daha güçlü bir korelasyon göstermektedir. Çalışmaya dâhil olan tüm gönüllüler 15 ile 19^{6/7} gebelik haftaları arasındadır. Bulgularımız bu haftalarda maternal serumda oksidatif stresin giderek yükseldiğini göstermektedir. NSSA ve GSH-PO enzim aktivitesinin gebelik haftasıyla aralarında anlamlı bir birliktelik gözlenmemiştir. Oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki bu dengesizliğin neden ortaya çıktığı kesin olarak bilinmemektedir. Oksidatif strese neden olan kronik inflamasyon, endotel disfonksiyonu gibi klinik durumlara ait çeşitli belirteçlerin (IL-6, hsCRP vb.) düzeylerinin belirlenmesi, gebelik haftası ilerledikçe ortaya çıkan bu oksidatif stres artışının kaynağını bulmamıza yardımcı olabilirdi. Gönüllülerin serumlarında 8-hidroksi-2-deoksiguanozin, izoprostan gibi farklı oksidatif hasar belirteci düzeylerinin de araştırılması çalışmanın bu bulgusunu değerlendirmeyi daha kolay hale getirebilirdi.

Yüksek risk grubunda serum MDA düzeyiyle gönüllülerin vücut ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı, pozitif yönde bir birliktelik belirlenmiştir. Van Gaal ve

ark. TBARS ile vücut kitle indeksi arasında anlamlı bir ilişki bulunduğunu daha önce bildirmişlerdir. Çalışmalarında TBARS düzeyleriyle lipit düzeyleri arasında hem obez hem de obez olmayan bireylerde anlamlı bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, TBARS oluşumuyla vücut kitle indeksinin, vücut ağırlığının ve bel–kalça oranının yakından ilişkili olduğunu, TBARS düzeyinin HDL kolesterol düzeyiyle de ters orantı gösterdiğini bildirmişlerdir (96). Bizim araştırmamızda gönüllülerin serum lipoprotein ve trigliserit düzeyleri üzerinde bir dosya araştırması ya da tarama yapılmamıştır. Gönüllülerin vücut kitle endeksleri de hesaplanmamıştır. Dolayısıyla MDA düzeyinde vücut ağırlığının artmasıyla birlikte görülen aynı yönlü değişimin lipoprotein düzeylerindeki farklılıklardan, vücut kitle indeksi ve bel–kalça oranındaki farklılıklardan ya da bilmediğimiz başka bir etkenden kaynaklandığı kesinliğe kavuşturulamamıştır. Fakat bulgularımız Van Gaal ve ark.’ın bulgularıyla örtüşmektedir. Prázný ve ark. obezitenin bilinmeyen bir işleyişle daha yüksek oksidatif strese yol açtığını bunun da MDA düzeyiyle ifade bulunduğunu öne sürmüşlerdir (97). Araştırmamızda yüksek risk grubunda serum MDA düzeyiyle maternal vücut ağırlığı arasında gözlemlediğimiz birliktelik Prázný ve ark.’ın bulgularıyla örtüşmekte fakat her iki grup ele alındığında MDA ile vücut ağırlığı arasında birliktelik bulmamış olmamız bu çalışmayla çelişmektedir.

Sonuç olarak, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Down Sendromlu fetüs sahibi olma riski eşik değerin üzerinde bulunan gebelerin serumlarında enzimatik olmayan antioksidan kapasitenin azaldığı, fakat oksidatif hasar belirteçlerinden MDA düzeyinde anlamlı bir değişiklik oluşmadığı görülmektedir. Bununla birlikte serum MDA düzeyi ve oksidan etkinlik gösteren enzimlerden KO’nun serum aktivitesi gebelik haftası ilerledikçe artma eğilimi göstermektedir. Bu bulgular ışığında, tüm gebelerin antioksidan bakımından zengin doğal besinlerle desteklenmelerinin yararlı olacağı söylenebilir.

6. SONUÇLAR

1. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, Down Sendromlu fetüs sahibi olma riski eşik değerin üzerinde olan gebelerin serumlarında NSSA belirgin şekilde azalmıştır, fakat MDA düzeylerinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bu bulgu DS'den etkilenmiş fetüse sahip olma riski eşik değerin üzerinde olan gebelerin önemli miktarda oksidatif strese maruz kaldığına, ancak bu durumun lipid peroksidasyonuna yol açacak şiddette olmadığına işaret etmektedir.
2. Oksidatif belirteçlerden MDA düzeyi ve KO enzim aktivitesi ikinci trimesterde gebelik haftası ilerledikçe artma eğilimi göstermektedirler.
3. Gebelik sürecinde enzimatik olmayan antioksidan kapasitede gözlenen azalma nedeniyle, diyetle doğal besinsel antioksidan içeriğinin zenginleştirilmesi faydalı bir yaklaşım olabilir.

ÖZET

Prenatal Dörtlü Tarama Testinde Down Sendromu Riski Eşik Değerin Üstünde Çıkan Gebelerin Serumlarında Oksidan/Antioksidan Durumun Araştırılması

Down Sendromu (DS) insanlarda 21. kromozomun triploidisi, translokasyonu veya mozaizmi sonucunda gelişen genetik temelli ve çok etkenli bir sağlık ve toplum sorunudur. DS'ye prenatal tanı konulabilmektedir ve invaziv tanısal testlerin uygulanacağı riskli popülasyonun belirlenmesi için prenatal tarama testleri uygulanmaktadır. Bunlar arasında dörtlü test, ikinci trimester gebeliklerinde en yaygın olarak uygulanan testlerdendir. Gebelikte maternal oksidatif stres artışının preeklampsi, gestasyonel diyabet, düşük doğum ağırlığı, intrauterin gelişme geriliği gibi çeşitli durumlarla birliktelikleri daha önce gösterilmiştir, fakat yüksek fetal DS riski taşıyan gebeliklerde maternal oksidatif stres ve antioksidan sistem hakkında yeterince bilgi elde edilememiştir. Bu çalışmada DS riski eşik değerin üstünde olan gebelerin serumlarında oksidan/antioksidan durumun ortaya konması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarında dörtlü testi çalışılmış gebeler arasında DS riski eşik değerin üstünde bulunmuş 30 gebe (çalışma grubu), DS riski eşik değerin altında olan ve yaş, vücut ağırlığı ve gebelik haftası bakımından 30 kişilik kontrol grubuyla eşleştirilmiştir. Tüm gebelerin serumlarında malondialdehit (MDA) düzeyi, ksantin oksidaz (KO) aktivitesi, glutatyon peroksidaz (GSH-PO) aktivitesi ve enzimatik olmayan süperoksit radikali temizleyici aktivite (NSSA) spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir. İstatistiksel değerlendirmede Mann-Whitney U testi ve Spearman korelasyon analizi kullanılmıştır. $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Araştırmanın bulgularına göre çalışma grubunda NSSA, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında belirgin olarak azalmıştır ($p=0,006$). Her iki grup arasında MDA düzeyleri, KO ve GSH-PO aktiviteleri bakımından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). Her iki grup birlikte ele alındığında, MDA düzeyinin ve KO enzim aktivitesinin gebelik haftası ilerledikçe artma eğiliminde olduğu belirlenmiştir (sırasıyla $p<0,001$ ve $p=0,007$).

Sonuç olarak, kontrol grubuna kıyasla DS riski eşik değerin üzerinde bulunan gebelerin serumlarında enzimatik olmayan antioksidan kapasitede önemli bir azalma meydana gelmekte, fakat bu duruma lipid peroksidasyonu eşlik etmemektedir. İkinci trimesterde oksidatif stres belirteçleri giderek artma eğilimi göstermektedir. Bu sonuçlara göre, gebelik sürecinde doğal besinsel antioksidan desteği sağlanması yararlı bir yaklaşım olabilir.

Anahtar Sözcükler: Antioksidanlar, Down sendromu, gebelik, oksidatif stres, prenatal tarama.

SUMMARY

Investigation of Oxidant/Antioxidant Status in Sera from Pregnant at High Risk of Carrying a Down Syndrome–Affected Fetus According to Prenatal Quadruple Test

Down Syndrome (DS) is a genetic–based multifactorial health and society problem caused by the triploidy, translocation or mosaicism of chromosome 21 in humans. DS can be prenatally diagnosed and several screening tests are used to identify the risky population before carrying out invasive diagnostic procedures. Quadruple test is one of the most commonly used screening options in second trimester. The association between increased maternal oxidative stress in pregnancy and some gestational complications and events such as preeclampsia, gestational diabetes, intrauterine growth retardation and low birth weight are well documented, however adequate information could not be obtained about oxidative stress and antioxidant system in pregnancies at a high risk of carrying a DS–affected fetus. In this study, it has been aimed to establish oxidant/antioxidant status in sera from pregnant above threshold for DS risk in this research.

For this purpose, 30 pregnant that were above threshold for DS risk (study group) were chosen from pregnant whose quadruple tests were studied at Ankara University Faculty of Medicine İbni Sina Research and Practice Hospital Central Laboratory and have been matched for age, body weight and gestational weight with a control group consisting of 30 pregnant who were below threshold for DS risk. Malondialdehyde (MDA) levels, xanthine oxidase (XO) and glutathione peroxidase (GSH–Px) enzyme activities and non–enzymatic superoxide radical scavenger activity (NSSA) were detected in sera of all pregnant. Mann–Whitney U and Spearman correlation tests were used for the statistical analysis. Values of p lower than 0.05 were considered statistically significant.

It was found that NSSA was markedly decreased in the study group as compared to that of the control group ($p=0.006$). There was no statistically significant difference between two groups regarding to MDA levels, XO and GSH–Px activities ($p>0.05$). When two groups were handled together, MDA levels and XO enzyme activities had a tendency to increase with gestational week ($p<0.001$ and $p=0.007$ respectively).

In conclusion, there is a significant decrease in non–enzymatic antioxidant capacity of sera obtained from pregnant that were above threshold for DS risk as compared to the control group. However, this decrease is not accompanied with lipid peroxidation. Oxidative stress biomarkers show a trend of increase in second trimester. In the context of these results, dietary natural antioxidant supplementation might be a useful approach during gestation.

Keywords: Antioxidants, Down syndrome, oxidative stress, pregnancy, prenatal screening.

KAYNAKLAR

1. Megarbane A, Ravel A, Mircher C, Sturtz F, Grattau Y, Rethore MO, Delabar JM, Mobley WC. The 50th anniversary of the discovery of trisomy 21: the past, present, and future of research and treatment of Down syndrome. *Genet Med*. 2009;11(9):611–616.
2. Perluigi M, Butterfield DA. The identification of protein biomarkers for oxidative stress in Down syndrome. *Expert Rev Proteomics*. 2011;8(4):427–429.
3. Zana M, Janka Z, Kalman J. Oxidative stress: a bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2007;28(5):648–676.
4. Roper RJ, Reeves RH. Understanding the basis for Down syndrome phenotypes. *PLoS Genet*. 2006;2(3):e50.
5. Wald NJ, Rodeck C, Hackshaw AK, Walters J, Chitty L, Mackinson AM. First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS). *Health Technol Assess*. 2003;7(11):1–77.
6. Wald NJ, Hackshaw AK. Advances in antenatal screening for Down syndrome. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2000;14(4):563–580.
7. Zitnanova I, Korytar P, Sobotova H, Horakova L, Sustrova M, Pueschel S, Durackova Z. Markers of oxidative stress in children with Down syndrome. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(3):306–310.
8. Jovanovic SV, Clements D, MacLeod K. Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome. *Free Radic Biol Med*. 1998;25(9):1044–1048.
9. Ishihara K, Amano K, Takaki E, Ebrahim AS, Shimohata A, Shibazaki N, Inoue I, Takaki M, Ueda Y, Sago H, Epstein CJ, Yamakawa K. Increased lipid peroxidation in Down's syndrome mouse models. *J Neurochem*. 2009;110(6):1965–1976.
10. Perrone S, Longini M, Bellieni CV, Centini G, Kenanidis A, De Marco L, Petraglia F, Buonocore G. Early oxidative stress in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. *Clin Biochem*. 2007;40(3–4):177–180.
11. Perluigi M, di Domenico F, Fiorini A, Cocciolo A, Giorgi A, Foppoli C, Butterfield DA, Giorlandino M, Giorlandino C, Schinina ME, Coccia R.

Oxidative stress occurs early in Down syndrome pregnancy: A redox proteomics analysis of amniotic fluid. *Proteomics Clin Appl*. 2011;5(3–4):167–178.

12. Ognibene A, Ciuti R, Tozzi P, Messeri G. Maternal serum superoxide dismutase (SOD): a possible marker for screening Down syndrome affected pregnancies. *Prenat Diagn*. 1999;19(11):1058–1060.
13. Down JL. Observations on an ethnic classification of idiots. . *Lond Hosp Clin Lect Rep*. 1866(3):259–262.
14. Bernal JE, Briceno I. Genetic and other diseases in the pottery of Tumaco–La Tolita culture in Colombia–Ecuador. *Clin Genet*. 2006;70(3):188–191.
15. Martinez–Frias ML. The real earliest historical evidence of Down syndrome. *Am J Med Genet A*. 2005;132A(2):231.
16. Levitas AS, Reid CS. An angel with Down syndrome in a sixteenth century Flemish Nativity painting. *Am J Med Genet A*. 2003;116A(4):399–405.
17. Ward OC. Further early historical evidence of Down syndrome. *Am J Med Genet A*. 2004;126A(2):220.
18. Allen G. Aetiology of Down's syndrome inferred by Waardenburg *Nature*. 1932;250(465):436–437.
19. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children. *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1956(248):1721–1722.
20. Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, Toyoda A, Ishii K, Totoki Y, Choi DK, Groner Y, Soeda E, Ohki M, Takagi T, Sakaki Y, Taudien S, Blechschmidt K, Polley A, Menzel U, Delabar J, Kumpf K, Lehmann R, Patterson D, Reichwald K, Rump A, Schillhabel M, Schudy A, Zimmermann W, Rosenthal A, Kudoh J, Schibuya K, Kawasaki K, Asakawa S, Shintani A, Sasaki T, Nagamine K, Mitsuyama S, Antonarakis SE, Minoshima S, Shimizu N, Nordsiek G, Hornischer K, Brant P, Scharfe M, Schon O, Desario A, Reichelt J, Kauer G, Blocker H, Ramser J, Beck A, Klages S, Hennig S, Riesselmann L, Dagand E, Haaf T, Wehrmeyer S, Borzym K, Gardiner K, Nizetic D, Francis F, Lehrach H, Reinhardt R, Yaspo ML. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*. 2000;405(6784):311–319.
21. Collins VR, Muggli EE, Riley M, Palma S, Halliday JL. Is Down syndrome a disappearing birth defect? *J Pediatr*. 2008;152(1):20–24, 24 e21.
22. Kang Y, Dong X, Zhou Q, Zhang Y, Cheng Y, Hu R, Su C, Jin H, Liu X, Ma D, Tian W, Li X. Identification of novel candidate maternal serum protein markers

- for Down syndrome by integrated proteomic and bioinformatic analysis. *Prenat Diagn.* 2012;32(3):284–292.
23. Morris JK, Wald NJ, Watt HC. Fetal loss in Down syndrome pregnancies. *Prenat Diagn.* 1999;19(2):142–145.
 24. Spencer K. What is the true fetal loss rate in pregnancies affected by trisomy 21 and how does this influence whether first trimester detection rates are superior to those in the second trimester? *Prenat Diagn.* 2001;21(9):788–789.
 25. Canfield MA, Honein MA, Yuskiv N, Xing J, Mai CT, Collins JS, Devine O, Petrini J, Ramadhani TA, Hobbs CA, Kirby RS. National estimates and race/ethnic-specific variation of selected birth defects in the United States, 1999–2001. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2006;76(11):747–756.
 26. Loane M, Morris JK, Addor MC, Arriola L, Budd J, Doray B, Garne E, Gatt M, Haeusler M, Khoshnood B, Klungsoyr Melve K, Latos-Bielenska A, McDonnell B, Mullaney C, O'Mahony M, Queisser-Wahrendorf A, Rankin J, Rissmann A, Rounding C, Salvador J, Tucker D, Wellesley D, Yevtushok L, Dolk H. Twenty-year trends in the prevalence of Down syndrome and other trisomies in Europe: impact of maternal age and prenatal screening. *Eur J Hum Genet.* 2012. doi: 10.1038/ejhg.2012.94.
 27. Irving C, Basu A, Richmond S, Burn J, Wren C. Twenty-year trends in prevalence and survival of Down syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(11):1336–1340.
 28. Sherman SL, Allen EG, Bean LH, Freeman SB. Epidemiology of Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2007;13(3):221–227.
 29. Freeman SB, Allen EG, Oxford-Wright CL, Tinker SW, Druschel C, Hobbs CA, O'Leary LA, Romitti PA, Royle MH, Torfs CP, Sherman SL. The National Down Syndrome Project: design and implementation. *Public Health Rep.* 2007;122(1):62–72.
 30. Sherman SL, Freeman SB, Allen EG, Lamb NE. Risk factors for nondisjunction of trisomy 21. *Cytogenet Genome Res.* 2005;111(3–4):273–280.
 31. Lamb NE, Yu K, Shaffer J, Feingold E, Sherman SL. Association between maternal age and meiotic recombination for trisomy 21. *Am J Hum Genet.* 2005;76(1):91–99.
 32. Hall JG. Chromosomal Clinical Abnormalities. In: Kliegman R, Nelson WE, editors. *Nelson textbook of pediatrics* 19th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2011. p. 382–391.

33. Amano K, Sago H, Uchikawa C, Suzuki T, Kotliarova SE, Nukina N, Epstein CJ, Yamakawa K. Dosage-dependent over-expression of genes in the trisomic region of Ts1Cje mouse model for Down syndrome. *Hum Mol Genet.* 2004;13(13):1333–1340.
34. Li CM, Guo M, Salas M, Schupf N, Silverman W, Zigman WB, Husain S, Warburton D, Thaker H, Tycko B. Cell type-specific over-expression of chromosome 21 genes in fibroblasts and fetal hearts with trisomy 21. *BMC Med Genet.* 2006;7:24.
35. Antonarakis SE, Epstein CJ. The challenge of Down syndrome. *Trends Mol Med.* 2006;12(10):473–479.
36. Summers AM, Langlois S, Wyatt P, Wilson RD. Prenatal screening for fetal aneuploidy. *J Obstet Gynaecol Can.* 2007;29(2):146–179.
37. Cuckle HS, Wald NJ, Lindenbaum RH. Maternal serum alpha-fetoprotein measurement: a screening test for Down syndrome. *Lancet.* 1984;1(8383):926–929.
38. Davis RO, Cosper P, Huddleston JF, Bradley EL, Finley SC, Finley WH, Milunsky A. Decreased levels of amniotic fluid alpha-fetoprotein associated with Down syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 1985;153(5):541–544.
39. Petrocik E, Wassman ER, Kelly JC. Prenatal screening for Down syndrome with maternal serum human chorionic gonadotropin levels. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;161(5):1168–1173.
40. Burton BK, Prins GS, Verp MS. A prospective trial of prenatal screening for Down syndrome by means of maternal serum alpha-fetoprotein, human chorionic gonadotropin, and unconjugated estriol. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;169(3):526–530.
41. Cuckle HS. Measuring unconjugated estriol in maternal serum to screen for fetal down syndrome. *Clin Chem.* 1992;38(9):1687–1689.
42. Wenstrom KD, Owen J, Chu DC, Boots L. Elevated second-trimester dimeric inhibin A levels identify Down syndrome pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;177(5):992–996.
43. Eddleman KA, Malone FD, Sullivan L, Dukes K, Berkowitz RL, Kharbutli Y, Porter TF, Luthy DA, Comstock CH, Saade GR, Klugman S, Dugoff L, Craigo SD, Timor-Tritsch IE, Carr SR, Wolfe HM, D'Alton ME. Pregnancy loss rates after midtrimester amniocentesis. *Obstet Gynecol.* 2006;108(5):1067–1072.

44. Seppo A, Frisova V, Ichetovkin I, Kim Y, Evans MI, Antsaklis A, Nicolaides KH, Tafas T, Tsipouras P, Kilpatrick MW. Detection of circulating fetal cells utilizing automated microscopy: potential for noninvasive prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies. *Prenat Diagn.* 2008;28(9):815–821.
45. Saker A, Benachi A, Bonnefont JP, Munnich A, Dumez Y, Lacour B, Paterlini–Brechot P. Genetic characterisation of circulating fetal cells allows non–invasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *Prenat Diagn.* 2006;26(10):906–916.
46. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert–Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, van den Boom D, Bombard AT, Deciu C, Grody WW, Nelson SF, Canick JA. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med.* 2011;13(11):913–920.
47. Wald NJ, Huttly WJ, Hackshaw AK. Antenatal screening for Down's syndrome with the quadruple test. *Lancet.* 2003;361(9360):835–836.
48. Cleary–Goldman J, Berkowitz RL. First trimester screening for Down syndrome in multiple pregnancy. *Semin Perinatol.* 2005;29(6):395–400.
49. Ruoslahti E, Seppala M. Studies of carcino–fetal proteins: physical and chemical properties of human alpha–fetoprotein. *Int J Cancer.* 1971;7(2):218–225.
50. Gitlin D, Perricelli A, Gitlin GM. Synthesis of –fetoprotein by liver, yolk sac, and gastrointestinal tract of the human conceptus. *Cancer Res.* 1972;32(5):979–982.
51. Kjessler B, Johansson SG. Monitoring of the development of early pregnancy by determination of alpha–fetoprotein in maternal serum and amniotic fluid samples. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl.* 1977;69:5–14.
52. Birken S. Chemistry of human choriogonadotropin. *Ann Endocrinol (Paris).* 1984;45(4–5):297–305.
53. Kardana A, Elliott MM, Gawinowicz MA, Birken S, Cole LA. The heterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG). I. Characterization of peptide heterogeneity in 13 individual preparations of hCG. *Endocrinology.* 1991;129(3):1541–1550.
54. Check JH, Weiss RM, Lurie D. Analysis of serum human chorionic gonadotrophin levels in normal singleton, multiple and abnormal pregnancies. *Hum Reprod.* 1992;7(8):1176–1180.
55. Lockwood GM, Muttukrishna S, Ledger WL. Inhibins and activins in human ovulation, conception and pregnancy. *Hum Reprod Update.* 1998;4(3):284–295.

56. Muttukrishna S. Role of inhibin in normal and high-risk pregnancy. *Semin Reprod Med.* 2004;22(3):227–234.
57. Robertson DM, Cahir N, Burger HG, Mamers P, Groome N. Inhibin forms in serum from postmenopausal women with ovarian cancers. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1999;50(3):381–386.
58. Iczkowski KA, Bostwick DG, Roche PC, Cheville JC. Inhibin A is a sensitive and specific marker for testicular sex cord–stromal tumors. *Mod Pathol.* 1998;11(8):774–779.
59. Aitken DA, Wallace EM, Crossley JA, Swanston IA, van Pareren Y, van Maarle M, Groome NP, Macri JN, Connor JM. Dimeric inhibin A as a marker for Down's syndrome in early pregnancy. *N Engl J Med.* 1996;334(19):1231–1236.
60. Gornall AG. *Applied biochemistry of clinical disorders.* 2nd ed. Philadelphia: Lippincott; 1986;507-508.
61. Williams RH, Wilson JD, Foster DW. *Williams' textbook of endocrinology.* 8th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1992; 983-985.
62. Hurley PA, Ward RH, Teisner B, Iles RK, Lucas M, Grudzinskas JG. Serum PAPP–A measurements in first-trimester screening for Down syndrome. *Prenat Diagn.* 1993;13(10):903–908.
63. Nicolaides KH, Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *BMJ.* 1992;304(6831):867–869.
64. Macri JN, Spencer K, Aitken D, Garver K, Buchanan PD, Muller F, Boue A. First-trimester free beta (hCG) screening for Down syndrome. *Prenat Diagn.* 1993;13(7):557–562.
65. Zhang J, Lambert–Messerlian G, Palomaki GE, Canick JA. Impact of smoking on maternal serum markers and prenatal screening in the first and second trimesters. *Prenat Diagn.* 2011;31(6):583–588.
66. Neveux LM, Palomaki GE, Larrivee DA, Knight GJ, Haddow JE. Refinements in managing maternal weight adjustment for interpreting prenatal screening results. *Prenat Diagn.* 1996;16(12):1115–1119.
67. Wald NJ, Watt HC, Hackshaw AK. Integrated screening for Down's syndrome on the basis of tests performed during the first and second trimesters. *N Engl J Med.* 1999;341(7):461–467.

68. Wald NJ, Rudnicka AR, Bestwick JP. Sequential and contingent prenatal screening for Down syndrome. *Prenat Diagn.* 2006;26(9):769–777.
69. Odibo AO, Schoenborn JA, Haas K, Macones GA. Does the combination of fronto–maxillary facial angle and nasal bone evaluation improve the detection of Down syndrome in the second trimester? *Prenat Diagn.* 2009;29(10):947–951.
70. McGee DC. Evaluation of first–trimester tricuspid regurgitation for Down syndrome screening. *J Perinat Neonatal Nurs.* 2008;22(4):282–290; quiz 292–283.
71. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997;82(2):291–295.
72. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford New York: Clarendon Press ; Oxford University Press; 1999.
73. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 2000;108(8):652–659.
74. Pastor MC, Sierra C, Dolade M, Navarro E, Brandi N, Cabre E, Mira A, Seres A. Antioxidant enzymes and fatty acid status in erythrocytes of Down's syndrome patients. *Clin Chem.* 1998;44(5):924–929.
75. Cuckle HS, Wald NJ, Thompson SG. Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha–fetoprotein level. *Br J Obstet Gynaecol.* 1987;94(5):387–402.
76. Benetech Prenatal Risk Assessment. Toronto, Canada: Benetech Clinical Software Solutions; 2008.
77. Beckman Coulter Access Family of Immunoassay Systems, Assay Inserts [CD–ROM] 2006.
78. Dahle LK, Hill EG, Holman RT. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch Biochem Biophys.* 1962;98:253–261.
79. Guillen–Sans R, Guzman–Chozas M. The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1998;38(4):315–330.
80. Hashimoto S. A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. *Anal Biochem.* 1974;62(2):426–435.

81. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967;70(1):158–169.
82. Ozturk HS, Cimen MY, Cimen OB, Kacmaz M, Durak I. Oxidant/antioxidant status of plasma samples from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 1999;19(1–2):35–37.
83. Durak I, Canbolat O, Kacmaz M, Ozgen G, Ozturk HS. Antioxidant interferences in superoxide dismutase activity methods using superoxide radical as substrate. *Clin Chem Lab Med.* 1998;36(6):407–408.
84. SPSS 15.0 for Windows. 15.0 ed. Chicago: SPSS Inc.; 2006.
85. Bazowska G, Jendryczko A. Concentration of malondialdehyde (MDA) in amniotic fluid and maternal and cord serum in cases of intrauterine growth retardation. *Zentralbl Gynakol.* 1994;116(6):329–330.
86. Rogers MS, Wang CC, Tam WH, Li CY, Chu KO, Chu CY. Oxidative stress in midpregnancy as a predictor of gestational hypertension and pre-eclampsia. *BJOG.* 2006;113(9):1053–1059.
87. Lappas M, Hiden U, Desoye G, Froehlich J, Hauguel-de Mouzon S, Jawerbaum A. The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(12):3061–3100.
88. Cuckle H, Arbuzova S. Maternal blood superoxide dismutase in Down syndrome. *Prenat Diagn.* 2000;20(4):354–355.
89. Meguid NA, Dardir AA, El-Sayed EM, Ahmed HH, Hashish AF, Ezzat A. Homocysteine and oxidative stress in Egyptian children with Down syndrome. *Clin Biochem.* 2010;43(12):963–967.
90. Sulthana SM, Kumar SN, Sridhar MG, Bhat BV, Rao KR. Levels of Non Enzymatic Antioxidants in Down Syndrome. *Indian J Pediatr.* 2012. doi: 10.1007/s12098-012-0795-8.
91. Czeizel AE, Puho E. Maternal use of nutritional supplements during the first month of pregnancy and decreased risk of Down's syndrome: case–control study. *Nutrition.* 2005;21(6):698–704; discussion 774.
92. Oliver TR, Feingold E, Yu K, Cheung V, Tinker S, Yadav–Shah M, Masse N, Sherman SL. New Insights into Human Nondisjunction of Chromosome 21 in Oocytes. *PLoS Genet.* 2008;4(3):e1000033.

93. Thurmon TF. Maternal use of nutritional supplements during the first month of pregnancy and decreased risk of Down's syndrome. *Nutrition*. 2005;21(6):774.
94. Hung JH. Oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. *J Chin Med Assoc*. 2007;70(10):430–432.
95. Jakovljevic B, Novakov–Mikic A, Brkic S, Bogavac MA, Tomic S, Miler V. Lipid peroxidation in the first trimester of pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012;25(8):1316–1318.
96. Van Gaal LF, Zhang A, Steijaert MM, De Leeuw IH. Human obesity: from lipid abnormalities to lipid oxidation. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1995;19 Suppl 3:S21–26.
97. Prazny M, Skrha J, Hilgertova J. Plasma malondialdehyde and obesity: is there a relationship? *Clin Chem Lab Med*. 1999;37(11–12):1129–1130.

EK 1: Etik Kurul Kararı

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI								
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Prenatal dörtlü tarama testinde Down Sendromu riski eşik değerin üstünde çıkan gebelerin serumlarında oksidan/antioksidan durumun araştırılması						
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU							
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Erdiç DEVRİM						
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya						
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı						
	DESTEKLEYİCİ							
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ							
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	☐					
		FAZ 2	☐					
		FAZ 3	☐					
	FAZ 4	☐						
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐						
	Yüksek Doz Araştırması	☐						
	Diğer ise belirtiniz: Laboratuvar Araştırması							
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ	☐	ÇOK MERKEZLİ	☒	ULUSAL	☐	ULUSLARARAS	☐



05 Ocak 2012

01012012

Sayfa 1

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	19.12.2011	01	Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐		
	ILAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:42-896	Tarih: 26 Aralık 2011		
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
Başkanın Unvanı / Adı / Soyadı:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	F ☒ K ☐	F ☐ H ☒	F ☒ H ☐	
Prof.Dr.Cihan YURDAYDIN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	F ☒ K ☐	F ☐ H ☒	F ☒ H ☐	
Prof.Dr.Ahmet DEMIRKAZIK	Tıbbi Onkoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	F ☒ K ☐	F ☐ H ☒	F ☒ H ☐	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY	Farmakoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	F ☒ K ☐	F ☐ H ☒	F ☒ H ☐	
Prof.Dr.Nuhan PURALI	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	F ☒ K ☐	F ☐ H ☒	F ☒ H ☐	
Prof.Dr.Cem ATBAŞOĞLU	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	F ☒ K ☐	F ☐ H ☒	F ☒ H ☐	
Prof.Dr.Hakan UNCU	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	F ☒ K ☐	F ☐ H ☒	F ☒ H ☐	
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	F ☒ K ☐	F ☐ H ☒	F ☒ H ☐	
Prof.Dr.Serap SIVRI	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	F ☐ K ☒	F ☐ H ☒	F ☒ H ☐	
Prof.Dr.Muharem ÖZEN	Hukuk	A.Ü. Hukuk Fakültesi	F ☒ K ☐	F ☐ H ☒	F ☒ H ☐	
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	F ☐ K ☒	F ☐ H ☒	F ☒ H ☐	
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	F ☐ K ☒	F ☐ H ☒	F ☒ H ☐	
Yrd.Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyostatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	F ☐ K ☒	F ☐ H ☒	F ☒ H ☐	
Öğr.Gör.Dr.Volkan KAVAS	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü. Tıp Fakültesi	F ☒ K ☐	F ☐ H ☒	F ☒ H ☐	
Gülşüm ASLAN	Arkeoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	F ☐ K ☒	F ☐ H ☒	F ☒ H ☐	

* Toplantıda Bulunma

EK 2: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Versiyon No: 2

Versiyon Tarihi: 30.12.2011

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sayın

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda "**Gebelikte Dörtlü Tarama Testinde Down Sendromu Riski Yüksek Çıkan Gebelerin Kanlarında Oksidan/Antioksidan Durumun Araştırılması**" adında bir çalışma yapılmaktadır. Bu araştırma amaçlı bir çalışmadır.

Günümüzde gebeliğin seyri sırasında görülebilen istenmeyen çeşitli tıbbi durumlarla vücudumuzdaki oksidan/antioksidan denge sistemi arasında ilişkiler gösterilmiştir. Bu istenmeyen tıbbi durumlar arasında gebelik şekeri (gestasyonel diyabet) ve gebelik zehirlenmesi (preeklampsi/ eklampsi) sayılabilir. Yine gebeliğin seyri sırasında hem anneyi hem bebeği yakından ilgilendiren durumlardan biri de bebeğin Down Sendromu denilen genetik bir hastalıkla doğma ihtimalidir. Dörtlü Tarama Testi, bebeğinizin Down Sendromuna ve diğer bazı bozukluklara sahip olarak dünyaya gelme riskinin hesaplandığı bir incelemedir. Bu tarama testinde bebeklerinin Down Sendromu riski topluma göre belirli bir değerin üstünde çıkan annelerin kanlarındaki oksidan/antioksidan sistemin durumuyla ilgili bizim araştırmalarımıza göre güncel bilimsel literatürde (yazılı ve görsel bilimsel ortamda) yapılmış araştırma bulunmamaktadır. Araştırmamızın bu alandaki boşluğu doldurması amaçlanmıştır. Bu araştırma sayesinde gebelerde uygulanan "Dörtlü Tarama Testi" sonucuna göre Down Sendromu açısından düşük ve yüksek riskli gebelerin oksidan/antioksidan sistemlerinin durumunun ortaya konulması ve yeni bilimsel veriler üretilmesi hedeflenmektedir.

Bu araştırmada, sizin "Dörtlü Tarama Testiniz" Merkez Laboratuvarında normal şekilde çalışılacaktır. Dörtlü Tarama Testinizin çalışıldıktan sonra, arta kalan kanınızda Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında vücudunuzdaki oksidan stresi gösteren testlerden malondialdehit ve ksantin oksidaz, vücudunuzun antioksidan savunma durumunu gösteren testlerden de süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz adındaki testler çalışılacaktır. Adı geçen testler araştırma amaçlı testlerdir. Bu araştırmada sizin vücudunuza zarar verecek hiçbir ek girişimde (invaziv girişim) bulunulmayacaktır. Araştırmaya katılmaya karar vermeniz halinde normalde "Dörtlü Tarama Testi" için vermiş olduğunuz kan haricinde sizden hiçbir ek test materyali (kan, idrar, BOS, amniyon sıvısı vb.) istenmeyecektir. "Dörtlü Tarama Testi" sonucunuza göre Down Sendromu riski yüksek çıkan annelerin kanları test grubunu, Down Sendromu riski düşük çıkan annelerin kanları kontrol grubunu oluşturacaktır.

Bu araştırmaya katılmanız zorunlu değildir, tamamen sizin isteğinize bağlıdır. İsteddiğiniz zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkınızı kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebilirsiniz veya araştırmadan çekilebilirsiniz. Araştırmaya dahil olma şartları;

- 18 yaşını doldurmuş, 38 yaşından gün almamış olması
- 15. ile 22. gebelik haftaları arasında olması
- İkiz veya üçüz gebelik sahibi olmaması
- Gebeliğinde sigara içmemiş olması
- İnsülin kullanmıyor olması
- Gebeliğin tüp bebek gibi yardımcı üreme teknikleriyle gerçekleştirilmemiş olmasıdır.

Bu şartları yerine getiremeyen, araştırmaya katılmak istemeyen ya da araştırmaya katılmış olup daha sonra çekilmek isteyen gönüllüler araştırma kapsamına alınmayacaktır.

Bu araştırmaya katılıp katılmamanız "Dörtlü Tarama Testi" sonucunuzu etkilemeyecektir. Herhangi bir rahatsızlık oluşturacak işleme tabi tutulmayacaksınız. Bu araştırma nedeniyle hiçbir risk ya da rahatsızlığa maruz bırakılmayacaksınız. Bu araştırma sizin için hiçbir ek risk taşımamaktadır.

Sizden alınmış olan kanlarda, yukarıda adı geçen araştırma amaçlı testler haricinde hiçbir ek çalışma yapılmayacaktır, genetik analiz vb. değerlendirmelere tabi tutulmayacaktır. Kanlarınız Ankara

Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı haricinde hiçbir yere götürülmeyecektir, ülke dışına gönderilmeyecektir.

Araştırmaya katılmaya karar vermeniz durumunda sizden fazladan kan alınmayacaktır, "Dörtlü Tarama Testi" sonuçlarınızda hiçbir değişiklik olmayacaktır, size ya da bebeğinize yeni, farklı ya da deneysel bir tedavi/işlem uygulanmayacaktır.

Araştırmaya katılmaya karar vermeniz halinde size veya sosyal güvenlik kurumunuza (Emekli Sandığı, SGK, Yeşil Kart, özel sigorta vb.) herhangi bir ek mali yük getirilmeyecektir. Bunun yanında, araştırmaya katılmanız halinde size ek bir tıbbi ya da mali fayda da sağlanmayacaktır.

Araştırmacılar, Etik Kurul, Sağlık Bakanlığı ve diğer ilgili sağlık otoriteleri araştırmaya katılmanız halinde orijinal tıbbi kayıtlarınıza erişebileceklerdir, ancak bu bilgileriniz kesinlikle gizli tutulacaktır. Yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla siz veya yasal temsilciniz söz konusu erişime izin vermiş olacaksınız. İlgili mevzuat gereğince kimliğinizi ortaya çıkaracak bütün kayıtlar gizli tutulacaktır, kamuoyuna açıklanmayacaktır; araştırma sonuçlarımızın bilimsel ortamda yayımlanması halinde dahi kimliğiniz gizli kalacaktır.

Bu araştırmaya ilk etapta 60 gebenin katılması öngörülmektedir.

Bu araştırmayla ilgili her türlü soru ve sorunuzla ilgili Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma görevlilerinden **Dr. Oğuz Han EDEBAL**'la 24 saat iletişime geçebilirsiniz. Kendisine ulaşabileceğiniz **telefon numarası 0530 607 8401**'dir. Elektronik ileti adresi **oguzhanedebal@gmail.com**'dur.

OLUR FORMU:

Ben

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın Adı Soyadı:	Tarih: ... / ... / 2011	İmza
Adres:	Telefon: 0 0	
Doktor Adı Soyadı: Araş. Gör. Dr. Oğuz Han EDEBAL	Tarih: ... / ... / 2011	İmza
Adres: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Morfoloji Yerleşkesi Dekanlık Binası 1. Kat Sıhhiye/ANKARA	Telefon: 0 530 6078401 0 312 5958268	
(Varsa)Tanıklık Eden Adı Soyadı:	Tarih: ... / ... / 2011	İmza
Adres:	Telefon: 0 0	

EK 3: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Prenatal Tarama Testleri Bilgi ve İstem Formu

	T.C. ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANELERİ MERKEZ LABORATUVARLARI Prenatal Tarama Testleri Bilgi ve İstem Formu				
	Tarih : .../.../...				
<table style="width:100%; border: none;"> <tr> <td style="width:60%;"> Annenin Adı Soyadı : Ev Tel : 0 Irkı : ☐ Beyaz ☐ Diğer Doğum tarihi (gün/ay/yıl) :/...../..... Son adet tarihi (gün/ay/yıl) :/...../..... Örneğin alındığı tarih (gün/ay/yıl) :/...../..... Vücut ağırlığı : kg İnsüline Bağımlı Diyabet : ☐ Var ☐ Yok Bu gebelikte sigara kullanımı : ☐ Var ☐ Yok Bu gebelik IVF ile mi gerçekleşti? : ☐ Evet ☐ Hayır Daha önce annenin Down sendromlu bebek sahibi olma öyküsü : ☐ Var ☐ Yok Anne veya baba Down sendromlu mu? : ☐ Evet ☐ Hayır Fetüsün anne, baba, kardeş veya akrabalarında Nöral Tüp Defekti öyküsü : ☐ Var ☐ Yok Gravida : Para : Diğer risk faktörleri : </td> <td style="width:40%;"> Protokol No : Cep Tel : 05..... Kan grubu : Örnek No : Varsa açıklayınız : Varsa açıklayınız : </td> </tr> </table>				Annenin Adı Soyadı : Ev Tel : 0 Irkı : ☐ Beyaz ☐ Diğer Doğum tarihi (gün/ay/yıl) :/...../..... Son adet tarihi (gün/ay/yıl) :/...../..... Örneğin alındığı tarih (gün/ay/yıl) :/...../..... Vücut ağırlığı : kg İnsüline Bağımlı Diyabet : ☐ Var ☐ Yok Bu gebelikte sigara kullanımı : ☐ Var ☐ Yok Bu gebelik IVF ile mi gerçekleşti? : ☐ Evet ☐ Hayır Daha önce annenin Down sendromlu bebek sahibi olma öyküsü : ☐ Var ☐ Yok Anne veya baba Down sendromlu mu? : ☐ Evet ☐ Hayır Fetüsün anne, baba, kardeş veya akrabalarında Nöral Tüp Defekti öyküsü : ☐ Var ☐ Yok Gravida : Para : Diğer risk faktörleri :	Protokol No : Cep Tel : 05..... Kan grubu : Örnek No : Varsa açıklayınız : Varsa açıklayınız :
Annenin Adı Soyadı : Ev Tel : 0 Irkı : ☐ Beyaz ☐ Diğer Doğum tarihi (gün/ay/yıl) :/...../..... Son adet tarihi (gün/ay/yıl) :/...../..... Örneğin alındığı tarih (gün/ay/yıl) :/...../..... Vücut ağırlığı : kg İnsüline Bağımlı Diyabet : ☐ Var ☐ Yok Bu gebelikte sigara kullanımı : ☐ Var ☐ Yok Bu gebelik IVF ile mi gerçekleşti? : ☐ Evet ☐ Hayır Daha önce annenin Down sendromlu bebek sahibi olma öyküsü : ☐ Var ☐ Yok Anne veya baba Down sendromlu mu? : ☐ Evet ☐ Hayır Fetüsün anne, baba, kardeş veya akrabalarında Nöral Tüp Defekti öyküsü : ☐ Var ☐ Yok Gravida : Para : Diğer risk faktörleri :	Protokol No : Cep Tel : 05..... Kan grubu : Örnek No : Varsa açıklayınız : Varsa açıklayınız :				
PRENATAL TARAMA TESTİ HASTA BİLGİLENDİRME FORMUNU OKUDUM.		HASTANIN İMZASI :			
İSTENİLEN TARAMA TESTİ					
☐ 510473 İkili Tarama Testi : (βhCG + PAPP-A) 11 HAFTA – 13 HAFTA 3 GÜN ARASINDA Ultrasonografi bilgileri USG tarihi :/...../..... CRL değeri : mm (41 – 84 mm) NT : mm Nazal kemik : ☐ Var ☐ Yok Fetüs sayısı : ☐ 1 ☐ 2					
☐ 517346 Dörtlü Tarama Testi : (βhCG + AFP + uE ₃ + İNHİBİN A) 14 HAFTA – 22 HAFTA 6 GÜN ARASINDA Ultrasonografi bilgileri USG tarihi :/...../..... BPD değeri : mm (26,5 – 55 mm) Fetüs sayısı : ☐ 1 ☐ 2					
Dikkat çeken diğer bulgular :		Doktor Kaşesi ve İmzası			
PRENATAL TARAMA TESTLERİNİN DAHA DOĞRU DEĞERLENDİRİLEBİLMESİ İÇİN İSTEM FORMUNDAKİ BİLGİLERİN EKSİKSİZ DOLDURULMASI GEREKMEKTEDİR.					

PRENATAL TARAMA TESTİ HASTA BİLGİLENDİRME FORMU

İKİLİ TARAMA TESTİ NEDİR?

Down sendromu (Trizomi 21) ve Trizomi 18, bebeklerde görülebilen kalıtsal hastalıklardır. İkili tarama testi, Down sendromu ve Trizomi 18 adı verilen genetik bozuklukları taşıyan bebeklerin anne karnındayken belirlenmesine yardımcı olan bir tarama testidir. Bu test adı geçen bozukluklar için tanı koydurmaz. Bir risk hesabı yapılmasını sağlar ve kesin tanıyı koyduracak testlerin yapılması kararının verilmesine yardımcı olur.

İkili Tarama Testi Nasıl Yapılır?

Bu tarama testi 2 ayrı değişkenin birlikte değerlendirilmesiyle gerçekleştirilir:

1. Bebeğin ensesinin arka kısmında bulunan sıvı kısmın kalınlığının ölçülmesi (fetal ense kalınlığı)
2. Annenin kanında gebelik hormonu (β hCG) ve gebeliğe özgü plazma proteini-A (PAPP-A) testlerinin yapılması

Gebelikte 11 hafta – 13 hafta 3 gün arasında anneye bu iki test uygulanarak elde edilen sonuçlar bir bilgisayar programı ile değerlendirilir. Ayrıca, ultrasonografi sonuçları ve diğer risk faktörleri de kullanılarak bebek için bir risk hesaplaması yapılır.

Test Sonuçları Nasıl Değerlendirilir?

Tarama testi sonucunda hesaplanan risk değeri aynı yaş grubundaki gebelerin beklenen risk düzeyiyle karşılaştırılarak değerlendirilir.

DÖRTLÜ TARAMA TESTİ NEDİR?

Down sendromu (Trizomi 21) ve Trizomi 18, bebeklerde görülebilen kalıtsal hastalıklardır. Nöral tüp insanlarda beyinden başlayıp omuriliği de içine alacak şekilde gelişim gösteren yapıdır. Çeşitli nedenlerden dolayı bu yapının gelişiminde ortaya çıkabilecek sorunlar nöral tüp defekti olarak adlandırılmaktadır.

Dörtlü tarama testi Down sendromu, nöral tüp defektleri ve Trizomi 18 adı verilen hastalıkların bebekte görülme riskini tespit eden bir tarama testidir. Bu test adı geçen hastalıklar için tanı koydurmaz. Bir risk hesabı yapılmasını sağlar ve kesin tanıyı koyduracak testlerin yapılması kararının verilmesine yardımcı olur.

Dörtlü Tarama Testi Nasıl Yapılır?

Bu tarama testinde anne kanındaki 4 farklı maddenin düzeyleri belirlenir. Daha sonra bu değerler, anne yaşı, sigara kullanımı, kilosu gibi bazı diğer bilgilerle birlikte bir bilgisayar programında değerlendirilir ve sonucunda bir risk belirlenir.

Dörtlü tarama testinde aşağıdaki maddeler incelenir:

β hCG

Alfa-feto protein (AFP)

Serbest Estriol (uE_3)

İnhibin-A

Test Sonuçları Nasıl Değerlendirilir?

Tarama testi sonucunda hesaplanan risk değeri aynı yaş grubundaki gebelerin beklenen risk düzeyiyle karşılaştırılarak değerlendirilir.

NOT: İKİLİ VE DÖRTLÜ TESTLER BİRER TARAMA TESTİ OLUP, SONUÇLAR KESİN TANIYI DEĞİL, OLASI RİSKİ GÖSTERMEKTEDİR.