

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**AMNİYON SIVI İNCELENMESİNDE DOWN SENDROMU
TESPİT EDİLMİŞ GEBELERDE OKSİDAN/ANTIOKSİDAN
SİSTEM, IL-6 VE IL-10 PARAMETRELERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Seda BAHSİ

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Berrin İmge ERGÜDER**

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından 13L3330008 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2014**

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN

Adı, Soyadı : Seda BAHSİ	Tarih: 22/ 07 / 2014
Anabilim/Bilim Dalı : Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	
Tez Danışmanı : Prof. B.İmge ERGÜDER	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER

Tezin Başlığı : Amniyon Sıvı İncelenmesinde Down Sendromu Tespit Edilmiş Gebelerde Oksidan/Antioksidan Sistem, IL-6 ve IL-10 Parametrelerinin Değerlendirilmesi.

Tezin Niteliği: ☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi

Kaçıncı tez sınavı olduğu: ☒ 1 ☐ 2 ☐ 3

III. KARAR

Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak

☒ Kabulüne

☐ Reddine

☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine

oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile karar verilmiştir.

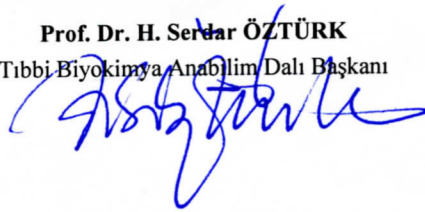
IV. AÇIKLAMALAR

Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız

Jüri Başkanı

Prof. Dr. H. Serdar ÖZTÜRK

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



Jüri

Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU

Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Jüri

Prof. Dr. B. İmge ERGÜDER

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



ÖNSÖZ

Tıpta uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmalarımın her aşamasında rehberliği, tecrübesi ve bilgi birikimi ile uzmanlık eğitimime yön veren değerli tez danışmanı hocam Prof. Dr. Berrin İmge ERGÜDER'e, tez çalışmamda ve akademik faaliyetlerde daima rehberliklerine başvurduğum değerli hocalarım Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. H. Serdar Öztürk'e, Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Kadirhan Sunguroğlu'na, Sayın Prof. Dr. İlker Durak'a, Sayın Prof. Dr. Serenay Elgün Ülkar'a, Sayın Prof. Dr. Aslıhan Avcı'ya ve Sayın Prof. Dr. Erdinç Devrim'e;

Tez çalışması sırasında yardımcı olan Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genetik Merkezi'nde çalışan Sayın Dr. Vehap Topçu'ya;

Beni dünyaya getiren, yetiştiren, hayat boyu bana ve kardeşlerime emek harcayan ve destek olan anne ve babama; beraber büyüyüp birçok şeyi paylaştığım abim ve kız kardeşime;

Hayatı paylaştığım, hep yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen sevgili eşim Taha'ya ve hayatımın anlamı ve neşesi canım oğlum Furkan'a;

Benden yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen araştırma görevlisi arkadaşlarım Dr. Neriman Sevinç'e, Dr. Oğuz Han Edebal'a, Dr. Süleyman Büber'e, Dr. Özkan Özer'e, Dr. Pınar Koyuncu'ya, Dr. Metin Genç'e, Dr. Bedia Akosman'a ve Dr. Ömer Yavuz'a;

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

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

Teşekkürlerimi, saygılarımı ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Seda BAHSİ

Ankara, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. DOWN SENDROMU	3
2.1.1. Down Sendromunun Tarihçesi	3
2.1.2. Epidemiyoloji	5
2.1.3. Patogenez	6
2.1.4. Down Sendromunun Klinik Özellikleri	11
2.1.5. Prenetal Tanı ve Tarama Endikasyonları	12
2.2. İnvaziv Olmayan Tarama Yöntemleri	14
2.2.1. İkili Test	14
2.2.2. Üçlü Test	15
2.2.3. Dörtlü Test	15
2.2.4. Ultrasonografi	16
2.3. İnvaziv Tanı Yöntemleri	17
2.3.1. Amniyosentez	17
2.3.2. Koryonvillus Örneklemesi (CVS)	19
2.3.3. Kordosentez	19
2.4. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller	19
2.4.1. Serbest Radikallerin Tanımı	20
2.4.1.1. Reaktif Oksijen Türleri	21

2.4.1.2. Reaktif Nitrojen Türleri	24
2.4.2. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri ve Lipit Peroksidasyonu	26
2.5. Antioksidan Sistem	27
2.5.1. Enzim Yapısında Olan Antioksidanlar	29
2.5.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	29
2.5.1.2. Katalaz (CAT)	29
2.5.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	30
2.5.1.4. Glutasyon Redüktaz	30
2.5.1.5. Diğer Antioksidan Enzimler	31
2.5.2. Enzim Yapısında Olmayan Antioksidanlar	31
2.5.2.1. Askorbik Asit	31
2.5.2.2. Karotenoidler	32
2.5.2.3. E Vitamini	32
2.5.2.4. Düşük Molekül Ağırlıklı Ajanlar	32
2.5.2.5. Fenolik Bileşikler	33
2.5.3. Pürin Metabolizması	33
2.5.3.1. Adenozin Deaminaz (ADA)	34
2.5.3.2. Ksantin Oksidaz (XO)	34
2.6. Down Sendromu ve Oksidatif Stres	35
2.7. Sitokinler	35
2.7.1. İnterlökin 6 (IL-6)	37
2.7.2. İnterlökin 10 (IL-10)	38
3. GEREÇ ve YÖNTEM	40
3.1. Gönüllü Seçimi	40
3.2. Gereçler	41

3.2.1. Cihazlar	41
3.2.2. Kimyasal Maddeler	41
3.3. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Ölçülmesi	41
3.3.1. MDA Miktarı Ölçüm Yöntemi	41
3.3.2. SOD Düzeyinin Belirlenmesi	43
3.3.3. GSH-Px Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	45
3.3.4. XO Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	46
3.3.5. CAT Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	48
3.3.6. ADA Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	49
3.3.7. NO Ölçüm Yöntemi	50
3.3.8. NOS Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	51
3.4. İnterlökin Düzeylerinin Ölçümü	53
3.4.1. IL-6 ve IL-10 Düzeyinin Belirlenmesi	53
3.5. İSTATİKSEL DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ	58
4. BULGULAR	59
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇLAR	71
ÖZET	72
SUMMARY	74
KAYNAKLAR	76
EKLER	89
EK 1: Etik Kurul Kararı	89
EK 2: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	91

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

(NH₄)₂SO₄	: Amonyum sülfat
°C	: Derece Celsius
¹O₂	: Singlet oksijen
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ADA	: Adenozin Deaminaz
AF	: Amniyotik sıvı
AF-MSCs	: Amniyon sıvısı mezemkimal hücre kültürü
AFP	: Alfa fetoprotein
APP	: Amiloid prekösür protein
Aβ	: Amiloid beta peptid
BACE2	: β-site APP- cleaving 2 enzim
C	: Derişim
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CAT	: Katalaz
CBC	: Sistasyon beta sentetaz
Cd	: Kadmiyum
Cu, Zn-SOD	: Bakır çinko süperoksit dismutaz
CuCl₂	: Bakır (II) klorür
CVS	: Koryonvillus örnekleme
ÇDYA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
d	: Yoğunluk
DCR	: Down Sendromu kritik bölgesi (Down Syndrome Critic Region)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DS	: Down Sendromu
DS-AF-MSCc	: Down sendromlu amniyon sıvısı mezemkimal hücre kültürü
e⁻	: Elektron

EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
F	: Faktör
Fe	: Demir
g	: gram
g	: gravity
GM-CSF	: Granülosit-macrofaj koloni sitimüle edici faktör
GSH	: Redükte glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GS-SG	: Okside glutatyon
H	: Hidrojen
H₂O	: Su
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
hCG	: İnsan koryonik gonadotropini (human chorionic gonadotropin)
HCl	: Hidroklorik asit
HIV	: Human immunodeficiency virus
HOB_r	: Hipobromöz asit
HOCl	: Hipokloröz asit
HOONO	: Hidroksinitrit
hsCRP	: Yüksek duyarlı C reaktif protein
IFN-γ	: interferon-gamma
IL-2	: interlökin-2
IL-6	: İnterlökin 6
IU	: İnternasyonal ünite
kg	: Kilogram
KH₂PO₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
L	: Litre

L•	: Lipit radikali
LOO•	: Lipit peroksil radikali
LOOH	: Lipit hidroperoksit
M	: Molarite (mol/L); molar
MA	: Molekül ağırlığı
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
MIP-1α/β	: Makrofaj inflamatuvar protein 1 alfa/beta
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
Mn-SOD	: Mangan süperoksit dismutaz
MoM	: Multiples of Median
MSAFP	: Maternal serum alfa fetoprotein
MI	: Mayoz 1 (maternal)
MII	: Mayoz 2 (maternal)
Na₂CO₃	: Sodyum karbonat
Na₂HPO₄	: Disodyum hidrojen fosfat
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
NBT	: Nitro Blue Tetrazolium
nm	: Nanometre
Nm	: Numune
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	: Nitrik oksit
NO⁻	: Nitroksi anyonu
NO₂	: Azot dioksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NT	: Nuchal Trans-lucency

O₂	: Oksijen molekülü
O₂^{•-}	: Süperoksit radikali
O₃	: Ozon
OD	: Optik dansite
OH⁻	: Hidroksil iyonu
OH[•]	: Hidroksil radikali
Ort	: Ortalama
PAPP-A	: Gebelikle ilişkili plasenta (plazma) proteini – A
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
r	: Korelasyon katsayısı
RNA	: Reoksiribonükleik asit
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
RO[•]	: Alkoksil radikali
rob	: Robertsonyan translokasyon
ROO[•]	: Peroksil radikali
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Dakikada dönüş sayısı (revolutions per minute)
SD	: Standart sapma
sE3	: Serbest Estriol
SOD	: Süperoksit dismutaz
St	: Standart
sTNFR1	: Tümör nekroz faktörü reseptörü 1
TBA	: Tiobarbitürik asit
TBARS	: Tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddeler
TCA	: Triklor asetik asit
Th	: T helper hücreleri
Th1	: T helper 1 hücreleri
Th2	: T helper 2 hücreleri

TMB	: Tetrametilbenzidin
TNF-α	: Tümör nekroz faktör alfa
v/v	: Hacim/hacim
vb	: ve benzerleri
VEGF	: Vasküler endotelyal growth faktör
VEGF	: Vasküler endotelyal growth faktör
w/v	: Ağırlık/hacim
w/v	: Ağırlık/hacim
βhCG	: İnsan koryonik gonadotropininin beta alt birimi
βhCG	: İnsan koryonik gonadotropininin beta alt birimi
ΔOD	: Delta optik dansite
μL	: Mikrolitre
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
μM	: Mikromolar
μmol	: Mikromol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	: Down Sendromunda 21. kromozomun gen haritası.....	4
Şekil 2.2.	: Normal bir erkek (46,XY) cinsiyete ait kromozomların karyotipi	7
Şekil 2.3.	: Down Sendromlu bir kadın hastanın 21. kromozomunu üç kopya gösteren karyotipi	8
Şekil 2.4.	: Down Sendromlu bir kadın hastada rob(14q21q) translokasyon karyotipi.	9
Şekil 2.5.	: Down Sendromlu çocuk	11
Şekil 2.6.	: Nitrik oksit sentezi.	25
Şekil 2.7.	: Vücuttaki major serbest radikal kaynakları ve serbest radikal hasarının sonuçları.....	26
Şekil 2.8.	: Katalazın üç boyutlu moleküler yapısı	30
Şekil 3.1.	: IL-6 standart grafiği	57
Şekil 3.2.	: IL-10 standart grafiği	57
Şekil 5.1.	: Okidatif stres ve Down Sendromu. Amiloid prekösür protein (APP), beta sekretaz (BACE2)	63

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1: Trizomi 21'in tarihçesi	4
Tablo 2.2: Anne yaşı ile ilişkili olarak canlı doğumlarda ve fetüslerde DS insidansı.....	5
Tablo 2.3: DS olarak tespit edilen 510 hastanın sitogenetik varyantları.	11
Tablo 2.4: Down Sendromunda gözlenen temel fenotipik bileşenler.....	12
Tablo 2.5: Reaktif Oksijen Türleri	21
Tablo 2.6: Organizmada antioksidan sistem elemanları	28
Tablo 3.1: MDA Ölçüm Yöntemi Protokolü	42
Tablo 3.2: SOD aktivitesi ölçümü protokolü	44
Tablo 3.3: GSH-Px Aktivitesi Ölçümü Protokolü	46
Tablo 3.4: XO enzim aktivitesi ölçüm protokolü.	47
Tablo 3.5: ADA aktivitesi ölçüm protokolü	49
Tablo 3.6: ADA aktivitesi ölçüm protokolü-2	50
Tablo 3.7: NO ölçüm protokolü	51
Tablo 3.8: NOS ölçüm protokolü	52
Tablo 4.1: Kontrol ve Çalışma Gruplarının Amniyon Sıvılarına ait Oksidan – Antioksidan Parametreler	59
Tablo 4.2: Kontrol ve Çalışma Gruplarının Amniyon Sıvılarına ait IL-6 ve IL-10 Parametreleri	60
Tablo 4.3: Çalışma Grubunda MDA ile ADA Arasındaki Korelasyon	60
Tablo 4.4: Çalışma Grubunda IL-6 ve IL-10 Parametreleri ile MDA Arasındaki Korelasyon	61
Tablo 4.5: Kontrol Grubunda Oksidan – Antioksidan Parametreler Arasındaki Korelasyon	61

1. GİRİŞ

Down Sendromu (DS), Trizomi 21 olarak da bilinen bu sendrom insanda 21. kromozomun tamamının ya da bir parçasının triploidisi, mozaizmi veya translokasyonu sonucunda oluşmaktadır ve yaklaşık olarak 700 canlı doğumda bir görülmektedir (1). Down Sendromu genetik kaynaklı mental retardasyonun en sık nedenini oluşturmaktadır. Bu hastalıkta erken yaşlanma, kalp ve damar sistemi bozuklukları, Alzheimer benzeri demans gibi çok çeşitli sağlık sorunları gözlenmektedir (2). Anne yaşı, ultrasonografi bulguları ve biyokimyasal belirteçler esas alınarak tespit edilen yüksek riskli gebelere çeşitli tarama protokolleri uygulanmaktadır (3-6). Fetal kromozomal anomali açısından risk altında olan gebelerde kesin tanı konulabilmesi için ilk trimesterde koryonvillus örnekleme ve erken amniyosentez (11-14. haftalarda), ikinci trimesterde amniyosentez ve daha ileri haftalarda kordosentez gibi invaziv prenatal tanı yöntemleri uygulanabilmektedir. Amniyosentez tipik olarak gebeliğin 15-17. haftaları arasında ultrasonografi kontrolü altında gerçekleştirilmektedir (7). Amniyon sıvısı gebelik sırasında fetüsü saran berrak, hafif sarımsı bir sıvıdır. Uterusta büyüyen bebeğin rahat hareket etmesini, kemik ve akciğer gelişiminin normal olmasını sağlar. Amniyon sıvısında proteinler (albümin, globülin), hormonlar (östrojen, progesteron, testesteron), prostaglandinler, katekolaminler (dopamin, adrenalin, noradrenalin, serotonin), enzimler, elektrolitler, glukoz, kreatinin ve bilirubin gibi birçok molekül bulunmaktadır (8). Alınan materyaller ise incelenmek üzere genetik merkezlere gönderilmektedir. Down sendromundan etkilenen bireylerin oksidatif stres belirteçlerinin yükseldiği çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir (9,10). Ayrıca DS'de gözlenen bu oksidatif stres artışının prenatal dönemde başladığı da bildirilmiştir (11). Amniyosentez sonucunda DS tespit edilmiş gebelerin amniyotik sıvısında süperoksit dismutaz (SOD) enziminin aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir (12). Down sendromu tespit edilen gebelerin amniyon sıvısındaki nitrik oksit (NO) düzeyleri incelenmiş ve yüksek olduğu gözlemlenmiştir (13). Bu çalışmada riskli gebelere yapılan amniyosentez sonucunda DS tespit edilen gebelerin amniyon sıvısında oksidan/antioksidan

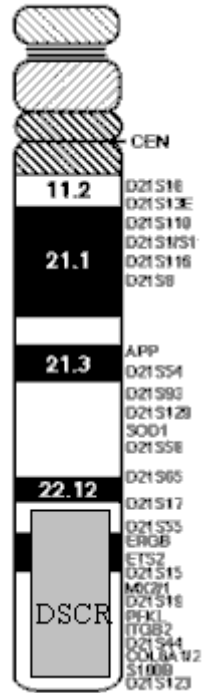
durumun ve interlökin-6(IL-6)/interlökin-10(IL-10) düzeylerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Bu amaçla Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genetik Merkezi'ne başvurup amniyosentez yapılan gebelerin amniyon sıvılarının genetik inceleme sonuçlarına göre DS saptanan 18 gebenin amniyon sıvısı ve DS saptanmayan 36 gebenin amniyon sıvısı çalışma kapsamına alınarak iki grup oluşturulmuştur. Alınan örneklerde, oksidan ve antioksidan durumu değerlendirmek amacıyla; malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), ksantin oksidaz (XO), katalaz (CAT), adenozin deaminaz (ADA), nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS), IL-6 ve IL-10 testlerinin ölçümleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Prof. Dr. Zuhal Yurtarslanı Araştırma Laboratuvar'ında gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DOWN SENDROMU

2.1.1. Down Sendromunun Tarihçesi

Down Sendromunu ilk olarak İngiliz hekim John Langdon Down tarafından 1866 yılında tanımlanmıştır. John Langdon Down konjenital olarak zeka seviyesi düşük olanların “Mongoloid” bir yüz görünümüne sahip olduğunu ifade etmiş ve bu çocukların bazılarında DS’nun tipik fenotipik bulgularının olduğunu tespit etmiştir (14). Kolombiya ve Ekvador’da yapılmış kazılarda elde edilen çömlek heykeller incelenmiş ve bazılarında DS’nu düşündüren özellikler saptanmıştır (15). Psikiyatrist olan Esquirol ise zekâ geriliği ve psikoz arasındaki fenotipik farklılıklar ile ilgilenmiş ve 1838 yılında ilk olarak Trizomi 21’li bireylerin fenotipik özelliklerini yazmıştır. Bu kanıtlara dayanarak DS’lu hastaların binlerce yıldır insan kültürünün bir parçası olduğu söylenebilmektedir (1). Lejeune ve arkadaşları 1959 yılında yaptıkları çalışmada mongoloid çocukların fibroblast hücrelerinden oluşan kültürleri analiz etmişler ve kromozom sayısının 47 olduğunu bulmuşlardır (16). Bundan sonra hastalığın patogenizinde rol oynayan spesifik genlerin üzerine yoğunlaşmıştır. Parsiyel Trizomi 21’li hastaların moleküler genetik analizleri ile fenotipik bulguları birleştirilmiş ve tam Trizomi 21’li hastalarla karşılaştırılmıştır. Bu analizler sonucunda fenotipik bulguların varlığının farklı gen kümelerindeki anöpoliden kaynaklandığı bulunmuştur (1). Çeşitli araştırma grupları hastalığın patogenezinin sorumlu başlıca genleri içeren 21.kromozomu incelemişlerdir. Sonuçta bu kromozom üzerinde hastalıktan sorumlu olan bir bölge olduğunu savunmuşlar ve DNA analiziyle bu bölgeyi Down Sendromu Kritik Bölgesi (*Down Syndrome Critic Region*; DCR) olarak tanımlamışlardır (17), (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Down Sendromunda 21. kromozomun gen haritası – Korenber ve ark. alınmıştır.

Bu bölge DS’de görülen majör bulgular olan konjenital kalp hastalıkları, fasiyal ve el anomalileri gibi özelliklerinden sorumlu tutulmuştur (18). DS’nun anlaşılmasında 21.kromozom dizisinin sekansı dönüm noktası olmuştur (19). Trizomi 21’in tarihçesi Tablo 2.1’de kronolojik olarak özetlenmiştir.

Tablo 2.1: Trizomi 21'in tarihçesi– Andre Me'garbane ve ark. (1)'dan alınmıştır.

1838: Esquirol tarafından ilk fenotip tanımlanmıştır.
1846: Sequin ‘aptallar eğitimi’ tedavisiyle geniş bir şekilde tanımlamıştır.
1866: John Langdon Down Trizomi 21’li çocukların fenotiplerini tanımlamıştır.
1932: Waardenburg ve Davenport muhtemel bir kromozomol orjin olduğundan şüphelenmiştir.
1959: Lejeune ve ark. ekstra bir kromozom 21 bulmuşlardır.
1961: Genetikçiler mongolizm terimi yerine Down Sendromu ya da Trizomi 21 anomalisi teriminin kullanılmasını daha uygun görmüşlerdir.
1989: Down Sendromu Kritik Bölgesi (<i>Down Syndrome Critic Region</i> ; DCR) tanımlanmıştır.
1900: Trizomik fareler üretilmiştir.
2000: Hattori ve ark. tarafından 21. kromozomun sekanslaması yapılmıştır.

2.1.2. Epidemiyoloji

Down Sendromu insanlarda en sık görülen kromozom anomalisi türü olup her ırktan, yaştan ve ekonomik seviyeden insanı etkilemektedir. Yaklaşık her 600-800 çocuktan biri, fazladan bir kromozomun bulunmasından kaynaklanan doğum anomalisi olan DS ile doğmaktadır (20). İleri anne yaşı DS için bilinen bir risk faktörüdür. Annenin kronolojik yaşının veya psikolojik yaşının overlere olan biyolojik ve klinik etkisi hala belirsizdir (21). Örneğin 20 yaşlarındaki 12 haftalık gebeliği olan bir kadında bu olasılık 1068 de 1 iken, 35 yaşlarındaki bir kadında 249 da 1'e, 40 yaşlarındaki bir kadında da 68 de 1'e yükselmektedir (22). Anne yaşıyla ilişkili olarak canlı doğumlarda ve fetüslerde DS görülme insidansları Tablo 2.2'de yer almıştır (23).

Tablo 2.2: Anne yaşı ile ilişkili olarak canlı doğumlarda ve fetüslerde DS insidansı- Thompson & Thompson Tıbbi Genetik (23)'den alınmıştır.

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

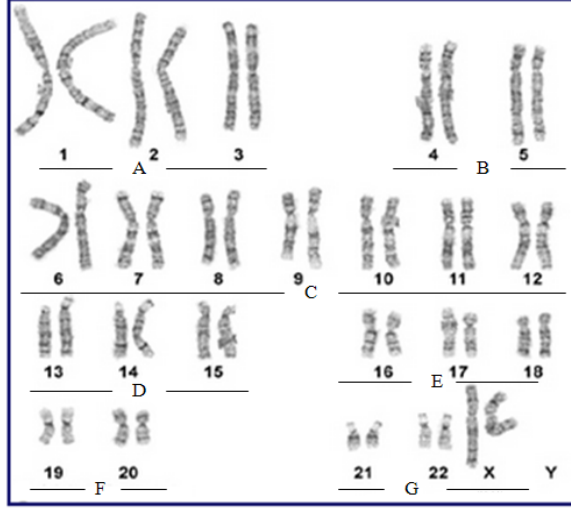
Konsepsiyonda DS sayısı oldukça fazladır ancak bunların %75'i birinci trimesterde, %50'si de ikinci trimesterde kaybedilmektedir. DS'lu bireylerin %90'ı 5 yaşına kadar ulaşabilmektedir. Hayatta olan DS'lu vakaların 50 yaşına kadar yaşama oranları ise %50 civarındadır (24-27).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yaklaşık 350.000 kişinin DS olduğu düşünülmektedir (28). Amerika Birleşik Devletleri'nin 10 bölgesinde 0-19 yaş arası çocuklar ve gençler arasında DS prevalansını öğrenmek amacıyla yapılmış bir çalışmada, 1979-2003 yılları arasında doğumsal defektleri olan kayıtlı hastalar incelenmiştir. Down Sendromu prevalansının 1979'dan 2003 yılına doğru 10 bölgede her yıl %0,9 artış göstermiş olduğu ve 10.000 doğumda %9'dan %11,8 çıkmıştır. Aynı dönemde yaşlı annelerin doğum insidansı artmış genç annelerinki ise azalmış olarak bulunmuştur. 2002 yılında ise çocuklar ve ergenlerde (0 -19 yaş) görülme sıklığı 10.000 doğumda %10,3 olarak bulunmuştur. Çocuk ve ergenlerde ise DS prevalansı, non-Hispanik beyaz bireyler ile non-Hispanik siyah bireyler karşılaştırılmış ve non-Hispanik beyaz bireylerde prevalans daha düşük bulunmuştur. Ayrıca cinsiyet karşılaştırıldığında ise kız infantların erkeklere göre daha az olduğu saptanmıştır. Çocuklarda ve ergenlerde DS prevalansı bölge, yaş, ırk/etnik köken ve cinsiyete göre değişmektedir (29). Say ve ark.'nın 1971 yılında Ankara Doğumevi'nde yaptıkları araştırmada ülkemizde DS'nun görülme sıklığının 1/1428 olduğunu ifade etmişlerdir (30).

2.1.3. Patogenez

İnsanda gonad hücreleri hariç vücut oluşumuna katılan tüm hücreler somatik hücreler olarak bilinir. İnsan somatik hücrelerindeki 46 kromozom 23 çift halindedir. Bu 23 çiftin 22'si dişi ve erkeklerde benzer olup otozomal kromozomlar olarak adlandırılır. Geri kalan X ve Y kromozomları ise cinsiyet kromozomlarıdır (46,XX dişi, 46,XY erkek). Karyotip ise bir organizmaya ait kromozomların yapısal ve sayısal özellikleri dikkate alınarak homolog çiftler şeklinde düzenlenmiş halidir. Karyotip her tür için karakteristiktir. Bununla beraber karyotip terimi, bir birey için veya bir tek hücre içinde kullanılabilir. İnsandaki sitogenetik isimlendirme sistemi 1978 yılındaki uluslararası komitenin kararı ile standart hale getirilmiştir. Buna göre insan karyotip

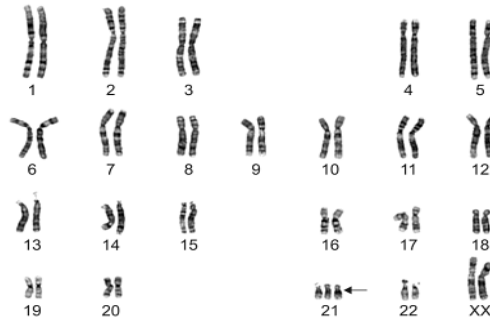
formülünde (örn; 46,XX), virgülden önce mevcut kromozomların toplam sayısı, virgülden sonra cinsiyet kromozomlarının kompozisyonu verilir. İnsanlarda 22 çift otozomal kromozom yedi gruba ayrılır (A-G), (Şekil 2.2). Bu kromozomların ifade edilmesinde uzun kolu q, kısa kolu ise p ile gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Normal bir erkek (46,XY) cinsiyete ait kromozomların karyotipi - The Principles of Clinical Cytogenetics (31)'den alınmıştır.

İnsandaki normal 46 kromozom sayısındaki herhangi bir değişiklik kendini fenotipik olarak gösterecektir. Haploid kromozom sayısının (n) tam katları şeklindeki anomalilere öploid (euploid) ve diğer kromozom sayı farkı anomalilerinde anöploidi (aneuploid) adı verilir. Anöploidi insan sayısal kromozom bozuklukları arasında en sık görüleni ve klinik olarak en önemli tipidir. Anöploidi hastaların tümünde ya trizomi (belirli bir kromozomun iki yerine üç adet bulunması) veya daha nadiren monozomi (belirli bir kromozomun tek bir temsilcisinin bulunması) vardır. Canlı doğan bebeklerde en sık görülen trizomi tipi, DS'lu hastaların %95'inde gözlenen 21. kromozomun trizomisi (47, XX veya XY,+21). Aneuploidi nedenleri çok iyi anlaşılmamış olmakla birlikte en sık görülen mekanizma mayotik non-disjunction (ayrılama) 'dır. Bu durum iki mayoz bölünmeden biri sırasında, genellikle 1. mayoz bölünmede ve bir çift kromozomun birbirinden düzgün ayrılmalarındaki hatayı ifade eder (23).

Down Sendromlu olgularının %95'inin nedeni 21. kromozom çiftinin mayotik non-disjunctiondan kaynaklanan 21. kromozom trizomisi ya da mayoz sırasında kromozomların anormal segregasyonu ile fazladan bir 21. kromozom bulunmasıdır (Şekil 2.3). Geri kalan %5'i ise somatik hücrelerinin mitozundaki hatalardan dolayı oluşmaktadır (32,33). Mayotik non-disjunction trizomik durumların ortak özelliğidir ve oluşumu birçok faktörle ilişkilidir. Maternal yaş, radyasyon ve viral ajanlar bu faktörlerden bazılarıdır (24,34). Mayotik non-disjunction hataları sonucu oluşan fazladan 21. kromozomun %79,24'nün maternal kaynaklı ve %20,76'nın ise paternal kaynaklı olduğu bulunmuştur (35). Bu hatalar annenin kronolojik yaşından çok overlerin biyolojik yaşıyla ilişkilendirilmiştir (36). Perikonsepsiyonel sigara ve kontraseptif kullanımının non-disjunction için potansiyel bir risk olabileceği tespit edilmiş olmakla birlikte bu bilginin kesinleşmesi için daha çok araştırmalara gerek duyulmaktadır (37).



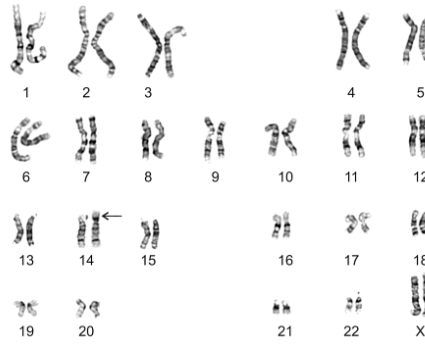
Şekil 2.3: Down Sendromlu bir kadın hastanın 21. kromozomunu üç kopya gösteren karyotipi - Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling (38)'den alınmıştır.

Down Sendromunun üç ana sitogenetik tipi bulunmaktadır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda iki tane sitogenetik varyantının daha olduğu gösterilmiştir. Bu sitogenetik varyantlar şunlardır (39):

Regüler Trizomi 21: Karyotip 47,XY,+21 ve 47,XX,+21 olup tüm hastaların % 95'ini oluşturur. %90'ının oluşum nedeni mayotik non-disjunctiondır ve maternal kaynaklıdır. Bu patogenezi ile oluşan Trizomi 21 varyantında en çok etken, ileri maternal yaştır. Maternal yaş arttıkça yıllar içerisinde maruz kalınan çevresel

etkenler ve kaliteli ovum sayısındaki azalma ile birlikte oogoniumlardaki mayotik kromozomal ayrılamama ihtimali oldukça artmıştır. Bunun da büyük kısmı mayoz 1 (MI)'deki hatadan kaynaklanır. Yaklaşık %20'si de mayoz 2 (MII)'deki hatadan kaynaklanır. Paternal kaynaklı trizomiler ise daha azdır (MI'de %3 ve MII'de %5) ve bunun %4'ü ise postzigotik hata sonucu oluşur (30,39).

Robertsonyan Translokasyon: Başka bir akrosentrik kromozom ile [grup D (13-14-15) veya G (21-22)] 21 nolu kromozomun translokasyonu sonucu oluşur. Karyotip 46,XX, rob(14;21) +21 veya 46,XY, rob(14;21) +21 şeklindedir ve hastaların yaklaşık %4'ünde görülür (23,39), (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Down Sendromlu bir kadın hastada rob(14q21q) translokasyon karyotipi - Choromosome Abnormalities and Genetic Counseling (38)'den alınmıştır.

21. Kromozomun Uzun Kolunun İzokromozomu: Bir 21q21q kromozomu, iki tane 21. kromozoma ait uzun kollardan (q kolu) oluşmuştur. 21. kromozomun uzun kollarının duplikasyonla iki tane olması, kısa kolunun ise delesyon sonucu hiç görülmemesidir. Robertsonyan translokasyon ile birlikte yaklaşık olarak %4 oranında görülür. Nadir görülmesine rağmen bu tip translokasyon taşıyan kişiden oluşan gebelik ya DS ya da nadiren yaşama şansı olan 21. monozomili olacaktır.

Mozaisizm: Normal hücre dizileri yanında trizomik hücre dizileri vardır. Karyotip 47, XX veya XY, +21 / 46, XX veya XY'dir ve tüm vakaların % 1-3'ünde görülür.

21q22.3 Bölgesinin Parsiyel Trizomisi: 21. kromozomun q22.3 bölgesinin trizomisidir. Karyotip 46,XX veya 46,XY, duplikasyon (21 (q22.3))'tir. Tüm vakalarda %1'den az görülmektedir.

24 yıllık çalışma süresince DS klinik tanısı ile bildirilen 581 hastada karyotip analizi yapılmış ve karyotipleme sonuçlarına göre; 71 hastanın normal karyotipli olduğu belirlenmiştir. Kalan 510 DS'lu hastanın karyotip analizleri tablo 2.3'de görülmektedir. Maternal yaş ise regüler trizomi ve mozaizmde diğer translokasyonlara göre daha yüksek saptanmıştır (23,39).

Regüler trizomi 21'in tekrarlama riski, aile böyle bir çocuğa sahip olduktan sonra, genel olarak %1 kadardır. Otuz yaşından genç anneler için tekrarlama riski %1,4 daha yaşlı anneler için risk yaşa bağımlı risk ile aynıdır (23). Anne ve baba sağlıklı ve normal kromozomal dizilime sahip olup çocuk mozaik ise ailenin diğer çocuklarında hastalığın tekrarlama riski %1 kadardır (30).

Translokasyonların yarıdan fazlası gametogenez sırasında "de novo" olarak oluşmaktadır. Bu durumda anne-babanın karyotipi normal olduğundan yineleme riski önemli oranda artmamaktadır. Ancak ebeveynlerden birinin, özellikle annenin, dengeli translokasyon taşıyıcısı olduğu ailelerde göreceli olarak artmış tekrarlama riskine neden olmaktadır. Translokasyon DS, otuz yaşından küçük annelerin bebeklerinde daha sık görülür. Bu da genetik danışma verilmeden önce, dengesiz translokasyon taşıyıcısı olgunun ebeveyn ve muhtemelen diğer yakınlarının karyotip analizlerinin yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır (23,40).

Prenatal tanı için başvuran ailelerde, daha önceki DS'lu çocuğun sitogenetik tipinin bilinmesi hem hastaya kesin tanı konulması hem de ailelere verilecek genetik danışmanlık açısından önemlidir. DS tanısı, dismorfik yüz özellikleri ve fenotipik bulguları ile klinik olarak kolay tanı konulabilmesine rağmen, tanının olguların tümünde konulamadığı, bu nedenle kesin tanı için kromozom analizinin gerekli olduğu bildirilmektedir (33).

Tablo 2.3: DS olarak tespit edilen 510 hastanın sitogenetik varyantları (39).

Sitogenetik varyant	Hasta Sayısı
47,XX,+21	214
47,XY,+21	229
47,XX,+21/46,XX	25
47,XY,+21/46,XY	17
46,rob(D;21),+21	15
46,+21,rob(21;21)(q10;q10)	6
46,XX,+21,rob(21;21)/46,XXa	1
47,XX,del(5)(p?),+21b	1
47,XY,t(8;14)(q22;q32),+21/46,XY,t(8;14)(q22;q32)c	1
48,XX,+21,+mar/47,XX,+21d	1
Toplam	510

2.1.4. Down Sendromunun Klinik Özellikleri

Down Sendromu çeşitli dismorfik özellikler, konjenital malformasyonlar, mental retardasyon, dil ve hafıza problemleri gibi karakteristik fiziksel ve nöro-psikolojik bulgular gibi birçok sağlık sorunlarının eşlik ettiği genetik bir bozukluktur (41). (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Down Sendromlu çocuk - Thompson & Thompson Tıbbi Genetik (23)'den alınmıştır.

Trizomi 21'li çocuklarda doğumsal kalp hastalığı olasılığı yaklaşık %40'dır. Mental retardasyon görülür ancak yetenekleri fazladır. Yukarı kalkık burun, epikantus

katlantıları, brakisefali, düz oksiput, brushfield lekeleri (benekli iris) ve orta çizgiye eğilimli palpebral fissürler gibi kraniofasial belirtileri vardır (Tablo2.4). Küçük mandibula ve maksilla nedeniyle dil belirgin, damak yüksek ve dar olabilir. Trizomi 21’li bebeklerin %80’i doğumda hipotoniktir. Ancak bu özellik zamanla kaybolur. Diğer neonatal belirtiler zayıf morro refleksi (%85), eklem fleksibilitesinin fazla olması (%80) ve düz yüzdür (42).

Tablo 2.4: Down Sendromunda gözlenen temel fenotipik bileşenler – (43)’den alınmıştır.

-Hipotoni, dışarıda dil, rektus diastazi
-Mental retardasyon
-Brakisefali, oksiputta düzlük, mikrosefali, basık burun kökü, epikantal kıvrımlar
-İriste brushfield lekeleri, lens opasiteleri, katarakt, kırma kusurları
-Küçük ve displastik kulak
-Dişlerde hipoplazi, düzensizlik ve eksiklik
-Boyunda kısalık
-Parmaklarda kısalık, klinodaktili, simian çizgisi
-Ayakta plantar oluk
-Konjenital kalp hastalıkları
-Deri kuru ve hiperkeratotik
-Saçlar zayıf, yumuşak ve seyrek
-Hipogonadizm
-Duodenal atrezi, trakeoözefagal fistül
-Tiroid bezi bozuklukları
-Malignite gelişimi (Lösemi gelişme iski 1/95)

2.1.5. Prenetal Tanı ve Tarama Endikasyonları

Prenatal tanı, ailede bir genetik kusurun olup olmadığı riskine ilişkin yapılan işlemlerin bütünüdür tanımlamaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2012 yılında yayınlanan bir rapora göre konjenital ve genetik bozukluklar, her 33 doğumda bir görülmekte ve her yıl böyle probleme sahip 3,2 milyon bebek doğmaktadır. En sık görülen doğumsal anomalilerin başında konjenital kalp defektleri, nöral tüp defekti ve DS bulunmaktadır (24,44). Spontan düşüklerin sıklığı ve bunların temelindeki

genetik nedenler tam bilinmediğinden dolayı da gerçek insidansı hesaplamak zordur. Genetik hastalıkların pek çoğunun kesin tedavisi hala söz konusu değildir. Bu nedenle genetik hastalıklarda tedaviden çok, korunma modelleri (prevantif yaklaşımlar) ön plana çıkmıştır.

Prenatal tanıda amaç, yaşam süresi kısıtlı, ağır fiziksel ve zihinsel defektlere yol açan tedavisi mümkün olmayan hastalıklar için yüksek risk taşıyan bireylere sağlıklı bir bebek için güvence vermektir (24). Ayrıca prenatal tanı bireylerin gebeliğe devam etme ya da gebeliği sonlandırma seçeneklerinden birini kullanmalarına izin vermektedir (45). Bunun sonucu olarak da, genetik hastalıkların ve doğumsal defektlerin perinatal mortalite oranlarını azaltmakta ve ciddi klinik sorunlar olarak ön planda yer almaları engellenmektedir (46). Tarama testleri diagnostik amaçla kullanılmamakta ve tarama testlerinden alınan sonuçlar ileri diagnostik testler ile doğrulanmalıdır (47).

Prenatal tanı endikasyonu gerektiren risk grubundaki hastalar şöyle sıralanabilir:

İleri anne yaşı (35 yaş ve üstü): Tarihsel olarak anne yaşı, fetal kromozom anomalileri taramak için kullanılan ilk endikasyonu ve prenatal tanı endikasyonları içerisinde en büyük grubu oluşturmaktadır. 1970'lerin sonlarında ABD'nde gebeliklerin yaklaşık %5'i 35 yaş ve daha yaşlı kadınlardan oluşmaktadır. 35 yaşında ikinci trimester Trizomi 21 prevalansı 1/270 iken amniyosentezden dolayı tahmini fetal kayıp ise 1/200 civarında olmaktadır. Bu nedenle tarama için 35 yaş kesin sınır olarak kabul edilmiştir. İkiz gebeliklerde konjenital hastalıkları belirlemede bu yaş sınırı 31'e kadar düşmektedir (45,48). Yine genç bir kadında DS bebek doğurma riski 1/1500 iken 48 yaşında risk 1/10'a yükselir. Ancak 15 ile 25 yaş arası ise risk aynıdır, 25-35 arasında artmaya başlayan risk 35-40 arası 4 kat, 40-48 yaş arasında yaklaşık 10 kat artar. Anne yaşı tek başına DS taramasında kullanılabilir. Ancak gebeliklerin %10'u 35 yaşın üstündedir ve DS'lu gebelerin %40'ını oluştururlar. 35 yaş sınırı tartışmaları devam etse de bu yaştaki risk ile invaziv girişime bağlı bebeği kaybetme riski birbirine yakındır.

Geçmiş Obstetrik Öykü: Önceki bebekte kromozomal anomali, herhangi bir genetik hastalık öyküsü olan, tekrarlayan düşük tanımlayan, önceden ölü doğum yada

yenidoğan ölüm öyküsü olan, önceden preterm doğum yapan, Rh yada ABO uyuşmazlığı olan, geçirilmiş preeklampsisi olan ve gebelikte herhangi bir teratojen ajan maruziyeti tanımlayan gebelerde tarama için endikasyon oluşturur.

Geçmiş Tıbbi Öykü: Birçok tıbbi sorun anne ve bebek açısından gebelik sürecini etkileyebilir. Bu hastalıklar ve süreci mümkünse gebelikten önce ele alınmalıdır. Kronik hipertansiyon, böbrek hastalığı, diyabet, kalp hastalığı, annede kanser, akciğer hastalığı, madde kullanımı ve bağımlılığı, tiroid hastalıkları, epilepsi, gastrointestinal ve karaciğer hastalığı, anemi, bağ dokusu hastalıkları ve psikiyatrik hastalıklar gebeliği sorunlu hale getirebilen en önemli hastalıklardır.

Aile Hikayesi: Kalıtsal hastalık durumlarının (tay-sachs, kistik fibrozis, orak hücreli anemi) anne ya da fetüsü gebelik sırasında ya da fetüsü doğumdan sonra etkileyebilecek riskleri taşıması açısından detaylı bir aile öyküsü yararlıdır (47).

2.2. İnvaziv Olmayan Tarama Yöntemleri

Ultrasonografi ve anne kanından yapılan tarama testleri non-invaziv prenatal tanı yöntemleri içinde en sık kullanılanlarıdır. Prenatal taramanın amacı, fetal sağlık problemlerini direk belirlemek veya riskli gebelikleri tespit ederek prenatal tanı programlarına yönlendirmektir. Ayrıca diğer bir neden de invaziv prenatal tanı yöntemlerinin bazı komplikasyonlara neden olabilmesidir (49).

2.2.1. İkili Test

Birinci trimester taramaları, malformasyonların daha erken tanınıp gebelik terminasyonu gereken durumlarda daha az invaziv girişimleri mümkün kılarak özellikle 2. trimester için riskli grubun ortaya çıkarılmasında önemlidir. Gebeliğin 9-11. haftalarında yapılır. Birinci trimester taramalarında kullanılan serum belirteçleri serbest β -hCG ve PAPP-A (Pregnancy associated plasma protein A)'dır. PAPP-A yüksek moleküler ağırlıklı bir glikoproteindir ve fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. DS gebeler normal etkilenmemiş gebeler ile karşılaştırıldığında DS'de β -hCG düzeyi normalin yaklaşık iki katı artmış, PAPP-A ise yaklaşık 2.5 kat azalmıştır.

Bu iki serum belirtecine anne yaşı da eklenip 1. trimester tarama testi olarak kullanıldığında %5 yalancı pozitif ile vakaların %63'ü yakalanabilmektedir. Bu başarı 2. trimesterde yapılan üçlü testin başarısından daha düşüktür. Bu nedenle tarama için yeterli bulunmamaktadır. Bu etkinliğin artırılması için bu iki serum belirtecine ultrasonografik nuchal trans-lucency (NT, ense kalınlığı) ölçümü eklenmiştir. 3 mm sınır olarak kabul edildiğinde NT, %5 yanlış pozitif ile %60-80 yakalama oranı ile güçlü bir DS belirtecidir. 10-14. haftalar arasında yapılan NT ölçümü fetal trizomilerin, özellikle Trizomi 21'lerin yakalanmasında oldukça etkili bir yöntemdir. NT ölçümü bu iki serum belirteci ile birleştiğinde (kombine test) %5 yanlış pozitiflik ile yakalama oranı %85'e çıkmaktadır. Bu nedenle kombine test tüm 2. trimester testlerinden daha başarılı sonuçlar vermektedir. Maliyet analizleri yapıldığında hem tarama açısından hem de erken yakalama nedeniyle de oldukça başarılıdır. Bu başarının tam sağlanması için NT ölçümleri konusunda uzman kişilerce yapılmalıdır (47,50).

2.2.2. Üçlü Test

Gebeliğin 14. ve 18. haftaları arasında yapılır. Maternal serum α -fetoprotein (MSAFP), β -hCG, estriol (sE3) düzeyleri nispeten bağımsız risk belirteçleridir ve anne yaşı ile kombine edilerek ve matematiksel algoritma içinde hastaya özel risk yüzdesi elde etmede kullanılır. Buna Triple Test denmektedir. %5 yalancı pozitiflik ile yakalama oranı %69'dur. Çeşitli çalışmalar sonucunda bu belirteçlerden β -hCG'nin en iyi belirleyici özelliğe sahip olduğu bulunmuştur. Üçlü tarama testinin sensitivitesi özellikle 35 yaş üstü gebelerde %80'e kadar çıkabilmektedir. Down Sendromlu gebeliklerde 2. trimesterde MSAFP değeri normalden daha düşüktür. sE3 düzeyleri DS gebeliklerde %25 azalırken β -hCG düzeyi 2 kat artmaktadır (47,50).

2.2.3. Dörtlü Test

Down Sendromu taramasında kullanılan dörtlü test 14-22 gebelik haftalarında ultrasonografik olarak gebelik yaşı tespit edildikten sonra anne serumunda AFP, β hCG, sE3 ve İnhibin A ölçülmesiyle yapılır. Şu anda 2. trimester taramalarında en iyi sonuç dörtlü test ile alınmaktadır. %6 yalancı pozitiflikle yakalama oranı %85'tir (47).

Birinci trimester NT ve PAPP-A ölçümü dörtlü test ile birleştirildiğinde entegre test ortaya çıkar. Entegre testte 1. trimester NT ve PAPP-A ölçümü yapılır ancak sonuçlar açıklanmaz ve 2. trimesterde dörtlü test yapılır ve altı belirtecin toplu sonucu oluşturulup ve risk belirlenir. Entegre testin yakalama oranı %85 iken yalancı pozitiflik oranı %1'dir. Şu anda kullanımda olan testler arasında en iyi tarama testi entegre test olarak belirlenmiştir (47).

Tarama testlerinin klinik uygulamalarının anlaşılması için tarama testinde kullanılan belirteçlerin normalize edilmesinde kullanılan, "Multiple of Median" (MoM) istatistiğinin anlaşılması gereklidir. MoM değerlerinin hesaplanmasında her bir gebelik haftası için medyan değer seti oluşturulur. Daha sonra her bir test sonucu uygun gebelik haftası için belirlenen medyan değere bölünerek o test sonucuna karşılık gelen MoM değeri belirlenir. Örneğin 1.0 şeklindeki bir MoM değeri o kişideki madde düzeyinin normal bebeklerde görülen değerle tam ortasına denk geldiğini gösterirken 2.0 MoM'luk bir değer ölçüm yapılan kişideki madde düzeyinin normal ortalamanın 2 katı olduğunu belirler. Ayrıca MoM değerlerinde analit düzeylerini etkileyen diğer maternal faktörler (örn; maternal yaş, kilo ve maternal ırk) de dikkate alınarak ayarlamalar yapılabilir. MoM değerleri şu anda DS, Trizomi 18 ve nöral tüp defekti riskinin hesaplanmasında biyokimyasal analit değerlerini yorumlanabilir bir birime dönüştürmede yaygın olarak kullanılmaktadır (47,51).

2.2.4. Ultrasonografi

Gebelikte ultrasonografi hem obstetrik izlem yönünden, hem de fetal anomali varlığının araştırılması amacıyla yapılır. Fetal ultrasonografi gebelik yaşını güvenilir olarak saptayabilir ve son adet tarihine göre gebelik yaşı kesin bilindiğinde, intrauterin büyümenin değerlendirilmesini olanaklı kılar. Gebeliğin 10-14. haftalarından itibaren fetal ultrasonografi ile bir çok anomali görüntülenebilir. Bunlar arasında ensefalosel, mikrosefali, hidrocefali, fetüse ait tümörler, major santral sinir sistemi malformasyonları, kardiyak anomaliler, renal agenezi ve diyafram hernileri gibi birçok anomaliler bulunur. Bu gebelik haftalarında ultrasonografi ile saptanan en önemli fetal bulgulardan biride artmış nuchal translucency ölçümüdür. NT artmış bulunan fetusların yaklaşık %33.8'inde kromozom anomalilerinin bulunduğu

gösterilmiştir. Bu ölçümün artmış bulunması en sık olarak fetal kardiyak defektlerle birlikte görüldüğünden, geçici kalp yetmezliğinin nukkal bölgede fazla sıvı birikimine neden olduğu tahmin edilmektedir (47).

Down Sendromunda artmış NT, ekojenik bağırsak, kısa femur, kısa humerus, nazal kemik yokluğu, nazal kemik hipoplazisi, piyelektazi, ekojenik intrakardiyak fokus ve koroid pleksus kisti en sık görülen ultrosonografik belirteçlerdir. Bunlar gibi ultrosonografik belirteçler saptandığında fetal yapılar tekrar incelenmeli, belirteçlerin risk artışı tarama testleriyle kombine edilerek oranları hesaplanmalı ve sonrasında invaziv girişim kararı değerlendirilmelidir (52).

2.3. İnvaziv Tanı Yöntemleri

Prenatal tanıda kullanılan girişimsel işlemler sayesinde fetal karyotip hakkında bilgi sahibi olabilmek mümkün olmuştur. İnvaziv teknikler içinde ilk uygulamaya giren ve en sık uygulanan yöntem ise amniyosentezdir. Prenatal tanıda amniyosentez, kültür çalışmalarının gelişmesi yeterli bir seviyeye gelmesi ile gerçek yerini bulmuştur (49).

2.3.1. Amniyosentez

Amniyon sıvısı (AF), amniyon boşluğunda bulunan koruyucu bir sıvıdır. Gebelik sırasında fetüs gelişimi ve olgunlaşması için gerekli bir bileşendir. Erken embriyogenezde, AF fetal ekstraselüler matriksin uzantısıdır. İnsanlarda gebeliğin 8. haftasında üretra oluşturulur ve fetal böbrekler idrarı üretmeye başlar ve fetal yutma da kısa bir süre sonra gerçekleşir. Amniyon sıvısının kaynağını fetal idrar, plasenta yüzeyi, respiratuvar ve gastrointestinal sistem oluşturmaktadır. Amniyon sıvısı fetusun çevresinde koruyucu bir kese oluşturur ve fetüsün daha rahat hareket etmesini sağlayarak fetüsü mekanik ve termal şoklardan korur. Ayrıca AF bağışıklık sisteminin bir parçası olarak da hücrel savunmada önemli bir rol oynar. Long Tong ve ark. yaptıkları çalışmada amniyon sıvısının, umlikal kord serumunun ve maternal serumun biyokimyasal içeriklerini kıyaslamışlardır. Sodyum, klorür gibi primer elektrolitler ve ozmotik basınç umlikal kord serumunda ve maternal serumda yaklaşık olarak aynı bulmuşlardır. Toplam protein, glukoz, trigliseridler, kolesterol ve çeşitli enzimler de dahil olmak üzere organik maddelerin seviyeleri özellikle

total protein seviyelerini AF daha düşük tespit etmişlerdir. Bu çalışmaya göre amniyon sıvısının biyokimyasal içeriğinin total protein, albümin, globülin, alanin amino transferaz, aspartat amino transferaz, kolinesteraz, γ -transpeptidaz, kreatin kinaz, kreatin kinaz izoenzimleri, laktat dehidrogenaz, hidroksibütirat dehidrogenaz, amilaz, high dansiteli lipoprotein, low dansiteli lipoprotein, apoprotein A1, apoprotein B, lipoprotein a, sodyum, klor, bilirubin, ürik asit, kalsiyum, fosfat, trigliserid, glukoz, üre, kreatinin, ürik asit, magnezyum, bikarbonat ve potasyumdan oluştuğunu göstermektedir (53).

Amniyosentez ilk olarak 1950 yılında cinsiyet belirlenmesi amacı ile uygulanmış, klinik pratiğe ise 1966 yılında fetal hücrelerden karyotip tayini yapılmasıyla girmiştir. Amniyosentez ultrasonografi eşliğinde transabdominal yol ile 15-20 ml amniyon sıvısı alınması işlemidir. Gebeliğin 16. ile 20. haftaları arasında yapılır. Amniyon sıvısı örneğinde fetal kromozom analizi, enzimatik çalışmalar, DNA analizleri ve AFP ölçümleri yapılabilir.

Genetik hastalıkların prenatal tanısında aşağıdaki durumlarda ve hasta gruplarında amniyosentez çok yararlıdır:

- 35 yaş veya üstünde anne yaşı
- Önceki çocukta kromozomal anomali
- Üç veya daha fazla spontan abortus
- Hasta veya eşinde kromozomal anomali
- Aile hikayesinde kromozomal anomali
- Kadının X'e bağlı hastalık taşıyıcılık riski
- Metabolik hastalık riski
- Nöral tüp defekti riski
- İkinci trimester maternal serum taramasında pozitiflik

Amniyosentezin kesin kontrendikasyonu, bağırsakların uterus üzerinde lokalize olduğu durumdur. Relatif konrendikasyonu ise annenin HIV virüsü ile ya da kanla bulaşan Hepatit B gibi virüslerle enfekte olması, maternal koagülopati ve maternal yüksek ateştir. Ultrason eşliğinde yapılması olası komplikasyonları büyük ölçüde azaltmaktadır. Eksilen sıvı kısa süre içinde tamamlandığı ve görüntüleme eşliğinde

sıvı alındığı için fetüs bu yönlerden zarar görmez. En önemli komplikasyonları %0.3-0.5 civarında düşük, kanama veya enfeksiyon riskidir. Bazı gebelerde girişim sonrasında hafif karın ağrısı veya az miktarda kanama olabilir (47,50,54,55).

2.3.2. Koryonvillus Örneklemesi (CVS)

Koryonvillus örneklemesi plasentadan biyopsi alınması işlemidir. Gebeliğin 10. ve 12. haftaları arasında yapılır. En sık transservikal uygulansa da transabdominal de yapılır. Alınan örnekten kromozom, DNA analizi, biyokimyasal ve enzimatik ölçümler yapılabilir. CVS'in değeri gebelikte daha erken uygulanabilmesi ve böylece gebelik sonlandırma kararının daha önce alınabilmesidir. Yapılma oranı düşüktür. Bunun nedeni ise %1-5 oranında düşüklere ve distal uzuv defektlerine yol açmasıdır (47,55).

2.3.3. Kordosentez

Kordosentez transabdominal yolla ve ultrasonografi eşliğinde umbilical cord'dan kan alınması işlemidir. Amniyosentez, CVS ile tanıya ulaşamadığı durumlarda, gebelik haftası ileri olduğunda ya da kanda bakılması zorunlu bazı hastalıkların araştırılması için yapılabilir. Gebeliğin 21. haftasından sonra yapılır. Bebeğe doğrudan girişim yapılması nedeniyle daha ciddi bir takım riskler taşır.

Fetoskopi ve fetal biyopsi daha nadir kullanılan girişimsel yöntemler olup bu yöntemlere fetusun görülebilen malformasyonlarını saptamak ve fetal deri hastalıklarından şüpheniildiğinde biyopsi yapmak için başvurulmaktadır. Preimplantasyon genetik tanı ise tekrarlayan düşük, başarısız in vitro fertilizasyon öyküsü olan ve anöploidi tanısı almış ileri yaş gebelere yapılabilir (47,55).

2.4. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Tüm organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı arasında bir denge bulunmaktadır ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. 'Oksidatif stres' olarak

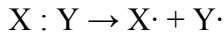
adlandırılan bu durum özetle serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (56).

2.4.1. Serbest Radikallerin Tanımı

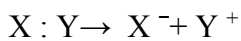
Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona (e^-) sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır (57,58). Eşleşmemiş elektron, serbest radikali kararsız bir duruma sokmaktadır. Kararlı yapıyı kazanmak için serbest radikal elektronunu başka bir elektronla eşleştirmeye çalışmakta ve kimyasal olarak büyük bir aktivite kazanmaktadır. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi sırasında serbest radikaller oluşmaktadır. Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral olabilirler (59).

Bir serbest radikal 3 yolla ortaya çıkabilir:

Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı ile: Böylece bölünme sonrası eşleşmemiş elektronlardan her biri ayrı parçada kalmakta ve iki adet serbest radikal oluşmaktadır.

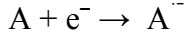


Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile: Radikal özellik göstermeyen molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitasında paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşmaktadır. Tokoferoller ve glutatyon gibi antioksidanlar, radikallere tek elektron verip radikalleri indirgerken; kendilerinin radikal formları oluşmaktadır. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalmakta ve serbest radikal değil iyonlar meydana gelmektedir.



Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile: Radikal özelliği bulunmayan moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilmektedir. Örneğin moleküller

oksijenin tek elektron indirgenmesi radikal formu olan süperoksidin oluşumuna neden olmaktadır.



Bu yollar ile oluşan moleküllerin yörüngelerindeki elektron sayısı, merkezdeki proton sayısına eşit olmadığından bu ajanlar daha çok aktifleşmekte ve negatif, pozitif yük dengesi oluşturabilmek için başka moleküllerden elektron almaya ya da dış orbitalarındaki paylaşılmamış elektronlarını vermeye çalışmaktadırlar (60-62).

Serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gereklidir. Bununla beraber serbest radikallerin fazla üretimi ise doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmakta ve kanser, ateroskleroz, sıtma, romatizmal artrit ve nöro-dejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarının patolojisinde rol oynamaktadırlar (63).

2.4.1.1. Reaktif Oksijen Türleri

Oksijen reaktif olmamasına rağmen diğer radikallerle reaksiyon verme özelliğine sahiptir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişi yapan bu moleküllere “oksidan moleküller” veya reaktif oksijen türleri (ROS) denir (64). ROS yalnız oksijen merkezli radikalleri değil aynı zamanda oksijenin nonradikal türlerini de içermektedir (Tablo 2.5), (65).

Tablo 2.5: Reaktif Oksijen Türleri- Halliwell B ve ark. (65)’den alınmıştır.

Radikaller	Radikal olmayanlar
Superoksid, $O_2^{\cdot -}$	Hidrojen Peroksit, H_2O_2
Hidroksil, $OH^{\cdot}$	Hipokloröz asit, $HOCl$
Peroksil, $ROO^{\cdot}$	Hipobromöz asit, $HOBr$
Alkoksil, $RO^{\cdot}$	Ozon, O_3
Hidroperoksil, $HO_2^{\cdot}$	Singlet oksijen, 1O_2

ROS normal metabolik olaylar sırasında oluşabileceği gibi çeşitli dış etkenler (endojen ve ekzojen) sonucunda da oluşabilmektedir. İnflamatuvar hücre aktivasyonu, peroksizom, mitokondri, sitokrom P450 metabolizması ve bazı geçiş

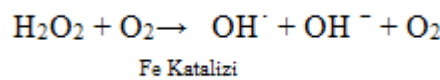
metalleri endojen kaynaklar olarak sayılabilmektedir (66). Çevresel ajanlar (sigara dumanı, pestisistler, anestezi maddeleri gibi), radyasyon, alkol ise ROS oluşumuna neden olan ekzojen kaynaklardır.

Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$); doğal oksijen molekülünün (O_2), çevresindeki herhangi bir molekülden bir elektron alması ile süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) oluşmaktadır (67).

Süperoksit radikali organizmada birçok mekanizmalarla üretilmektedir.

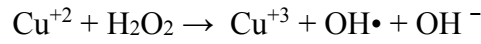
- Çeşitli antioksidan tepkimeler sonucu oluşmaktadır. Gliseraldehid, FMN, FADH₂, L-DOPA, noradrenalin, adrenalin, dopamin, sistein oksijeni yavaş şekilde $O_2^{\cdot-}$ haline dönüştürür. Ayrıca organizmada redükte halde bulunan bazı maddeler oksijeni oksitleyerek $O_2^{\cdot-}$ oluşturabilirler.
- Çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere birçok enzim katalitik etkisiyle süperoksit radikalini bir ürün olarak oluşturabilmektedirler.
- Hem proteinlerine O_2 bağlandığında yapısında bulunan Fe^{+2} , Fe^{+3} haline dönüştürülür ve bu sırada $O_2^{\cdot-}$ açığa çıkar.
- Mitokondride gerçekleşen elektron taşıma zincirinde normal koşullarda oksijen suya indirgenirken, zincirde yer alan NAD, FAD gibi yapılar oksijenle reaksiyona girip $O_2^{\cdot-}$ açığa çıkmaktadır.

Sulu çözeltilerde hidroksil radikaline kıyasla $O_2^{\cdot-}$ çok reaktif değildir. $O_2^{\cdot-}$ çeşitli tepkimelere girmektedir. Örneğin sulu çözeltilerde indirgen madde olarak rol oynar ve sitokrom c'de Fe^{+3} 'i Fe^{+2} 'e indirger. Ayrıca *Nitro blue tetrazolium*'u (NBT) formazana indirger ve bu özellikleri süperoksit dismutaz aktivitesinin ölçümünde kullanılır. Yükseltgen madde olarak da rol oynayabilmektedir. Glutatyon, askorbik asit gibi bazı antioksidanları oksitleyebilir. Fe^{+3} 'in süperoksit tarafından indirgenmesi Fenton tepkimesini hızlandırabilir ve süperoksit yardımcı Fenton tepkimesi meydana gelir (60).



Hidroksil Radikali (OH•); son derece reaktif bir radikal olup yarılanma ömrü kısadır. Canlılarda iki mekanizma ile oluşabilir.

- İyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle sulu ortamda su molekülünün iyonlaşması sırasında OH• açığa çıkmaktadır.
- Hidrojen peroksitin H₂O₂ homolitik fizyonu ile OH• yapımıdır. Vücutta OH•'nin en önemli kaynağını oluşturur. H₂O₂'nin bir 2e⁻ ile indirgenmesi sonucunda su oluşurken, 1e⁻ indirgenmesi OH• yapımına neden olur. Bu tür indirgenme demir, bakır gibi geçiş metallerince katalizlenmektedir.



Askorbik asit, süperoksit gibi indirgeyici bileşiklerin de yer aldığı bir ortamda, oksitlenen metal iyonu tekrar indirgendiğinden H₂O₂'den OH• yapımı sürekli bir duruma gelir. Haber-Weiss tepkimesi ya da fenton tepkimesi olarak adlandırılan bu tepkime ile oluşan OH•, vücutta üretilen H₂O₂ derişimi ve serbest metal iyonun varlığına bağlıdır.



Hidroksil radikalının kaynaklarından birisi de, ultraviyole ışınları ile uyarılmış homolitik fizyonla H₂O₂'nin O-O bağlarının yıkılması ve OH• oluşumudur.



OH• ultrason, litotripsi, dondurma ve kurutma gibi işlemler sırasında da açığa çıkabilir. Ayrıca hücrelerin γ ışınlarına maruz kalması sonucunda da oluşabilmektedir. Bu şekilde iyonize radyasyon ile oluşan OH• hücresel DNA, proteinler ve lipidlerin hasarlanmasına neden olur. Bu radikal ile oluşan en iyi tanımlanmış biyolojik hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur (60).

Hidrojen Peroksit (H_2O_2); oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksidlerin enzimatik ve nonenzimatik dismutasyon tepkimeleri sonucunda oluşmaktadır. Oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni hücre içinde Fe veya Cu gibi metal iyonlarıyla tepkimeye girerek hidroksil radikallerinin oluşumuna aracılık eder. Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek, yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturmaktadır. Bu formdaki demir hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilmektedir (68,69).

Singlet Oksijen (1O_2); ortaklanmamış elektronu olmadığı için nonradikal reaktif oksijen molekülüdür. Retinal gibi pigmentlerin oksijenli ortamda ışığı absorbe etmesiyle, hidroperoksitlerin metaller varlığındaki yıkım tepkimelerinde ve kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında ve prostoglandin endoperoksit sentaz, bazı sitokrom p450 tepkimelerinde, myeloperoksidaz ve laktoperoksidaz gibi enzimlerinin etkileri sırasında oluşmaktadır. Direk olarak doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek peroksil radikalini oluşturmakta ve lipid peroksidasyonunu başlatabilmektedir. Bilirubin, karotenler, histidin, metionin gibi bazı kimyasal bileşiklerle tepkimeye girerek singlet oksijeni temizlemekte ve ona bağlı tepkimeleri inhibe edebilmektedir (70,71).

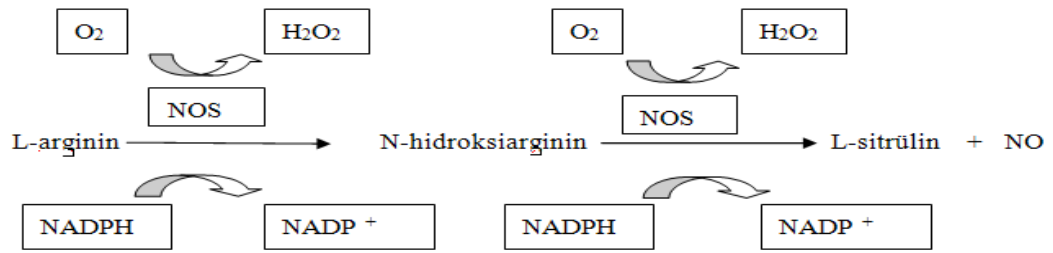
Peroksil ($ROO\cdot$) ve Alkoksil ($RO\cdot$) Radikalleri; güçlü oksitleyici maddelerdir. $OH\cdot$ 'nin organik moleküllerle reaksiyona girmesiyle karbon merkezli radikaller ($R\cdot$) oluşur. Bunlarında aerobik şartlarda O_2 'yle tepkimeye girmesi sonucunda $ROO\cdot$ oluşur. Netice de oluşan peroksil radikaller alkoksil radikallerini de oluşturan tepkimelerde yer alabilirler. Peroksil ve alkoksil radikalleri organik bileşiklerden hidrojen atomu alabilirler. Bu da lipid peroksidasyonunda önemlidir (60).

2.4.1.2. Reaktif Nitrojen Türleri

Reaktif nitrojen türlerinin (RNS) nitroksil anyonu (NO^-), nitrosonyum katyonu (NO^+), nitrojen dioksit ($NO_2\cdot$), S-nitrozotiol ($RSNO$) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi çeşitli nitrik oksit türevi olan bileşikler oluşturmaktadır. Reaktif nitrojen türleri organizmanın fizyolojik düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Örneğin düz

kas gevşemesi, kan basıncı düşmesi, sinir iletimi ve immün sistem düzenlenmesi gibi olaylarda biyolojik sinyal molekülü şeklinde davranmaktadırlar (72).

Nitrik oksit (NO•); L-argininden sitrulin oluşumu sırasında, L-argininin guanidin nitrojen grubunun hidroksilasyonu ile oluşan ara üründür (Şekil 2.6). Bu reaksiyon bir dizi nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından katalize edilir.



Şekil 2.6: Nitrik oksit sentezi – Edgaras Stankevičius ve ark. (73)’ndan alınmıştır.

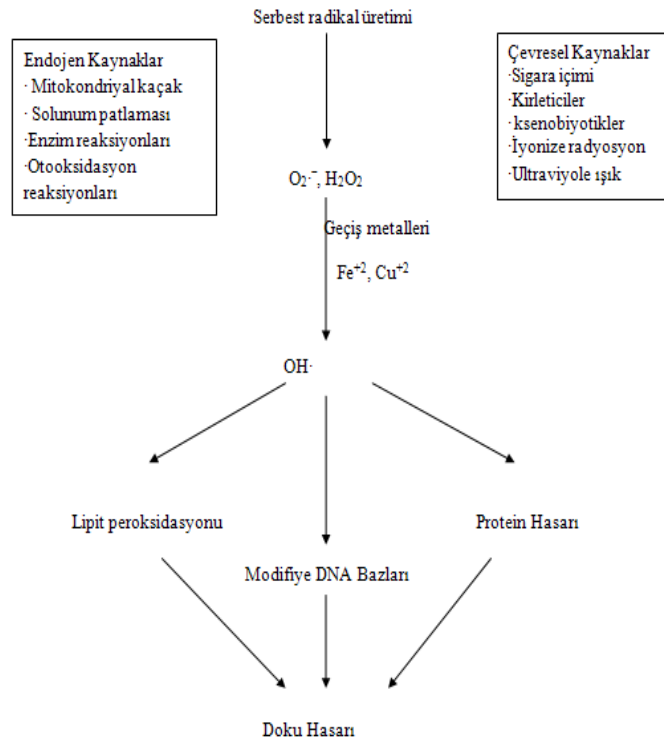
Bu enzimin nöronal (nNOS), endotelial (eNOS) ve indüklenebilir (iNOS) olmak üzere üç formu vardır. eNOS ve nNOS enzimleri tarafından üretilen çok düşük konsantrasyondaki NO düz kaslarda ve sinir sisteminde hücre içi ve hücreler arası haberci olarak kullanılır. Haberci molekül olarak sitoplazmik guanilat siklazı aktive ederek hücrelerde cGMP konsantrasyonunu artırarak cGMP’nin değişik enzimler aracılığıyla hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesini sağlar. Nitrik oksit sentazların indüklenebilir formu ise fagositik lökositler olmak üzere çeşitli hücrelerde bulunur ve sentezi IL-1, TNF- α ve γ -interferon gibi sitokinler ve endotoksinler tarafından indüklenir. iNOS enziminin aktivitesi kalsiyumdan bağımsız olup kontrol edilemediğinden, ortamda arjinin bulunduğu sürece aktiftir (71,73,74).

Endojen NO üretimi gebelerde artmaktadır. Bu şekilde gebelerde plasentanın kanlanması ve fetüsün besin infüzyonunun NO’nin vazodilatör özelliğinden dolayı iyi bir şekilde olmasını sağlar (8).

Radikal olarak reaktivitesi düşük olan NO, metal içeren merkezler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girer. Özellikle lipid radikallerle (örneğin hücre zarında) tepkimeye girmesi NO'e antioksidan bir etki kazandırır. Süperoksit ile NO arasındaki tepkime ile oluşan peroksinitrit (ONOO^-), hidroksil radikali benzeri aktiviteye sahip olup radikalik tepkimeleri başlatarak biyomoleküllerin nitrasyonuna neden olur. ONOO^- yarılanma ömrü uzun güçlü bir oksidandır. Organizmada peroksinitrit, hidroksil radikali gibi davranan hidroksinitrite (HOONO) dönüşür. Peroksinitritin parçalanmasıyla yüksek derişimde azot dioksit (NO_2) oluşur. Bu reaktif nitrojen bileşikleri lipidler, DNA, aminoasitler ve metallerle reaksiyona girerek enzim fonksiyonlarını bozup membran bütünlüğüne zarar verir (74,75).

2.4.2. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri ve Lipit Peroksidasyonu

Serbest radikallerin biyolojik sisteme birçok zararlı etkileri vardır. Nükleik asitler, aminoasitler, proteinler, karbonhidratlar ve lipitler gibi bütün hücre elemanlarında hasara neden olabilirler (Şekil 2.7), (76).



Şekil 2.7: Vücuttaki major serbest radikal kaynakları ve serbest radikal hasarının sonuçları - Young ve ark. (77)'dan alınmıştır.

Lipidlere etkileri (Lipid peroksidasyonu): Yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliunsatüre yağ asitleri sebest radikal hasarına oldukça hassastır. Bu oksidatif hasara lipit peroksidasyonu denir (75). Memeli hücre membranı büyük miktarda çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) içermektedir. Bu yağ asitlerinin peroksidasyonu hücresel hasarın en önemli nedenlerinden birisidir. Lipit peroksidasyonu çoklu doymamış yağ asidinden bir hidrojen atomu uzaklaştırıldığında lipit radikali ($L\cdot$) oluşur. Bu molekül O_2 ile tepkimeye girdiğinde lipit peroksil radikali ($LOO\cdot$) oluşur. $LOO\cdot$ membran yapısındaki diğer ÇDYA moleküllerinden hidrojen atomları çıkartarak yeni reaksiyonlar başlatır. Kendileri ise açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine ($LOOH$) dönüşür. Metal iyonlarının etkisi ile bazı enzimatik tepkimelere katılan bu peroksit ürünlerinden etan, pentan ve MDA gibi yıkım ürünleri açığa çıkarak lipit peroksidasyon reaksiyonları sona erer.

Lipit peroksidasyonu sonucunda hücre membranı transport sistemi de etkilenerek iyon dengesi bozulur. Bunun sonucunda hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar ve buna bağlı olarak proteazlar aktive olarak hücre hasarına neden olurlar.

Proteinlere etkileri: Prolin, lizin gibi aminoasitler serbest radikallerden etkilenirler. Protein oksidasyonu özellikle histidin, trozin ve fenilalanin gibi aminoasitlerde karbonil gruplarının oluşumu şeklinde olur. Lipit peroksidasyonunun aldehit yapıdaki ürünleri sisteinin sülfidril grupları ile veya lizin ve histidinler ile kovalent bağlar oluşturarak proteinlerde fragmentasyon ve çarpaz bağlanmalara yol açar.

Nükleik Asitler ve DNA'e Etkileri: Serbest radikallerin etkisiyle DNA yapısında yapısal değişimler olur. Bunlar pürin ve pirimidin bazlarında parçalanma, zincir kırılmaları ve DNA denatürasyonu gibi çeşitli olayları içerir (61,78).

2.5. Antioksidan Sistem

Hücrelere oksidatif hasarı önleyen, yok eden veya kısmen azaltan bazı mekanizmalar bulunmaktadır. Antioksidan madde ise okside olabilen bir substrata göre ortamda daha düşük konsantrasyonda bulunduğu o substratın oksidasyonunu belirgin şekilde geciktiren veya engelleyen herhangi bir maddeye denmektedir (60). İyi bir

antioksidan madde hem hücre içinde hemde sulu ortamlarda etki gösterebilmeli, dokularda belirli bir derişimde bulunmalı, serbest radikallerin etkilerini yok edebilmeli, metaller ile redoks tepkimelerine girebilmeli ve gen ekspresyonunun sağlayabilmelidir (79).

Antioksidan sistemde dört farklı mekanizma ile oksidanlar etkisizleştirilir (80):

1. *Temizleme Etkisi:* Antioksidan enzimler tarafından oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde yapılır.
2. *Baskılama Etkisi:* Vitaminler ve flavonoidler oksidanlara bir hidrojen aktararak onları etkisiz hale getirirler.
3. *Onarma Etkisi:* Serbest radikallerin oluşturduğu hasarları onaran antioksidanlar bulunmaktadır. Örneğin DNA tamir genleri membran lipidlerinin oksidasyonunu önleyerek antioksidan aktivite gösterir (81).
4. *Zincir Koparma Etkisi:* Hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından oksidanlar bağlanarak fonksiyonları önlenmektedir.

Antioksidan sistem; enzimleri, suda ve yağda çözünen radikal tutucuları ve metal iyonları bağlayan proteinleri kapsar (Tablo 2.6).

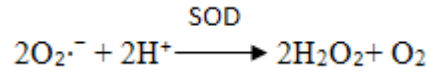
Tablo 2.6: Organizmada antioksidan sistem elemanları (78)'den alınmıştır.

Enzimler	Suda Çözünen Radikal Tutucular	Yağda Çözünen Radikal Tutucular	Metal İyonlarını Bağlayan Proteinler
Süperoksit dismutaz	Glutasyon	E vitamini	Ferritin
Katalaz	C vitamini	B karoten	Transferrin
Glutasyon peroksidaz	Ürik asit	Bilirubin	Haptogloblin
Glutasyon redüktaz		Ubikinol	Seruloplazmin
Glutasyon transferaz		Flavanoidler	Albumin

2.5.1. Enzim Yapısında Olan Antioksidanlar

2.5.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

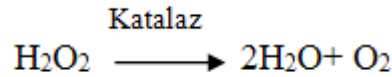
Süperoksit dismutaz enzimi süperoksit radikalini dismutasyona uğratarak H₂O₂ ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar. Organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzim SOD'dır (78).



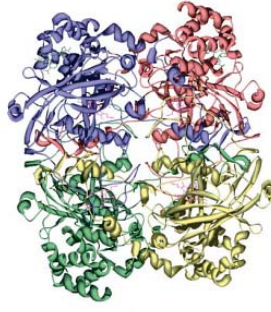
İnsanlarda SOD'ın bakır-çinko SOD (Cu, Zn-SOD) ve mangenez SOD (Mn-SOD) ve demir SOD (Fe-SOD) olmak üzere 3 izomeri bulunmaktadır. Cu, Zn-SOD sitozolik Mn-SOD ise mitokondriyal yerleşimli enzimdir. Cu-Zn SOD enziminin genleri 21. kromozomda, Mn-SOD enziminin genleri ise 6. kromozomda lokalizedir. Mn-SOD mitokondride bulunduğundan burada oluşan serbest radikallere karşı oldukça etkilidir. Cu,Zn-SOD ve Mn-SOD'nin fizyolojik pH'da mekanizmaları benzer olup alkali pH'da Mn-SOD'ın aktivitesi azalırken Cu,Zn-SOD'nin aktivitesi değişmez. Demir içeren SOD izoenzimi ise hayvan dokularında gösterilememiş ancak çoğu bakteride bulunmaktadır (60,82).

2.5.1.2. Katalaz (CAT)

Yapısal olarak bir hemoproteindir. Hidrojen peroksiti suya ve oksijene parçalayan reaksiyonu katalizler.



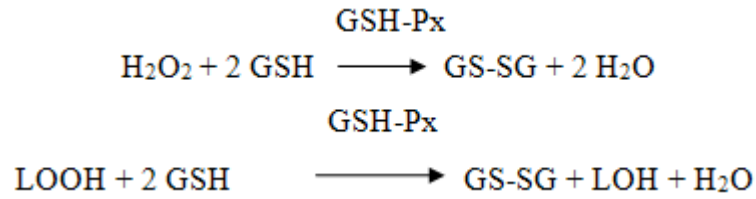
Katalaz dört hem grubu içeren bir hemoproteindir (Şekil 2.8). Enzimin dondurulması ya da asit ve alkaliye maruz bırakılması alt birimlerin ayrışmasına neden olarak aktivite kaybına yol açar. Enzim peroksizomlarda bulunmaktadır. Mitokondri ve endoplazmik retikulum çok az katalaz içerir. Katalazı kodlayan gen 11. kromozomdadır. Bu gende hasar olduğunda akatalezemi görülür (60).



Şekil 2.8: Katalazın üç boyutlu moleküler yapısı - Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function (83)'dan alınmıştır.

2.5.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

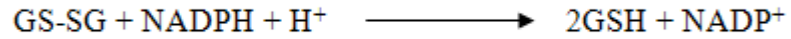
Hidrojen peroksit ve lipit hidroperoksitleri üzerine etkilidir. Redükte glutasyon ile hidrojen peroksitin tepkimeye girip okside glutasyon ve su oluşturduğu reaksiyonu katalizleyen enzimdir. Aktivitesi için selenyuma ihtiyaç duymaktadır.



Bu reaksiyonlarda glutasyon (GSH) hidrojen verici olup H_2O_2 ve LOOH'lar indirgenirken, GSH oksitlenmiş şekline (GS-SG) dönüşür. Oksitlenmiş glutasyon ise NADPH'a bağımlı glutasyon redüktaz tarafından tekrar GSH'a indirgenir. Bu sayede glutasyon peroksidazın işlev görebilmesi için gerekli olan redükte glutasyonun devamlılığı sağlanır. Glutasyon peroksidaz ve katalaz H_2O_2 'in temizlenmesinde birlikte görev alırlar Glutasyon peroksidaz enziminin genleri 3. kromozomda lokalizedir (60,78).

2.5.1.4. Glutasyon Redüktaz

Okside glutasyonun redükte hale çevrilmesi glutasyon redüktaz enzimiyle gerçekleştirilir. Bu tepkimenin gerçekleşmesi için NADPH gereklidir.



Glutatyon hücre içinin en önemli antioksidan molekülü olup serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girip hücreleri oksidan hasara karşı korur (60,78).

2.5.1.5. Diğer Antioksidan Enzimler

Tiyoredüksinler, glutatyon-S-transferaz ve sitokrom oksidaz da antioksidan aktivite gösteren enzimlerdir.

Tiyoredüksinler, direk olarak H_2O_2 ile reaksiyona girerek antioksidan aktivite gösterir. Ayrıca oksidan strese uğramış gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenazı da tekrar redükte hale getirebilir.

Glutatyon-S-transferaz, GSH-Px gibi etki göstermektedir. Ancak kofaktör olarak selenyum kullanmaz. Fosfolipit hidroperoksit gibi diğer hidroperoksitlerin yıkılmasında rolü bulunmaktadır.

Sitokrom oksidaz, yapısında bakır içermektedir. Mitokondride elektron transport zincirinin enzimi olup süperoksidi temizlemektedir (60).

2.5.2. Enzim Yapısında Olmayan Antioksidanlar

2.5.2.1. Askorbik Asit

Suda çözünen güçlü antioksidan bir moleküldür. İki tane iyonize olabilen -OH grubu içerir. İnsanlarda sentez edilemediğinden besinlerle alınması gerekir. Vücutta birçok enzimin kofaktörü olarak görev yapar. Bunlardan en önemlileri lizin hidroksilaz ve prolin hidroksilazdır. Süperoksit radikali, hidroksil radikali ve singlet oksijen ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Sulu fazda bulunmasına rağmen lipit peroksidasyonunu başlatıcı radikalleri temizleyerek lipitleri ve membranları oksidatif hasara karşı korur. E vitamini rejenerasyonunda rol alır. Böylece E vitamini ile beraber düşük dansiteli lipoproteinleri oksidasyona karşı korur. İn vitro yapılan çalışmalarda askorbik asidin demir veya bakır karışımlarının süperoksit radikali

oluşumuna yol açarak DNA'a, proteinlere ve lipitlere hasar verebileceği gösterilmiştir (60,78).

2.5.2.2. Karotenoidler

Karotenoidler bitkilerde bulunan, açık sarı-kırmızı arası renkleri veren pigmentlerdir. Karotenoidler, birbiri ardına dizilmiş izoprenoid birimlerinden oluşmuştur. Suda çözünmezler, alkali ortamda stabildirler. Bazı karotenoidler A vitamini ön maddesi olarak aktivite gösterirler ve bu nedenle vücut için gerekli olan A vitamininin sentezi açısından önemlidirler. A vitamini eksikliği sonucu oluşabilecek hastalıkların, koroner kalp rahatsızlıklarının ve kanserin önlenmesinde önemli rolleri bulunmaktadır. Karotenoidlerin singlet oksijeni ve reaktif oksijen türlerini temizlerler. Sahip oldukları antioksidan özellikleri sayesinde kanseri önleme ya da geciktirmede etkilidirler. Karotenoid alımı ile özellikle akciğer kanseri riskini düşürmede başarılı sonuçlar elde edilmiştir (84).

2.5.2.3. E Vitamini

E vitamini yağda çözünen çok önemli bir antioksidan moleküldür. Sekiz farklı izoformu vardır. α -tokoferol insanda en aktif olan formdur. E vitamininin bu formu hücre membranındaki lipitleri koruyan en önemli antioksidandır (85). Lipit peroksil radikallerini membran proteinleriyle ya da lipit yan zincirleriyle tepkimeye girmeden hızlıca temizler. Askorbik asit gibi geçiş metalleri varlığında zayıf prooksidan etkiye yol açabilir. Antioksidan etkisinin yanı sıra membran stabilize edici etkisi de bulunmaktadır (60).

2.5.2.4. Düşük Molekül Ağırlıklı Ajanlar

Genelde protein yapıda olan bu antioksidanlar vücutta *invivo* olarak sentezlenir ya da diyetle alınır. Başlıcaları bilirubin, melatonin, lipoik asit, koenzim Q, ürik asit, seks hormonlarıdır. *Bilirubin* albümine bağlanarak taşınır. Bilirubinin albümine bağlanması ile albumin bağlı yağ asitlerinin oluşturduğu radikal hasarına karşı koruyucu etki gösterir. Ayrıca singlet oksijeni ve peroksil radikallerini ortamdaki temizler. *Koenzim Q* mitokondriyal elektron transport zincirinde rol oynar. Lipit

peroksidasyonunu inhibe eder ve reaktif oksijen türlerini ortamdan temizler. *Östrojen*, *östradiol* ve *östron* lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Bu etkileri için daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılmaları gerekir. Bu da endometrium kanseri gibi istenmeyen yan etkilere neden olabilir (60). *Ürik asit* insanlarda pürin katabolizmasının son ürünüdür. Plazma antioksidan kapasitesinin %60'ını oluşturmaktadır. Serbest radikallerle direk reaksiyona girerek ya da geçiş metalleriyle kararlı bileşikler oluşturarak antioksidan aktivite gösterip lipid peroksidasyonunu önlemektedir (86). *Melatonin* pineal glanddan triptofandan sentezlenir. Hidroksil radikalini temizler ve lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Mikrozomal zarları stabilize ederek oksidatif hasara karşı hücreyi korur. Ayrıca katalaz, süperoksit dismutaz gibi enzimlerin aktivitesini artırarak güçlü bir antioksidan aktivite gösterir (87).

2.5.2.5. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler ya da polifenoller, bitkilerin yapısında çok bulunan, bitkilerin tat, aroma gibi özelliklerine katkıda bulunan, bitkileri çeşitli zararlı organizmalara karşı koruyan çok fonksiyonlu ve karışık yapıya sahip bileşiklerdir. Yapısal olarak bir veya daha fazla aromatik halka yapısına ya da bir veya daha fazla –OH grubuna sahiptirler. Değişik şekilde sınıflandırılabilirler. En yaygın sınıflama moleküldeki karbon sayısına göre yapılan sınıflandırmadır. En basit fenolik bileşik bir tane –OH grubu içeren benzen yani fenoldür. Fenolik bileşiklerin antikarsinojen, antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyel ve antiviral etki gibi birçok etkileri vardır. Ayrıca kardiyovasküler hastalıkları azaltıcı etkileri de bulunur. Bunu oksidatif stresi çeşitli yollardan azaltarak, aterosklerotik plakların büyümesini engelleyerek, plazma lipid düzeylerini düşürerek ve platelet agregasyonunu inhibe ederek gerçekleştirirler (60).

2.5.3. Pürin Metabolizması

Deoksiribonükleozid ve ribonükleozidfosfatlar (nükleotidler) bütün hücreler için esansiyel maddelerdir. Nükleotidler olmadan DNA ve RNA sentezlenemez. DNA ve RNA sentezlenemez ise protein sentezi de yapılamaz ve hücre proliferasyonu sağlanamaz. Ayrıca hücrelerin büyüme ve farklılaşmasında önemli yerleri olan karbonhidratların, lipidlerin ve proteinlerin sentezinde nükleotidler ara ürünlerin

aktifleşmesi sonrası taşıyıcı olarak da rol oynarlar. Metabolik işlemlerde enerji vericisi olarak, hormon ve benzeri hücre dışı uyarılara cevap verilmesinde kullanılırlar, pek çok metabolik ara bileşiklerin ve enzim kofaktörlerinin yapısında bulunurlar. Pürin ve primidinler de novo sentez yoluyla elde edilebilir ve diyetle bulunan daha önce sentezlenmiş bazlar bu şekilde yeniden kullanılmış olurlar Bu döngü içinde yapım ve yıkım tepkimeleri bir denge halinde sürmektedir. Pürin yıkım basamağında ADA ve XO rol alarak sağlıklı bireylerde bu denge halinin oluşturulmasında önemlidirler (88).

2.5.3.1. Adenozin Deaminaz (ADA)

Adenozin deaminaz (E.C.3.5.4.4) adenozinden inozin, 2'deoksiadenozinden 2'deoksiinozine hidrolitik deaminasyonunu katalize eden pürin metabolizması enzimidir. ADA immün sistemin olgunlaşmasına katkıda bulunur. ADA lenfoid hücrelerin olgunlaşmasında ve farklılaşmasında rol oynar ve olgunlaşma sürecinin farklı safhalarında kritik olarak görülür. ADA inflamatuvar cevap ve sitokin üretimi ile ilgili olan plazma adenozin düzeylerini de düzenler. Plazma adenozin deaminaz aktivitesi immunolojik durumu değiştiren çeşitli otoimmun ve inflamatuvar hastalıklarda değişir. Plazmadaki ADA'nın temel kaynağı lenfositler veya monosit-makrofaj hücre sistemi olabilir (89).

2.5.3.2. Ksantin Oksidaz (XO)

Ksantin oksiaz (EC 1.1.3.22) ksantin oksido redüktaz grubu bir enzimdir. İnsanlarda karaciğer ve bağırsaklarda bulunmaktadır. Bu enzim pürin katabolizmasında son basamaklar olan hipoksantin ve ksantine ve ksantin de ürik asite oluşumunu sağlayan enzimdir. Ksantin oksiaz enzimi vücutta en çok hepatosit sitoplazmasında, meme epitelinde ve vasküler endotel hücrelerde bulunmaktadır. Oksijeni indirgeyerek hidrojen peroksit, süperoksit gibi reaktif oksijen kaynakları oluşturduğu ve nitriti nitrit okside indirgeyerek kuvvetli antimikrobiyal etki gösteren peroksinitrit oluşumunda rolü olduğu bilinmektedir (90-92).

2.6. Down Sendromu ve Oksidatif Stres

Yapılan çalışmalar DS'nun genlerin ve proteinlerin ekspresyonundaki düzensizliklerden kaynaklandığını ve hastalığın patogenezinde/ilerlemesinde oksidatif stresin rol oynadığını göstermektedir (93). DS'nda embriyolojik yaşamın erken döneminde hücrelerde ROS artmakta ve nöronlar gibi birçok hücrede hasar meydana gelmektedir. Sonuçta bu hasar hayatın erken döneminde mental retardasyona ve erişkinlerde ise Alzheimer hastalığının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (94). Oksidatif stresin artması kromozom 21 tarafından kodlanan bazı genlerin artmış ekspresyonuna neden olur. Bunlar arasında SOD enziminin alt türlerinden Cu,Zn-SOD 21. kromozomda kodlandığından DS'de ekspresyonu ve aktivitesi artmaktadır. SOD enzim aktivitesinin artması sonucu açığa çıkan aşırı miktarda H₂O₂, GSH-Px ve katalaz enzimlerinin uzaklaştırabileceğinden fazla olduğundan temizlenemeyen H₂O₂ birikir ve ciddi bir oksidatif stres meydana gelmektedir. Neticede hücrelerde oksidatif hasar oluşmakta ve MDA, 8-hidroksi-2-deoksiguanozin gibi oksidatif DNA hasarı belirteçlerinin düzeylerinde artış meydana gelmektedir (2,10). Down Sendromunda gözlenen bu oksidatif stres artışının prenatal dönemde başladığı bildirilmiştir. Down Sendromu tespit edilen gebelerin amniyotik sıvılarında SOD aktivitesinin arttığı görülmüş olup lipit peroksidasyonun da normale göre artmış olduğu bildirilmiştir. Sonuçta DS fetüslerin beyinlerinde de lipit peroksidasyonunun ve DNA oksidasyon ürünlerinin artmış olduğu gösterilmiştir (11,95). İn vitro olarak DS'li bireylerin nöronlarında oluşmuş dejenerasyonun antioksidan vitaminler ve katalaz ile düzeltilebildiği gösterilmiş ancak bununla ilgili in vivo araştırmaların yetersiz olduğu da öne sürülmektedir (10).

2.7. Sitokinler

Sitokinler bir dizi hücre tarafından üretilen inflamatuvar sistemi, bağışıklık sistemi ve hematopoezi düzenleyen küçük glikoproteinlerdir. Sitokinler birçok fizyolojik ve patolojik fonksiyonları düzenlerler. Edinsel bağışıklık, kazanılmış bağışıklık ve inflamatuvar yanıtlar bu fonksiyonlardan bazılarıdır. Belli bir sitokin çeşitli hücreler tarafından farklı dokularda salgılanır fakat aynı biyolojik etkiyi gösterir. Sitokinlerin etkileri sistemik veya lokaldir. Bazıları klasik hormon gibi davranırlar. Şöyle ki; belli

hücreler tarafından kana veya çeşitli hücresel sıvılara salgılanıp vücudun diğer bölgelerindeki hücresel reseptörlerine bağlanırlar. Bazıları da daha lokal etki gösterirler. Bunlar otokrin (bir hücre tarafından salgılanan sitokinin aynı hücre üzerine etkisi) ve parakrin (belli bir hücre tarafından salgılanan sitokinin yakındaki komşu hücreye etkisi) etkilerdir.

Sitokinlerin tanımlanması ve karakterize edilmesi çeşitli isimlendirme ve sınıflandırma sistemine göre yapılmıştır. Bu sınıflandırma sitokinler arasındaki fonksiyonel benzerliklere ve sitokinlerin etki mekanizmalarına dayanmaktadır. Sitokinler başlıca şu ana gruplara ayrılmaktadır:

1. Büyüme faktörleri (Epidermal büyüme faktörü, platelet orijinli büyüme faktörü)
2. Lenfokinler (interlökin-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9 ve IL-10)
3. Koloni sitimüle eden faktörler (Granülosit/makrofaj koloni sitimüle eden faktör, eritropoietin, lösemi inhibitör faktör)
4. Transforme edici büyüme faktörleri (TGF- α ; TGF- β)
5. Tümör nekroz faktörleri (TNF- α ; TNF- β)
6. İnterferonlar (IFN- α ; IFN- β ; IFN- γ) (Cö, Cp).

Sitokinler monositler, makrofajlar, T lenfositler, fibroblastlar ve kemik iliği stroma hücreleri gibi birçok hücre tarafından sentezlenirler. T lenfositler, dolaşımdaki lenfositlerin %60-80 kadarını oluştururlar ve periferik kandaki T hücrelerinin üçte ikisi CD4+, üçte biri CD8+ yüzey reseptörleri taşırlar. CD8+ yüzey reseptörü taşıyan lenfositler sitotoksik fonksiyon yapan efektör T hücrelerinden oluşur. CD4+ T lenfositleri, T helper (Th) hücreleri olarak da isimlendirilirler ve Th1 ve Th2 olmak üzere iki önemli alt grubu mevcuttur (96). Th1 hücreleri interferon-gamma (IFN- γ), tümör nekroz faktör-alfa ve beta (TNF- α , TNF- β) ve interlökin-2 (IL-2) sitokinlerini sekrete ederken, Th2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 sitokinlerini sekrete ederler. IL-1, TNF- α , IFN-g, IL-6 proinflamatuvar sitokinler; IL-4, IL-10, IL-12 ve IL-13 ise antiinflamatuvar sitokinlerdir (97).

Th1 tipi sitokinlerin direkt embriyotoksik aktivite göstererek veya plasental trofoblast hasara neden olarak gebeliğe zararlı etkileri olabileceği bildirilmektedir

(96). İnsanlarda, antijen veya mitojenlerle indüklenmiş periferik kan mononükleer hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda, abortusların Th1 grubundan IL-2 ve INF- γ konsantrasyonlarında artış ve Th2 grubundan olan IL-10 konsantrasyonunda azalış ile birlikte olduğu rapor edilmiştir. Gestasyon yaşı küçük (SGA) bebeklerde ise annelerin amniyon sıvılarında IL-10 düzeyleri bakılmış ve yükselmiş olduğu görülmüştür (98). Ayrıca yapılan çalışmalarda, amniyotik kavitede inflamasyon olduğunda amniyon sıvısında IL-6 konsantrasyonunun arttığı görülmüştür ve amniyon sıvısında artan interlökin-6 düzeylerinin akut koryoamniyonit muhtemel tanısı için hassas bir test olabileceği ön görülmüştür. Amniyon sıvısında yüksek konsantrasyonda IL-6 bulunması neonatal komplikasyonların ortaya çıkmasında rol oynadığı gösterilmiştir (99). Son kanıtlar plasental trofoblast hücrelerin IL-6 ürettiğini ve IL-6'nın fetal-maternal etkileşimde immün regülatör olduğunu göstermektedir (100). Bu çalışmalar sitokinlerin ve humoral faktörlerin, plasantasyon ve vaskülarizasyon basamağında etkili faktörler olduğunu ve bunların gebeliğin prognozu üzerinde muhtemelen etkili olduklarını göstermektedir.

Gebelikte immün sistem baskılanmakla birlikte organizma mikrobik enfeksiyonlara karşı, immünite aracılı doku gelişimi ve farklılaşması için kendini korumalıdır. Bu nedenle proinflamatuvar sitokin düzeyleri fetal organlara zarar vermeyecek ve erken doğuma yol açmayacak seviyelerde tutulmalıdır (101).

2.7.1. İnterlökin 6 (IL-6)

IL-6'nın en önemli kaynağı mononükleer fagositik hücrelerdir. Ayrıca IL-6 B ve T lenfositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, hepatositler, keratinositler, astrositler ve kemik iliği stroma hücreleri tarafından da sentezlenir. IL-6 geni, 7. kromozomun kısa kolunda lokalizedir. Çeşitli sitokinler [TNF- α , IL-1, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), İnterferon-beta (IFN- β)], antijenler, mitojenler ve bakteriyel endotoksinler (lipopolisakkarit) farklı hücre tiplerinde IL-6 oluşumunu uyarır. Beyin omurilik sıvısı (BOS)'daki IL-6 yapımı ise virüsler ve fibroblastlar tarafından indüklenir. Human immunodeficiency virus (HIV), monositlerde IL-6 yapımını uyarır (102). İn vivo ve in vitro olarak IL-6, B hücrelerinin farklılaşmasını ve timus hücrelerinin aktivasyonunu sağlar. İmmünglobulin salgılayan plazma hücrelerinin

farklılaşması için de IL-6'ya ihtiyaç vardır (103). IL-6 fibroblastların antiviral aktivitelerini, prostaglandin üretimini artırır. Ayrıca IL-6 bilinen bütün akut faz proteinlerinin sentezlerini uyarmaktadır. Dokuda hasar oluştuğunda makrofajlar, epitel hücreleri ve fibroblastlar gibi inflamatuvar hücrelerden sitokinler salgılanır ve bu sitokinler hepatositlere doğrudan etki ederler. İnflamasyona yanıt olarak hipotalamo hipofizer adrenal aksın uyarılmasıyla kortikosteroidler salgılanır ve sitokinlerin bu aktiviteleri daha da güçlenir. Karaciğer hücrelerinde IL-6 reseptörleri ekspresyonunun kortizol tarafından uyarılması ile IL-6 aracılı akut faz proteinleri sentezi uyarılmaktadır. Aynı zamanda özellikle IL-6 olmak üzere, diğer sitokinler de steroid biyosentezini artırmaktadırlar. IL-6 bilinen tüm sitokinlerin sentezini artırır. IL-6 düzeyinde meydana gelen değişiklikler B lenfosit fonksiyonunu ve immünglobülin sentezini olumsuz etkileyerek humarol immüniteyi de baskılamaktadır (61,104).

2.7.2. İnterlökin 10 (IL-10)

İnterlökin 10 T lenfosit, makrofaj, keratinosit ve B lenfositlerden sentezlenir. B lenfosit çoğalmasını ve immünglobülin sekresyonunu uyarır. IL-10 sitokin sentez inhibitörü olarak bilinir ve proinflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyonunu inhibe eder. Bu şekilde inflamatuvar reaksiyonların çözülmesinde önemli bir rol oynar. İnflamatuvar reaksiyonlarda IL-10 ekspresyonu genellikle geç inflamatuvar süreçte olup böylelikle organizmada inflamasyona neden olan patojenlere karşı uygun bir yanıt verilir. IL-10 kromozom 1 üzerinde lokalize olmuş bir gen tarafından kodlanır. IL-10, IL-3 ile birlikte megakaryositlerin büyüme ve gelişmesini uyarır. IL-10 B lenfositlerin proliferasyonunu ve atikör üretimini artırır. Ayrıca hematopoetik progenitör hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasını artırır. IL-10, IL-6 gibi akut faz proteinlerinin üretimini uyarmakta ve B hücrelerinin büyümesini ve plazma hücrelerine dönüşümünü arttırmaktadır (61,105). IL-10 implantasyon ve gebelikte plasenta ve trofoblastlardan tarafından üretilir ve immümsüpresan özellikte olması nedeniyle fetal rejeksiyonu önler. IL-1β uyarılmasına tepki olarak desidual hücreler tarafından IL-10 üretimi de tanımlanmıştır. Bu bulgular gebelikte IL-10'un önemli bir rolü olduğunu gösterir. Doğumda veya intrauterin enfeksiyon varlığında amniyotik sıvıdaki IL-10 konsantrasyonunu gösteren yapılmış herhangi bir invivo

Çalışma yayınlanmamıştır. IL-10 konsantrasyonu enfeksiyon nedeniyle preterm doğum yapmış hastaların amniyon sıvısında incelenmiş ve zamanında ya da enfeksiyon olmadan gerçekleşen preterm doğum yapmış hastaların amniyon sıvısında daha yüksek konsantrasyonda bulunmuştur. Bu bulgular IL-10'un intrauterin enfeksiyona neden olan inflamatuvar süreci stimüle etmesiyle aıklanabilmekle birlikte henüz IL-10'un intrauterin enfeksiyondaki kesin rolü anlaşılamamıştır. İleride yapılacak olan alışmalar IL-10'un gebelikteki ve preterm doğum tedavisindeki terapatik potansiyel etkisini ve nasıl bir rol oynadığını açıklayabilir (106).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gönüllü Seçimi

Bu araştırma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan gerekli izin alınmıştır (Ek 1). Araştırmaya katılan tüm gönüllülerin aydınlatılmış onamları alınmıştır (Ek 2). Bu çalışmada kullanılan materyaller; 15 Eylül 2013 tarihinden itibaren Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genetik Merkezi'ne başvuran gebelerden, 16-20. gebelik haftaları arasında ultrasonografi eşliğinde yapılan ikili ve üçlü testlerde DS açısından risk taşıyan gebelerin amniyon sıvılarının alınarak karyotip analizi sonucu Trizomi 21'li fetüse sahip olduklarının belirlenmesiyle oluşturulmuştur. Çalışmamızda DS'lu ve normal karyotipli bebeğe sahip olan gebelerin amniyon sıvısı toplanarak iki grup oluşturulmuştur. Çalışma grubunu DS'lu bebeğe sahip gebelerin amniyon sıvısı kontrol grubunu ise sağlıklı bebeğe sahip gebelerin amniyon sıvısı oluşturmaktadır. Çalışmamızın başarısının ve güvenilirliğinin yüksek olması için Two-Sample T-Test Power Analiz yaparak çalışacağımız örnek sayısını belirledik. Buna göre DS'lu vaka sayısı (çalışma grubu) 18 ve kontrol grubumuz 36 olduğunda 0,05 hata ile power analizimiz %82 olmaktadır. Bu değerler bizim çalışmamızın güvenilirliği açısından kabul edilebilir değerler olarak tespit edilmiştir. Toplanan amniyon sıvıları çalışma gününe dek -80°C'de saklanmıştır. Araştırma için hedeflenmiş olan 18 sayısına ulaştığımız 20 Haziran 2014 tarihinde örnek toplama aşaması sonlandırılmıştır.

Çalışma ve kontrol grupları oluşturulduktan sonra Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Prof. Dr. Zuhall Yurtarslanı Araştırma Laboratuvarında MDA, SOD, GSH-Px, XO, CAT, ADA, NO, NOS, IL-6 ve IL-10 testleri çalışılmıştır.

3.2. Gereçler

3.2.1. Cihazlar

- ELISA okuyucu ve yıkayıcı (ChemWell® 2910 Automated EIA and Chemistry Analyzer)
- 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
- Su Banyosu/Grant Ins
- Whirlmix 20 W vorteks
- Çeşitli hacimlerde ayarlanabilir hacimli otomatik pipetler ve cam pipetler
- Çeşitli boyutlarda cam ve polipropilen deney tüpleri ve eppendorf tüpleri

3.2.2. Kimyasal Maddeler

IL-6 ve IL-10 ölçümünde Platinum ELISA kitleri kullanılmıştır.

Oksidan ve antioksidan belirteçlerin ölçülmesinde kullanılan tüm kimyasal maddeler Sigma-Aldrich ve Merck Kimya şirketlerinden sağlanmıştır.

3.3. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Ölçülmesi

3.3.1. MDA Miktarı Ölçüm Yöntemi

MDA lipid peroksidasyonunun son ürünü olduğundan dolayı ve oksidatif stresin göstergesi olarak sıklıkla kullanılmaktadır. MDA dışındaki çeşitli maddeler de tiyobarbitürik asit (TBA) ile tepkimeye girebilir. Bu maddeler TBARS (tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddeler) olarak adlandırılır.

MDA düzeyi ölçümünün prensibi MDA ile TBA'in oluşturduğu pembe renkli kompleksin absorbansının 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanır (107).

MDA ölçümünde kullanılan reaktifler:

- Etil alkol (% 95'lik, v/v)
- Fosfat tamponu (pH 6; 100 mM): 2,13 g Na_2HPO_4 ile 11,56 g KH_2PO_4 tartılıp distile suda çözülür ve hacim 1 litreye tamamlanır.
- Trikloroasetik asit (TCA) (% 20 w/v): 500 ml 0,6 N HCl'de 100 g katı TCA çözülerek hazırlanılır.
- TBA çözeltisi (% 2 w/v): 200 mg TBA tartılıp 10 ml distile suda çözülür.

Tablo 3.1: MDA Ölçüm Yöntemi Protokolü

	KÖR	NUMUNE
SÜPERNATANT	200 µl	200 µl
ETİL ALKOL	1ml	1ml
FOSFAT TAMPONU	1ml	1ml
TCA	1ml	1ml
TBA	1ml	-

30 dakika boyunca kaynar suda deney tüpleri inkübe edilmiştir. Sonra 20 dakika boyunca 4000 x g santrifüj yapılmıştır. Spektrofotometrik ölçüm yapılacağı zaman kör tüplerine 1 ml TBA çözeltisi konulmuştur. 532 nm dalga boyunda numune ve kör tüplerindeki çözeltilerin absorbansları distile suya karşı spektrofotometrik olarak okunmuştur.

Bu ölçümde MDA standardı olarak tetraetoksipropan (TEP) kullanılır (% 96; d=0,92; MA= 220,3).

TEP molaritesinin hesaplanması:

$$0,92 \times 1000 = 920 \text{ g (TEP çözeltisinin 1 litresinin ağırlığı)}$$

$$920 : 100 \times 96 = 883,2 \text{ g (1 litre çözeltideki TEP miktarı)}$$

883,2 : 220,3 = 4 mol TEP (1 litre çözeltide 4 mol TEP olduğu için, çözeltideki TEP'in konsantrasyonu 4 molar (M)'dir.

4 M'lık çözelti etil alkolle 400.000 kat dilüe edilerek, 10 µM'lık standart çözelti elde edilir. Aynı deney protokolü standart ve standart körü için uygulanır ve spektrofotometrede absorbanslar okunur. Buna göre 'Faktör' değeri aşağıda görüldüğü şekilde 161,3 olarak hesaplanır.

Standartın optik dansitesi (OD_{St}) = 0,152

Standart körünün optik dansitesi (OD_{Stkör}) = 0,090

ΔOD_S = 0,062

MDA konsantrasyonu (nmol/ml) = ΔOD_N x Standartın konsantrasyonu / ΔOD_S

$$= \Delta OD_N \times 10 \mu M / 0,062$$

$$= \Delta OD_N \times 161,3$$

Elde edilen MDA değeri "nmol/ml" olarak belirtilir. Çalışmamızda süpernatantlar 100 µl yerine 200 µl olarak alınmıştır. Buna göre hesaplama aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

MDA (nmol/ml) = ΔOD x 161,3 x (1/2)

$$= \Delta OD \times 80,65$$

3.3.2. SOD Düzeyinin Belirlenmesi

Bu deneyin prensibi; ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan süperoksit radikalının ortamda bulunan nitroblue tetrazolium (NBT) bileşiğini indirgemesi ve menekşe renkli formazan bileşiği oluşturması esasına dayanmaktadır. Bu bileşik spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. Reaksiyon ortamına ilave edilen (numunede bulunan) SOD enzimi, oluşan süperoksit radikallerini ortamdan uzaklaştırarak, aktivitesiyle doğru orantılı

olarak NBT'nin inhibisyonunu engellemektedir. Ortama SOD ilave edilerek bulunan absorbans değeri, enzimin ilave edilmediği kör deneyinin absorbansıyla karşılaştırılarak enzim aktivitesi hesaplanmaktadır.

SOD aktivitesinin ölçümünde kullanılan reaktifler:

- Reaktif 1: Aşağıdaki çözeltiler ayrı olarak hazırlandıktan sonra birleştirilir.
 - 9,1 mg ksantin tartılıp toplam hacim 200 ml olacak şekilde distile suda birkaç damla 1 N NaOH ile çözülür.
 - 100 ml distile suda NBT 12,3 mg tartılıp çözülür.
 - 100 ml distile suda 25 mg EDTA (Disodyum tuzu, dihidrat) çözülür.
 - Bovin (sığır) albumin 30 mg tartılıp distile su ile toplam hacim 30 ml olacak şekilde çözülür.
- XO çözeltisi : 100 µl XO 1 ml 3,2 M amonyum sülfatta çözülür.
- CuCl₂ çözeltisi: 108 mg CuCl₂ tartılıp 100 ml distile suda çözülür.

Tablo 3.2: SOD aktivitesi ölçümü protokolü

	KÖR	NUMUNE
REAKTİF 1	2,75 ml	2,75 ml
SÜPERNATANT	100 µl	---
XO	50 µl	50 µl

Tüpler oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir.

CuCl₂	100 µl	100 µl
SÜPERNATANT	---	100 µl

Bu deneyde SOD enzim aktivitesi ünite (U) cinsinden ifade edilir. Buna göre SOD enzim aktivitesi (1U), NBT'nin indirgenmesini % 50 inhibe eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Numune ve körün absorbansları spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda distile suya karşı ölçülür ve elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formülde yerine konarak SOD aktivitesi hesaplanır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(OD_{Kör} - OD_{Nm}) / OD_{Kör}] \times 100$$

$$\text{SOD aktivitesi (U/ml)} = \% \text{ İnhibisyon} / (50 \times 0,1)$$

$$= [(OD_{Kör} - OD_{Nm}) / OD_{Kör}] \times 100 / (50 \times 0,1)$$

$$\text{SOD aktivitesi (U/ml)} = [(OD_{Kör} - OD_{Nm}) / OD_{Kör}] \times 20$$

$$\text{SOD aktivitesi (U/ml)} = [(OD_{Kör} - OD_{Nm}) / OD_{Kör}] \times 20$$

3.3.3. GSH-Px Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

GSH-Px, indirgenmiş glutatyon (GSH) ve H₂O₂'nin reaksiyona girerek yükseltgenmiş glutatyon (GS-SG) ve H₂O oluşumunu sağlar. Bu reaksiyonun ardından GSH redüktaz enzimi GS-SG'yi tekrar indirger. Bu sırada ortamdaki NADPH'ı yükseltgeyerek NADP'ye dönüşümünü sağlar (109). GSH– Px aktivitesiyle GS-SG oluştukça NADPH'nin ortamdaki miktarı azalacağından 340 nm dalga boyunda NADPH absorbansındaki azalma GSH–Px enzim aktivitesiyle doğru orantılıdır.

Bu ölçüm yönteminde kullanılan reaktifler:

- Fosfat Tamponu: 2,72 gr KH₂PO₄, 4,2 gr Na₂HPO₄ ve 2,08 gr EDTA (Disodyum tuzu, dihidrat) 1 litre distile suda çözülerek hazırlanır.
- Glutatyon çözeltisi: 250 mg GSH 5 ml fosfat tamponunda çözülerek hazırlanır.
- NADPH çözeltisi: 2,5 ml fosfat tamponunda 15 mg NADPH çözülür.
- GSH Redüktaz çözeltisi: GSH Redüktaz enzim çözeltisinden 10 µl alınıp 1 ml 3,2 M amonyum sülfatta seyreltilir.
- Sodyum azid çözeltisi: 65 mg sodyum azid tartılıp 5 ml fosfat tamponunda çözülür.
- H₂O₂ çözeltisi: 5 ml fosfat tamponuna 15 µl H₂O₂ stok çözeltisi (% 30 v/v) eklenir.

Tablo 3.3: GSH-Px Aktivitesi Ölçümü Protokolü

FOSFAT TAMPONU	2,5 ml
GSH	100 µl
NADPH	50 µl
GSH REDÜKTAZ	100 µl
SODYUM AZİD	100 µl
SÜPERNATANT	100 µl

Spektrofotometre 340 nm dalga boyuna ayarlanır ve fosfat tamponuyla sıfırlanır. Yukarıdaki protokoldeki maddeler sırayla kuvars küvete konulur ve bir dakika süreyle absorbans takip edilir. Elde edilen sonuç kör değeridir. Aynı küvete 100 µl H₂O₂ eklenip bir dakika süreyle okunur ve bu sonuç numune değeridir. Bu iki değer arasındaki fark (ΔOD) GSH-Px aktivitesiyle doğru orantılıdır. GSH-Px aktivitesi NADPH'nin molar absorpsiyon katsayısı ($\epsilon = 6,22 \cdot 10^3$ L/mol.cm) kullanılarak hesaplanır.

GSH-Px aktivitesi (IU/L) :

$\Delta OD \times (1/\epsilon_{NADPH}) \times (V_{toplam}/V_{numune}) \times (1/zaman (dk)) \times \text{Seyreltme Faktörü}$

GSH-Px aktivitesi (IU/L) = $(\Delta OD/dk) \times (1/6220) \times (3ml/0,1ml)$

GSH-Px aktivitesi (IU/L) = $(\Delta OD/dk) \times 0,0048$ mol/L/dk; mmol/ml için 1000 ile çarpılır.

GSH-Px aktivitesi (IU/ml) = $(\Delta OD/dk) \times 4,8$

3.3.4. XO Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

XO enzimi ksantini yıkarak ürik asit meydana getirmektedir. Deneyin prensibi XO açığa çıkarttığı ürik asitin optik dansitesinin 293 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Birim zamanda oluşan ürik asit miktarı üzerinden XO aktivitesi hesaplanır (110).

Bu ölçüm yönteminde kullanılan reaktifler:

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

Tablo 3.4: XO enzim aktivitesi ölçüm protokolü.

FOSFAT TAMPONU	2,8 mL
KSANTİN ÇÖZELTİSİ	0,1 mL
SERUM	0,1 mL

Tablo 3.4'teki gibi deney protokolü hazırlanmıştır. Deney tüpündeki çözeltinin absorbansı 293 nm dalga boyunda kuartz kuvet kullanılarak spektrofotometrede distile suya karşı ölçülmüştür. Çözeltiler oda sıcaklığında inkübe edildi ve absorbansları 1. saat ve 20. saatte tekrar ölçüldü. Ölçüm değerleri arasındaki fark (ΔOD) ve ürik asitin molar absorpsiyon katsayısı ($\epsilon = 10 \times 10^3 \text{ L}/\mu\text{mol} \cdot \text{cm}$) kullanılarak XO enzim aktivitesi hesaplandı. XO aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

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

$$\Delta\text{OD}_{\text{ürik asit}} = \epsilon \text{ ürik asit} \times C_{\text{ürik asit}} \times l$$

$$C_{\text{ürik asit}} = \Delta\text{OD}_{\text{ürik asit}} / (\epsilon \text{ ürik asit} \times l)$$

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

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

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

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

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

Tepkime süresi 1140 dk (1 ve 20. saatler arası) olduğundan; numunede XO aktiviteleri şu formüllere göre hesaplanır:

$$XO \text{ (mIU/ml)} = (\Delta OD/1140) \times 3000$$

3.3.5. CAT Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Hidrojen peroksit katalaz için substrattır. Katalaz ölçüm yönteminin prensibi CAT enzimi tarafından kataliz edilen reaksiyon sırasında hidrojen peroksitin 240 nm dalga boyunda verdiği absorbans değerinin azalma göstermesi ve bu azalmanın spektrofotometrik olarak takip edilmesi esasına dayanır (111).

Bu ölçüm yönteminde kullanılan reaktifler:

- Fosfat tamponu (pH 7; 50 mM): 600 ml distile suda 4,2 g Na_2HPO_4 çözülür ve 2,72 g KH_2PO_4 400 ml distile suda çözülerek karıştırılır.
- H_2O_2 çözeltisi: H_2O_2 stok çözeltisinden (% 30 v/v) 0,2 ml alınır. 100 ml fosfat tamponu (pH 7; 50 mM) ile seyreltilir.

Deney, kuartz küvete 3 ml H_2O_2 çözeltisi ve 0,01 ml süpernatant konulmuştur. Distile suya karşı 240 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbansın bir dakika izlenmesi protokolüne göre gerçekleştirilir. Bir dakikanın sonunda ortaya çıkan absorbans farkı (ΔOD) ve H_2O_2 'in molar absorpsiyon katsayısı ($\epsilon=0.04098$ litre/mmol.cm) kullanılarak CAT aktivitesi hesaplanır. CAT enzim aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanır. F değeri bu çalışmada 7320 alınmıştır.

$$\begin{aligned} \text{CAT aktivitesi (IU/ml)} &= (\Delta OD/\text{dk.}) \times F \\ &= (\Delta OD/\text{dk.}) \times (1/\epsilon) \times (\text{Toplam hacim/Numune hacmi}) \\ &= (\Delta OD/\text{dk.}) \times (1/40,98) \times (3\text{ml}/0,01\text{ml}) \\ &= (\Delta OD/\text{dk.}) \times 7,320 \text{ mol/L/dk; mmol/ml için 1000 ile} \\ &\quad \text{çarpılır} \end{aligned}$$

$$\text{CAT aktivitesi (IU/ml)} = (\Delta OD/\text{dk.}) \times 7320$$

3.3.6. ADA Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

ADA enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan yöntemin prensibi ADA enziminin adenzinden inozin oluşturduğu sırada açığa çıkan amonyağın alkali hipoklorid ve fenol nitroprussid ile reaksiyon oluşturması ve meydana gelen mavi rengin absorbansının 628 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (112).

Bu ölçüm yönteminde kullanılan reaktifler:

- Fosfat tamponu (pH: 6,5; 50 mM fosfat): 5.62 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ve 4.73 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ tartılıp distile suda çözülür ve hacim 1 litreye tamamlanır.
- Adenozin çözeltisi (2mM): Sıcak su banyosunda 25 ml fosfat tamponunda (50 mM, pH: 6,5) 140 mg adenozin çözündürülür ve soğutulur.
- Amonyum sülfat stok çözeltisi (15 mM): 1,982 gr anhidroz amonyum sülfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ tartılıp distile suda çözülür ve hacim 1 litreye tamamlanır.
- Amonyum sülfat standart çözeltisi (75 μM): Amonyum sülfat stok çözeltisinden 0,5 ml alınır ve 100 ml hacme tamamlanır.
- Fenol nitroprussid çözeltisi: (106 mM fenol ve 0,17 mM sodyum nitroprussid): Distile suda 10 gr fenol ve 50 mg sodyum nitroprussid çözülür ve hacim 1 litreye tamamlanır.
- Alkali hipoklorid çözeltisi (11 mM NaOCl) ve 125 mM NaOH): 125 ml 1 N NaOH ve 16,4 ml Clorox (% 5) karıştırılır ve hacim 1 litreye tamamlanır.

Tablo 3.5: ADA aktivitesi ölçüm protokolü

	NUMUNE	KÖR	STANDART	STANDART KÖR
ADENOZİN ÇÖZELTİSİ	0,5 ml	0,5 ml	--	--
NUMUNE	25 μl	--	--	--
STANDART ÇÖZELTİSİ	--	--	0,5 ml	--
FOSFAT TAMPONU	--	--	--	0,5 ml
DİSTİLE SU			25 μl	25 μl

Tablo 3.5’de ki deney protokolü yapıldıktan sonra deney tüpleri karıştırılır. Daha sonra 37°C su banyosunda 60 dakika süre ile inkübe edilir ve tablo 3.6’te gösterilen şekilde devam edilir.

Tablo 3.6: ADA aktivitesi ölçüm protokolü-2

	NUMUNE	KÖR	STANDART	STANDART KÖR
FENOL NİTROPRUSSİD	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
NUMUNE	--	25 µl	--	--
ALKALİ HİPOKLORİD ÇÖZELTİSİ	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml

Tekrar protokolden sonra deney tüpleri karıştırılıp 37°C su banyosunda 30 dakika süre ile daha inkübe edilir ve 628 nm dalga boyunda distile suya karşı numune ve kör absorbansları (OD) okunur. ADA enzim aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanır. Bu çalışmada faktör 50 olarak alınmıştır.

$$\text{ADA aktivitesi (mIU/ml)} = [(\text{OD}_{\text{Nm}} - \text{OD}_{\text{Kör}}) / (\text{OD}_{\text{St}} - \text{OD}_{\text{Stkör}})] \times F$$

Amonyum sülfat standart çözeltisi 75 µM olup adenzinden inozin oluşumu sırasında 150 µM ürün (amonyak) ortaya çıkarmaktadır. Örnek hacmi 25 mikrolitre iken standart hacmi 500 mikrolitre olduğundan 20 kat sulandırma kullanılmıştır. Toplamda 150*20 = 3000 µM amonyak oluşumu gözlenmiştir. Bu reaksiyon 60 dakika içinde gerçekleştiği için dakikada 3000/60=50 µM ürün oluşmuştur.

1 IU ADA aktivitesi, IU'nun tanımı gereği 1 µmol/dk amonyak oluşmasını sağlayan enzim aktivitesi olduğundan 1 IU/L ADA = 1 mIU/ml ADA = 1 µmol/(dk x L) amonyak oluşumuna karşılık gelmelidir.

ADA aktivitesi (mIU/ml) = $[(\text{OD}_{\text{Nm}} - \text{OD}_{\text{Kör}}) / (\text{OD}_{\text{St}} - \text{OD}_{\text{Stkör}})] \times F$ formülünde 'F' değeri yukarıda gösterilen hesaplamadan dolayı 50 alınmıştır.

3.3.7. NO Ölçüm Yöntemi

NO düzeyinin ölçülmesi NO'nun asidik ortamda sülfanilik asiti diazotizasyonu ve ardından naftiletilendiamin ile reaksiyona girmesi esasına dayanır. Reaksiyon sonunda ortaya renkli bir bileşik çıkar. Bu bileşiğin absorbansı 540 nm'de okunur. Okunan optik dansite değeri, NO konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (113,114).

Bu ölçüm yönteminde kullanılan reaktifler:

- Naftiletilendiamin çözeltisi: 162 mg naftiletilendiamin 10 ml distile suda çözülür.
- HCl: 10 ml distile suda 50 µl HCl çözülür.
- Sülfanilik asit çözeltisi: 180 mg sülfanilik asit 10 ml distile suda çözülür.

%20'lik TCA 200 µl numuneye eklendi. 5 dk inkübe edildi. Sonra 200 µl distile su ilave edildi. 5000 devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant alındı. Daha sonra içine kadminyum (Cd) metali konuldu. 24 saat beklenildikten sonra aşağıdaki deney protokolü uygulandı.

Tablo 3.7: NO ölçüm protokolü

	KÖR	NUMUNE
SÜZÜNTÜ	100 µl	100 µl
HCl	250 µl	250 µl
SÜLFANİLİK ASİT	250 µl	250 µl
NAFTİLETİLENDİAMİN	--	250 µl
DİSTİLE SU	250 µl	--

En son işlemde sonra tüpler oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 540 nm'de distile suya karşı okunmuştur. NO konsantrasyonu hazırlanan standartın optik dansitesinden yararlanılarak hesaplandı.

Standartın optik dansitesi (OD_{St}) = 0,1

Standartın konsantrasyonu (C_{St}) = 25 mM

NO konsantrasyonu (mM) = $\{(OD_{Nm} - \sum KOD) / OD_{St}\} \times C_{St}$

NO konsantrasyonu (mM) = $\{(OD_{Nm} - \sum KOD) / 0,1\} \times 25 \text{ mM}$

NO konsantrasyonu (mM) = $(OD_{Nm} - \sum KOD) \times 250$

Buna göre 'Faktör' değeri 250 olarak bulunmuştur.

3.3.8. NOS Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

NO, L-argininden sitrülün oluşumu sırasında nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla oluşur. Deneyin prensibi; L-argininden oluşan NO'un asidik ortamda

sülfanilik asidi diazotizasyonu ve radından naftiletilendiamin ile reaksiyona girmesi esasına dayanır. Oluşan renkli çözeltinin optik dansitesi spektrofotometride, 540 nm’de okunur. Bulunan değer NO konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Birim zamanda oluşan NO’dan oluşan nitrit miktarı üzerinden NOS aktivitesi hesaplanır (113,114).

Bu ölçüm yönteminde kullanılan reaktifler:

- Naftiletilendiamin çözeltisi: 162 mg naftiletilendiamin 10 ml distile suda çözülür.
- HCl: 10 ml distile suda 50 µl HCl çözülür.
- Sülfanilik asit çözeltisi: 180 mg sülfanilik asit 10 ml distile suda çözülür.
- Substrat çözeltisi: 700 mg arginin 10 ml distile suda çözünür.

Tablo 3.8: NOS ölçüm protokolü

	KÖR	NUMUNE	STANDART KÖRÜ	STANDART
STANDART	--	--	--	100 µl
NUMUNE	100 µl	100 µl	--	--
ARGİNİN	--	100 µl	--	--
DİSTİLE SU	100 µl	--	200 µl	100 µl

Tüpler oda sıcaklığında 1 sa bekletilir.

%20 TCA	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
ARGİNİN	100 µl	--	100 µl	100 µl
DİSTİLE SU	--	100 µl	--	--

Tüpler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir ve 5000 devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant alınır ve içine Cd konulan tüpler 24 saat bekletilir ve Cd’lar alındıktan sonra çalışmaya aşağıdaki şekilde devam edilir.

SÜZÜNTÜ	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
HCl	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl
SÜLFANİLİK ASİT	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl
NAFTİETİLENDİAMİN	--	250 µl	250 µl	250 µl
DİSTİLE SU	250 µl	--	--	--

En son basamaktan sonra tüpler oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilir. Daha sonra spektrofotometrede 540 nm dalga boyuna ayarlanır ve absorbanlar okunur. Standart olarak sodyum nitroprussid kullanılır. NOS aktivitesi standardın optik dansite değerinden yararlanılarak ve bir saatlik inkübasyon süresi dikkate alınarak hesaplanır.

Standartın optik dansitesi (OD_{St}) = 0,1

Son hacimdeki Standartın konsantrasyonu (C_{St}) = 25 mM = 25 μ mol/mL

Numune hacmi = 0,1 mL

Total hacim = 0,9 mL

NOS aktivitesi(IU/mL)=[{(OD_{Nm}- OD_{Kör}) / OD_{St} } x C_{St}] x (1/60)xSeyreltmefaktörü

NOS aktivitesi(IU/mL)= [{(OD_{Nm}- OD_{Kör}) / OD_{St} } x 25 μ mol/ mL]x (1/60)x (0,9/0,1)

NOS aktivitesi(IU/mL)= (OD_{Nm}- OD_{Kör}) x 37,5

Buna göre Faktör değeri 37,5 olarak bulunur.

NOS aktivitesi (IU/ml) = ($\Delta OD_{Nm} - \Delta OD_{Kör}$) X 37,5

3.4. İnterlökin Düzeylerinin Ölçümü

3.4.1. IL-6 ve IL-10 Düzeyinin Belirlenmesi

Amniyon sıvısında IL-6 ve IL-10 düzeyi ticari kitler kullanılarak ‘Enzyme-linked Immunosorbent Assay’ yani immunoenzimatik yöntem olan ELISA yöntemi ile ölçüldü. ELISA yöntemi özgül antijen antikor bağlanmasının antikorlara alkalin fosfataz veya horseradish peroksidaz gibi bir enzim bağlanması ve bu enzim substratının renkli ürünlere dönüştürülmesi suretiyle gösterilmesi esasına dayalı immünokimyasal ölçüm tekniğidir. ELISA yöntemi ile özgül antikor kullanılarak örnekteki antijenin miktarı ve özgül antijen kullanılarak örnekteki antikorun miktarı ölçülebilir. ELISA yöntemi çeşitli şekillerde uygulanabilir. Yarışmalı (kompetitif) ve sandviç (nonkompetitif) ELISA en çok tercih edilen türlerdir. Bizim çalışmamızda sandviç ELISA yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde yakalayıcı antikor olarak adlandırılan antikor ilk önce katı faz yüzeyine pasif olarak adsorbe edilir veya

kovalent olarak bağlanır. Ölçümün ikinci aşamasında, örnekteki antijenin reaksiyona girmesi ve katı faz antikoru tarafından yakalanması sağlanır. Daha sonra diğer proteinler yıkanarak, ortamdan uzaklaştırılır ve işaretli antikor (konjuge) eklenir; ikinci antikor, bağlı antijen üzerindeki ikinci ve farklı bir epitop ile reaksiyona girer. İkinci yıkama ile bağlı olmayan işaretli antikor uzaklaştırılır ve bağlı işaretleyici saptanır. Elde edilen aktivite yada konsantrasyon direk olarak antijen konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (115).

Çalışmamızda interleokinin düzeylerinin belirlenmesinde Human IL6 ve IL10 Platinim ELISA (eBioscience) kitleri kullanılmıştır. Her iki kitteki deney prosedürü birbirinin aynı olup kit prospektusu gereği deney akışı gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle aşağıda IL6 ve IL10 ölçüm proseduru akışı birlikte açıklanmıştır.

Çalışmada kitlerde hazır olarak bulunan human IL-6 (human IL-10) antikorları ile kaplanmış kuyucuklardan oluşan plakalar kullanılmıştır. Numune veya standartta bulunan human IL-6 (human IL-10) kuyucuklardaki antikorlara bağlanır. Konjuge biotin anti- human IL-6 (human IL-10) antikorları ilave edilir. Birinci antikorlar tarafından human IL-6 (human IL-10) yakalanır. İnkübasyondan sonra, bağlanmamış olan konjuge biotin anti- human IL-6 (human IL-10) antikoru birinci yıkama aşaması sırasında ayrılır. Daha sonra streptavidin-horseradishperoksidaz (HRP) eklenir ve konjuge biotin anti- human IL-6 (human IL-10) antikoru bağlanır. Tekrar inkübe edilir. İnkübasyondan sonra bağlanmamış streptavidin-HRP yıkama sırasında ayrılır ve substrat çözeltisi reaktifi ile HRP kuyucuklara ilave edilir. Sonuçta human IL-6 (human IL-10) miktarına göre renkli bir ürün oluşur. Reaksiyon asit ilavesinden sonra biter ve ölçüm 450 nm dalga boyunda yapılır.

IL-6 ölçümü için gerekli reaktifler ve hazırlanışı:

- Yıkama Tamponu: Yıkama tamponuna (50 ml) 950 ml distile su ilave edilir.
- Analiz Tamponu: Analiz tamponuna (5 ml) 95 ml distile su ilave edilir.
- Biotin-konjugat: Biotin konjugat analiz tamponuyla 1/100 oranında seyreltilir.
- Streptavidin-HRP: Streptavidin-HRP analiz tamponuyla 1/200 oranında seyreltilir.

- Human IL-6 standart: Sulandırılmış liyolifize human IL-6 standart su ile distile edilir.
- Kontroller: Liyolifilize kontrollere 300µl distile su eklenir

Test protokolü:

- Numuneler için yeterli olacak şekilde şerit sayısı belirlenir
- Yıkama Tamponu ile iki defa mikro şeritleri yıkanır.
- Mikro plaka üzerinde standart seyreltme: Tüm standart kuyulara, iki kez 100 µl analiz tamponu (1x) ilave edin. İlk kuyulara 100 ul hazırlanan standart Pipetlenir ve kuyudan kuyuya 100 ul aktararak standart seyreltilerini oluşturulur. Son kuyulardan 100 ul atılır.
- Boş kuyucuklara, iki kez 100 µl deney tamponu (1x) eklenir.
- 50 µl analiz tamponu (1x) numune kuyularına eklenir
- Belirlenmiş numune kuyularına iki kez 50µl numune eklenir.
- Biotin konjugatı hazırlanır.
- Bütün kuyulara 50 µl biotin konjugat eklenir.
- Mikro şeritler örtün ve oda sıcaklığında 2 saat (25 ° C ila 18 °) inkübe edilir.
- Streptavidin-HR hazırlanır.
- Yıkama tamponu ile boş ve yıkanmış mikro şeritler 4 kez yıkanır.
- Tüm kuyucuklara seyreltilmiş 100 µl Streptavidin-HRP eklenir.
- Mikro şeritler örtün ve oda sıcaklığında 1 saat (25 ° C ile 18 ° C) inkübe edilir.
- Yıkama tamponu ile boş ve yıkanmış mikro şeritler 4 kez yıkanır.
- Tüm oyuklara tetrametilbenzidin (TMB) substrat çözeltisi, 100 µl eklenir.
- Oda sıcaklığında (25 ° C ila 18 ° C) yaklaşık 10 dakika boyunca mikro şeritler inkübe edilir.
- Tüm oyuklara 100 µl durdurma çözeltisi ilave edilir
- 450 nm'de boş mikrokuyucuklar okunur ve renk yoğunluğu ölçülür.

IL-10 ölçümü için gerekli reaktifler ve hazırlanışı:

- Yıkama Tamponu: Yıkama tamponuna (50 ml) 950 ml distile su ilave edilir.
- Analiz Tamponu: Analiz tamponuna (5 ml) 95 ml distile su ilave edilir.

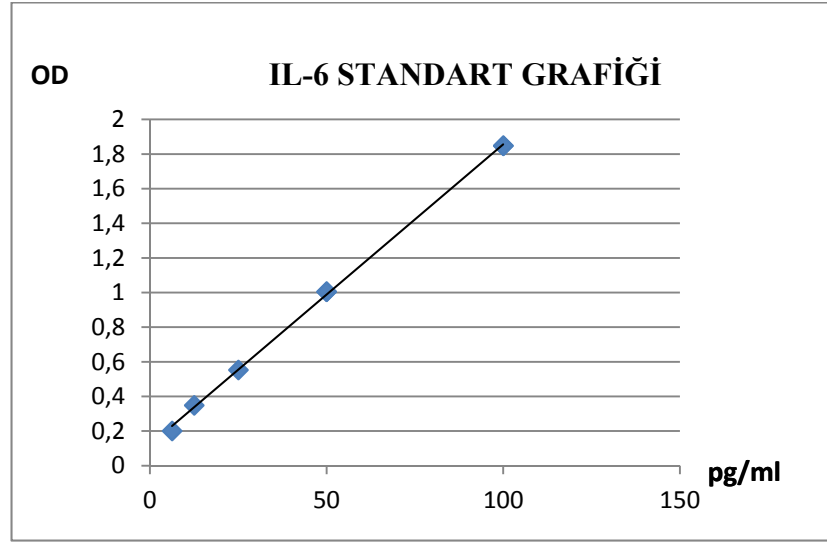
- Biotin-konjugat: Biotin konjugat analiz tamponuyla 1/100 oranında seyreltilir.
- Streptavidin-HRP: Streptavidin-HRP analiz tamponuyla 1/100 oranında seyreltilir.
- Human IL-6 standart: Sulandırılmış liyolifize human IL-6 standart su ile distile edilir.
- Kontroller: Liyolifilize kontrollere 300µl distile su eklenir

Test protokolü:

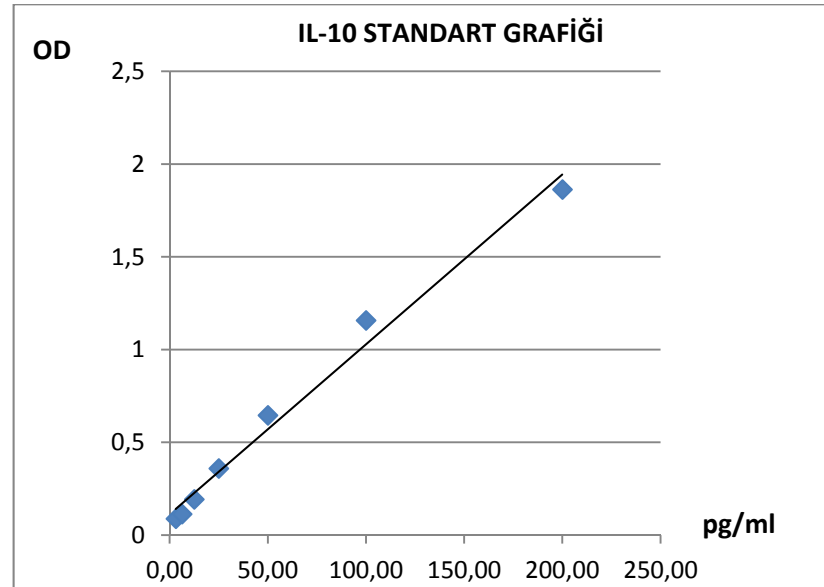
- Numuneler için yeterli olacak şekilde şerit sayısı belirlenir
- Yıkama tamponu ile iki defa mikro şeritleri yıkanır.
- Mikro plaka üzerinde standart seyreltme: Tüm standart kuyulara, iki kez 100 µl analiz tamponu (1x) ilave edin. İlk kuyulara 100 µl hazırlanan standart pipetlenir ve kuyudan kuyuya 100 µl aktararak standart seyreltilerini oluşturulur. Son kuyulardan 100 µl atılır.
- Boş kuyucuklara, iki kez 100 µl analiz tamponu (1x) eklenir.
- 50 µl analiz tamponu (1x) numune kuyularına eklenir.
- Belirlenmiş numune kuyularına iki kez 50µl numune eklenir.
- Biotin konjugatı hazırlanır.
- Bütün kuyulara 50 µl biotin konjugat eklenir.
- Mikro şeritler örtün ve oda sıcaklığında 2 saat (25 ° C ila 18 °) inkübe edilir.
- Streptavidin-HR hazırlanır.
- Yıkama tamponu ile boş ve yıkanmış mikro şeritler 3 kez yıkanır.
- Tüm kuyucuklara seyreltilmiş 100 ul Streptavidin-HRP eklenir.
- Mikro şeritler örtün ve oda sıcaklığında 1 saat (25 ° C ila 18 °) inkübe edilir.
- Yıkama tamponu ile boş ve yıkanmış mikro şeritler 3 kez yıkanır.
- Tüm oyuklara TMB substrat çözeltisi, 100 µl eklenir.
- Oda sıcaklığında (25°C ila 18°) yaklaşık 10 dakika boyunca mikro şeritler inkübe edilir.
- Tüm oyuklara 100 µl durdurma çözeltisi ilave edilir.
- 450 nm'de boş mikrokuyucuklar okunur ve renk yoğunluğu ölçülür.

Sonuç Hesaplama:

Kit prospektüsünde belirtilmiş olan 5 tane standart konsantrasyonu temel alınarak bir standart eğrisi çizilir ve bu eğriye göre numunelerin konsantrasyonu hesaplanır (Şekil 3.1), (Şekil 3.2).



Şekil 3.1: IL-6 standart grafiği



Şekil 3.2: IL-10 standart grafiği

3.5. İSTATİKSEL DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

Verilerin analizi SPSS for Windows 15 paket programında yapılmıştır. Parametrik varsayımları sağlandığından, veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak belirtilmiştir. Bu değerlerin karşılaştırılmasında iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi (*Student's t-test*) ile araştırılmıştır. Oksidan- antioksidan parametrelerin ve IL-6 ve IL-10 değerlerinin birbiriyle ilişkisini gözlemek amacıyla spearman korelasyon analizi uygulanmıştır. $P < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Gebelere yapılan rutin kontroller sırasında Down Sendromu riski tespit edilmiş olan hastalara amniyosentez yapılmış ve DS tanısı almış bebeğe sahip 18 gebenin ve sağlıklı bebeğe sahip 36 gebenin amniyon sıvısı alınarak iki çalışma grubu oluşturulmuştur. Çalışma grubunu DS'lu bebeğe sahip gebelerin amniyon sıvısı kontrol grubunu ise sağlıklı bebeğe sahip gebelerin amniyon sıvısı oluşturmaktadır. Çalışmada SOD, GSH-Px, XO, CAT, ADA ve NOS enzim aktiviteleri ile MDA ve NO düzeylerine ait sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma değerleri (Ort $\pm$ SD) olarak tablo 4.1'de verilmiştir. Buna göre kontrol grubu ile çalışma grubu karşılaştırıldığında çalışma grubundaki SOD düzeyi ile kontrol grubundaki SOD düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,05$). Çalışma grubundaki SOD düzeyi kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Çalışmada gruplar arasında katalaz düzeyi arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,05$). Çalışma grubundaki katalaz düzeyi kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Kontrol ve Çalışma Gruplarının Amniyon Sıvılarına ait Oksidan – Antioksidan Parametreler

Oksidan-Antioksidan Parametreler	Kontrol Grubu (n=36) (Ort $\pm$ SD)	Çalışma Grubu (n=18) (Ort $\pm$ SD)	p değeri
SOD (U/ml)	5,33 $\pm$ 1,61	6,28 $\pm$ 1,35	0,012*
Katalaz (IU/ml)	3,62 $\pm$ 3,16	1,71 $\pm$ 1,35	0,034*
MDA (nmol/ml)	0,92 $\pm$ 0,31	0,86 $\pm$ 0,31	0,323
GSH-Px (IU/ml)	0,098 $\pm$ 0,02	0,094 $\pm$ 0,02	0,566
ADA (mIU/ml)	3,10 $\pm$ 3,80	2,70 $\pm$ 0,97	0,149
XO (mIU/ml)	47,74 $\pm$ 20,78	42,33 $\pm$ 13,46	0,114
NO (mM)	45,78 $\pm$ 10,67	46,82 $\pm$ 12,30	0,749
NOS (IU/ml)	10,78 $\pm$ 2,63	10,19 $\pm$ 2,41	0,434

* $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Gruplara göre amniyon sıvılarına ait IL-6 ve IL-10 parametrelerinin Ort $\pm$ SD ile tablo 4.2'de gösterilmektedir. Buna göre çalışma grubundaki IL-6 düzeyi kontrol

grubundaki IL-6 düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. Çalışma grubundaki IL-6 düzeyi kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur.

Tablo 4.2: Kontrol ve Çalışma Gruplarının Amniyon Sıvılarına ait IL-6 ve IL-10 Parametreleri

Parametreler	Kontrol Grubu (n=36) (Ort ± SD)	Çalışma Grubu (n=18) (Ort ± SD)	p değeri
IL-6 (pg/ml)	88,40±47,72	60,39±46,73	0,017*
IL-10 (pg/ml)	35,93±34,24	31,32±6,29	0,425

Çalışmada ölçümleri yapılmış olan parametrelere spearman korelasyon analizi yapılarak oksidan- antioksidan sistem parametreleriyle IL-6 ve IL-10 değerlerinin birbiriyle ilişkisi değerlendirilmiştir. Buna göre korelasyon katsayısı (r) değeri:

0,00 – 0,049 arasında ise zayıf;

0,50 – 0,69 arasında ise orta;

0,70 – 0,79 arasında ise yüksek;

0,80 – 1,00 arasında ise mükemmel bir ilişki olduğundan bahsedilir.

Tablo 4.3’de Çalışma grubundaki MDA ile ADA arasındaki korelasyon gösterilmiştir. Tablo 4.4’de ise çalışma grubundaki IL-6 ve IL-10 parametreleri ile oksidan – antioksidan parametreler arasındaki korelasyon gösterilmektedir.

Tablo 4.3: Çalışma Grubunda MDA ile ADA Arasındaki Korelasyon

	MDA (nmol/ml)	
	r	p
ADA (mIU/ml)	-0,503	0,033

* İstatistiksel olarak anlamlı bulunmayan ilişkiler belirtilmedi.
Çalışma Grubu (n=18)

Tablo 4.4: Çalışma Grubunda IL-6 ve IL-10 Parametreleri ile MDA Arasındaki Korelasyon

	MDA (nmol/ml)	
	r	p
IL-6 (pg/ml)	0,482	0,043
IL-10 (pg/ml)	-0,503	0,033

*İstatistiksel olarak anlamlı bulunmayan ilişkiler belirtilmedi.

Çalışma Grubu (n=18)

Tablo 4.5’de Kontrol grubunda analiz edilen oksidan – antioksidan parametreler arasındaki korelasyon gösterilmektedir. Kontrol grubunda IL-6 ve IL-10 parametreleri ile oksidan – antioksidan parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır.

Tablo 4.5: Kontrol Grubunda Oksidan – Antioksidan Parametreler Arasındaki Korelasyon

	MDA (nmol/ml)		XO (mIU/ml)		NOS (IU/ml)	
	r	p	r	p	r	p
Katalaz (IU/ml)	-0,374	0,025	---	---	---	---
SOD (U/ml)	0,359	0,031	----	---	---	---
GSH-Px (IU/ml)	0,407	0,014	0,344	0,040	-0,369	0,027

*İstatistiksel olarak anlamlı bulunmayan ilişkiler belirtilmedi.

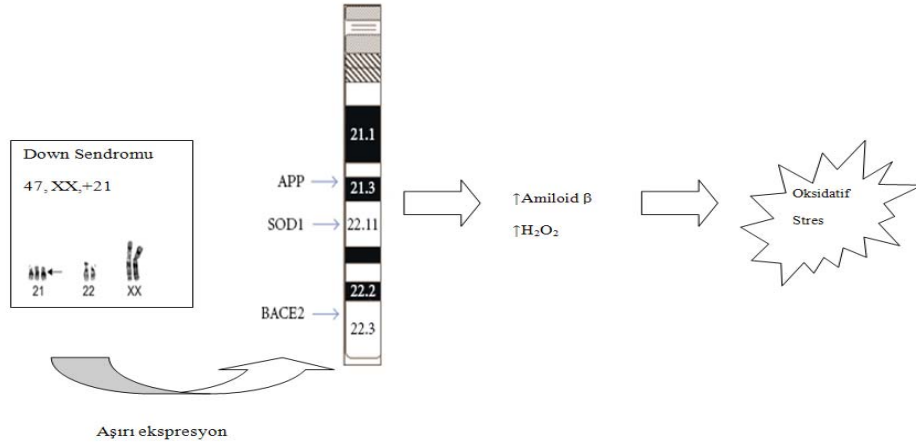
Kontrol Grubu (n=36)

5. TARTIŞMA

Down Sendromu insanda 21. kromozomun tamamının ya da bir parçasının triploidisi, mozaizmi veya translokasyonu sonucunda oluşmaktadır. Yaklaşık olarak 700 canlı doğumda bir görülmektedir. DS genetik kaynaklı mental retardasyonun en sık nedenini oluşturmaktadır. Bu hastalıkta mental retardasyonun yanında erken yaşlanma, kalp ve damar sistemi bozuklukları, Alzheimer benzeri demans, çeşitli dismorfik özellikler, konjenital malformasyonlar, dil ve hafıza problemleri gibi karakteristik fiziksel ve nöro-psikolojik bulgular gibi birçok sağlık sorunu eşlik etmektedir (1,2, 41). Patolojik değişikliklerin altında yatan moleküler mekanizma ve oksidatif dengesizliğin nasıl DS klinik belirtilerine katkıda bulunabileceği henüz tam olarak aydınlatılmamıştır (95).

Gebelikte oksidatif stres sonucu spontan düşük, preeklampsi, intra uterin gelişme geriliği, erken doğum, gestasyonel diyabet ve düşük doğum ağırlığında bebek doğurma gibi bir çok komplikasyon ortaya çıkmaktadır (116,117). Ayrıca DS'nun patogenezinde çok erken evrelerde ve klinik bulguların ortaya çıkmasında oksidatif stresin major rol oynadığı ispatlanmıştır. Bununla birlikte DS bebeğe sahip gebelerin amniyon sıvılarında bazı oksidatif stres belirteçlerinin yükseldiği de gözlemlenmiştir (95,118).

Oksidatif stresin artması kromozom 21 tarafından kodlanan bazı genlerin artmış ekspresyonuna neden olur (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: Okidatif stres ve Down Sendromu. Amiloid prekösür protein (APP), beta sekretaz (BACE2) -Perluigi ve ark. (95)'dan alınmıştır.

SOD, BACE2, APP, CBC (sistasyon beta sentetaz) ve interferon ailesinin ligandları ve reseptörleri 21. kromozom tarafından kodlanan genlerdir. SOD enziminin alt türlerinden Cu, Zn-SOD (SOD1) 21. kromozomda kodlandığından DS'de ekspresyonu ve aktivitesi artmaktadır. SOD antioksidan savunmada süperoksit radikalini dismutasyona uğratarak H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlayarak ilk basamağı oluşturur. Açığa çıkan H_2O_2 ise CAT ve GSH-Px ile suya dönüştürülür. 21. kromozomun triploidisi sonucunda SOD1, CAT ve GSH-Px oranları arasında dengesizlik oluşur. Sonuçta ortamdan temizlenemeyen H_2O_2 fazla miktarda birikir ve ciddi bir oksidatif stres meydana gelir (119). Ayrıca Gulesserian ve ark. DS'na neden olan oksidatif stresin SOD'ın aşırı ekspresyonundan ziyade indirgen ajanların seviyesinin azalmasına bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir (120). Çalışmamızda literatüre uygun olarak SOD enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre DS'lu grupta anlamlı derecede arttığını bulduk. Buna rağmen ortamda biriken H_2O_2 'i temizlemeye çalışan CAT enzim aktivitesini kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda DS'lu grupta anlamlı derecede azaldığını tespit ettik. GSH-Px düzeylerine baktığımızda ise iki grup arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte çalışma grubunda hafif bir azalma saptadık. Bulduğumuz bu veriler önceki çalışmalarla uyumlu olmakla birlikte DS'da gözlenen ekstra 21. kromozom üzerinde kodlanan SOD aktivitesinin artmasıyla açıklanabilmektedir. Artan SOD aktivitesiyle birlikte ortamda fazla biriken H_2O_2 oksidatif stres oluşturmaktadır. Ortamdaki H_2O_2 'i

temizleyen antioksidan enzimlerin (CAT, GSH-Px) düzeyleri artmayıp aksine aktivitelerinin azalması oksidatif hasarın artmasına neden olmaktadır.

Shin ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada SOD'nın çok önemli bir rolü gösterilmiştir. SOD1'i aşırı ekspre eden fare modelleri oluşturulmuş ve bu farelerin mitokondrilerinde şişme ve vakuolizasyonun görülmüş olup bu farelerde öğrenme ve hafıza güçlüklerinin ortaya çıktığı gösterilmiştir (121).

Gulesserian ve ark. yaptıkları çalışmada DS'da oluşan oksidatif stresin SOD1'in aşırı ekspresyonu sonucu olmadığını, H₂O₂ temizleyen glutatyon transferaz ve tioredüksin redüktaz gibi antioksidan enzimlerin düşük seviyede olduğu için meydana geldiğini göstermişlerdir (122).

Oksidatif stresin artması amiloid beta peptid (A β)'in artmasına neden olabilmektedir. Birçok çalışmada A β 'in oksidatif stresi indükleyebileceği gösterilmiştir. Amiloid prekürsör protein (APP)'in aşırı ekspresyonu DS'lu hastalarda neden aşırı bir A β 'in üretimi olduğunu açıklamaktadır. Down sendromu ve Alzheimer hastalığının her ikisinde de amiloidin aşırı üretimi gösterilmiş ve bunun APP'in 21. Kromozom tarafından kodlandığı için ve DS'da da amiloid aşırı üretiminin bu nedenle olduğu ortaya konmuştur (123-126).

Amiloid prekürsör protein metabolizmasıyla ilişkili olarak, 21. kromozom tarafından kodlanan β -site APP- cleaving 2 enzim (BACE2) de gösterilmiştir. BACE2 bir beta sekretaz olup APP'in proteolizinde amiloidogenik yolağa katılmaktadır. Bu iki genin (APP, BACE2) birlikte aşırı ekspresyonu DS'da gözlenen Alzhemier benzeri nöropatolojik duruma yol açmış olabileceği önerilen hipotezler arasındadır (127), (Bakınız şekil 2.1).

Netto ve ark. 2004 yılında DS'da gözlenen nörodejeneratif semptomların antioksidan bir enzim olan SOD ve yine 21. kromozom tarafından kodlanan S100B ile ilişkili olabileceğini ve bunlardaki aktivite artışının prenatal tarama kapsamında değerli bir belirteç olabileceğini düşünmüşlerdir. S100B astrositlerden sekrete edilen, kalsiyum bağlayan bir proteindir. Ayrıca mikrogliyalardan nitrik oksit ve çeşitli sitokinlerin salınımına neden olarak proinflamatuvar mediatörleri serbestleştirerek gliotik

reaksiyonların başlamasına sebep olur. Araştırmacılar sağlıklı bebeğe sahip gebelerin ve DS'lu bebeğe sahip gebelerin amniyon sıvılarını toplayarak bir çalışma yapmışlardır. Çalışma için 26 normal karyotipe sahip bebeği olan gebenin amniyon sıvısı ile 71 DS'lu bebeğe sahip gebenin amniyon sıvısını toplamışlar ve SOD enzim aktivitesini ve S100B düzeylerini ölçmüşlerdir. Sonuçta DS'lu grupta amniyon sıvısında SOD enzim aktivitesinin ve S100B düzeyinin sağlıklı gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar DS'da görülen bazı bulguların DS'nun patogenezinde rol oynayan ekstra bir SOD geninden kaynaklandığını ortaya sürmüşlerdir. Bilindiği üzere SOD, GSH-Px ve katalazın rölatif seviyelerinde oluşan herhangi bir dengesizlik sonucunda hücre membranında çeşitli hasarlar gözlenmektedir. Bu çalışmada SOD enzim aktivitesinin yüksek bulunması önceden yapılmış diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Yazarlar SOD enzim aktivitesinin aşırı ekspresyonunun DS'da gözlenen oksidatif süreçte meydana gelen hasardan sorumlu olabileceğini düşünmüşlerdir. Bu çalışma SOD enziminin özellikle Cu,Zn-SOD'ın ve S100B'nin DS'unda gözlenen nörodejeneratif semptomlardan sorumlu olabileceğini ve bu hastalıkta prenatal belirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir (2,12). Yine Baeteman ve ark. yaptıkları çalışmada DS' lu gebelerde amniyotik sıvıdaki SOD aktivitesinin normal olanlara göre daha yüksek olduğunu bildirilmiştir (128).

Perluigi ve ark. 10 DS'lu bebeğe sahip gebelerden ve 10 tane de normal bebeğe sahip gebelerden elde ettikleri amniyon sıvılarında yaptıkları çalışma sonucunda, DS'li gebeliklerden elde edilmiş amniyon sıvılarında lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu belirteçlerinin belirgin olarak yükseldiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada bulunan sonuçlar oksidatif hasarın DS'da gözlenen patolojik değişikliklere neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca DS'da gözlenen birçok nörolojik semptomların SOD artan aktivitesinden kaynaklandığı gösterilmiştir. SOD'ın artan aktivitesine göre ortamdaki H_2O_2 'i temizlemek için CAT ve GSH-Px'in da aktivitesinin artması beklenirken bu durum gözlenmemekte ve oksidatif durumda bir dengesizlik oluşmaktadır. Fazla miktarda oluşan H_2O_2 Fe ve Cu gibi geçiş metal iyonlarıyla tepkimeye girerek biyolojik makromoleküllerde oksidatif hasara neden olan hidroksil radikallerinin oluşumuna aracılık eder. Proteinlerdeki oksidatif modifikasyonlar bu

proteinlerde işlev bozukluğuna yol açmakta ve hücresel düzeyde zararlar ortaya çıkarmaktadır (95).

Perrone ve ark. yaptıkları çalışmada ileri anne yaşı nedeniyle amniyosentez yapılan 89 gebeyi ele almışlar ve 56 normal gebeliği, 23 fetal gelişme geriliği ve 10 DS'lu bebeğe sahip gebeleri karşılaştırarak amniyosentez sırasında elde edilen amniyotik sıvı örnekleri incelemişlerdir. Serbest radikal aracılığıyla gerçekleşen lipid peroksidasyonunun belirteçlerinden biri olan izoprostan düzeylerini karşılaştırmışlar ve izoprostan düzeyinin DS'den etkilenmiş gebelerin amniyotik sıvılarında normal gebeliklerle karşılaştırıldığında 9 kat daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar amniyotik sıvı içinde izoprostan konsantrasyonlarının tespiti ile ilerleyen potansiyel hastalıkların erken evrelerindeki hasarın ve oksidatif stresin düzeyinin değerlendirilmesinin mümkün olabileceğini ve izoprostan tepitinin bunun için yararlı bir test olabileceğini söylemişlerdir (11).

Tranquilli ve ark. 15 DS'lu bebeğe sahip gebenin ve 15 sağlıklı bebeğe sahip gebenin amniyon sıvılarını toplamışlar ve NO ve vasküler endotelial growth faktör (VEGF) düzeylerini incelemişlerdir. NO düzeyini DS'lu grupta normal gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğunu, VEGF düzeyini ise düşük olarak bulmuşlardır. Araştırmacılar bu sonuçlardan yola çıkarak Down sendromlu fetusların amniyotik sıvısında plasental damarlanma ve endotel fonksiyonunda bir bozukluk olabileceğini düşünmüşlerdir. Down Sendromlu bebeğe sahip gebelerde artan NO sentezi hCG'nin yüksek seviyede olmasıyla ya da immatür plaseenta tarafından VEGF'ün düşük düzeyde olmasına karşılık bir cevap olarak artabilir (13). Bizim çalışmamızda NO düzeyleri incelendiğinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte, DS'lu grupta kontrol grubuna göre hafif bir artış olduğunu tespit ettik.

Salvolini ve ark. 3 DS'lu bebeğe sahip gebelerden ve 10 normal bebeğe sahip gebelerden aldıkları amniyon sıvılarından mezemkimal kök hücre kültürü ve izolasyonu yaparak normal amniyon sıvısı mezemkimal hücre kültürü (AF-MSCs) ve DS'lu amniyon sıvısı mezemkimal hücre kültürü (DS-AF-MSCc) yapmışlardır. Bu hücre kültürlerinde VEGF ve NOS izoormlarının immünohistokimyasal

ekspresyonu değerlendirmiştir. Buna göre VEGF ekspresyonu DS-AF-MSCc'de AF-MSCs göre karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük bulunmuştur. NOS izoformlarından eNOS ekspresyonu ise DS-AF-MSCc'de azalmış olarak saptanmıştır. nNOS ve iNOS ekspresyonu ise her iki grupta benzer olarak tespit edilmiştir (129). Yaptığımız alışmada NOS düzeylerinde, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Ancak DS'lu grupta kontrol grubuna göre bir azalma olduğunu saptadık.

Bogavac ve ark. 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada gebeliğin indüklediği hipertansiyonu (PIH) olan 23 gebenin ve sağlıklı olan 66 gebenin amniyon sıvısında SOD, XO, MDA ve GSH-Px düzeylerini lmşlerdir. MDA düzeyini PIH gebelerde 0,49-20,01nmol/l, sağlıklı gebelerde ise 1,67-22,43 nmol/l olarak bulmuşlardır. GSH-Px ve SOD aktivitesi her iki grupta lmş ve iki grup arsında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı rapor edilmiştir. XO aktivitesinde amniyon sıvısında bir azalma olduğunu saptamışlar ve gruplar arasında anlamlı bir fark tespit etmişlerdir (8). Çalışmamızda MDA düzeyleri arasında iki grupta anlamlı bir fark bulunmazken, DS'lu grupta hafif bir azalma saptadık. Ksantin oksidaz düzeyleri arasında yine gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Brooksbank ve ark. DS'lu, fetusların serebral korteksinde in-vitro lipoperoksidasyonda MDA tarafından olduğu tahmin edilen önemli bir artış olduğunu yaptıkları çalışmada göstermişlerdir (130).

Meguid ve ark. yaptıkları bir çalışmada daha önceden DS'li bebek dünyaya getirmiş 42 annenin serumlarında TBARS düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğunu bulmuşlardır. Buna ek olarak DS'li bebek dünyaya getirmiş annelerin E ve C vitamini düzeyleri ile bakır ve çinko düzeyleri düşük olarak bulunmuştur. Bu annelerin homosistein düzeylerinin de kontrole göre anlamlı derecede yüksek olduğu folik asit ve B12 vitamini düzeylerinin ise düşük olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmanın sonuçlarına bakarak anormal folat ve homosistein metabolizmasının DS için risk faktörü olduğunu ve DS'li bebek dünyaya getiren annelerin oksidan/antioksidan dengesinin bozulduğunu ne sürmüşlerdir (131).

Bütün bunlara dayanarak, serbest oksijen radikalleri temizleyen antioksidan besinleri kullanarak DS'da gözlenen komplikasyonların bazılarının iyileştirilebileceği söylenebilir. Lott ve ark. yaptıkları plasebo kontrollü çalışmada günlük 900 IU alfa-tokoferol, 200mg askorbik asit ve 600 mg alfa-askorbik asit alımının DS'lu bireylerde ve demansta etkili, güvenli ve tolere edilebilir olduğunu tespit etmişlerdir (132). Ancak, antioksidan takviyesi alan bireyler kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ne bilişsel işlevlerinde iyileşme ne de bilişsel zayıflamada bir istikrar göstermemiştir (2).

Adenozin ve siklik adenozin monofosfat (cAMP) bağışıklıkla tetiklenen sitokin üretiminin güçlü modölatörleridir. Bunlar pro-enflamatuar sitokinler olan TNF-alfa, IFN-gama, IL-12 inhibisyonuna neden olup ve bir anti-inflamatuar sitokin olan IL-10 üretiminin uyarılmasını aktive eder. Sitokin üretimi Th1 ve Th2'den etkileneceği gibi aynı zamanda deneysel verilerin heterojenite ve düşük miktarda olması kesin sonuçların çizilmesine izin vermez. Bununla birlikte adenozin ve cAMP'ın IL-3, IL-4, makrofaj inflammatuar protein 1 alfa/beta (MIP-1 α/β) ve granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF)'i inhibe, IL-5'i stimüle ettiği IL-1'in ise etkilemediği bildirilmektedir. Bu etkiler, özellikle de TNF-alfa'nın inhibisyonu ve IL-10 ekspresyonunun uyarılması çeşitli patofizyolojik durumların önlenmesi bakımından terapötik olarak değerli olabilir (133).

Yoneyama ve ark. ADA aktivitesinin gebe kadınlarda gebe olmayan kadınlardan önemli düzeyde düşük olduğunu rapor etmişlerdir (134). Normal gebelikte ADA aktivitesinin azalmasının gebelikte oluşan immunolojik değişikliklerle ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (89).

Uslu ve ark. yapmış oldukları çalışmada yüksek yaş ve Down Sendrom riski taşıyan ikinci trimester gebelerde serum ADA aktivitelerini ölçmüşlerdir. 280 gebe kadında gerçekleştirilen bu çalışmada, gebe grubunu Down Sendrom riski açısından düşük riskli, yüksek riskli ve yaşa bağlı yüksek riskli olarak gruplandırılarak, tüm grupların ve kontrol grubunun ADA aktiviteleri karşılaştırılmıştır. ADA aktivitelerini kontrol grubuna göre, düşük Down Sendrom riski taşıyanlarda, tüm gebelerde ve yüksek yaş

riski taşıyan gebelerde düşük, yüksek Down Sendrom riski taşıyan gebelerde ise yüksek bulmuşlardır (89).

Puukka R ve ark. yaptıkları çalışmada eritrosit adenoazin deaminaz, nükleozid fosforilaz, hipoksantinguanin fosforiboziltransferaz ve adenin fosforiboziltransferaz aktiviteleri ve plazma ürat konsantrasyonları Down sendromlu 20 hastada ve 20 sağlıklı kontrol grubunda ölçmüşlerdir. Ortalama eritrosit adenoazin deaminaz, adenin fosforiboziltransferaz aktiviteleri ve plazma ürat konsantrasyonlarını kontrollere göre DS'lu hastalarda anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Yaptıkları korelasyon analizinde ise eritrosit adenoazin deaminaz aktivitesi ve plazma ürat konsantrasyonu arasında pozitif bir saptamışlardır. Bununla birlikte eritrosit adenin nükleotid, AMP, ADP ve ATP konsantrasyonları incelenmiş ve kontrol grubu ile DS grubu arasında bir fark tespit edilmemiştir. Yazarlar bu sonuçlara bakarak DS'lu hastalarda plazma ürat konsantrasyonlarının artmasının adenosin deaminaz aktivitesinin artışının bir sonucu olduğunu düşünmüşlerdir (135). Çalışmamızda ADA enzim aktiviteleri incelendiğinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Compleman C9, α -1B-glikoprotein akut faz yanıtın bir parçası olup fetüs gelişiminde koruyucu rolleri olan proteinlerdir. Bu proteinlerin amniyon sıvısında bulunması intraamniyotik infeksiyon ve sonradan oluşabilecek komplikasyonları önlemektedir. Bunların okside olması biyolojik fonksiyonlarını kaybetmelerine ve fetüsü koruma görevlerini yerine getirememelerine neden olmaktadır. Bu sonuçlar DS'da ortaya çıkan kazanılmış immün yetmezlik ve otoimmün hastalıklar gibi patolojik durumların neden daha sık gözlemlendiğini açıklamaktadır (136,137).

Alzheimer hastalığında ve DS'da görülen demansta bütün pro-enflamatuar sitokinlerin nasıl rol aldığı tüm kanıtlara ve hipotezler rağmen hala net değildir. Heyser ve ark. yaptıkları çalışmada öğrenme güçlüğü olan transgenik farelerin astrositlerinde IL-6 üretimini yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (125,138). Carta ve ark. ise DS'lu hastalarda kemokinlerin ve sitokinlerin düzeylerinin yükseldiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada DS'da gözlenen duygulanım bozuklukları ve zihinsel zayıflamanın proinflamatuar sitokinler ile ilişkili olup olmayacağını araştırmayı hedeflemişlerdir. 19 DS'lu hasta ile 87 perinatal iskemik

hasarı olan hastayı incelemişler ve DS'lu hastalarda sitokinlerin ve kemokinlerin yükseldiğini ancak sadece MIF-1 α seviyesinde anlamlı bir fark olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca DS'lu grupta IL-6 düzeyi ile mental retardasyonun derecesi arasında da pozitif bir ilişki olduğunu bulmuşlardır. Bu verilere dayanarak, DS'da Alzheimer hastalığında gözlenen dejeneratif süreçlerin benzer olduğunu ve inflamatuvar kemokinlerin de bu süreçlerde rol oynayabileceklerini öne sürmüşlerdir (139). Başka bir çalışmada Park ve ark. erişkin DS'lu hastalarda IL-6'nın plazma seviyelerinde herhangi bir değişiklik bulamamışlardır. Yine bazı araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda IL-8, TNF- α seviyelerinin arttığını, bazıları ise sitokinlerin ve kemokinlerin düzeylerinde herhangi bir değişiklik olmadığını saptamışlardır (126).

Kameda ve ark. yaptıkları çalışmada plasental trofoblast hücrelerin IL-6 ürettiğini ve IL-6'nın fetal-maternal etkileşimde immünregülatör olarak rol oynadığını göstermişlerdir (140). Çalışmamızda IL-6 düzeylerine baktığımızda DS'lu grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğunu saptadık. İnterlökin 10 seviyelerinde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamakla beraber DS'lu grupta kontrole göre hafif bir azalma tespit ettik.

DS'da gözlenen immümsistem değişikliklerine ilginin artmasına rağmen sitokinlerin rolü hala tam açıklanamamıştır. Çalışmaların çoğu DS'lu yetişkinlerde yapılmıştır. DS'da sitokinlerin rolünün daha iyi anlaşılması için Śmigieliska-Kuzia ve ark. DS'lu çocukların ve yetişkinlerin plazma proinflamatuvar sitokinleri [İnterlökin-1 α (IL-1 α), IL-2, IL-6, TNF- α ve çözünebilir tümör nekroz faktörü reseptörü 1 (sTNFR1)] seviyesi üzerinde durmuşlardır. Araştırmacılar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında IL-1 α , IL-2, IL-6, TNF- α konsantrasyonlarının DS olan çocukların ve yetişkinlerin serumunda yükselmiş olduğunu öne sürmüşlerdir (126).

6. SONUÇLAR

Down sendrromlu bebeğe sahip 18 gebenin amniyon sıvısı ile sağlıklı bebeğe sahip 36 gebenin amniyon sıvılarında oksidan/antioksidan ve IL-6/IL-10 paremetrelerini incelenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, DS'lu bebeğe sahip gebelerin amniyon sıvısında SOD aktivitesinin anlamlı bir şekilde arttığı; CAT aktivitesinin anlamlı olarak, GSH-Px aktivitesinin ise anlamlı olmamakla birlikte azaldığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular DS'lu bebeğe sahip gebelerde kromozom 21 tarafından kodlanan SOD geninin artmış ekspresyonu ile ilişkilendirilmektedir. Artan Süperoksit dismutaz enziminin aktivitesi sonucunda oluşan aşırı miktardaki H₂O₂'i temizleyecek düzeyde CAT ve GSH-Px'ın bulunmaması ciddi bir oksidatif strese neden olmaktadır.

Down Sendromlu bebeğe sahip gebelerdeki artmış SOD enzim aktivitesi ölçümleri diğer kullanılmakta olan prenatal tarama testlerinin yanısıra ilave bir belirteç olarak değerlendirilebilir düşüncesindeyiz. Bu amaçla daha yüksek sayıda normal ve DS riskli gebeliklerde çalışmaların yapılmasını önermekteyiz.

ÖZET

Amniyon Sıvı İncelenmesinde Down Sendromu Tespit Edilmiş Gebelerde Oksidan/Antioksidan sistem, IL-6 ve IL-10 Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Down Sendromu genetik kaynaklı mental retardasyonun en sık nedeni olup, birçok klinik ve dismorfolojik bulgularla kendini gösteren önemli bir sağlık sorunudur. Down Sendromu açısından riskli popülasyona invaziv tanı testleri uygulanarak prenatal tanı konabilmektedir. Bu invaziv tanı testlerinden en çok kullanılan ise amniyosentezdir. Amniyosentez ile alınan amniyon sıvısı örneğinde fetal kromozom analizi, enzimatik çalışmalar, DNA analizleri yapılabilir ve bize gebelik hakkında bilgi verebilir. Down Sendromlu bebek sahibi gebelerde oksidatif stres belirteçlerinin yükseldiği daha önce gösterilmiştir. Bu araştırma amniyosentez ile DS tanısı konmuş bebek sahibi gebelerin amniyon sıvılarında oksidan/antioksidan sistem ve interlökin-6 (IL-6)/interlökin-10(IL-10)düzeylerinin durumunun ortaya konması amaçlanmıştır.

Bu amaçla Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genetik Merkezi'ne başvurup amniyosentez yapılan gebelerin amniyon sıvılarının genetik inceleme sonuçlarına göre DS'lu bebeğe sahip olan 18 gebenin amniyon sıvısı ve sağlıklı bebeğe sahip 36 gebenin amniyon sıvısı çalışma kapsamına alınarak iki grup oluşturulmuştur. Alınan örneklerde malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve ksantin oksidaz (XO), katalaz (CAT), adenzin deaminaz (ADA), nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) spektrofotometrik yöntemlerle IL-6 ve IL-10 testlerinin ölçümleri ise ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. İstatistiksel değerlendirmede Student t testi ve spearman korelasyon analizi kullanılmıştır. $P<0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Araştırmanın bulgularına göre çalışma grubunda SOD düzeyi, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$). Bununla birlikte çalışma grubunda CAT ve IL-6, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$). Her iki grup arasında MDA, GSH-Px, XO, NO, NOS, ADA ve IL-10 düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Sonuç olarak DS'lu grupta SOD enzim aktivitesi artmış olarak bulunmuştur. Bu sonuca 21. kromozom üzerinde yer almakta olan SOD geninin neden olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca kontrol grubuna kıyasla DS'lu bebeğe sahip gebelerin amniyon sıvılarında SOD enziminin aktivitesi sonucunda oluşan aşırı miktardaki H₂O₂'i temizleyecek düzeyde CAT ve GSH-Px'ın bulunmaması ciddi bir oksidatif strese yol açmaktadır. Bu veriler doğrultusunda SOD enzimini prenatal tanıda belirteç olarak kullanmak yararlı bir yaklaşım olabilir. Bu amaçla daha yüksek sayıda yapılmış çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir

Anahtar Sözcükler: Down Sendromu, interlekin-6/ interlekin-10, Oksidan/antioksidan sistem, prenatal tanı, SOD.

SUMMARY

Evaluation of Oxidant / Antioxidant System Parameters, IL-6 and IL-10 Levels in Amniotic Fluid of Pregnancies with Down Syndrome

Down syndrome (DS) is a genetic disorder that is the most commonly recognized genetic cause of mental retardation and it presents with many clinical and dismorphologic findings. Down syndrome can be diagnosed at high-risk of down syndrome pregnancies by invasive prenatal testing. The most common invasive prenatal test for diagnosis of DS is amniocentesis. Amniotic fluid sampling can provide a lot of data by allowing analysis of fetal chromosomes, fetal DNAs and enzymatic activity. It is previously shown that oxidative stress marker levels are statistically elevated in amniotic fluid samples of pregnancies with DS. In this study we aimed to demonstrate antioxidant/oxidant system markers, IL6 and IL10 levels in amniotic fluid samples of pregnancies affected by DS.

For this purpose we collected amniotic fluid samples from 18 pregnancies affected by down syndrome and 36 normal healthy pregnancies who applied to Zekai Tahir Burak Research and Training Hospital Genetic Center and were proceeded with amniocentesis. In the amniotic fluid samples; malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathion peroksidase (GSH-Px) xhantine oksidase (XO), catalase (CAT), adenosine deaminase (ADA), nitric oxide (NO), nitric oxide synthase (NOS) enzymatic activities were evaluated by spectrophotometric methods, IL6 and IL10 levels are evaluated by ELISA. For statistical analysis Student's t-test and Spearman correlation analysis are used.

It was found that SOD levels are significantly elevated in study group compared to control group ($p < 0,05$). Besides this, in study group, CAT and IL-6 levels are found significantly lower than control group ($p < 0,05$). We couldn't find any significant difference between two groups in terms of MDA, GSH-Px, XO, NO, NOS, ADA ve IL-10 levels ($p > 0,05$).

As a consequence, SOD enzyme activity was found to be increased what we think is caused from SOD gene on 21 st chromosome. Also not having enough CAT and

GSH-Px to clear up the high H_2O_2 increase because of the high SOD enzyme activity in DS pregnancies causes a real oxidative stress. Based on these results, SOD enzyme can be used as a marker for prenatal diagnosis of DS. For this purpose these experiments should be tried on larger sample groups.

Keywords: Down syndrome, interleukin-6/interleukin-10, oxidant/antioxidant system, prenatal diagnosis, superoxide dismutase

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: 611–616.
2. Perluigi M, Butterfield DA. Oxidative Stress and Down Syndrome: A Route toward Alzheimer-Like Dementia. *Current Gerontology and Geriatrics Research*. 2012; 2012:724904.
3. Yu B, Zhang B, Wang J, Wang QW, Huang RP, Yang YQ, Shao SH. Preliminary proteomic-based identification of a novel protein for Down's syndrome in maternal serum. *Experimental Biology and Medicine*. 2012; 237: 530-539.
4. Sifakis S, Papadopoulou E, Konstantinidou A, Giahnakis E, Fragouli Y, Karkavitsas N, Koumantakis E, Kalmanti M, Increased levels of human placental growth hormone in the amniotic fluid of pregnancies affected by Down syndrome. *Science Direct*. 2009; 19: 121-125.
5. Nicolaides KH. Screening for chromosomal defects. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2003; 21: 313–321.
6. Malone FD, Canick JA, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Bukowski R, Berkowitz RL, Gross SJ, Dugoff L, Craigo SD, Timor-Tritsch IE, Carr SR, Wolfe HM, Dukes K, Bianchi DW, Rudnicka AR, Hackshaw AK, Lambert-Messerlian G, Wald NJ, D'Alton ME. First-trimester or second trimester screening, or both, for Down's syndrome. *The New England Journal Of Medicine*. 2005; 353: 2001–2011.
7. Wieacker P, Steinhard J. The Prenatal Diagnosis of Genetic Diseases. *Dtsch Arztebl Int*. 2010; 107: 857–862.
8. Bogavac M, Lakic N, Simin N, Nikolic A, Sudji J, Bozin B. Biomarkers of oxidative stress in amniotic fluid and complications in pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012 ;25 :104-108.

9. 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: 306-310.
10. Jovanovic SV, Clements D, MacLeod K. Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome. *Free Radical Biology and Medicine.* 1998; 25: 1044-1048.
11. 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: 177–180.
12. Netto CB, Siqueira IR, Fochesatto C, Portela LV, da Purificação Tavares M, Souza DO, Giugliani R, Gonçalves CA. S100B content and SOD activity in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. *Clin Biochem.* 2004; 37: 134-137.
13. Tranquilli AL, Bezzeccheri V, Scagnoli C, Mazzanti L, Garzetti GG. Amniotic levels of vascular endothelial growth factor and nitric oxide at the second trimester in Down's syndrome. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2003; 13: 28-31.
14. Down JL. Observations on an ethnic classification of idiots. *Lond Hosp Clin Lect Rep.* 1866; 3: 259–262.
15. Bernal JE, Briceno I. Genetic and other diseases in the pottery of Tumaco–La Tolita culture in Colombia–Ecuador. *Clin Genet.* 2006; 70: 188–191.
16. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children. *C R Hebd Seances Acad Sci.* 1956; 248:1721–1722.
17. McCormick MK, Schinzel A, Petersen MB, Stetten G, Driscoll DJ, Cantu ES, Tranebjaerg L, Mikkelsen M, Watkins PC, Antonarakis SE. Molecular genetic approach to the characterization of the “Down syndrome region” of chromosome 21. *Genomics.* 1989; 5: 325–331.
18. Korenberg JR, Kawashima H, Pulst SM, Ikeuchi T, Ogasawara N, Yamamoto K, Schonberg SA, West R, Allen L, Magenis E, Ikawa K, Taniguchi N, Epstein CJ. Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. *Am J Hum Genet.* 1990; 47: 236 –246.

19. Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet.* 2004; 5: 725–738.
20. Yiğiter AB, Kavak ZN. Anne Karnında Down Sendromu Tanısına Güncel Yaklaşımlar ve Bir Olgu Sunumu. *Türk Aile Hek Derg.* 2006; 10: 178-182.
21. Vashist M, Neelkamal. Maternal age: a controversial factor in trisomy 21. *Med Int Syndr Down.* 2013; 17: 8-12.
22. Snijders RJ, Sundberg K, Holzgreve W, Henry G, Nicolaides KH. Maternal age- and gestation-specific risk for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1999; 13: 167-170.
23. Nusbaum RL, MD, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson Tıbbi Genetik.* Ankara: Güneş Kitabevi, 2005.
24. Balcı S. Kromozom Hastalıkları: Maternal-Fetal Tıp ve Perinatoloji. In: Beksaç MS, Demir N, Koç A, eds. Ankara. 2001: 149-156.
25. Halliday J, Collins V, Riley M, Youssef D, Muggli E. Has prenatal screening influenced the prevalence of comorbidities associated with Down syndrome and subsequent survival rates. *Pediatrics.* 2009; 123: 256 –261.
26. Morris JK, Wald NJ, Watt HC Fetal loss in Down syndrome pregnancies. *Prenat Diagn.* 1999; 19: 142–145.
27. 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: 788–789.
28. Hodapp RM, Urbano RC, So SA. Using an epidemiological approach to examine outcomes affecting young children with Down syndrome and their families. *Downs Syndr Res Pract.* 2006; 10: 83-93.
29. Shin M, Besser LM, Kuick JE, Lu C, Siffel C, Correa A. Prevalence of Down Syndrome Among Children and Adolescents in 10 Regions of the United States. *Pediatrics.* 2009;124: 1565-1571.
30. Başaran N. *Tıbbi Genetik.* Bursa: Güneş & Nobel Tıp Kitabevi, 1999.

31. Gersen S.L, Keagle M.B. *The Principles of Clinical Cytogenetics*. Second ed. New Jersey: Humana Pres, 2005.
32. Antonarakis SE, Avramopoulos D, Blouin JL, Talbot CC Jr, Schinzel AA. Mitotic errors in somatic cells cause trisomy 21 in about %4.5 of cases and are not associated with advanced maternal age. *Nat Genet*. 1993; 3: 146-150.
33. Azman BZ, Ankathil R, Siti Mariam I, Suhaida MA, Norhashimah M, Tarmizi AB, Nor Atifah MA, Kannan TP, Zilfalil BA. Cytogenetic and clinical profile of Down syndrome in Northeast Malaysia. *Singapore Med J*. 2007; 48: 550-554.
34. Jones KL, Jones MC, Campho MD. *Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation*. Philadelphia: Elsevier Sounders, 2013.
35. Jyothy A, Kumar KS, Mallikarjuna GN, Babu Rao V, Uma Devi B, Sujatha M, Reddy PP. Parental age and the origin of extra chromosome 21 in Down syndrome. *J Hum Genet*. 2001; 46: 347–350.
36. Dey SK, Ghosh S. Etiology of Down Syndrome: Risk of Advanced Maternal Age and Altered Meiotic Recombination for Chromosome 21 Nondisjunction. *Genetics and Etiology of Down Syndrome*. 2011; 23-36.
37. Yang Q, Sherman SL, Hassold TJ, Allran K, Taft L, Pettay D, Khoury MJ, Erickson JD, Freeman SB. Risk factors for trisomy 21: maternal cigarette smoking and oral contraceptive use in a population-based case-control study. *Genet Med*. 1999; 1: 80-88.
38. Gardner R.J.M, Sutherland G.R. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. Third ed. Oxford New York: Oxford University Press, 2004.
39. Garduno-Zarazua LM, Giammatteo AL, Kofman-Epstein S, Cervantes PAB. Prevalence of mosaicism for trisomy 21 and cytogenetic variant analysis in patients with clinical diagnosis of Down syndrome: a 24-year review (1986-2010) at the Servicio de Genetica, Hospital General de Mexico “Dr. Eduardo Liceaga”. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2013; 70: 29-34.
40. Yüce H, Özbey Ü, Erol D, Etem E, Deveci ŞD, Ceylan GG, Kara M, Elyas H. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında 2000-2005 Yılları Arasında Saptanan Down Sendromlu Olguların Periferik

- Kan Sitogenetik Analiz Sonuçları ve Klinik Değerlendirmeleri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2006; 20; 289-291.
41. Hall JG. Chromosomal clinical abnormalities. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, eds. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 16th Edition, Philadelphia: W.B Saunders Company, 2000.
 42. Marcante K, Kliegman RM, Behrman RE. *Nelson Essentials of pediatrics*. 4. Baskı, 2002.
 43. Cin Ş. *Klinik kitaplar serisi. Çocuk hastalıkları*. Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi ANTIP A.Ş Yayınları, 1997.
 44. World Health Organization. Media Center. Congenital anomalies. 2014
 45. Newberger DS. Down Syndrome: Prenatal Risk Assessment and Diagnosis. *Am Fam Physician*. 2000; 62: 825-832.
 46. Oğur G. *Genetik Hastalıklarda Prenatal Tanı: Fetal Tanı ve Tedavi*. In Saraçoğlu F, Ed. Ankara: 1998.
 47. Ayhan A, Durukan T, Günalp S, Gürkan T, Önderoğlu LS, Yaralı H, Yüce K. *Temel kadın hastalıkları ve doğum bilgisi*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi, 2008.
 48. Meyers C, Adam R, Dungan J, Penger V. Aneuploidy in twin gestations: When is maternal age advanced? *Obstet Gynecol*. 1997; 89: 248-251.
 49. Beksaç MS. *Prenatal tanıda non-invaziv yöntemler: Fetal Tıp; Prenatal Tanı*. Ankara: Medical Network, 1996.
 50. Balcı O, Gezginç K, Acar A. Prenatal tanı yöntemleri. *Kadın Doğum Dergisi* 2006; 5: 999-1005.
 51. Şanlı DB, Kartkaya K. Eskişehir Bölgesinde Üçlü Test Tarama Parametrelerinin Medyan Düzeylerinin Belirlenmesi. *Türk Biyokimya Dergisi*. 2011; 36: 50-54.
 52. Taner CE, Aygören MO, Kayar İ, Derin G. Down Sendromlu Olgularda Ultrasonografik Bulgular. *İzmir Perinatoloji Dergisi*. 2009; 17: 65-69.

53. Tong XL, Wang L, Gao TB, Qin YG, Qi YQ, Xu YP. Potential Function of Amniotic Fluid in Fetal Development—Novel Insights by Comparing the Composition of Human Amniotic Fluid with Umbilical Cord and Maternal Serum at Mid and Late Gestation. *J Chin Med Assoc.* 2009; 72: 368-373.
54. Güven MA, Ceylaner S. Amniyosentez ve Kordosentez ile Prenatal Tanı:181 Olgunun Değerlendirilmesi. *Perinatoloji Dergisi.* 2005; 13: 25-30.
55. Decherney AH, Nathan L, Goodwin TM, Laufer N. *Güncel Obstetrik ve Jinekoloji Tanı ve Tedavi-Lange.* Ankara: Güneş Tıp Kitabevi, 2009.
56. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi.* 2006; 31: 51–56.
57. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *Yüzyüncü yıl Vet Fak Derg.* 2004; 15: 91-96.
58. Bishop ML, Duben-Engelkirik JL, Fody EP. *Clinical Chemistry.* Fourth Edition. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
59. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu rev nutr.* 1996;16:33-50.
60. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* 3rd ed. Oxford
61. Sözman OE. İnsan Biyokimyası. In: Onat T, Emerk K, Sözman EY ed. *Yaşlanma Biyokimyası.* Ankara: 2006.
62. Akpoyraz M, Durak İ. Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *Ankara Tıp Mecmuası.* 1995; 253-262.
63. Aruoma OI. Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *JAOCs.* 1998; 2: 199-212.
64. Halliwell B, Cross CE, Gutteridge JMC. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med.* 1992; 119: 598-620.
65. Halliwell B. Free Radicals and other reactive species in Disease. In: Nature Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group. London: 2001.

66. Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem*. 2003; 10: 2495-2505.
67. Yerer BM, Aydoğan S. Oksidatif stres ve antioksidanlar. *Erciyes üniversitesi Sağlık bilimleri dergisi*. 2000; 9: 49-53.
68. Gupta P, Narang M, Banerjee BD, Basu S. Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers: A case control study. *BMC Pediatr*. 2004; 4:14.
69. Wijnberger LD, Krediet TG, Visser GH et al: Early neonatal antioxidant capacity after preexisting impaired placental function. *Early Hum Dev*, 2003; 71:111-6.
70. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci*. 2000; 25: 502-507.
71. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp dergisi*. 2002; 33: 110-118.
72. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. Comprehensive Invited Review. M. Carmen Martínez and Ramarosan Andriantsitohaina. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009; 1: 669-702.
73. Stankevičius E, Kėvelaitis E, Vainorius E, Simonsen U. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *Medicina*.2003;39: 333-341.
74. Kuyumcu A, Düzgün AP, Özmen MM, Besler HT. Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolü. *Ulus Travma Derg*. 2004; 10: 149-150.
75. Erenel G, Erbaş D, Arıcioğlu A. Serbest radikaller ve antioksidan sistem. *Gazi Tıp Dergisi*. 1992; 3: 243-250.
76. Delibaş N, Özcanakaya R. Serbest radikaller. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 1995; 2: 11-17.
77. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 2001; 54: 176–186.

78. Grdol F, Ademoğlu E. *Biyokimya*. 2. Baskı. İstanbul: Nobel tıp kitabevleri, 2009.
79. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur MM. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006; 160: 1–40.
80. Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikaller ve Antioksidanlar. *Dzce Tıp Fakltesi Dergisi*. 2005; 3: 30-39.
81. Colleen S.M, Allan M.D, Lieberman M.A. *Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*. Second ed. Philadelphia:Lippincott Williams& Wilkins, 2005.
82. Bag A, Bag N. Target Sequence Polymorphism of Human Manganese Superoxide Dismutase Gene and Its Association with Cancer Risk: A Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008; 17: 3298-3305.
83. Schaller J, Gerber S, Kaempfer U, Lejon S, Trachse C. *Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function*. England: John Willey& Sons LTD, 2008.
84. tleş S, Atlı Y. Karotenoidlerin insan sağlığı açısından nemi. *Ege niversitesi Mhendislik Bilimleri Dergisi*. 1997; 3: 249-254.
85. Pryor WA. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28: 141-164.
86. Boban M, Modun D. Uric Acid and Antioxidant Effects of Wine. *Croat Med J*. 2010; 51: 16-22.
87. Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, Anisimov SV, Vesnushkin GM, Vinogradova IA. Melatonin as antioxidant geroprotector and anticarcinogen. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1757: 573–589.
88. Champe PC, Harvey R. *Biochemistry*. Lippincott's illustrated series, 1997.
89. Uslu S, Stken E, Gler Z, olak , Alataş .Yksek yaş ve Down sendromu riski taşıyan gebelerde, seruloplazmin ve adenozin deaminaz aktiviteleri. *Trk Klinik Biyokimya Derg*. 2004; 2: 121-126.

90. Borges F, Fernandes E, Roleria F. Progress towards the discovery of xanthine oksidase inhibitors. *Curr Med Chem*. 2002; 9: 195-217.
91. Dağdemir E, Özdemir S. Ksantin Oksidaz Enzimi ve Sütteki Önemi. Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum
92. Linder N, Rapola J, Raivio KO. Cellular expression of human xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Lab Invest*. 1999; 79: 967–974.
93. Conti A, Fabbrini F, D'Agostino P, Negri R, Greco D, Genesio R, D'Armiento M, Olla C, Paladini D, Zannini M, Nitsch L. Altered expression of mitochondrial and extracellular matrix genes in the heart of human fetuses with chromosome 21 trisomy. *BMC Genomics*. 2007; 8: 268.
94. Busciglio J, Yankner BA. Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature*. 1995; 378: 776–779.
95. 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;5:167–178.
96. Boztosun A, Kumru S, Gödekmerdan A. Rekürren spontan abortuslarda lenfosit subgrupları ve sitokinlerin rolünün araştırılması. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*. 2004; 18: 147-155.
97. Raghupathy R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Immunology*. 2001; 13: 219-227.
98. Marzi M, Vigano A, Trabattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, Clerici M. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol*. 1996; 1: 127-133.
99. Yoon BH, Romero R, Kim CJ, Jun JK, Gomez R, Choi JH, Syn HC. Amniotic fluid interleukin-6: A sensitive test for antenatal diagnosis of acute inflammatory lesions of preterm placenta and prediction of perinatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol*. 1995; 172: 960-970.

100. Hillier SL, Witkin SS, Krohn MA, Watts DH, Kiviat NB, Eschenbach DA. The Relationship of Amniotic Fluid Cytokines and Preterm Delivery, Amniotic Fluid Infection, Histologic Chorioamnionitis, and Chorioamnion Infection. *Obstetrics & Gynecology*. 1993;81: 941-948.
101. Witkin SS, Chervenak J, Bongiovanni AM, Herway C, Linhares IM, Skupski D. Influence of Mid-Trimester Amniotic Fluid on Endogenous and Lipopolysaccharide-Mediated Responses of Mononuclear Lymphoid Cells. *Am J Reprod Immunol*. 2012; 67: 28-33.
102. Kishimoto T. The biology of IL-6. *Blood*. 1989; 74: 1-10.
103. Şahin Y, Şahin DA. Yenidoğan sepsisinin erken tanısında C-reaktif protein ve interlökin-6'nın rolü. *Türk Pediatri Arşivi*. 2004; 39: 171-177.
104. Akbulu G, Altındış M, Dilek ON. Genel cerrahi uygulamalarında kan transfüzyonunun immünosüpresif etkisi- daha bilinmeyen çok şey var-. *Ulusal Travma Derg*. 2001; 7: 213-219.
105. Dudley DJ, Hunter C, Mitchell MD, Varner MW. Amniotic fluid interleukin-10 (IL- 10) concentrations during pregnancy and with labor. *Varner Journal of Reproductive Immunology*. 1997; 33: 147-156.
106. Greig PC, Herbert WN, Robinette BL, Teot LA. Amniotic fluid interleukin-10 concentrations increase through pregnancy and are elevated in patients with preterm labor associated with intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol*. 1995; 173: 1223-1227.
107. Dahle LK, Hill EG, Hollman RT. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch Biochem Biophys*. 1962; 98: 253-261.
108. Durak İ, Canbolat O, Kacmaz M, Ozgen G, Ozturk HS. Antioxidant interference in superoxide dismutase activity methods using superoxide radical as substrate. *Clin Chem Lab Med*. 1998; 36: 407-408.
109. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967; 70: 158-169.

110. Hashimoto S. A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. *Anal Biochem.* 1974; 62: 426–435.
111. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU. *Methods of Enzymatic Analysis*. New York and London: Academic Press Inc, 1974: 673-677.
112. Guisti G. Enzyme activities. In: Bergmeyer UH, (editor). *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim, Bergest: Verlag Chemia, 1974; 1092–1098.
113. Durak I, Burak Cimen MY, Kacmaz M, Goren D, Serdar Ozturk H, Bolgen Cimen O. Aspirin induces erythrocyte nitric oxide synthase activity in vivo. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 2001; 314 (1-2): 265-7.
114. Ridnour LA, Sim JE, Hayward MA, Wink DA, Martin SM, Buettner GR, Spitz DR. A spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite, and nitrate in cell culture media. *Analytical biochemistry.* 2000; 281 (2): 223-9.
115. Mehmetoğlu İ. *Klinik Biyokimya el Kitabı*. Ankara: Nobel tıp kitapevi, 2013.
116. Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42;1634-1650.
117. 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 :3061–3100.
118. Perluigi M, Butterfield DA. The identification of protein biomarkers for oxidative stress in Down syndrome. *Expert Rev Proteomics.* 2011;8 :427–429.
119. Zana M, Janka Z, K'alm'an J. Oxidative stress: abridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging.* 2007;28: 648–676.
120. Gulesserian T, Seidl R, Hardmeier R, Cairns N, Lubec G. Superoxide dismutase SOD1, encoded on chromosome 21, but not SOD2 is overexpressed in brains of patients with Down syndrome. *J Investig Med.* 2001;49: 41–46.

121. Shin J.H, London J, Pecheur M. Le, H"oger h, Pollak D, Lubec G. Aberrant neuronal and mitochondrial proteins in hippocampus of transgenic mice overexpressing human Cu/Zn superoxide dismutase 1. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004; 37: 643–653.
122. Gulesserian T, Engidawork E, Fountoulakis M, Lubec G. Antioxidant proteins in fetal brain: superoxide dismutase-1 (SOD-1) protein is not overexpressed in fetal Down syndrome. *Journal of Neural Transmission*. 2001;61: 71-84.
123. Pratic`o D, Iuliano L, Amerio G. Down's syndrome is associated with increased 8,12-iso-iPF(2 α)-VI levels: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. *Annals of Neurology*. 2000; 48: 795–798.
124. Butterfield D.A, Galvan V, Lange M,B. In vivo oxidative stress in brain of Alzheimer disease transgenic mice: requirement for methionine 35 in amyloid β -peptide of APP. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010; 48:136–144.
125. Mazur-Kolecka M, Golabek A, Nowicki K, Flory M, Frackowiak J. Amyloid- β impairs development of neuronal progenitor cells by oxidative mechanisms. *Neurobiology of Aging*. 2006; 27: 1181–1192.
126. Śmigielska-Kuzia J, Sendrowski K, Jakubiuk-Tomaszuk A, Boćkowski L, Olchowik B, Cholewa M, Sobaniec W, Żelazowska-Rutkowska B, Stasiak-Barmuta A, Żochowska M. Proinflammatory plasma cytokines in patients with Down syndrome. *Praca Oryginalna*. 2012; 21: 19-25.
127. Azkona G, Levannon D, Groner Y, Dierssen M. In vivo effects of APP are not exacerbated by BACE2 co-overexpression: behavioural characterization of a double transgenic mouse model. *Amino Acids*. 2010; 39: 1571–1580.
128. Baeteman MA, Mattei MG, Baret A, Gamberre M, Mattei JF. Immunoreactive SOD-1 in amniotic fluid, amniotic cells and fibroblasts from trisomy 21 fetus. *Acta Paediatr Scand*. 1985;74: 697-700.
129. Salvolini E, Orciani M, Lucarini G, Vignini A, Tranquilli AL, Di Primio R. VEGF and nitric oxide synthase immunoexpression in Down's syndrome amniotic fluid stem cells. *Eur J Clin Invest*. 2011 ;41 :23-29.
130. Brooksbank BW, Balazs R. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and lipoperoxidation in Down's syndrome fetal brain. *Brain Res*. 1984; 318 :37-44.

131. 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: 963–967.
132. Lott IT, Doran E, Nguyen VQ, Tournay A, Head E, Gillen DL. Down syndrome and dementia: a randomized, controlled trial of antioxidant supplementation. *American Journal of Medical Genetics.* 2011; 155: 1939–1948.
133. Zidek Z. Adenosine - cyclic AMP pathways and cytokine expression. *Eur Cytokine Netw.* 1999; 10: 319-328.
134. Yoneyama Y, Sawa R, Suzuki S, Otsubo Y, Araki T. Serum adenosine deaminase activity in women with hyperemesis gravidarum. *Clin Chim Acta.* 2002; 324: 141-145.
135. Puukka R, Puukka M, Leppilampi M, Linna SL, Kouvalainen K. Erythrocyte adenosine deaminase, purine nucleoside phosphorylase and phosphoribosyltransferase activity in patients with Down's syndrome. *Clin Chim Acta.* 1982; 126: 275-281.
136. Bloemers BL, van Bleek GM, Kimpfen JL, Bont L. Distinct abnormalities in the innate immune system of children with Down syndrome. *J Pediatr.* 2010;156: 804–809.
137. Kusters MA, Verstegen RH, Gemen EF, de Vries E. Intrinsic defect of the immune system in children with Down syndrome: a review. *Clin Exp Immunol.* 2009;156: 189–193.
138. Heyser CJ, Masliah E, Samimi A. Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin-6 in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 1500–1505.
139. Carta MG, Serra P, Ghiani A. Chemokines and pro-inflammatory cytokines in Down's syndrome: an early marker for Alzheimer-type dementia? *Psychother Psychosom.* 2002; 71: 233–236.
140. Kameda T, Matsuzaki N, Sawai K, Okada T, Saji F, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, Tanizawa O. Production of interleukin-6 by normal human trophoblast. *Placenta.* 1990; 11: 205-213.

EKLER

EK 1: Etik Kurul Kararı

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Amniyon sıvı incelenmesinde down sendromu tespit edilmiş gebelerde oksidan/antioksidan sistem IL-6 ve IL-10 parametrelerinin değerlendirilmesi			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Berrin İmge Ergüder			
	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 Çalışması					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARAS I ☐	

31 Mart 2013
Hesaplar
Sekreter

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			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/GÜNÜKLERİ	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:01-19-13	Tarih: 14 Ocak 2013		
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri ile bilgilendirilmiş gönüllü olur formu 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
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI: 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	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	M.Melli
Prof.Dr.Cihan YURDAYDIN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	Yurdaydin
Prof.Dr.Mehmet GÜREL	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Gürel
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY	Farmakoloji	A.Ü.Eczacılık Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Özçelikay
Prof.Dr.Nuhan PURALI	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Purali
Prof.Dr.Cem ATİLAŞOĞLU	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Atilaşoğlu
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Öztürk
Prof.Dr.Serap SIVRI	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Sivri
Prof.Dr.Muharrem ÖZEN	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	Özen
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Çakır
Doç.Dr.Güngör UTKAN	Tıbbi Onkoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	Utkan
Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyostatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	Öztuna
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Kutlay
Yrd.Doç.Dr.Volkan KAVAS	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	Kavas
Gülüm ASLAN	Arkeoloji	-	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Aslan

H. TUNA
Bakülte Sekreter/Vekili

EK 2: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Versiyon No: 2

Versiyon Tarihi: 18.01.2013

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sayın

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda "Amniyon sıvı incelenmesinde down sendromu tespit edilmiş gebelerde oksidan/antioksidan sistem, IL-6 ve IL-10 parametrelerinin değerlendirilmesi." adında bir çalışma yapılmaktadır. Bu araştırma amaçlı bir çalışmadır.

Bebeklerin %2-4'ü çeşitli anomaliler ile doğmaktadır. Bunların oluşumunda genetik kusurların rolü çok büyüktür. Genetik hastalıkları için kalıcı bir tedavi yöntemi henüz olmadığından bu hastalıkların erken tanısı anne ve baba adayının kararıyla bebek kritik sınıra ulaşmadan gebeliğin sonlandırılması çok önemlidir. Bu amaca yönelik kullanılan çok sayıda yöntem vardır ve anne adayında girişimsel işlem gerektiren doğum öncesi tanı yöntemleri arasında en sık kullanılan yöntem amniyosentezdir. Amniyosentez en sık ileri anne yaşı olan anne adaylarının bebeklerinin kromozom anomalisi açısından değerlendirilmesinde ve dörtlü tarama testinde risk saptandığı durumlarda kesin tanı amacıyla kullanılmaktadır. Amniyosentez sonucunda down sendromu tespit edilen annelerin amniyon sıvısında oksidan/antioksidan sistem ve interlökin-6 ve 10' un düzeyiyle ilgili bizim araştırmalarımıza göre güncel bilimsel literatürde (yazılı ve görsel bilimsel ortamda) yapılmış araştırma bulunmamaktadır. Araştırmamızın bu alandaki boşluğun doldurması amaçlanmıştır. Bu araştırma sayesinde gebelerde uygulanan "Amniyosentez" sonucuna göre Down Sendromu tespit edilen gebelerin oksidan/antioksidan sistemlerinin durumunun ortaya konulması ve yeni bilimsel veriler üretilmesi hedeflenmektedir.

Bu araştırmada, sizin "Amniyosentez" işleminiz Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genetik Merkezi normal şekilde çalışılacaktır. Amniyosentez sonucunda down sendromu saptanan gebelerin arta kalan amniyon sıvısında ve amniyosentez sonucu normal olan gebelerin arta kalan amniyon sıvısında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında oksidan stresi gösteren testlerden malondialdehit ve ksantin oksidaz, antioksidan savunma durumunu gösteren testlerden de süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz adındaki testler çalışılacaktır. Ayrıca bu amniyon sıvılarında interlökin-6 ve 10 gibi doğal bağışıklıkta rol alan testler çalışılacaktır. Adı geçen testler araştırma amaçlı testlerdir. Bu araştırmada sizin ve bebeğinizin vücuduna zarar verecek hiçbir ek girişimde (invaziv girişim) bulunulmayacaktır. Araştırmaya katılmaya karar vermeniz halinde normalde "Amniyosentez" için vermiş olduğunuz amniyon sıvısı haricinde sizden hiçbir ek test materyali (kan, idrar, BOS vb.) istenmeyecektir. "Amniyosentez" sonucunuza göre Down Sendromu saptanan annelerin amniyon sıvıları test grubunu, Down Sendromu çıkmayan annelerin amniyon sıvıları kontrol grubunu oluşturacaktır.

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

- 16. ile 20. gebelik haftaları arasında olması
- 18 yaşını doldurmuş

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

Bu araştırmaya katılıp katılmamanız "Amniyosentez" 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 amniyon sıvıları, yukarıda adı geçen araştırma amaçlı testler haricinde hiçbir ek çalışma yapılmayacaktır. Amniyon sıvılarınız Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı haricinde hiçbir yere götürülmeyecektir, ülke dışına gönderilmeyecektir.

Araştırmaya katılmaya karar vermeniz durumunda sizden fazladan amniyon sıvısı alınmayacaktır, "Amniyosentez" 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 sonuçlarınızın 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. Seda YILMAZ BAHSİ** ile 24 saat iletişime geçebilirsiniz. Kendisine ulaşabileceğiniz **telefon numarası 05057653345**. Elektronik ileti adresi **dr.sedabahsi@hotmail.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: ... / ... / 2012	İmza
Adres:	Telefon: 0 0	
Doktor Adı Soyadı: Araş. Gör. Dr. Seda BAHSİ	Tarih: ... / ... / 2012	İmza
Adres: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Morfoloji Yerleşkesi Dekanlık Binası 1. Kat Sıhhiye/ANKARA	Telefon: 0 505 7653345 0 312 5958268	
(Varsa) Tanıklık Eden Adı Soyadı:	Tarih: ... / ... / 2012	İmza
Adres:	Telefon: 0 0	