



IJBCM

International Journal of Basic and Clinical Medicine
Uluslararası Temel ve Klinik Tıp Dergisi

Research Article / Araştırma Makalesi

Anensefalide Gebelerin Folat ve Vitamin B12 Düzeyleri ile Faktör V Leiden, Faktör II G20210A, MTHFR C667T ve MTHFR A1298C Polimorfizlerinin Önemi

Significance of Maternal Serum Folate and Vitamin B12 levels with Factor V Leiden, Factor II G20210A, MTHFR C667T and MTHFR A1298C variations in Anencephaly

Hatip Aydın¹, Resul Arisoy², Ali Karaman³, Arda Çetinkaya³, Emre Erdoğan², Oya Demirci², Mehmet Burak Mutlu³

¹ Namık Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Tekirdağ, Türkiye

² Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim Araştırma Hastanesi, Perinatoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

³ Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik Birimi, İstanbul, Türkiye

Özet

Amaç

Multifaktöryel anensefali etyolojisi halen tam olarak bilinmeyen durumlardan biridir. Etiyolojinin daha iyi anlaşılması için bilinen faktörler olan Folat ve vitamin B12 düzeyleri yanı sıra Faktör V Leiden, Faktör II G20210A, MTHFR C667C>T and MTHFR C.1298A>C polimorfizmlerini anensefalili gebeliği olan ve sağlıklı gebeliği olan annelerde inceleyerek karşılaştırmayı amaçladık.

Materyal ve Metot

Çalışmamızda 10 anensefalili gebeliği olan anne ve 32 sağlıklı gebede serum folat ve B12 vitamin düzeyleri yanı sıra Real-Time PCR ile Faktör V Leiden, Faktör II G20210A, MTHFR C667T ve MTHFR A1298C polimorfizmlerinin genotipleri incelenerek karşılaştırıldı.

Sonuç

Çalışmamızda serum folat düzeyi ve MTHFR A1298C genotipi açısından gruplar arasında anlamlı fark saptandı. Serum B12 vitamin düzeyi, FVL, FII G20210A ve MTHFR C667T varyasyonları anensefalili gebe ve kontrollerin karşılaştırmasında anlamlı farklılık olmadığı belirlendi.

Tartışma

Anensefali ve nöral tüp defekti gelişiminde anne folat düzeylerinin düşük olması bilinen bir faktördür. MTHFR gen polimorfizmleri ile ilişkili çalışmalar da bulunmaktadır. Biz de çalışmamızda folat eksikliğinin etiyolojide önemli rol oynadığını; ancak diğer faktörlerin anlamlı fark yaratmadığını belirledik. Ayrıca, anensefali için daha fazla araştırmaya gerek olduğu kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Anensefali, Folat, Vitamin B12, Faktör V Leiden, Faktör II G20210A, MTHFR C667T, MTHFR A1298C

Abstract

Aim

Exact etiology of multifactorial anencephaly is still unclear. For a better understanding of the etiology, we sought to determine serum levels of folate and vitamin B12 as well as genetic variations including Factor V Leiden, Factor II G20210A, MTHFR C.667C>T and MTHFR C.1298A>C in pregnant Turkish women with fetal anencephaly, and healthy pregnant women to point out significant differences.

Material-Methods

We compared the concentration of serum folate, vitamin B12 and genotype related with Factor V Leiden (FVL), Factor II (FII) G20210A, MTHFR C667T and MTHFR A1298C variations in 10 pregnant mothers with fetal anencephaly, and 32 mothers with healthy pregnancies. Gene polymorphisms were genotyped using Real-Time PCR.

Results

We found a significant difference in serum folate concentrations and MTHFR A1298C genotypes between groups. However, serum B12 vitamin concentrations and Factor V Leiden, Factor II G20210A, and MTHFR C667T genotypes were not significantly different in mothers with fetal anencephaly, compared to controls.

Conclusion

Low maternal folate level is a known factor in the development of anencephaly and neural tube defects. Studies indicating an association with MTHFR gene polymorphisms are also present. We have determined that the lack of folic acid plays an important role in the etiology of anencephaly, however other factors are not significant. We believe that more research is needed as the etiology of anencephaly is still not fully understood.

Keywords: Anencephaly, Folate, Vitamin B12, Factor V Leiden (FVL), Factor II (FII) G20210A, MTHFR C667T, MTHFR A1298C

Corresponding Author / Sorumlu Yazar:

Yrd. Doç. Dr. Hatip Aydın
Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Tekirdağ, Türkiye
Telefon: 0 282 250 5931
E-posta: dr.hatip@gmail.com

Article History / Makale Geçmişi:

Date Received / Geliş Tarihi: 09.12.2015
Date Accepted / Kabul Tarihi: 23.12.2015

Int J Basic Clin Med 2015;3(3):112-6

Giriş

Anensefali, nöral tüp defekti (NTD)'nin ağır bir tipi olup embriyonik nörolasyon aşamasının tamamlanmamasından kaynaklanır^{1,2}. Çevresel faktörler, genetik yatkınlık ve yetersiz beslenme gibi birden fazla nedenin bu duruma yol açtığı düşünülmektedir². NTD oluşumunda folik asit yetersizliği rol aldığı bilinmektedir. Ayrıca, MTHFR gen polimorfizmlerinin de genetik yatkınlık oluşturduğu bilinmektedir³. Literatürde yaygın olarak kabul edilen NTD nedeni folat eksikliğidir. Folat ile ilişkili genlerden en iyi bilineni 5,10-metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR)'dir^{4,5}. B12 vitamini de folat metabolizmasında yer alması nedeniyle önemlidir. Faktör V Leiden (FVL) ve Faktör II G20210A (FII G20210A) ise kalıtsal trombozda etkili olup bu gende değişim taşıyan annelerde iskemiye tetikleyerek beyin anomalilerine neden olduğu bildirilmiştir^{6,7}.

Biz bu çalışmada folat, B12 vitamin düzeylerinin yanısıra FVL, FII G20210A, MTHFR C667T ve MTHFR A1298C polimorfizmlerinin anensefali oluşumundaki rolünü öğrenmek amacıyla anensefalili fetüsü olan anneler ve sağlıklı gönüllü bireylerden periferik kan örneği alarak karşılaştırma yaptık.

Materyal ve Metot

Hasta Seçimi

Çalışmaya 2012-2014 yılları arasında Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genetik Tanı Merkezi'ne başvuran perinatal 12-16 haftalar arasında anensefalili gebeliği tespit edilmiş olan 10 anne dahil edildi. FVL, FII G20210A, MTHFR C667T, MTHFR A1298C polimorfizmleri, folat ve B12 vitamin düzeyleri bakılmamış, anensefali dışında anomalisi olan, tanısı kesin olmayan ve postnatal muayenesi anensefali ile

uyumlu olmayan gebeler çalışma dışı bırakıldı. Anensefalili gebeliğe sahip bireyler folat veya vitamin kullanıp kullanılmadığına bakılmaksızın çalışmaya dahil edildi. Kontrol amacıyla en az iki sağlıklı gebeliği olmasının yanısıra gebelik kaybı veya anomalili gebeliği olmayan 32 sağlıklı gebe çalışmaya dahil edildi. Aynı kontrol grubuna ait bireyler daha önceden grubumuz tarafından yapılan anensefali dışındaki nöral tüp defektlerini inceleyen başka bir çalışmada da kullanılmıştı⁸.

Folat ve Vitamin B12 düzeyleri üretici firmanın belirlediği protokol (Abbott Architect, USA) ile Abbott Architect i1000 İmmunoassay Analyzer (Abbott, USA) cihazında çalışılarak değerlendirildi.

Genotipleme

Genomik DNA periferik kan örneklerinden Magnesia DNA Blood Kit (Anatolia, Türkiye) kullanılarak izole edildi. FVL, FII G20210A, MTHFR C667T ve MTHFR A1298C gen polimorfizmleri Bosphore Kit ile Montania 483 (Anatolia Inc., Türkiye) Real-Time PCR cihazı kullanılarak üretici firmanın belirttiği şekilde çalışıldı.

İstatistik Analizi

Genotip ve allelerin karşılaştırmasında SHEsis online web programı kullanıldı. Folat ve B12 Vitamin düzeylerinin karşılaştırması için Wilcoxon W ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

Bulgular

Anensefalili gebeliği olan anne grubu yaş ortalaması 25 (20-32) yaş ve kontrol gebe grubu yaş ortalaması 26 (22-30) yaş idi. Çalışmada gruplar arası karşılaştırmada FVL, FII G20210A ve MTHFR C667T genotipleri

(sırayla $p=0.372$, $p=0.571$, $p=0.666$) (Tablo 1) ve allelleri (sırayla $p=0.387$, $p=0.574$, $p=0.754$) (Tablo 2) açısından anlamlı fark bulunmamaktaydı. MTHFR A1298C açısından gruplar karşılaştırıldığında genotip (OR=0.371901 %95 CI= [0.133122~1.038973], $p=0.005$) olarak anlamlı; ancak allel ($p=0.054$)

olarak anlamlı fark yoktu. Ek olarak, gruplar arasında folat ve B12 vitamin düzeyi açısından fark olup olmadığı bakıldığında folat düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark varken (0.037), B12 vitamini açısından fark bulunmamaktaydı ($p=0.106$) (Tablo 3).

Tablo 1: Anensefalili ve Sağlıklı Gebelerin Genotip Dağılımları

Genotip	Anensefalili Gebeler			Sağlıklı Gebeler			p değeri
	Doğal	Heterozigot	Homozigot	Doğal	Heterozigot	Homozigot	
Faktör V Leiden	9 (90%)	1(10%)	0 (0%)	31 (97%)	1 (31%)	0 (0%)	0.372
Faktör II G20210A	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	31 (97%)	0 (0%)	1(3%)	0.571
MTHFR C677T	3 (30%)	7 (70%)	0 (0%)	12(37.5%)	20 (62.5%)	0 (0%)	0.666
MTHFR A1298C	2 (20%)	5 (50%)	3 (30%)	12 37.5%)	20 (62.5%)	0 (0%)	0.005

Tablo 2: Anensefalili ve Sağlıklı Gebelerin Allel Dağılımları

Allel	Anensefalili Gebeler		Sağlıklı Gebeler		p değeri
	Doğal Allel	Mutasyonlu Allel	Doğal Allel	Mutasyonlu Allel	
Factor V Leiden	19 (95%)	1 (5%)	63 (98.4%)	1 (1.6%)	0.387
Factor II G20210A	20 (100%)	0 (0%)	63 (98.4%)	1 (1.6%)	0.574
MTHFR C677T	13 (65%)	7 (35%)	44 (69%)	20 (31%)	0.754
MTHFR A1298C	9(45%)	11 (55%)	44 (69%)	20 (31%)	0.054

Tablo 3: Anensefalili ve Sağlıklı Gebelerin Folik asit ve B12 Vitamin Düzeylerinin Ortanca, Minimum, Maksimum ve p değerleri

	Anensefalili Gebeler	Sağlıklı Gebeler	p değeri
Folik Asit (ng/mL)	10 (4,45-19)	17 (4,2-46)	0.037
B12 Vitamin (pg/mL)	318 (228-459)	265,5 (145-377)	0.106

Tartışma

Anensefali bir NTD varyantı olup beyin gelişimi olması nedeniyle en ağır formudur^{1,2}. NTD ve anensefali gelişiminde folat yetersizliği, homosistein yüksekliği, MTHFR gen polimorfizmlerinin risk oluşturduğu bilinmektedir. Folat biyolojik olaylarda tek karbon grubu taşıyıcısı özelliği nedeniyle DNA sentezi, tamiri ve metilasyonunda rol alır. MTHFR gen varyantları ise folat'ın homosistein yıkılmasını etkilemesi nedeniyle yetersizliği homosistein yüksekliğine neden olurlar⁹. Gebelikten önce ve gebeliğinin ilk 4 haftasında folat takviyesi alan gebelerde NTD'nin %50'ya varan azalma göstermesi bu yolağın etkisini

kanıtlamaktadır^{10,11}. Literatürde anensefali ile folat arasındaki ilişki birebir nadir olarak ele alınmıştır. Çoğunlukla anensefalinin dahil olduğu NTD grubu ile folat arasındaki ilişki araştırılmıştır. Yaptığımız araştırmada anensefali ile folik asit arasında kontrollerle karşılaştırıldığında önemli istatistiksel fark olduğu saptandı. Ancak kontrollere göre anensefalili gebeliği olan annelerin anlamlı düşük folat seviyelerine sahip olmalarına rağmen folik asit ortalamalarının normal sınırlar içerisinde olduğu saptandı. Bu da folik asit seviyesinin normal sınırlar içerisinde olsa da takviye edilerek seviyenin üst sınırlarda tutulması gerektiğini kanıtlamaktadır. B12

vitamini ise folat biyolojik yolağında önemli bir reseptördür. Dolaylı olarak B12 vitamin eksikliği NTD ile ilişkili olmaktadır^{8,12}. B12 vitamini bu yolda bir kofaktör görevi rol almasına ve toplumda B12 vitamin eksikliği sık görülüyor olmasına rağmen anensefalili anneler ve kontroller arasında fark olmaması bu vitaminin anensefali etyolojisinde olmadığı veya toplumdaki sık nedeni olmadığını desteklemektedir.

MTHFR C677T homozigot değişimini normal popülasyona göre 2-3 kat NTD riski artışına neden olmaktadır^{4,13}. MTHFR 1298A→C değişimi de NTD risk artışına neden olduğu bildirilmesine rağmen 677C→T değişimi taşıyanlara göre daha az risk oluşturmaktadır¹⁴. Anensefali gebeliğe sahip anneler ile yaptığımız çalışmamızda MTHFR C677T açısından karşılaştırmada gruplar arasında fark tespit edilmedi. MTHFR A1298C açısından ise genotip olarak hasta grubunda homozigot değişimin kontrol grubuna göre fazla olduğu saptandı. Ancak allel olarak kontrollere göre anlamlı farklılık olmaması bu varyasyonunda anensefalide bir anlam ifade etmediğini desteklemektedir.

FVL ve FII G20210A kalıtsal trombofilide önemli mutasyonlar olduğu bilinmektedir ve tromboembolizm, derin ven trombozu gibi durumlara neden olduğu kesin olarak kanıtlanmıştır⁶. Bu iki mutasyon ve anensefali arasında bir ilişki varlığını araştıran çok az araştırma bulunmaktadır. Ceyhan ST ve ark. Türk popülasyonunda spina bifidalı olgularda bu iki gen ile ilgili araştırma yapmış ancak herhangi bir ilişki bulmamışlardır¹⁵. Buna karşın, NTD ile FVL ilişkisinin gösterildiği çalışmalar da literatürde yer almaktadır⁸. Bu çalışmada öndeki çalışmalardan farklı olarak anensefalili gebeliği olan anneleri inceledik ve

bu iki mutasyon için herhangi ilişkili tespit etmedik.

Anensefalili gebeliği olan annelerdeki etiyolojyi araştırmak amacıyla yaptığımız çalışmada folik asit eksikliğinin halen etiyolojide önemli rol oynadığını belirledik. Ayrıca MTHFR A1298C homozigot değişiminin göz ardı edilmemesinin gerektiği de göze çarpmaktadır. Folat eksikliği kaynaklı olmayan anensefalilerin moleküler temellerinin anlaşılması için daha çok araştırma yapılması gerekmektedir. Moleküler temellerin bilinmesi halinde koruyucu ve önleyici önlemler sağlanabileceğinden yapılacak ileri moleküler çalışmalar oldukça önemlidir.

Kaynaklar

1. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, MIM Number: {182940}: {03/10/2015}, World Wide Web URL: <http://omim.org/182940>.
2. Greene NDE, Stanier P, Copp AJ. Genetics of human neural tube defects. *Hum Mol Genet* 2009;18(R2):113-29.
3. Molloy AM, Kirke PN, Troendle JF, et al. Maternal Vitamin B-12 Status and Risk of Neural Tube Defects in a Population With High Neural Tube Defect Prevalence and No Folic Acid Fortification. *Pediatrics* 2009;123(3):917-23.
4. Van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995;346(8982):1070-1.
5. Shields DC, Kirke PN, Mills JL, et al. The 'thermolabile' variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: an evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. *Am J Hum Genet* 1999;64(4):1045-55.
6. Pileri P, Franchi F, Cetin I, et al. Maternal and fetal thrombophilia in intrauterine growth restriction in the presence or absence of maternal hypertensive disease. *Reprod Sci*. 2010;17(9): 844-8.
7. Reid S, Halliday J, Ditchfield M, et al. Factor V Leiden mutation: a contributory factor for cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* 2006;48(1):14-9
8. Aydın H, Arısoy R, Karaman A, Erdoğan E, Çetinkaya

- A, Geçkinli B, Şimşek H, Demirci O. Evaluation of maternal serum folate, vitamin B12, and homocysteine levels and factor V Leiden, factor II g.20210G>A, and MTHFR variations in prenatally diagnosed neural tube defects. *Turk J Med Sci* 2015; 45: doi:10.3906/sag-1502-128.
9. Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: An examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet* 2000;67(4):986-90.
 10. Motulsky AG. Nutritional ecogenetics: homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defects, and folic acid. *Am J Hum Genet* 1996;58(3):648.
 11. Anonymous. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *Morb Mortal Wkly Rep*. 1992;41:1-7.
 12. Li F, Watkins D, Rosenblatt DS. Vitamin B-12 and birth defects. *Molecular Genetics and Metabolism* 2009;98(1-2):166-72.
 13. Blom HJ, Shaw GM, Den Heijer M, et al. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci* 2006;7(9):724-31.
 14. Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: An additional risk factor for neural tube defects? *Am J Hum Genet*. 1998;62(5):1044-51.
 15. Ceyhan ST, Beyan C, Bahce M, et al. Thrombophilia associated gene mutations in women with pregnancies complicated by fetal neural tube defects. *Inter J Gynecology Obstetrics* 2008; 101(2):188-9.