

# Akut İnme Hastalarında Risk Faktörü Olan Homosistein Düzeyine MTHFR Gen Polimorfizmlerinin Etkisi\*

*The Effect of MTHFR Gene Polymorphisms on The Homocysteine Level, A Risk Factor, in Acute Stroke Patients*

Miriş DİKMEN<sup>1</sup>, Bilge GÜLEL<sup>2</sup>, Hasan Veysi GÜNEŞ<sup>1</sup>, Demet GÜCÜYENER<sup>2</sup>, İrfan DEĞİRMENCI<sup>1</sup>, Gazi ÖZDEMİR<sup>2</sup>, Ayşe BAŞARAN<sup>1</sup>

*Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji<sup>1</sup> ve Nöroloji<sup>2</sup> AD, Eskişehir*

**ÖZET:** Bu çalışmada, akut inme hastalarında MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmi genotip ve allel sıklıklarını belirlemek ve bu genotipler ile plazma total homosistein düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırmak amaçlanmıştır. Çalışma 203 akut inmeli hasta ve 55 sağlıklı kişide yapılmıştır. Tüm araştırma grubu bireylerinin periferik kan örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapılarak, PCR-RFLP, elektroforez yöntemleri uygulanarak, MTHFR enzimini kodlayan genin C677T ve A1298C polimorfizm genotipleri tayin edildi. Yine bu kan örneklerinde plazma total homosistein düzeyleri ELISA yöntemiyle belirlendi.

Araştırma sonucunda, akut inme hastaları ve hasta alt grupları ile kontrol grubu arasında C677T ve A1298C genotipleri ile 677 T-C ve 1298 A-C allel sıklıkları bakımından önemli bir farklılık bulunmadı. Ancak plazma total homosistein artışının, en fazla tüm inmeli hasta grubu ile iskemi hasta alt grubunun 677TT ve 1298AA genotiplerinde olduğu belirlendi. Bizim çalışmamıza göre, inme oluşumunda MTHFR C677T ve A1298C mutasyonlarının etkisinin direkt olmadığı ancak inme oluşumunda bir risk faktörü olan homosistein artışına C677T mutasyonunun A1298C mutasyonuna göre etkisinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Akut inme, A1298C, C677T, Homosistein, Metilentetrahidrofolat redüktaz.

**ABSTRACT:** This study was performed to observe whether the MTHFR C677T and A1298C genetic polymorphisms contribute to hyperhomocysteinemia and increase the risk for stroke. In this study, 203 patients with acute stroke and 55 control subjects without any history of stroke were recruited in this study. DNA was extracted from peripheral blood samples of the patients and controls. C677T and A1298C genotypes and alleles in the MTHFR gene were identified by PCR-RFLP and electrophoresis methods. Also, plasma total homocysteine levels were determined by using ELISA.

The results of the experiment, there were no significant differences between C677T and A1298C genotypes, and 677 T-C and 1298 A-C allele frequencies in the control and acute stroke patients groups. However, in all stroke patients, it has been found that plasma total homocysteine level was higher in the 677 TT and 1298 AA genotypes. Our study showed that MTHFR C677T and A1298C mutations were an independent risk factor on increased plasma total homocysteine level in acute stroke. And we determined that the effect on homocysteine levels of C677T mutation was higher than the effect of A1298C mutation.

**Key Words:** Acute stroke, A1298C, C677T, Homocysteine, Methylentetrahydrofolate reductase

## GİRİŞ

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR), folat metabolizmasında önemli bir enzimdir. İnsan MTHFR geni, kromozom 1p36.3'de lokalize olmuştur ve 656 aminoasitten oluşan MTHFR enzimini kodlar (1). MTHFR, 5,10 metilentetrahidrofolatı (5,10-metilen THF) irreversibel olarak 5-metil tetrahidrofolata (5-

metil THF) dönüştürür. 5-metil THF; DNA metilasyonu ve metiyonin sentezi için metil grubu sağlar. 5,10- metilen THF ise deoksüridilatin timidilata dönüşümünde kullanılırken bir taraftan da pürin sentezi için 10-formil THF'a okside olmaktadır. MTHFR geninde meydana gelen bir mutasyon (en yaygın olanı C677T polimorfizmi) enzim aktivitesini azaltmaktadır. Azalan MTHFR aktivitesi sonucunda 5- metil THF düzeyi azalmakta, 5,10- metilen THF miktarı ile plazma homosistein düzeyi artmaktadır (1-5).

MTHFR geninde görülen bazı mutasyonlar, enzimde inaktivasyona neden olarak, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olan hiperhomosisteinemi ve homosisteinüri oluşmasına neden olur (6-8).

Yazışma ve tıbbi basım için; Arş.Gör.Dr. Miriş Dikmen, Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD., TR-26480 Eskişehir (Türkiye)  
Tel: 0- 222-2392979/4596  
(e-mail: mdikmen@ogu.edu.tr / mirisdikmen2004@yahoo.com)

\* Bu çalışma Osmangazi Üniversitesi Araştırma Fonu'nun desteklediği 200211017 nolu araştırma projesinin bir kısmıdır.

MTHFR C677T polimorfizminde, MTHFR enzimini kodlayan gende 677. nükleotid olan C (Sitozin)'in →T (Timin)'e dönüşmesi sonucu ortaya çıkan bir nokta mutasyonu vardır. Bu nokta mutasyonunun sonucu MTHFR aktivitesi azalır. Azalan MTHFR aktivitesi, 5-metil tetrahidrofolat seviyesinde azalmaya ve homosisteinin metiyonine dönüşmemesi nedeniyle plazma homosistein seviyesinde artmaya neden olur (9-15). MTHFR'nin C677T polimorfizminin, kardiovasküler hastalıklar, inme, nöral tüp defektleri, Down sendromu, meme ve endometrial kanser gibi hastalıklarda bir risk faktörü olduğu açıklanmıştır (12,16,17). C677T mutasyonunda, MTHFR aktivitesi, homozigot mutant TT genotipinde, heterozigot CT ve homozigot normal CC genotiplerine göre azalırken, homosistein seviyesi önemli oranda yükselir (3,12,18).

MTHFR geninde belirlenen diğer bir mutasyon da, enzimi kodlayan gende 1298. nükleotid olan A(Adenin)'in → C (Sitozin)'e değişimi sonucu oluşan nokta mutasyonudur. Bu mutasyonda da diğer mutasyon tipinde olduğu gibi MTHFR aktivitesi azalır. A1298C polimorfizminin plazma homosistein artışını, C677T polimorfizmi kadar etkilemediği ileri sürülse de, bu polimorfizmin önemi henüz tam olarak açıklanamamıştır (19).

A1298C ve C677T mutasyonunun sıklığı popülasyonlara göre farklılık göstermektedir (20). A1298C ve C677T mutasyonlarının birlikte heterozigot olduğu durumda, MTHFR enzim aktivitesi, her iki allelin normal homozigot olduğu durumlardaki enzim aktivitesinin %50-60'ı kadardır (5,20,21).

Bu çalışmada, 203 akut inmeli hasta ile 55 sağlıklı kişide, C677T ve A1298C polimorfizm genotip ve allel sıklıklarını belirlemek ve bu genotipler ile plazma total homosistein seviyesi arasındaki ilişkiyi açıklamayı amaçladık.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

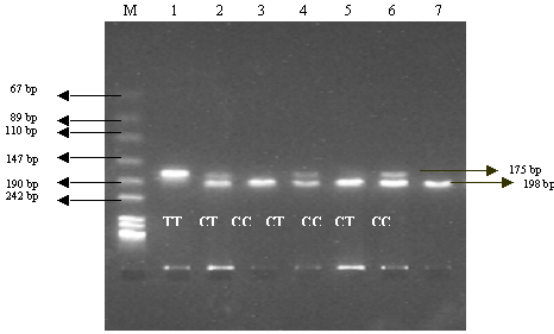
Bu çalışma, Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı servisine akut inme tanısı ile başvuran, yaş ortalaması 63,42±0,87 (ort ± standart hata) yıl olan, 203 hasta (110 erkek, 93 kadın) ve kontrol amacı ile kullanılan, yaş ortalaması 56,78±1,18 (ort ± standart hata) yıl olan, 55 sağlıklı kişi (16 erkek, 39 kadın) de yapıldı.

Hastalar, Beyin Tomografisi (BT) ve Magnetik Rozenans (MR) görüntüleme yöntemlerine göre, iskemik inme ve hemoraji olmak üzere 2 grup altında incelendi. Kontrol grubu nöroloji polikliniğine başvuran ve herhangi bir nörolojik ve sistemik hastalığı bulunmayan ve vitB<sub>12</sub> almamış kişi ve yakınlarından oluşturuldu. Çalışmada, hasta ve kontrol olmak üzere toplam 258 kişinin periferik kan örneği

alındı. Hasta kan örnekleri aç karına olmak üzere tedaviye başlanmadan önce ve akut dönemde (1-4. günler arası), kontrol bireylerden de aç karına, sabah alındı. Örnekler arasında vitamin kullananların, kan alınımından en az iki hafta önce vitamin alımını durdurmuş olmalarına dikkat edildi. Örneklerden toplanan EDTA'lı kan örnekleri alınır alınmaz buza kondu. 3000 g.'de 10 dak. santrifüj edilerek plazması ayrıldı. Plazma örnekleri daha sonra homosistein ölçümüne kadar -80°C'de depolandı (22). Plazma total homosistein konsantrasyonları Axis Enzim İmmünoassay Homosistein kiti (ELISA) kullanılarak ölçüldü. Plazma total homosistein düzeyi standardize edilememiş olmakla birlikte, bizim çalışmamızda kit içeriği de değerlendirilerek 5-15 µmol/L düzeyi normal, 15 µmol/L üzerindeki değerler ise hiperhomosisteinemi olarak değerlendirildi (6). Plazması alınan bu kan örneklerinin peletinden ise tuz yöntemiyle DNA ekstraksiyonu yapıldı ve DNA'lar C677T ve A1298C polimorfizmleri açısından değerlendirildi.

Örneklerde C677T ve A1298C polimorfizmleri bakımından MTHFR genotiplerini belirlemek için, DNA'lar her iki gen bölgesinde farklı primer çiftleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifiye edildi. C677T polimorfizmi için; (ekzonik) 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' ve (intronik) 5'-AGGACGGTGCAGTGAGAGTG-3' (9, 23, 24); A1298C polimorfizmi için de; (ekzonik) 5'-CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC-3' ve (intronik) 5'-CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG-3' (9,24,25) primer çiftleri kullanıldı. DNA örneklerinin PCR ile amplifikasyonu için, her bir primerden 10 pmol (C677T mutasyonu için her bir 677 primer çifti ve A1298C mutasyonu için de 1298 primer çifti), her bir dNTP'den 0.2 mM, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCL (pH:8), 2U taq polimeraz ve distile H<sub>2</sub>O'dan oluşan 50µL'lik PCR karışımı hazırlandı. C677T polimorfizmi için 94°C'de 60sn, 61°C'de 60sn, 72°C'de 60sn, A1298C polimorfizmi için de 92°C'de 60sn, 60°C'de 60sn, 72°C'de 30sn PCR şartları kullanılarak thermal cyclers (Eppendorf Mastercycler Personal) da 35 siklus olarak amplifiye edildi.

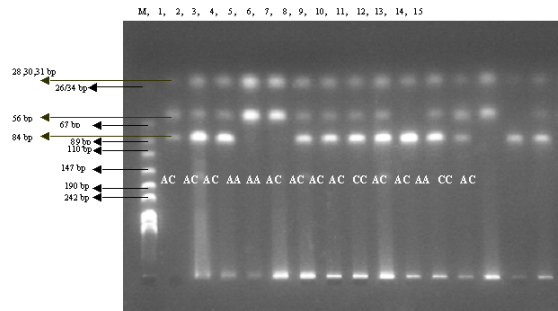
C677T polimorfizmi için her bir 15 µL PCR ürünü, 5 ünit Hinf I restriksiyon enzimi (Fermentas) ile kesilerek 198 bp'lik DNA fragmentinin 175 ve 23 bp'lik fragmentlere ayrılması sağlandı. Kesim işleminden sonra DNA fragmentleri %2'lik agaroz (Sigma) jel elektroforezi ile birbirinden ayrılarak CCD kamerada Labworks Software programı ile incelendi. C677T mutasyonu için; 677CC homozigot normal (wild type) (198 bp), 677CT heterozigot (198, 175 ve 23 bp) ve 677TT homozigot mutant (175 ve 23 bp) olan üç farklı genotip belirlendi (Şekil 1).



**Şekil 1.** Hinfl enzimi ile kesilen C677T PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüleri. 23 bp'lik fragment jelde görülüyor. (M:Marker, pUC18 DNA Msp I Digest, Sigma). CC; homozigot normal (3,5,7), CT; heterozigot (2,4,6), TT; homozigot (1) genotipler.

A1298C polimorfizmi için her bir 20 µL PCR ürünü, 1 ünit Mbo II restriksiyon enzimi (Fermentas) ile kesilerek 163 bp'lik DNA fragmentinin 56, 31, 30, 28 ve 18 bp'lik fragmentlere ayrılması sağlandı. Kesim işleminden sonra DNA fragmentleri %4'lik high resolution agaroz jel (Bio Basic Inc.) elektroforezi ile birbirinden ayrılarak CCD kameralarda Labworks Software programı ile incelendi. A1298C mutasyonu için; 1298AA homozigot normal (wild type) (56, 31, 30, 28 ve 18 bp), 1298AC heterozigot (84, 56, 31, 30, 28 ve 18 bp) ve 1298CC homozigot mutant (84, 31, 30 ve 18 bp) olan üç farklı genotip belirlendi (Şekil 2).

Nicel veriler ortalama ± Standart hata (SEM) olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi için  $p < 0,05$  alındı. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde ki-kare, t-testi ve ANOVA testi kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmada da post hoc testlerden TUKEY testi kullanıldı.



**Şekil 2.** Mbo II enzimi ile kesilen A1298C PCR ürünlerinin %4'lük agaroz jel görüntüleri. 18 bp'lik fragment jelde görülüyor. (M:Marker; pUC18 DNA Msp I Digest, Sigma). AA; homozigot normal (4,5,13), AC; heterozigot (1,2,3,6,7,8,9,11,12,15), CC; homozigot mutant (10,14).

## BULGULAR

Kontrol ve tüm hastalar ile hasta alt gruplarının, C677T ve A1298C genotip ile allel sayısı ve yüzdeleri Tablo 1'de verilmiştir. İstatistiksel olarak, kontrol ile tüm hasta ve hasta alt grupları arasında, C677T ve A1298C genotip ve allel sayısı-yüzde değerleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunamadı ( $p > 0.05$ ). Ayrıca iskemi ve hemoraji alt grupları arasında da her iki polimorfizmin genotip ve allel sıklığı bakımından anlamlılık görülmedi ( $p > 0.05$ ).

Kontrol ve tüm inmeli hasta grubu ile iskemi ve hemoraji hasta alt gruplarının, C677T genotiplerine göre plazma total homosistein düzeyleri Tablo 2'de görülmektedir. Kontrol, tüm hasta grubu ve hasta alt gruplarında, grup içinde, C677T genotipleri arasında homosistein düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p > 0.05$ ). Bununla birlikte, kontrol ve hemoraji gruplarında TT genotipine sahip bireylerde, homosistein düzeyi, CC ve CT genotiplerine göre yüksek olmasına rağmen TT genotipinde birey sayısı yetersiz olduğundan, istatistiksel değerlendirme yapılamadı. 677 CC ve CT genotipleri bakımından, kontrol ve tüm hasta grubu homosistein düzeyleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, tüm hasta grubunda homosistein düzeyi önemli derecede yüksek bulundu ( $p < 0.001$ ). Yine tüm hasta TT genotipinde, kontrole göre homosistein düzeyi önemli ölçüde yüksek olmasına karşılık ( $18,6 \pm 2,79$  µmol/L) kontrol birey sayısı yetersiz olduğu için gruplar arası TT genotip homosistein düzeyleri istatistiksel olarak karşılaştırılmadı. Kontrol ile iskemi ve hemoraji hasta alt grupları arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da, kontrole göre iskemi grubunda CC ( $p < 0.01$ ) ve CT ( $p < 0.05$ ) genotiplerindeki homosistein düzeyindeki artış anlamlı bulundu. (Tablo 2). Yine kontrol ve hemoroji gruplarının TT genotipinde yetersiz sayıda birey bulunması nedeniyle, gruplar arası TT genotipi homosistein düzeyleri arasında istatistiksel karşılaştırma yapılamadı.

Kontrol ve tüm inmeli hasta grubu ile iskemi ve hemoraji hasta alt gruplarının, A1298C genotiplerine göre plazma total homosistein düzeyleri Tablo 3'de görülmektedir. Kontrol, tüm hasta grubu ve hasta alt gruplarında, grup içinde, A1298C genotipleri arasında homosistein düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p > 0.05$ ). 1298 AA ve AC genotipleri bakımından, kontrol ve tüm hasta grubu homosistein düzeyleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ise, hasta grubunda homosistein düzeyleri önemli derecede yüksek bulundu ( $p < 0.001$ ). Yine kontrol, iskemi ve hemoraji grupları arasında yapılan karşılaştırmada da, kontrole göre iskemi AA ve AC genotipi homosistein düzeyindeki artışın anlamlı

olduğu belirlendi ( $p < 0.05$  ve  $p > 0.01$ ). Tüm hasta ve hasta alt gruplarında CC genotipinde, total plazma homosistein düzeyi, kontrol CC genotipine göre daha yüksek olmasına rağmen, kontrol grubu CC genotipli bireylerin sayısı yetersiz olduğundan ista-

tistiksel olarak karşılaştırma yapılamadı. İskemi ve hemoraji CC genotipi homosistein düzeyleri arasındaki farklılık da istatistiksel olarak anlamsız bulundu ( $p > 0.05$ ) (Tablo 3).

**Tablo 1.** Kontrol, tüm hastalar ve hasta alt grupları arasında C677T ve A1298C genotiplerinin dağılımı ve allel sıklıkları.

	n	C677T GENOTİPLERİ			ALLELLER		A1298C GENOTİPLERİ			ALLELLER	
		CC n (%)	CT n (%)	TT n (%)	C n (%)	T n (%)	AA n (%)	AC n (%)	CC n (%)	A n (%)	C n (%)
<b>KONTROL</b>	55	32 (58)	21 (38)	2 (4)	85 (77)	25 (23)	19 (35)	33 (60)	3 (5)	71 (65)	39 (35)
<b>TÜM HASTALAR</b>	203	107 (53)	79 (39)	17 (8)	293 (72)	113 (28)	78 (39)	102 (50)	23 (11)	258 (64)	148 (36)
İskemi	154	79 (51)	61 (40)	14 (9)	219 (71)	89 (29)	59 (38)	79 (51)	16 (21)	197 (64)	111 (36)
Hemoraji	49	28 (57)	18 (37)	3 (6)	74 (76)	24 (24)	19 (39)	23 (47)	7 (14)	61 (62)	37 (38)
<b>İSTATİSTİKSEL ANALİZ</b>	K-Th	$\chi^2=1,56$	$p>0,05$		$\chi^2=1,15$	$p>0,05$		$\chi^2=2,44$	$p>0,05$	$\chi^2=0,04$	$p>0,05$
	K-İ	$\chi^2=1,98$	$p>0,05$		$\chi^2=1,56$	$p>0,05$		$\chi^2=1,81$	$p>0,05$	$\chi^2=0,012$	$p>0,05$
	K-H	$\chi^2=0,35$	$p>0,05$		$\chi^2=0,09$	$p>0,05$		$\chi^2=3,05$	$p>0,05$	$\chi^2=0,12$	$p>0,05$
	İ-H	$\chi^2=0,71$	$p>0,05$		$\chi^2=0,72$	$p>0,05$		$\chi^2=0,64$	$p>0,05$	$\chi^2=0,10$	$p>0,05$

K: Kontrol, Th: Tüm hastalar, İ: İskemi, H: Hemoraji, ns:  $p > 0.05$

**Tablo 2.** Kontrol ve tüm hastalar ile hasta alt gruplarının C677T genotiplerine göre plazma total homosistein değerleri ( $\mu\text{mol/L}$ ).

	C677T genotiplerine göre homosistein değerleri ( $\mu\text{mol/L}$ )			<b>İSTATİSTİKSEL ANALİZ</b>
	CC	CT	TT	
<b>KONTROL (n=55)</b>	(n=32) 8,7 $\pm$ 0,43	(n=21) 9,2 $\pm$ 0,53	(n=2) <sup>(a)</sup> 12,2 $\pm$ 1,78	<b>t= 0,70 p&gt; 0,05</b>
<b>TÜM HASTALAR (n=203)</b>	(n=107) 12,0 $\pm$ 0,64	(n=79) 14,0 $\pm$ 1,01	(n=17) 18,6 $\pm$ 2,79	<b>F= 0,14 p&gt; 0,05</b>
<b>İSTATİSTİKSEL ANALİZ</b>	<b>t=4,29 p&lt; 0,001</b>	<b>t=4,23 p&lt; 0,001</b>	-	
İskemi (n=154)	(n=79) 12,7 $\pm$ 0,82	(n=61) 14,9 $\pm$ 1,26	(n=14) 18,8 $\pm$ 3,37	<b>F= 3,20 p&gt; 0,05</b>
Hemoraji (n=49)	(n=28) 10,3 $\pm$ 0,79	(n=18) 10,9 $\pm$ 0,99	(n= 3) <sup>(a)</sup> 17,9 $\pm$ 2,83	<b>t= 0,50 p&gt; 0,05</b>
<b>İSTATİSTİKSEL ANALİZ</b>	<b>K-İ-H F=5,48 p&lt; 0,01</b>	<b>K-İ-H F=4,74 p&lt; 0,05</b>	-	
	<b>Çoklu Karş. K İ H İ ** H</b>	<b>Çoklu Karş. K İ H İ * H</b>	-	

(a): Gruba ait örnek sayısı yeterli olmadığı için istatistiksel değerlendirmeye alınmadı.

K: Kontrol, İ: İskemi, H: Hemoraji, Çoklu Karş: Çoklu karşılaştırma

\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , ns:  $p > 0,05$

**Tablo 3.** Kontrol ve tüm hastalar ile hasta alt gruplarının A1298C genotiplerine göre plazma total homosistein değerleri ( $\mu\text{mol/L}$ ).

	A1298C genotiplerine göre homosistein değerleri ( $\mu\text{mol/L}$ )			İSTATİSTİKSEL ANALİZ
	AA	AC	CC	
<b>KONTROL</b> (n=55)	(n=19) 8,8 $\pm$ 0,63	(n=33) 9,1 $\pm$ 0,42	(n=3) <sup>(a)</sup> 8,5 $\pm$ 1,80	<b>t= 0,42 p&gt; 0,05</b>
<b>TÜM HASTALAR</b> (n=203)	(n=78) 14,1 $\pm$ 1,10	(n=102) 13,2 $\pm$ 0,76	(n=23) 11,6 $\pm$ 0,86	<b>F= 0,89 p&gt; 0,05</b>
<b>İSTATİSTİKSEL ANALİZ</b>	t=4,17 p< 0,001	t=4,62 p< 0,001	-	
<b>İskemi</b> (n=154)	(n=59) 14,7 $\pm$ 1,41	(n=79) 14,1 $\pm$ 0,93	(n=16) 12,2 $\pm$ 0,94	<b>F= 0,46 p&gt; 0,05</b>
<b>Hemoraji</b> (n=49)	(n=19) 12,4 $\pm$ 1,09	(n=23) 10,2 $\pm$ 0,85	(n= 7) 10,1 $\pm$ 1,81	<b>F= 1,55 p&gt; 0,05</b>
<b>İSTATİSTİKSEL ANALİZ</b>	K-İ-H F=3,19 p< 0,05	K-İ-H F=7,5 p< 0,01	İ-H t=1,14 p>0,05	
	Çoklu Karş. K İ H İ *	Çoklu Karş. K İ H İ ** *	-	
	H	H	*	

(a): Gruba ait örnek sayısı yeterli olmadığı için istatistiksel değerlendirmeye alınmadı.

K: Kontrol, İ: İskemi, H: Hemoraji, Çoklu Karş: Çoklu karşılaştırma

\*: p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*: p<0,001, ns: p>0,05

## TARTIŞMA

İskemik inmeli hastalar ile sağlıklı bireyler arasında yapılan çalışmalarda bizim sonuçlarımıza paralel olarak, C677T genotip dağılımları bakımından önemli farklılık bulunamazken (26-28), Morita ve ark. ise 677 T allel sıklığının iskemik hastalarda önemli derecede yüksek olduğunu açıklamışlardır (29). Akut inmeli hastalarda A1298C polimorfizmini araştıran çalışmaya rastlanılmamış olup, çalışmamızda, hasta ve sağlıklı bireyler arasında A1298C genotip dağılımı ve allel sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulamadık.

İskemik hastalar ile yapılan bazı çalışmalarda hasta TT genotipinde, CT ve CC genotiplerine göre total homosistein düzeyinin daha yüksek olduğu rapor edilmiş olup, kontrol grubunda ise C677T genotipleri arasında homosistein değeri bakımından farklılık bulunmadığı bildirilmiştir (19,30-32). Bu sonuçlar bizim sonuçlarımızla uyumluluk göstermektedir. Özellikle en yüksek homosistein düzeyi-

nin en fazla TT genotipli hasta içeren iskemik hasta alt grubunda olması, çalışmanın amacı bakımından oldukça önem taşımaktadır. Artan homosistein düzeyinin, koagülasyon olayında görev yapan faktör V, X ve XII'nin aktivasyonunu hızlandırarak, arterial trombozise katkıda bulunduğu, böylece büyük ve küçük damar aterosklerozisine yatkınlık ile ortaya çıkan serebrovasküler hastalıklara neden olduğunu açıklayan çalışmalar vardır (33-35). Bu bulgulara zıt olarak, C677T genotip dağılımının plazma homosistein düzeyini etkilemediğini rapor eden bir çalışma da vardır (27).

A1298C polimorfizminin homosistein düzeyine etkisine bakıldığında da, Friedman ve arkadaşları da, 1298 CC homozigot genotipe sahip bireylerde plazma total homosistein düzeyinin artmadığını rapor etmişlerdir (9). Yine başka bir çalışmada da, A1298C mutasyonunun tek başına homosistein düzeyine etkisinin görülmediği bildirilmiştir (18). Bizim sonuçlarımızda bu literatür bulgularıyla uyumluluk göstermekte olup, bu çalışmayla 1298 CC

homozigot genotipinin homosistein artışında 677 TT genotipi kadar etkili olmadığını belirledik.

Yapılan bu çalışmada sonuç olarak; akut inmeli hastalar ve hasta alt grupları ile kontrol grubu arasında C677T ve A1298C genotip dağılımları ile 677T-C ve 1298 A-C allel sıklıkları bakımından önemli bir farklılık olmadığı belirlendi. Tüm akut inmeli hasta grubunda, kontrol genotiplerine göre, en fazla homosistein artışının 677 TT ile 1298 AA genotiplerinde olduğu belirlendi. İnmeli hastaların alt tipleri arasında, plazma total homosistein düzeyinin, en fazla iskemi alt grubu 677 TT ve 1298 AA genotipli hastalarda olduğu görüldü. Böylece inmeli hastalarda homosistein artışı üzerine, C677T polimorfizminin homozigot mutant genotipin önemli bir etkisi olmasına rağmen A1298C polimorfizminin homozigot mutant genotipinin doğrudan bir etkisi olmadığı ve 1298 AA genotipindeki homosistein artışına başka risk faktörlerinin etkisinin olabileceği belirlendi.

Bütün bunlardan dolayı, inme geçirmiş olsun ya da olmasın, 677 TT homozigot mutant genotipine sahip bireylerin serebrovasküler, kardiyovasküler olaylara ve dolayısıyla ime oluşumuna yatkınlığından dolayı, yaşamları süresince homosistein düzeylerini etkileyecek olan risk faktörlerini kontrol altında tutmaları gerektiğini söyleyebiliriz.

#### KAYNAKLAR

- Rosenblatt DS. Methylenetetrahydrofolate reductase. *Clin Invest Med*, 2001; 24:56-59.
- Bagley PJ, Jacob S. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Med Sci*, 1998; 95:13217-13220.
- Bailey LB, Duhane RL, Maneval DR, et al. Vitamin B-12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. *J Nutr*, 2002; 132:24665-24709.
- Kim Y. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: A paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutr Rev*, 2000; 58:205-217.
- Weisberg I, Tran P, Christensen B, et al. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*, 1998; 64: 169-172.
- Daly SF, Molloy AM, Mills JL, et al. The influence of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genotypes on enzyme activity in placental tissue. *Brit J Obstet Gynaec*, 1999;106:1214-1218.
- Homberger G, Linnebank M, Winter C, et al. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet*, 2000; 8:725-729.
- Stern LL, Bagley PJ, Rosenberg IH, et al. Conversion of 5-formyltetrahydrofolic acid is unimpaired in folate-adequate persons homozygous for the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *J Nutr*, 2000; 130: 2238-2242.
- Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y, et al. Common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: Association with plasma total homocysteine and folate concentrations. *J Nutr*, 1999;129:656-1661.
- Goyette P, Rozen R. The thermolabile variant 677CT can further reduce activity when expressed in cis with severe mutations for human methylenetetrahydrofolate reductase. *Hum Mutat*, 2000; 16:132-138.
- Lee H, Choi J, Ha K, et al. Influence of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism on plasma homocysteine concentration in patients with end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis*, 1999;34: 259-263.
- Schmitz C, Lindpainter K, Verhoef P, et al. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and myocardial infarction. *Circulation*, 1996; 94:1812-1814.
- Schneider JA, Rees DC, Liu YT, et al. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet*, 1998;62: 1258-1260.
- Sell SM, Lagemwa PR. Development of a highly accurate, rapid PCR-RFLP genotyping assay for the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Genet Test*, 1998;3:287-289.
- Verhoef P, Hennekens CH, Malinow MR, et al. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of ischemic stroke. *Stroke*, 1994;25:1924-1930.
- Bova I, Chapman J, Sylantiev C, et al. The A677C methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and carotid atherosclerosis. *Stroke*, 1999;30: 2180-2182.
- Kang S, Wong PWK, Susmano A, et al. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: An inherited risk factor for coronary artery disease. *J Hum Genet*, 1991;48: 536-545.
- Lievers KJA, Boers GHJ, Verhoef V, et al. A second common variant in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine and

- cardiovascular disease risk. *Journal of Molecular Medicine* Received, 1 February 2001, Published online 5 July, 2001
19. Shpichinetsky V, Raz I, Friedlander Y, et al. The association between two common mutations C677T and A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk for diabetic nephropathy in type II diabetic patients. *J Nutr*, 2000;130: 2493-2497.
  20. Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassman G. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol*, 2000;13(1):20-33.
  21. Peng F, Labelle LA, Rainey B, et al. Single nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are common in US Caucasian and Hispanic American populations. *Int J Mol Med*, 2001;8: 509-511.
  22. Nelen WJDM, Blom HJ, Thomas CMG, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. *Nutrition* Org, 1998;128:1336.
  23. Frosst P, Blom RM, Goyette P, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics*, 1995;10: 111-113.
  24. Skibola CF, Smith MT, Kane E, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Med Sci*, 1996;96:12810-12815.
  25. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EMB, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: An additional risk factor for neural-tube defects. *Am J Hum Genet*, 1998;62:1044-1051.
  26. Harmon DL, Doyle RM, Meleady R, et al. Genetic analysis of the thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for ischemic stroke. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 19:208-211, 1999.
  27. Madonna P, Stefano V, Coppola A, et al. Hyperhomocysteinemia and other inherited prothrombotic conditions in young adults with a history of ischemic stroke. *Stroke*, 2002;33:51-56.
  28. Wu Y, Tomon M, Sumino K. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and ischemic stroke: sex difference in Japanese. *Kobe J Med Sci*, 2001;47:255-262.
  29. Morita H, Kurihara H, Tsubaki S, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and ischemic stroke in Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998;18:1465-1469.
  30. Akar N, Akar E, Özel D, et al. Common mutations at the homocysteine metabolism pathway and pediatric stroke. *Thrombosis Research*, 2001;102:115-120.
  31. Chambers J, Skooner J. Homosisteine. A novel risk factor for coronary heart disease in UK Indian Asians. *Heart*, 2001;86:121-122.
  32. Visy JM, Le Coz P, Chadeaux B, et al. Homocystinuria due to 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency revealed by stroke in adult siblings. *Neurology*, 1991; 1:1313-1315.
  33. McDowell IFW, Long D. Homosisteine and endothelial dysfunction: a link with cardiovascular disease. *J Nutr*, 2000;130:3695-3725.
  34. Diaz-Arrastia R. Homocysteine and Neurologic Disease. *Arch Neurol*, 2000; 57:1422-1428.
  35. Kelly PJ, Barron M, Furie KL. Hyperhomocysteinemia, MTHFR 677C→T polymorphism and stroke. *Stroke*, 2001;33:1452-1453.

