



**T.C.
UFUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**İKİNCİ VE ÜÇÜNCÜ TRİMESTER GEBELİK
KAYIPLARINDA FIX PADUA MUTASYONUNUN
ETKİSİ**

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. AŞKIN ŞEN

TEZ DANIŞMANI: YRD. DOÇ. DR. EMİNE BERRİN YÜKSEL

2012-ANKARA

İÇİNDEKİLER II

ÖNSÖZIII

KISALTMALARIV

TABLolar..... V

ŞEKİLLER..... VI

RESİMLER..... VII

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. KOAGÜLASYON	3
2.1.1. KOAGÜLASYON KASKADI	3
2.1.1.1. EKSTRİNSİK YOL	5
2.1.1.2. İNTRİNSİK YOL	5
2.1.1.3. ORTAK YOL	6
2.1.1.4. FİBRİNOLİZ.....	7
2.1.2. KOAGÜLASYON TESTLERİ.....	8
2.1.3. ANTİKOAGÜLAN ETKİLİ MOLEKÜLLER.....	9
2.1.4. ANTİKOAGÜLAN İLAÇLAR	10
2.1.5. TROMBOFİLİ.....	11
2.1.5.1 EDİNSEL TROMBOFİLİ.....	11
2.1.5.2 KALITSAL TROMBOFİLİ.....	11
2.2. GEBELİK	12
2.2.1. GEBELİK FİZYOLOJİSİ	12
2.2.2. TANIMLAR.....	12
2.2.3. PREEKLAMPSİ – EKLAMPSİ.....	14
2.2.4. ANTİFOSFOLİPİD SENDROMU.....	15
2.2.5. GEBELİK VE TROMBOZ	17
2.2.5.1. GEBELİĞİN TROMBOZ İLE İLİŞKİSİ	17
2.2.5.2. FV LEİDEN MUTASYONU.....	17
2.2.5.3. PROTROMBİN G20210A MUTASYONU	17
2.2.5.4. MTHFR C677T VE A1298C MUTASYONLARI	17
2.2.5.5. HİPERHOMOSİSTEİNEMİ.....	18
2.2.5.6. PROTEİN C VE PROTEİN S EKSİKLİĞİ	21
2.2.5.7. GEBELİK KAYIPLARINDA ANTİTROMBOTİK TEDAVİ	21
2.3. FAKTÖR IX GENİ	22
2.3.1. FAKTÖR IX GENİ ALLELİK VARYANLARI.....	22
2.3.2. FAKTÖR IX PADUA MUTASYONU.....	22
3.MATERYAL VE METOD.....	24
4.BULGULAR.....	31
5.TARTIŞMA	33
6.SONUÇLAR	35
7.ÖZET	36
8.ABSTRACT.....	37
9.KAYNAKLAR.....	38

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince, bilgi ve deneyimlerini sunmaktan keyif alan, her zaman paylaşımcı ve yol gösterici olan saygıdeğer tez hocam Sn. Yrd.Doç.Dr. Emine Berrin Yüksel'e,

Tez çalışmamı gerçekleştirebilmem için mevcut imkanlarını istifademize sunan ve T.C. Sağlık Bakanlığı Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi , Genetik Merkezi'nde çalışmama izin veren Sn. Başhekim Op.Dr.Leyla Mollamahmutoğlu'na,

Mesleki bilgi ve tecrübelerini paylaşan, kendi uzmanlık alanlarındaki konularda yol gösterici olan Sn. Doç.Dr. Nuri DANIŞMAN'a ve Sn. Op.Dr. Ayşe Seval ÖZGÜ ERDİNÇ'e,

Her şeyden önce bir ağabey olarak kabul ettiğim, tezim ile ilgili her aşamada maddi-manevi desteğini, ilgisini eksik etmeyen, bilgi ve becerisiyle her zaman çalışmayı kolaylaştırıp zevkli hale getiren Sn. Doç.Dr. Ahmet Yeşilyurt'a,

Gerek laboratuvar uygulamaları esnasında ve gerek akademik konuları değerlendirirken kıymetli katkılarda bulunan Sn. Uz.Dr. Esra Şükran Çakar'a ve Sn.Uz.Dr.Zuhal Candemir'e,

Çalışma esnasında, tecrübelerini ve fikirlerini sunarak ışık tutan, kolaylaştırıcı öneriler sunan ve farklı bir bakış açısı katan Sn. Prof.Dr.Muhterem Bahçe'ye,

Laboratuvar çalışmalarımı gerçekleştirirken bana her zaman yardımcı olan, katkıda bulunan, güler yüzleri ve sempatik yaklaşımlarıyla, bıkmadan, yorulmadan yardımcı olan değerli mesai arkadaşlarım Sn. Dr.Bio. İpek S. Keskin'e ve Sn. Bio. Songül Harşit'a,

Sevgi, ilgi ve desteklerini hep hissettiğim, sabırlı ve fedakar anneme, babama ve sevgili kızkardeşime,

En içten ve samimi teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Aşkın ŞEN

KISALTMALAR

vWF	: Von Willebrand Faktör
TF	: Doku Faktörü
TFPI	: Doku Faktörü Yolağı İnhibitörü
TAFI	: Thrombin ile aktive olabilen fibrinoliz inhibitorü
t-PA	: Doku tipi plazminojen aktivatörü
u-PA	: Ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü
PAI	: Plazminojen aktivatör inhibitörü
FYÜ	: Fibrin Yıkım Ürünleri
PT	: Protrombin Zamanı
aPTT	: Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı
AT III	: Antitrombin III
LMWH	: Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin
UFH	: Unfraksiyone heparin
hCG	: Human Koryonik Gonadotropin
COMT	: Katekol-o-metil transferaz
aPC	: Aktive Protein C
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu

TABLÖLAR

Tablo 1 : Koagölasyon kaskadında yer alan faktörler ve isimleri

Tablo 2: Gebelik ve fetal gelişim evreleri ile ilgili tanımlar

Tablo 3: Hiperhomosisteinemi nedenleri

Tablo 4: Hiperhomosisteineminin patofizyolojik bulguları

ŞEKİLLER

Şekil 1 : Koagölasyon kaskadı

Şekil 2 : Folat siklusu ve homosistein metabolizmasının şematik anlatımı

Şekil 3 : Kesim sonrası bantların yorumlanması

RESİMLER

Resim 1: 3 hastaya ait PCR ürünü

Resim 2: Resim 1'de gösterilen hasta örneklerinin, TaqI enzimi ile kesildikten sonra elde edilen görüntüleri

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Gebelik kayıplarının etyolojisinde pek çok etken suçlanmaktadır. Biyokimyasal, hormonal, immünolojik ve genetik nedenler, kadın genital sisteminin anatomik özellikleri ve fizyolojik işleyişi, gebelikte geçirilen ateşli hastalıklar, kronik hastalıklar etyolojinin belirlenmesi için göz önünde tutulması gereken etkenlerdir. Bununla beraber, pek çok gebelik kaybının nedeni bilinmemektedir.

Plasental yapının oluşması sürecinde, uteroplasental damar ağı oluşumu ve gelişimi fetusun büyümesi ve gelişmesi için çok kritik bir önem taşımaktadır. Embriyonun beslenmesi, ilk haftalarda difüzyon yoluyla olmaktadır. Yaklaşık olarak 10. haftadan itibaren damar ağı yoluyla beslenme başlamaktadır. Bu nedenle, gebelik kayıplarının genetik nedenleri ele alınırken, kromozomal nedenler, ilk trimester kayıplarında daha sık görülen bir neden olarak karşımıza çıkmaktadır. İkinci ve üçüncü trimester kayıplarındaki sıklığı giderek azalmaktadır. Buna karşın, tromboza sebep olabilecek olan her türlü kazanılmış ve/veya herediter tromboz etkenleri ikinci ve üçüncü trimesterde daha fazla önem kazanmaktadır.

Kazanılmış tromboz etkenleri içinde, antifosfolipid sendromu önemli bir nedendir. Kalıtsal trombofili nedenleri içinde en sık üzerinde durulan nedenler; FV Leiden G1691A mutasyonu, Protrombin G20210A mutasyonu, Antitrombin III eksikliği, Protein C eksikliği, Protein S eksikliği olarak ele alınabilir.

Bu etkenler irdelendiğinde, kanın damar içinde düzenli akışının, fetusun büyümesi ve gelişmesi açısından çok önemli olduğu anlaşılmaktadır. Fizyolojik açıdan, hemostatik mekanizmaların ve koagülasyon mekanizmasının detaylı ve dikkatli bir şekilde irdelenmesi gerekmektedir. Zira, hemostazda rolü olan etkenler açısından, herhangi bir basamakta oluşan patolojik bir değişiklik, kanamaya veya tromboza neden olabilmektedir. Tromboza yatkınlık olduğunda, gebelik ile ilgili olarak; gebelik kaybı, plasental abrupsiyon, preeklampsi, derin ven trombozu, intrauterin gelişme geriliği gibi çeşitli klinik tablolar ortaya çıkmaktadır.

Koagülasyonda pek çok faktör rol oynamaktadır. Bu faktörlerden birisi, Faktör IX (FIX)'dur. FIX geni, X kromozomu üzerinde yer almaktadır. FIX'un kan düzeylerinin eksikliği veya fazlalığı çeşitli klinik sorunlara yol açabilmektedir. Üç yıl önce, FIX geninde yeni bir fonksiyon kazanma mutasyonu tanımlanmıştır [1]. Bu mutasyon, proteinin 338. pozisyonunda Arginin aminoasidi yerine Lözin aminoasidinin geçmesine neden olmaktadır.

İlginç olarak, bu mutasyonu taşıyan bireydeki plazma FIX seviyesi değişmemesine rağmen aktivitesinin 5-10 kat arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle, tromboza eğilim oluşturması beklenen bir durumdur.

Bu çalışmada, ikinci ve üçüncü trimester gebelik kayıpları olan kadınların etyolojisinde, yeni tanımlanmış olan FIX Padua mutasyonunun muhtemel etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, T.C. Sağlık Bakanlığı Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genetik Merkezi'nde gerçekleştirilmek üzere retrospektif bir çalışma planlanmıştır. Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Eğitim Planlama Koordinasyon Kurulu'nun ve Ufuk Üniversitesi Etik Kurul Komitesi'nin onayı alınmıştır. Çalışma için, gebelik kaybı olan ve gebelik kaybı olmayan kadınlardan oluşan iki grup oluşturulmuştur. Seçilen hastalar için hastanenin Genetik Merkezi'nde ki hastane kayıtları ve tromboza yatkınlık oluşturduğu bilinen genlere yönelik çalışılmış olan test sonuçları değerlendirilmiştir. Hastaların saklanan DNA örnekleri kullanılarak, FIX Padua mutasyonunun varlığı araştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER:

2.1. KOAGÜLASYON

Koagülasyon, homeostazın korunması için ardışık reaksiyonların gerçekleştiği fizyolojik bir yanıttır. Koagülasyonun etkin bir biçimde gerçekleşmemesi klinik sorunlara yol açmaktadır. Yetersiz koagülasyon olması durumunda kanamaya eğilim (kanama diatezi) söz konusu iken; uzun süren, sınırlandırılmamış ve abartılı koagülasyon durumunda tromboza eğilimden (trombofili) bahsedilir. Kanın damar içinde akışı sırasında, koagülasyonu önleyici mekanizmalar, koagülasyonu tetikleyen mekanizmalara baskın gelir. Fizyolojik sınırlarda, damar içinde kan akımı düzenlidir.

Kanın sıvı fazda akışında etkili olan mekanizmalar [2]

- a. Kanın normal laminar akışının, trombositlerin ince plazma aracılığıyla endotele direkt temasını önlemesi
- b. Kan akışının, protrombotik veya aktive haldeki faktörleri dilue etmesi
- c. Prokoagülan faktörlerin fazla olması halinde endotelial antikoagülan faktörlerin ve antitrombosit fonksiyonların ifadenmesi
- d. Aktive trombositlerin üretimi için yeterli stimülasyon ihtiyacı, aktivasyonun tam bir şekilde gerçekleşmesi için çoklu uyaran gerektirmesi
- e. Başka hücrelere veya inaktive edici komplekslere bağlı halde olan bazı faktörlerle birlikte, inaktif zimojen halinde dolaşımda bulunan koagülasyon faktörlerinin aktivasyon için reseptör aracılı mediatör proteolizine gereksinim duyması
- f. En üst düzeye yakın şiddette uyaran varlığında aktive olan bazı yanıtıcı faktörlerin yıkılımını sağlayan birçok proteazın dolaşımda bulunması

2.1.1. KOAGÜLASYON KASKADI

Koagülasyonu açıklamak için çeşitli modeller geliştirilmiştir. İlk model, Morawitz tarafından 1905'te tanımlanmıştır [3]. İkinci model, kaskad/şelale modeli olup, 1964'te açıklanmıştır. Bu model, koagülasyonun anlaşılmasında önemli katkı sağlamıştır ancak koagülasyon sürecini in vivo olarak net tanımlayamamaktadır [4]. Günümüzde, hücreyi temel alan model in vivo süreci daha iyi tanımlamaktadır.

Koagülasyon kaskadı, ardışık enzimatik dönüşüm reaksiyonlarının tamamını belirtmek için kullanılan bir ifadedir. Kaskadın yorumlanmasını kolaylaştırdığı için, intrinsik ve ekstrinsik yollar olmak üzere iki ayrı yol ve bu yolların birleştiği bir ortak yol üzerinden ele alınır.

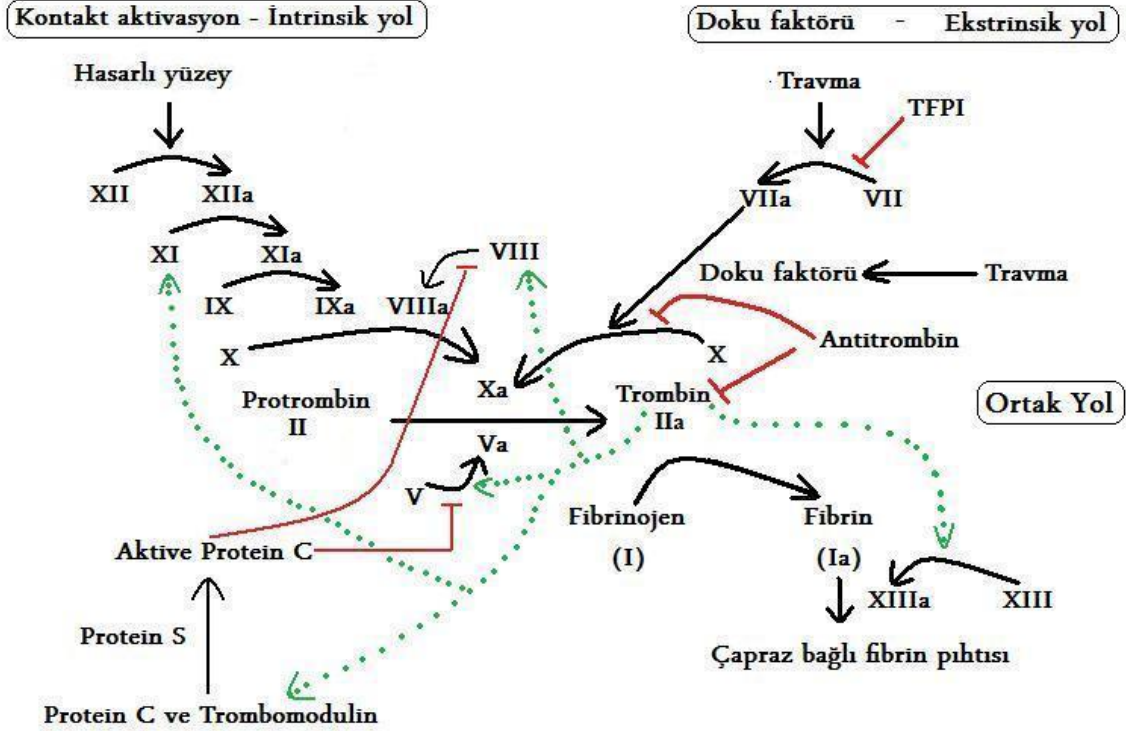
Hücreyi temel alan modelde, doku faktörü, koagülasyon faktörleri (Bkz. Tablo 1) ve hücre yüzeyi önemli rol oynamaktadır. Bu model, kaskad modeline ilave olarak, karmaşık

yolları, regülatör mekanizmaları, kilit rol üstlenen faktörleri ve reaksiyonların oluşacağı hücresele yüzeyler hakkında da ışık tutan bilgiler sunar [4].

Damar duvarında bir hasar meydana geldiğinde ilk yanıt, vazokonstriksiyondur. Endotelin bütünlüğünün bozulması sonucunda subendotelial yapılar açığa çıkar. Subendotel, sahip olduğu bağ dokusu yapısı nedeniyle çok güçlü bir trombojenik (pıhtılaşmaya yatkınlık oluşturan) özelliğe sahiptir. Trombositler, subendotelial kollajene yapışırlar ve Von Willebrand Faktör (vWF), bu bağlanmada önemli bir yere sahiptir. Trombositlerden salınan bazı maddeler (ADP, Ca²⁺, serotonin gibi), trombosit agregasyonunu tetikler. Trombositler çöker, fibrinojen köprüleri oluşur. Böylece geçici ve zayıf bir tıkaç oluşur. Bu tıkaçta, Primer Hemostaz denir [5]. Bu aşamada, doku faktörü aracılığı ile intrinsik ve ekstrinsik yol reaksiyonları başlatılmış olur (Bkz. Şekil 1). Ardışık seri reaksiyonlar, hücresele elemanların ve koagülasyon faktörlerinin katkısıyla koagülasyon devam ettirilir ve sağlam bir fibrin tıkaçını oluşmasıyla bu reaksiyonlar zirve noktasına ulaşmış olur. Bu evrelerden sonra fibrinoliz gerçekleşir.

Koagülasyon Faktörleri	
Faktörler	İsim
I	Fibrinojen
II	Protrombin
III	Doku Faktörü
IV	Kalsiyum (Ca ²⁺)
V	Proakselerin, labil faktör
VII	Prokonvertin
VIII	Antihemofilik faktör
IX	Plazma tromboplastin komponent, Christmas Faktör
X	Stuart – Prower Faktör
XI	Plazma Tromboplastin Antesedent (PTA)
XII	Hageman Faktör
XIII	Fibrin Stabilizre Edici Faktör, Laki-Lorand Faktör
vWF	Von Willebrand Faktör

Tablo 1: Koagülasyon kaskadında yer alan faktörler ve isimleri



Şekil 1: Koagülasyon kaskadı. Noktalı oklar aktive edici özelliği, ucu künt sonlanan oklar inhibe edici özelliği gösterir. (Adams, R. L. and R. J. Bird (2009). "Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants." Nephrology 14(5): 462-470. 'dan esinlenerek çizilmiştir.)

2.1.1.1. EKSTRİNSİK YOL

Damara duvarında bir hasar olduğunda veya endotel yüzeyi zedelendiğinde, subendotel kan ile temasa geçer, doku faktörü (Tissue Factor, TF) açığa çıkar ve FVII ile birleşip aktive olarak TF+FVIIa kompleksini oluşturur. Bu kompleks, ortak yola girer.

2.1.1.2. İNTRİNSİK YOL

Damar duvarında oluşan hasar ile FXII aktifleşir. Sonra sırasıyla bir dizi enzimatik reaksiyon oluşur ve kaskad şeklinde devam eder. Aktiflenmiş olan bir molekül, başka bir molekülü 'sınırlı proteoliz' ile aktif hale dönüştürür [6].

FXIIa, FXI'i aktive eder. FXI, aktive FXI (FXIa) haline gelir. FXIa, FIX'u aktive eder. FIXa da FVIII 'ün kofaktör olarak katıldığı ve iyonize kalsiyum ile fosfolipid membranın bulunduğu ortamda FX'u, FXa'ya çevirir. Bu basamaktan sonra ortak yola girerler.

2.1.1.3. ORTAK YOL

FX, FV'in kofaktör olarak katıldığı ve iyonize kalsiyum ile fosfolipid membranın bulunduğu ortamda, FII'yi (Protrombin), FIIa'ya (Trombin) çevirir. Trombin, fibrinojeni fibrine çevirir. Fibrin, fizyolojik koşullarda kanda bulunmayan bir moleküldür. FXIII, fibrin monomerleri arasında çapraz bağlar oluşturarak, bu yapının çözünmeyen ve sağlam bir pıhtı haline gelmesini sağlar.

İn vivo koagülasyonda günümüzde kabul edilen hücreyi temel alan modele göre [2];

- Doku faktörünün merkezi başlatıcı rolü,
- Stabil bir pıhtının oluşması esnasında trombin amplifikasyonun kritik önemi [7],
- Koagülasyon faktörleri ve hücrel elemanların birbirine olan bağımlılığı, hücrel elemanlar (aktive trombositler) tarafından moleküllerin bağlanabileceği uygun bir negatif yüklü yüzey oluşturulmasının önemi vurgulanmaktadır.

Bu model, klasik model üzerine inşa edilmiştir. Doku faktörünün Faktör VII ile birlikte oluşturduğu kompleks (TF+FVIIa kompleksi), FIX ve FX'u aktive eder [8]. Sonuçta, intrinsik ve ekstrinsik yol birbirine bağlanmış olur. Ekstrinsik yol, başlangıç fazında tetikleyici olurken, intrinsik yol, çoğalma fazında önem kazanmaktadır [9].

Hücreyi temel alan modelde koagülasyon, başlangıç fazı, çoğalma fazı ve yayılma fazı olmak üzere üç evrede ele alınır.

Başlangıç Fazı:

Endotel hasarı veya aktivasyonu, doku faktörünün kan ile karşılaşmasına neden olur. Doku faktörü, bir transmembran glikoproteinidir [3]. Doku faktörü, yapısal olarak pek çok ekstravasküler yapıda bulunmaktadır. Beyin, kalp, testis, böbrek, plasenta gibi önemli olan organlarda yüksek düzeylerde bulunmaktadır [10].

Bu fazda, TF, FVII ile birleşerek, Ekstrinsik Faktör Tenaz (Tenase, Xase) Kompleksi olarak adlandırılan katalitik bir kompleks oluşturur. Bu kompleks, FIX ve FX'u aktive eder. Aktive FX, düşük konsantrasyonda trombin (FIIa) oluşturur [11].

Çoğalma Fazı:

FIXa, kofaktörü FVIIIa ile birlikte, İntrinsik Faktör Tenaz Kompleksi'ni (FIXa+FVIIIa) oluşturur [8]. İntrinsik tenaz kompleksi oluşumu, FIXa üretimi ve trombin üretim hızı artışı sonucunda, çoğalma fazının derecesini belirleyici niteliktedir. FIXa üretimi, Ekstrinsik Tenaz Kompleksi üzerinden üretilen FIXa miktarının yaklaşık 50-100 katı düzeyindedir [8, 11].

FXa+FVa kompleksi, Protrombinaz Kompleksi olarak adlandırılır. Bu kompleksin ve İntrinsik Faktör Tenaz Kompleksinin etkinliği, Ca^{+2} varlığında, fosfolipid membranda beraber bulunmaları ile kat kat artmaktadır [12]. Bu aktive faktörler, geriye dönük pozitif etki yaparlar ve enzimatik reaksiyon dizisi yeterli pıhtının oluşumu için hızlı trombin üretimi ile sonuçlanır. Trombin, trombositler üzerindeki etkisini, trombosit reseptör GpIb üzerinden gösterir ve bu etki hem trombosit agregasyonunu artırır hem de negatif yüklü fosfolipid membran oluşturur.

Trombin, FXI'i aktiveleştirir ve FXIa oluşur [13]. Yine, FVIIIa'yı, FVIIIa+vWF kompleksinden serbest kalmasını sağlayarak, FVIIIa düzeyini artırır. Böylece, trombosit yüzeyine yerleşen FVIIIa, intrinsik yol enzimlerinin daha ileri aktivasyonuna neden olmaktadır.

Trombositler, ilk oluşan plakta bulunurlar ve vasküler hasarın bulunduğu yerdeki lokal kollajen tarafından da uyarılırlar ve yüksek miktarlarda trombin üretimi sağlayabilecek bir lokalizasyonları vardır. Bütün bu etkiler, üretilen trombinin düzeyini artırmaya yöneliktir.

Yayıma Fazı:

Hasarlı bölgeye gelen trombositlerin sayısı ve işlevselliği, reaksiyonların devamı açısından önemlidir. Bu fazda trombin çok yoğun bir şekilde oluşur. Oluşan trombin, fibrinojeni fibrine çevirir. Fibrin monomerleri biraraya gelir, yoğunlaşırlar. Trombin tarafından aktive edilen FXIIIa, oluşan bu fibrin monomerleri arasında çapraz bağlar meydana gelmesini sağlar. Fibrin, son haliyle çok güçlü bir yapıya sahiptir ve pıhtı kararlı ve sağlam bir özellik kazanır.

Trombin, trombinle aktive olan fibrinoliz inhibitörünü, Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), aktive eder. TAFI, plazminin fibrini eritici etkisini önler [14]. Fibrin yapısı korunmuş olur.

2.1.1.4. FİBRİNOLİZ

Doku tipi plazminojen aktivatörü (Tissue-Type Plasminogen Activator, t-PA), endotel hücrelerinde üretilir. Trombin varlığında ve venöz damarların tıkanması halinde salgılanır.

Ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (Urokinase-Type Plasminogen Activator, u-PA), proürokinaz olarak salınır. Plazmin ve kontakt faktörleri tarafından (kininojen, prekallikrein, FXII) tarafından aktive edilir.

Plazminojen, t-PA ve u-PA aracılığı ile enzimatik yıkıma uğrar ve plazmine dönüşür.

Plazminojen aktivatör inhibitörü (Plazminogen Activator Inhibitor, PAI), kanda bol miktarda bulunmaktadır [15]. t-PA ve u-PA ile kompleksler oluşturarak inaktifleştirir. Bu sayede, gereğinden fazla plazmin üretimi engellenir.

Oluşan pıhtının yıkımı, hemostazın korunması için önemli ve gerekli bir basamaktır. Plazmin, fibrini özgün lizin ve arginin bakiyelerinden yıkar. Fibrin yıkım ürünleri (FYÜ) oluşur.

Fibrinolizin belli bir hızda ve belli bir dengede olması gerekmektedir. Eğer çok yavaş olursa, tromboza eğilim artar, çok hızlı olursa kanamaya eğilim artar.

FYÜ artışı, şu sonuçlara yol açabilmektedir [16]

- Antitrombosit etkileri ile trombosit fonksiyonlarını bozar.
- Güçlü antitrombin etkileri ile pıhtılaşmayı engeller.
- Fibrin monomerlerinin polimerizasyonu ve sağlam bir pıhtı oluşumunu engeller.
- Retiküloendotelial sistemin temizleme işlevini bozar.

Bahsedilen bu nedenlerle, FYÜ, kanamalara yol açabilir.

2.1.2. KOAGÜLASYON TESTLERİ

Koagülasyon testleri, hemostazın korunmasına yönelik olarak gelişen karmaşık ve içiçe reaksiyonların etkinliğini değerlendirmek için kullanılan ölçüm yöntemleridir.

Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı (APTT): İntrinsik ve ortak yolu değerlendirmek için kullanılır. Fizyolojik şartlarda süresi, 29-39 saniyedir (Laboratuarlar arası değişkenlik gösterebilir).

Sürenin kısalması tromboembolizme yatkınlık olarak değerlendirilebilirken[17], uzaması durumunda antifosfolipid antikor varlığı, antikoagülan (heparin) kullanımı, Dissemine İntravasküler Koagülasyon (DİK), Hipofibrinojenemi, Hemofili A, Hemofili B, FXII eksikliği, FXI eksikliği, karaciğer ile ilgili bir patolojik durum, Von Willebrand Hastalığı, K vitamini eksikliği akla gelmelidir.

Protrombin Zamanı (PT): Ekstrinsik ve ortak yolu değerlendirmek için kullanılır. Fizyolojik şartlarda süresi, 10-14 saniyedir (Laboratuarlar arası değişkenlik gösterebilir).

Günümüzde INR (International Normalized Ratio) ile değerlendirilir. Fizyolojik şartlarda aralığı: 0.8 – 1.3 .

INR değerinin azalması, koagülasyon riskinin artması anlamını taşır. INR değerinin artması, kanama riskinin artması anlamını taşır.

Kanama zamanı: Trombosit fonksiyonlarını ve sayısını değerlendirmek için yapılan bir incelemedir. Ekimoz, purpura, spontan kanamaların incelenmesinde önem kazanır. Aspirine duyarlılık, Glanzman Hastalığı, von Willebrand Hastalığı, Bernard – Soulier Sendromu, üremi, bağ dokusu hastalıkları, herediter telenjektazi ve karaciğer hastalıklarında süre uzayabilmektedir. Fizyolojik şartlarda süresi, 3-7 dakikadır.

Koagülasyon faktörlerinin miktarının ve / veya aktivitesinin azalması veya çoğalması durumunda koagülasyonun değerlendirildiği laboratuvar incelemeleri anormal sonuç verir. Kanama riskini değerlendirebilmek için klinik öykünün bu sonuçlarla birlikte değerlendirilmesi gerekir.

2.1.3. ANTİKOAGÜLAN ETKİLİ MOLEKÜLLER

Koagülasyonun tüm basamakları, kofaktörlerin aktivitesinin veya enzimlerin inhibisyonu yolu ile düzenli olarak regüle edilir.

Antitrombin III (AT III):

Asıl üretim yeri karaciğerdir. Endotelde de ifadelenir. Serin proteaz inhibitörüdür. Koagülasyonun en önemli inhibitörüdür. Etkisini özellikle serbest enzimler üzerinden yapar. FXIIa, FXIa, FIXa, FXa ve trombinin inhibe eder. FIXa'nın proteolitik aktivitesi, primer olarak antitrombin tarafından regüle edilir [18]. Koagülasyonun, hasarlı bölgeden etrafa daha fazla yayılmasını önlemiş olur.

Antitrombinin etkisi, heparin uygulaması ile belirgin olarak artar. Heparin uygulaması ile antitrombinin FII'ye ve FX'a bağlanması artar.

Protein C:

Karaciğerde üretilir. Yapımı, K vitaminine bağlıdır. Endotelde üretilen trombomodülin, trombin bağlandığında aktive olur. Kofaktörü Protein S ile birlikte FVa ve FVIIIa inhibisyonunu yapar.

Protein S:

Karaciğerde üretilir. Protein C'nin kofaktörüdür. ATIII ve Protein C eksikliğinde tromboza eğilim ortaya çıkar.

Doku Faktörü Yolağı İnhibitörü (Tissue Factor Pathway Inhibitor, TFPI)

Serin proteazdır. Endotelde üretilir. Trombositlerde de bulunur. Plazmada, moleküler yapısı değişmemiş olarak veya karboksi terminalinin kesilmiş formu halinde bulunur. Ayrıca, plazma lipoproteinleri ile kompleks yaparak da sirküle olabilir [19]. FXa aktivitesini ortadan kaldırır. TF+FVIIa kompleksini inhibe eder. Ekstrinsik yol inhibitörü olarak bilinir. Heparin veya Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin (Low Molecular Weight Heparin, LMWH) uygulanımı sonrasında endotelial form dolaşıma verilir.

2.1.4. ANTİKOAGÜLAN İLAÇLAR

Antikoagülan ilaçlar, koagülasyonun patolojik düzeyde oluşmasını engellemek ve kanın intravasküler kompartmanda akışının devamlılığını sağlayabilmek için klinik pratikte yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Oral ve parenteral kullanım şekilleri vardır.

Günümüze kadar sık kullanılan ilaçlar, heparin, warfarin ve LMWH olup, birden çok faktöre yönelik etkileri vardır. İdeal antitrombotik tedavide hedef, tek bir etkene veya basamağa yönelik etki eden ilaç geliştirilmesi ve kullanımudur.

Warfarin

γ -Glutamil Karboksilaz enzimi, bir integral membran glikoproteinidir [20]. Katalizlediği reaksiyonda, karboksil grubu (-CO₂) eklenmesini sağlar. Karboksilasyon; koagülasyonda, kemik metabolizmasında[21], büyümenin kontrolü[22], sinyal iletimi[20] ve vasküler değişimlerde (remodelling gibi) [23] gerekli ve önemli bir reaksiyondur.

FII, FVII, FIX, FX, Protein C, Protein S ve Protein Z, etkisini vitamin K'ya bağımlı olarak gösteren moleküllerdir. Karboksilaz enzimi, vitamin K varlığında, vitamin K'ya bağımlı proteinlerin glutamat bakiyelerinin (glu's) karboksilasyonunu gerçekleştirir ve gamakarboksigliutamat bakiyelerinin (gla's) oluşmasını sağlarlar. Bu reaksiyon, translasyon sonrası düzenlemedir. Her glu \rightarrow gla döngüsünde, Vitamin K Hidrokinon, Vitamin K Epoksid'e okside olur. Vitamin K epoksid, karboksilasyon reaksiyonunda kofaktördür. Vitamin K Epoksid Redüktaz enzimi, Vitamin K epoksidi, Vitamin K hidrokinona indirger. Warfarin, Vitamin K epoksid redüktaz inhibitörüdür. Warfarin kullanımı sonrasında bu enzim baskılanır, Vitamin K hidrokinon rezervi tükenir. Vitamin K bağımlı proteinlerinin öncüleri intraselüler alanda birikir [20] ve gama karboksilasyon gerçekleşmeyeceğinden, koagülasyon reaksiyonları duraksar. Sonuçta, antikoagülan etki göstermiş olur. Vitamin K Epoksid Redüktaz (VKORC) enziminde belirlenen polimorfik değişiklikler warfarine yanıtı değiştirmektedir [24]. Doz ayarlaması yapılması gerekir. VKORC enziminde tanımlanmış yanlış anlamlı mutasyonlar, warfarin dozunu artırmayı gerektirir. Bu hastalar, warfarine dirençli kabul edilir [25].

Warfarin kullanımı sırasında Protein C ve S de baskılanır. Etkilerinin kaybolması, diğer Vitamin K bağımlı faktörlere göre daha hızlıdır. Bu nedenle, warfarin tedavisinin ilk günlerinde geçici bir prokoagülan eğilim olur. Bu eğilimi nötralize etmek için, etki mekanizması farklı başka bir antikoagülan (genellikle heparin) kullanılmaktadır.

Heparin

Heparin –unfraksiyone heparin (UFH) olarak ta bilinir-, fizyolojik olarak, bazofil ve mast hücrelerinde üretilmektedir. Medikal tedavi için hazırlanmış heparinin ağırlığı ortalama olarak 12 kDa ile 15 kDa arasında değişmektedir. Etkisini antitrombin üzerinden gösterir. Antitrombini aktive eder ve aktive antitrombin, FXa ve trombin başta olmak üzere diğer proteazları inaktive eder [26]. Heparinin, oluşmuş pıhtıyı eritici bir etkisi yoktur. Pıhtının oluşumunu ve büyümesini engeller. Antidodu, protamindir [27].

Düşük molekül ağırlıklı heparin

(Low Molecular Weight Heparin, LMWH)

Unfraksiyone heparin'in depolimerizasyonu veya fraksiyone edilmesi ile elde edilmiş türevidir. Molekül ağırlıkları ortalama olarak 4kDa ile 5 kDa arasında değişmektedir. Etkisi, öncelikli olarak FXa üzerindedir ve FXa'yı inhibe eder. Gebelikte profilaktik ve tedavi amaçlı kullanımı açısından, unfraksiyone heparinin yerini almıştır [28].

2.1.5. TROMBOFİLİ

Trombofili, arteriyel veya venöz damarda tromboza artmış yatkınlıktır[29]. Herediter ve akkiz (kazanılmış) olabilir.

2.1.5.1. EDİNSEL TROMBOFİLİ

Kanser, gebelik ve lohusa dönemi, oral kontraseptif kullanımı, antifosfolipid sendomu, polistemia vera, sepsis, nefrotik sendrom, cerrahi operasyon, hormon replasman tedavisi, uzun süre immobilizasyon, kazanılmış trombofililere örnek olarak verilebilir.

2.1.5.2. KALITSAL TROMBOFİLİ

Kalitsal trombofililer içinde sık görülenler; Antitrombin III eksikliği, Protein C eksikliği, Protein S eksikliği, FV Leiden G1691A mutasyonu, Protrombin G20210A mutasyonu, hiperhomosisteinemi'dir.

Kalitsal trombofililer, batı toplumlarının %15'inde bulunur ve gebelikte görülen venöz tromboembolizm tanılarının yaklaşık %50'sinin altında yatan nedendir [30].

2.2. GEBELİK

Konsepsiyon, haploid kromozom yapıları olan (n) ovum ve spermin birleşmesiyle meydana gelen diploid (2n) kromozom kuruluşuna sahip zigotun oluşmasıdır. Zigot, uterusu implante olduktan sonra emrionik ve fetal evrelerden geçerek matur bir canlı haline gelir. Gebelik, konsepsiyon ile başlayan, term döneme kadar devam eden ve doğum ile sonlanan fizyolojik bir periyoddur.

2.2.1. GEBELİK FİZYOLOJİSİ

Gebelik, organizmada birçok fizyolojik değişikliğin gerçekleştiği bir dönemdir. Kan hacmi, demir ihtiyacı, pıhtılaşmaya eğilim, kalp hızı, kardiyak output, kanda kolesterol ve trigliserid düzeyleri, vücutta su tutulumu, idrar çıkışı, kilo, meme hacmi artar. Hormonal düzeyde de değişiklikler olur. Plasentadan sentezlenen Human Koryonik Gonadotropin (hCG), ilk 9 – 10 haftaya kadar ovaryumları uyararak, östrojen ve progesteron sentezini ve böylece düzeylerinin artmasını sağlar. 9-10 haftadan sonra, plasentanın kendisi bu hormonları yüksek miktarlarda sentezler. Bu iki hormon, gebeliğin devamı için gereklidir. Placenta, böbreküstü bezlerini de uyararak, aldosteron ve kortizol düzeylerinin de artmasını sağlar. Bu nedenle, organizmada su tutulumu olur. Prolaktin ve parathormon düzeyleri artar.

Kan hacmi, lökosit sayısı ve koagülasyon faktörlerinin sentezi (özellikle fibrinojen ve FVIII) artarken, trombosit sayısı azalır. Net olarak, gebeliğin kendisi, hiperkoagülan bir süreçtir.

2.2.2. TANIMLAR

Gebelikte önem arz eden kavramlar ile ilgili olarak farklı tanımlamalar yapılabilmektedir. [31]. Gebeliğin oluşması halinde, birinci haftanın başlangıcı olarak menstrüasyonun ilk günü alınır. İki hafta sonra ovulasyon gerçekleştiğinde, eğer fertilizasyon olursa embriyogenezis dönemi başlar. Organogenezis bu dönemde gerçekleşir. Onuncu haftaya gelindiğinde fetal dönem başlamış olur. Süreler çok keskin sınırlarla ayrılmamaktadır, devam eden sürecin kademeli olarak değişimi söz konusudur.

Trimester	Gebeliğin dönemlerine verilen addır.
Birinci trimester	1.-14. haftalar arası dönemdir. Embriyonik ve fetal dönemleri içerir.
İkinci trimester	15.-28. haftalar arası dönemdir.
Üçüncü trimester	29-42 haftalar arası dönemdir.
Normal doğum haftası	40±2 haftadır.
Spontan Abortus (Düşük)	20 haftadan önce gerçekleşen veya fetal ağırlığın 500 gramdan küçük olduğu gebelik kayıplarıdır.
Habituel abortus (Rekürren abortus)	Ardışık iki spontan abortus olmasıdır
Ölü doğum	20. haftadan itibaren ve sonraki haftalarda gerçekleşen kayıp için kullanılan terimdir. Kesin bir tanımı olmayıp, farklı haftalar referans alınabilmektedir [32].
Gebelik kaybı	İki kısma ayrılarak tanımlanmıştır [33]. Vajinal kanama ile sonlanan gebelik için biyokimyasal (subklinik, erken) gebelik kaybı ifadesi kullanılır. Bu kanama, mens kanaması ile karıştırılabilir. Klinisyenin gebeliği tespit etmesinden sonra veya kadının gebe kaldığını farketmesinden sonra, konsepsiyon ürününün herhangi bir şekilde kaybedilmesi halinde, farkedilen (klinik) kayıp ifadesi kullanılır. Bu tanım, spontan abortus, ektopik gebelik ve ölü doğum tanımlarını kapsar.
Embriyo dönemi	1.-10. Haftalar arası dönem
Fetal dönem	11.-40. Haftalar arası dönem
Preterm	Doğumun, 37. haftadan önce gerçekleşmesi halidir.
Term	Doğumun 40±2 hafta aralığı içinde gerçekleşmesi halidir.
Postmatür	Gestasyonel yaşın 42 haftadan büyük olması halidir.

Tablo 2: Gebelik ve fetal gelişim evreleri ile ilgili tanımlar

Gebelik Kayıpları:

Gebelik kayıpları birçok nedenle oluşabilmektedir. Bu nedenler, gebeliğin dönemlerine göre sınıflanarak değerlendirilmektedir [34]. Bu değerlendirmeye göre, kromozomal ve konjenital anormallikler, her üç trimesterde fetal nedenler içinde yer almaktadır.

Her üç trimester için pek çok maternal sebep tanımlanmıştır. Bu nedenler; anatomik, immunolojik, enfeksiyöz, plasental nedenler ve trombofili olarak ele alınabilmektedir.

Birinci trimesterdaki gebelik kayıplarının maternal nedenlerine örnekler verilerek irdelendiğinde, intrauterin lezyonlar, leiomyom ve uterus septumu anatomik nedenler içinde yer alır. Cushing Sendromu, luteal faz defekti, polikistik over sendromu ve tiroid hastalıkları endokrinolojik nedenler içinde yer alır. Antifosfolipid sendromu, sistemik lupus eritematozus immunolojik nedenler içinde yer alır. Sitomegalovirüs, herpes simpleks virüs, listeria monocytogenes, parvovirüs B19, rubella ve toxoplasma gondii enfeksiyöz nedenler içinde yer alır. Aktive Protein C, FV Leiden ve Protrombin G20210A mutasyonları trombofilik nedenler içinde yer alır. Diabetes mellitus ve hipertansiyon, her üç trimesterdeki maternal kaynaklı nedenler içinde kontrol edilememiş kronik hastalıklar içinde yer alır. Annenin ciddi akut hastalığının olması da her üç trimesterdaki maternal kaynaklı nedenler içinde değinilen diğer bir nedendir.

İkinci trimester gebelik kayıplarının maternal nedenlerine örnekler verilerek irdelendiğinde, serviks yetersizliği, intrauterin adezyonlar, leiomyom ve uterus anomalileri anatomik nedenler içinde yer alır. Antifosfolipid antikorları [antikardiolipin antikorları ve lupus antikoagülanı] immunolojik nedenler içinde yer alır. Bakteriyel vaginosis, intraamniotik enfeksiyon enfeksiyöz nedenler içinde yer alır. Hematom, çıkarılamamış intrauterin araç, plasental abrupsiyon ve plasenta previya plasental problemler içinde yer alır. Protein S Eksikliği, FV Leiden, Protrombin G20210A mutasyonları trombofilik nedenler içinde yer alır.

Üçüncü trimester gebelik kayıplarının maternal nedenlerine örnekler verilerek irdelendiğinde, antifosfolipid antikorları [antikardiolipin antikorları ve lupus antikoagülanı] immunolojik nedenler içinde yer alır. Plasental abrupsiyon, plasenta previya plasental problemler içinde yer alır. Protein S Eksikliği, FV Leiden, Protrombin G20210A mutasyonları trombofilik nedenler içinde yer alır. İntrapartum asfiksi, enfeksiyon, post-term gebelik, umbilikal kord komplikasyonu da belirlenmiş diğer maternal nedenlerdendir.

Fetal büyüme kısıtlanması, fetomaternal transfüzyon, izoimmünizasyon, non-immün hidrops fetalis, ikizden ikize transfüzyon, üçüncü trimesterde fetomaternal nedenler içinde ele alınmaktadır.

İlaç kullanımı, sigara kullanımı, teratojene maruziyet, travma, her üç trimesterde de diğer nedenler grubu içinde değerlendirilmektedir. Ek olarak, ektopik gebelik ilk trimesterde ele alınırken, membranların preterm prematür rüptürü ise ikinci trimesterde ele alınması gereken nedendir.

2.2.3. PREEKLAMPSİ – EKLAMPSİ

Preeklampsi, gebelik sırasında, en az 6 saat ara ile ve iki defa ölçülen kan basıncı değerinin 160/110 mmHg üzerinde olması ve 24 saatlik idrarda protein düzeyinin 5 gramdan fazla bulunmasıdır [35]. Bu bulgulara ödem eşlik edebilir. Şikayetler, ılımlı düzeyden şiddetli düzeye kadar değişebilir. Endotel fonksiyonunun bozukluğu ve vazospazm vardır. Genellikle 20 haftadan sonra ortaya çıkar. Eğer, trofoblastik bir hastalık sözkonusu ise daha erken dönemde ortaya çıkabilir. Doğum sonrası 6. haftaya kadar devam edebilir.

HELLP sendromu, hemoliz, artmış karaciğer enzim düzeyleri ve düşük trombosit seviyeleri ile karakterizedir. Preeklampsinin atipik bir formu olduğu düşünülmektedir [35].

Gebeliği sırasında preeklampsi geçiren kadınların, gebelikten sonra venöz tromboembolizm geçirmesi riskinin yükseldiği tespit edilmiştir [36].

Preeklampsi bulgu ve şikayetlerine ek olarak, başka bir nedene bağlanamamış konvülsiyonların klinik tabloya eşlik etmesi halinde eklampsi ifadesi kullanılmaktadır.

2.2.4. ANTİFOSFOLİPİD SENDROMU

Otoimmün bir hastalıktır. Hücredeki fosfolipid membranlara karşı antikor gelişir. Özellikle, kardiolipin ve β_2 Glikoprotein I'e karşı antikorlar oluşmaktadır. Lupus antikolagülanı, tanımlanmış bir diğer antikordur. Ayrıca, tPA [37], annexin A2 [38] ve plazmin [39] gibi başka bazı antijenik hedefler de tanımlanmıştır. Bu antijenlere karşı gelişen antikorlar ile antifosfolipid sendromu arasında ilişki bulunmuştur. Vasküler alanda, henüz tam olarak aydınlatılamamış fizyopatolojik mekanizmalar ile arteriyel veya venöz koagülasyon tetiklenir. Düşük, preeklampsi, ölü doğum gibi gebelik komplikasyonları oluşur.

Antifosfolipid sendromu'nda meydana gelen tromboza yatkınlık ile ilgili pek çok mekanizma gündeme gelmiştir [40]. Bu mekanizmalardan etkin olanının belirlenmesi veya hastaya ait alta yatan nedenlerin etkin olup olmadığının belirlenmesi henüz mümkün olmamıştır.

Tromboza yatkınlık için öne sürülen mekanizmalardan bazıları şöyledir.

- 1- Endotelin aktivasyonu sonucunda trombositlerin ve monositlerin bağlanması kolaylaşması
- 2- Endotelial bağlanmayı artırmak için trombositlerin aktive olması
- 3- Okside olmuş düşük dansiteli lipoproteinlere karşı antikor reaksiyonunun olması ile ateroskleroz ve myokard enfarktüsüne zemin hazırlanmış olunması
- 4- Koagülasyon faktörlerine karşı antikor gelişmesi (Protein C, Protein S)

Fetal morbidite ve mortalitenin sadece tromboza bağlı olmayabileceği, ayrıca trofoblast fonksiyonunun bozulması ve kompleman aktivasyonuna bağlı olarak gelişen plasental inflamasyonun da etkili olabileceği öngörülmüştür [40].

Antifosfolipid sendromu, primer olabileceği gibi sekonder de olabilir. Eşlik eden başka bir hastalık olmadığında, primer antifosfolipid sendromu sözkonusudur. Sistemik Lupus Eritematozus, veya başka bir romatoid veya otoimmün hastalıkla beraber olduğunda, sekonder antifosfolipid sendromu sözkonusudur. Nadir bazı durumlarda, jeneralize tromboza bağlı olarak, organ yetmezliği görülen ve mortalitesi yüksek 'Katastrofik Antifosfolipid Sendromu' tipi de vardır.

Antifosfolipid sendromunun trombotik bir doğası olmasına rağmen, hastaların bir kısmında trombositopeni vardır [41]. Trombositlerin, immün aracılı yıkımı nedeniyle trombositopeni olabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle, tedavisi karmaşık hale gelmektedir ve antitrombotik tedavi sınırlanmaktadır. Tromboz riski azalmamaktadır.

Antifosfolipid Sendromu'nun gözden geçirilmiş tanı kriterleri [42]

Antifosfolipid Sendromu tanısı en az bir laboratuvar ve bir klinik kriter karşılandığında konulur.

Klinik kriterler:

1- Vasküler tromboz

Herhangi bir organ veya dokuda en az bir defa oluşan arteriyel, venöz ve küçük çaplı damar tromboz epizodu. Trombozun, objektif olarak dökümente edilmiş olması gerekir. Yüzeysel venlerdeki trombozlar bu tanıma girmemektedir.

2- Gebelik morbiditesi

Herhangi bir tanesinin bulunması, yeterlidir.

a- En az bir defa, fizik muayene veya ultrason ile morfolojik olarak normal olduğu belirlenmiş olan fetusların, 10 hafta veya üzerinde iken açıklanamamış ölümleri

b- En az bir defa, gestasyonel yaşı 34 haftadan küçük ve morfolojik olarak normal olan, preeklampsi, eklampsi veya plasental yetersizlik nedeniyle prematür bebek doğumu

c- Gestasyonel yaşı 10 haftadan küçük, nedeni açıklanamamış, ardışık en az üç spontan abortus

Annenin anatomik ve hormonal anormalliklerinin ve her iki ebeveyne ait kromozomal nedenlerin dışlanmış olması gerekir.

Laboratuvar kriterleri:

1- En az iki defa ve en az on iki hafta ara ile Lupus Antikoagülan değerlerinin ölçülmüş olması ve bu değerlerin, International Society on Thrombosis and Haemostasis'in klavuz değerlerine göre yüksek bulunmuş olması

2- Plazmada veya serumda antikardiolipin IgG veya IgM değerlerinin orta veya yüksek değerde olması. Ölçümler, en az iki defa ve en az on iki hafta ara ile standart ELİSA yöntemi ile yapılmış olmalı.

3- Plazmada veya serumda Anti- β_2 glikoprotein-I değerlerinin orta veya yüksek değerde bulunması. Ölçümler, en az iki defa ve en az on iki hafta ara ile standart ELİSA yöntemi ile yapılmış olmalı.

2.2.5. GEBELİK VE TROMBOZ

Konsepsiyonların yaklaşık %50'sinin başarısızlıkla sonuçlandığı bilinmektedir. Gebeliğin sağlıklı bir şekilde devam edebilmesi açısından, uteroplasental kan akımının yeterli olması çok önemlidir. Uteroplasental dolaşım sisteminin düzgün çalışmaması veya kan basıncının düşük olması, tromboza eğilim oluşturabilmekte ve bu durum, embryonun veya fetusun beslenmesi bozulduğu için gebelik kaybına zemin hazırlamaktadır.

2.2.5.1. GEBELİĞİN TROMBOZ İLE İLİŞKİSİ

Günümüze kadar yapılan çalışmalar, kalıtsal tromboz ile gebelik kaybı arasında ilişki olduğunu düşündürse de, bu ilişkinin moleküler alt yapısı henüz tam olarak tanımlanmamıştır [43].

2.2.5.2. FV LEİDEN MUTASYONU

FV geni, 1q24.2 'de lokalizedir. 25 eksonludur. FV Leiden mutasyonu, 1691.nükleotidde guanin (G) yerine adenin (A) geçmesi ile genin ürünü olan proteinde 506. kodonda arginin yerine glutamin geçmektedir (R506Q). Bu bölge, Aktive Protein C'nin etki ettiği yerdir. Bu nedenle, Faktör V, Aktive Protein C'ye rezistans kazanır, tromboza yatkınlık oluşur. Bu tabloya klinik olarak, 'Aktive Protein C Rezistansı' denmektedir. En sık görülen kalıtsal trombofilik kusurdur [44].

2.2.5.3. PROTROMBİN G20210A MUTASYONU

Protrombin geni, 11p11.2 'de lokalizedir ve 14 ekson içerir. Protrombin sentezler. Protrombin, karaciğerden inaktif zimojen halinde salgılanır.

Protrombin geninin kodlamayan bölgesinde, 3' çevrilmemiş bölgede, 20210. nükleotidde, guanin bazı yerine adenin bazı geçmiştir. Fizyolojik olarak 3' uç bölünme sinyalinin yetersiz olduğu ve F2 20210 G→A değişiminin bir fonksiyon kazanma mutasyonu olduğu, bu mutasyonun bölünme bölgesinin tanınmasını artırdığı, 3' ucun işlenmesinin arttığı, mRNA yığılımının arttığı ve protein sentezinin arttığı gösterilmiştir [45]. Bu mutasyon sonucunda, plazma protrombin düzeylerinin arttığı ve venöz tromboz için risk faktörü haline geldiği gösterilmiştir [46].

2.2.5.4. MTHFR C677T VE A1298C MUTASYONLARI

Metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi, 1p36.22'de lokalizedir. 11 eksonludur. 5,10-Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi, 5,10-Metilentetrahidrofolat'ın 5-metiltetrahidrofolat'a dönüşümünü katalize eden enzimdir. 5-metiltetrahidrofolat, homosistein'in metionin'e remetilasyonunun gerçekleştiği reaksiyonda kofaktördür.

MTHFR ile ilgili pek çok mutasyon ve polimorfizm tanımlanmıştır. MTHFR geni için, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C en sık incelenen mutasyonlardır.

MTHFR C677T mutasyonu:

MTHFR geninin 677. nükleotidinde sitozin'in (C) timin (T) ile yer değiştirmesi sonucunda, proteinde 222. pozisyonda Alanin yerine Valin amino asidi (A222V) geçmektedir. Bu değişim, MTHFR'yi termolabil bir enzim haline getirir. Mutasyonu homozigot olarak taşıyanlarda, homosistein plazma seviyesi artmaktadır. Bu nedenle, vasküler hastalıklarda önemli bir risk teşkil etmektedir.

MTHFR A1298C mutasyonu:

MTHFR geninin 1298. nükleotidinde adenin'in (A) sitozin (C) ile yer değiştirmesi sonucunda, proteinde 429. pozisyonda Glutamat yerine Alanin amino asidi geçmektedir. (E429A) Bu değişim, MTHFR'yi termolabil bir enzim haline getirir. MTHFR enzim aktivitesi düşer. Bu mutasyonu homozigot olarak taşıyanlardaki aktivite azalması, mutasyonu heterozigot olarak taşıyan bireyler ile kıyaslandığında, daha belirgindir.

2.2.5.5. HİPERHOMOSİSTEİNEMİ

Homosistein, metiyonin metabolizması sırasında oluşan esansiyel bir aminoasittir (Bkz. Şekil 2). Sülfür içerir. Remetilasyon (homosisteinin metiyonine dönüşümü) ve transsülfürasyon (homosisteinin sistatyonine dönüşümü) yolları ile metabolize edilir [47]. Bu iki metabolik yolun birleştiği bir noktada metabolize olur. Folik asit, B12 (metilkobalamin) ve B6 (Pridoksal Fosfat) metabolizması, bu reaksiyonların etkinliği için önemlidir. Sistatyonin sentaz eksikliğinde, defektif metilkobalamin üretimine bağlı metionin sentazın fonksiyonel eksikliğe olduğunda ve MTHFR eksikliğinde, hiperhomosisteinemi ortaya çıkmaktadır.

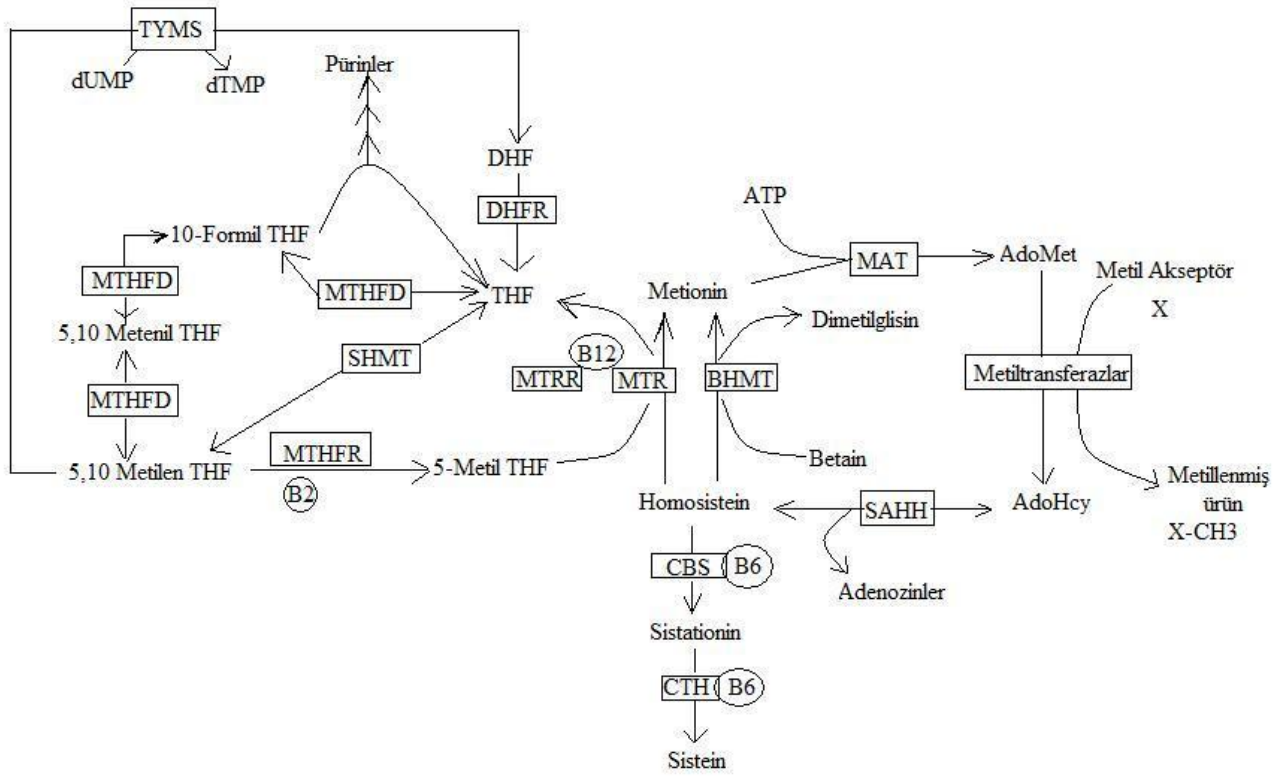
Hiperhomosisteinemi, plazmada/serumda homosistein seviyesinin yüksek olmasıdır. Genel olarak toplumun %5'inde hiperhomosisteinemi vardır ve vasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, otoimmün hastalıklar, doğum defektleri, renal hastalıklar, Diabetes Mellitus, osteoporoz, nöropsikiyatrik hastalıklar ve kanser gibi bazı hastalıklar için artmış bir risk olarak ilişkilendirilmiştir [48]. İlmli düzeyde homosistein yüksekliği, klasik aterotrombotik risk faktörlerinden bağımsız olarak kardiyovasküler hastalıklar için güçlü bir prediktördür [49]. Hiperhomosisteineminin patofizyolojik etki sürecinde; çeşitli katekol bileşiklerini (Katekolaminler ve katekol östrojenleri gibi) metile ederek metabolize eden Katekol-o-metil transferaz enzimini (COMT) nonkompetitif olarak inhibe eden S-Adenozil-L-Homosistein birikimi üzerinden hiperhomosisteineminin pekçok klinik şikayete/bulguya neden olduğu düşünölmektedir [50]. Bu etki sonucunda, periferal dokularda endojen katekolaminlerin metilasyonunun inhibe olması ile katekolaminler dokuda ve kanda birikir. Sonuçta, kardiyovasküler sistem aşırı düzeyde uyarılır. Damar yapısı, sabit olarak endojen katekolaminlere maruz kalır. Endojen katekolaminler tarafından üretilen yüksek düzeydeki oksidatif ürünler (katekol kinonlar/semikinonlar ve oksiradikaller), endotel hücrelerini kronik kümülatif hasara maruz bırakırlar. Bu açıklama, hiperhomosisteinemili hastalarda, folat, vitamin B12, vitamin B6 kullanımının koruyucu etkisi ile uyum göstermektedir [50].

Hiperhomosisteinemi nedenleri
Enzim Eksiklikleri <ul style="list-style-type: none"> - Sistatyonin β-Sentaz - Metiyonin Sentaz - 5-Metiltetrahidrofolat redüktaz
Vitamin Eksiklikleri <ul style="list-style-type: none"> - Folat - Vitamin B6 - Vitamin B12
Demografik <ul style="list-style-type: none"> - Artan yaş - Erkek cinsiyeti - Tütün kullanımı - Solid organ transplant alıcıları
Kronik Tıbbi Hastalıklar <ul style="list-style-type: none"> - Renal Disfonksiyon - Sistemik Lupus Eritematozus - Malign Neoplazm - Psöriazis
Sistemik hastalığa akut-faz cevabı
Medikal Tedavi Kullanımı <ul style="list-style-type: none"> - Metotreksat - Nitröz Oksid - Fenitoin, Karbamazepin gibi nöbet önleyici ilaçlar - Nikotinic Asit - Kolestipol - Tiazid Diüretikleri

Tablo 3: Hiperhomosisteinemi nedenleri [51]

Hiperhomosisteineminin Patofizyolojik Bulguları
Endotelial Hücre Hasarı <ul style="list-style-type: none"> - Azalmış Endotel Bağımlı Vazodilatasyon - Azalmış endojen doku tipi plazminojen aktivatör aktivitesi - Artmış düz kas proliferasyonu
Artmış trombosit agregasyonu <ul style="list-style-type: none"> - Artmış tromboxan A₂ sentezi - Azalmış prostosiklin sentezi
Fibrinoliz anormallikleri <ul style="list-style-type: none"> - FV, FX ve FXII'nin aktivasyonu - Faktör C ve Antitrombin III inhibisyonu - Artmış lipoprotein(a)-fibrin bağlanması
Fibrinojen seviyeleri ile korelasyon

Tablo 4: Hiperhomosisteineminin patofizyolojik bulguları [51]



Şekil 2: Folat siklusu ve homosistein metabolizmasının şematik anlatımı [52]. (Blom, H.J. and Y. Smulders, Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. Journal of inherited metabolic disease, 2011. **34**(1): p. 75-81. 'den esinlenerek çizilmiştir.)

AdoHcy : S-adenozilhomosistein, AdoMet : S-adenozilmetyonin

SAHH : S-adenozilhomosistein hidrolaz, ATP : Adenozin trifosfat

BHMT : Betain-homosistein metiltransferaz, CBS : Systationin β -sentaz

CTH : Systationin γ -liyaz, DHF : Dihidrofolat, DHFR : Dihidrofolat redüktaz

dUMP : Deoksiüridin monofosfat, dTMP : Deoksitimidin monofosfat

MAT : Metionin-adenozil transferaz, MTHFR : Metilentetrahidrofolat redüktaz

MTHFD : Metilentetrahidrofolat dehidrogenaz / Meteniltetrahidrofolat siklohidrolaz / formiltetrahidrofolat sentetaz

MTR : Metionin sentaz, MTRR : Metionin sentaz redüktaz

SHMT : Serin-hidroksimetil transferaz, THF : Tetrahidrofolat

TYMS : Timidilat sentaz

AICAR : 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid

FAICAR : formil-AICAR

2.2.5.6. PROTEİN C VE PROTEİN S EKSİKLİĞİ

PROC geni, 2q14.3'da lokalize bir gendir. Dokuz eksonludur. FIX ile hem gen düzeyinde hem de protein düzeyinde benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir [53]. Protein C'yi sentezler. Protein C, trombin-trombomodülin kompleksi varlığında, endotelde aktive Protein C'ye dönüşür (aPC). aPC, aktive FV ve FVIII'i inaktive eder.

PROC geninde tanımlanmış mutasyonlar, Protein C eksikliğine yol açar [54-56]. Protein C eksikliğinin, otozomal dominant ve otozomal resesif olmak üzere iki formu vardır. Dominant formu, rekürren venöz trombozlar ile karakterizedir. Resesif formu, neonatal dönemde çıkınca daha ciddi, geç dönemde ortaya çıkınca daha ılımlı bir trombotik eğilim gösterir.

PROS1 geni, 3q11.1'de lokalizedir. 15 eksonludur. Protein S'i sentezler. aPC için nonenzimatik kofaktör olarak görev yapar.

Protein C eksikliğinin, otozomal dominant ve otozomal resesif olmak üzere iki formu vardır. Dominant formu için mutasyonlar [57, 58] ve delesyonlar [59] tanımlanmıştır. Tromboembolizm ile karakterize klinik tablolara yol açar. Üç tip Protein S eksikliği tanımlanmıştır. Tip I Eksiklik'te, serbest ve total Protein S düzeyleri eksiktir. Protein S aktivitesi azalmıştır. Tip II Eksiklik'te serbest ve total Protein S düzeyleri normaldir. Protein S aktivitesi azalmıştır. Tip III Eksiklik'te serbest Protein S düzeyi ve Protein S aktivitesi azalmıştır. Total Protein S düzeyleri normaldir.

Resesif formu için de mutasyonlar tanımlanmıştır [60, 61]. Tromboembolizm ile karakterize klinik tablolalara yol açar.

2.2.5.7. GEBELİK KAYIPLARINDA ANTİTROMBOTİK TEDAVİ

Gebe kadınlara, klinik durum ve kalıtsal trombofili testlerini gözüne alarak tedavi kararı verilmesi önerilmektedir [62]. Antikoagülan tedavinin, gebelik kaybı, kanama, teratojenik yan etkileri olabilir. Gebelik kayıplarını önlemek için kullanılan ilaçlar iki grupta ele alınabilmektedir. İlk grup profilaktik dozda UFH ve/veya LMWH olup, ikinci grupta aspirin yer almaktadır.

Pek çok endikasyonda, gebelik sırasında tercih edilen ilaç, LMWH'dir [43]. American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines,(2008)(8. Baskı)'a göre, tekrarlayan gebelik kayıpları olan ve antifosfolipid antikorları yüksek olan kadınlarda, antepartum dönemde aspirin ve profilaktik dozda veya intermediate dozda UFH / LMWH kombinasyonu kullanılması tavsiye edilmektedir [63].

2.3. FAKTÖR IX GENİ

Faktör IX (FIX) geni, Xq27.1'de lokalizedir. Sekiz eksonlu bir gendir [64]. Koagülasyon faktörü IX'u (FIX) sentezler. FIX, dolaşımında inaktif zimojen olarak bulunur, aktivasyon peptidi proteolitik olarak molekülden ayrılınca, FIX aktifleşir. Kalsiyum, membran fosfolipidi, FVIII varlığında FX'u aktive eder.

FIX geninde, delesyonlar [65, 66] ve mutasyonlar [67-71] tanımlanmıştır.

FIX, koagülasyon sisteminde yer alan bir protein olduğu için, FIX proteininin kan düzeyleri ve FIX geninde oluşan polimorfik değişimler veya mutasyonlar önemli olmaktadır.

FIX'un kan düzeyi belli bir düzeyin ($P_{90} = 129$ U/dL) üzerine çıkınca venöz tromboz riskinin 2-3 kat arttığı tespit edilmiştir [72].

2.3.1. FAKTÖR IX GENİ ALLELİK VARYANLARI

FIX geni için birçok allelik varyant tanımlanmıştır. En iyi bilinen değişiklik, FIX eksikliği ile karakterize Hemofili B hastalığıdır. Hemofili B, X kalıtmımlı resesif geçişli, koagülasyonun tam olarak gerçekleşemeyişi ile karakterize bir hastalıktır.

FIX 'un Malmö sekans varyantı F9(rs6048) ile derin venöz tromboz riski üzerinde araştırma yapılmıştır. Matür m-RNA'da 148. kodonda treonin yerine alanin geçmektedir. Bu değişikliğin, erkeklerde derin ven tromboz riskini %20 oranında azalttığı tespit edilmiştir [73].

2.3.2. FAKTÖR IX PADUA MUTASYONU

Faktör IX geninde, G31134T transversiyonu tanımlanmıştır [1]. Bu değişikliğin bir fonksiyon kazanma mutasyonu olduğu belirlenmiştir. FIX Padua mutasyonu olarak adlandırılmıştır. Mutasyon, matür m-RNA'da, 338. kodonda Arginin yerine Lözin geçmesine neden olmaktadır (R338L). 338. Pozisyon, proteininin kritik bir bölgesidir. Yine aynı noktada, arginin yerine alanin aminoasidinin kodlanmasının (R338A), koagülasyon aktivitesinin 3 kat artmasına neden olduğu tespit edilmiştir [74]. Çeşitli in vitro çalışmaların sonucunda, bu rezidünün, FIXa ile FVIIIa bağlanması gerçekleştikten sonra FX'a ulaşabilme niteliğinin daha çok olduğu belirlenmiştir [75].

FIX Padua mutasyonunun neden olduğu R338L değişikliğinin, kanda FIX seviyesi değişmediği halde, FIX aktivitesinin 5 ila 10 kat arasında bir artış göstermesine ve trombotik etkinin belirginleşmesine neden olduğu tespit edilmiştir [1]. Erkek bireylerde tek X kromozomu olduğu için (hemizigot), mutasyon olması halinde, klinik etki daha belirgindir.

FIX Padua mutasyonunun, venöz tromboembolizm geçiren hastalarda, ılımlı düzeyde artmış FIX seviyelerinin veya ılımlı düzeyde artmış aktivite/antijen oranlarının nedeni olmadığı tespit edilmiştir [76].

Erken yaşta (≤ 45 yaş) ortaya çıkan venöz tromboembolizm görülen Hollandalı kardeş gruplarından oluşturulan bir popülasyonda yapılan bir taramada, FIX Padua mutasyonunun prevalan bir mutasyon olmadığı belirlenmiştir [77].

Bu araştırmada, uteroplental kan dolaşımının yetersizliğine bağlı gelişen klinik tabloların (gebelik kaybı, preeklampsi, intrauterin gelişme geriliği, plasental abrupsiyon) etyolojisinde tespit edilen etkenlere ek olarak, FIX Padua mutasyonunun olası etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

3.MATERYAL VE METOD

Çalışma, retrospektif bir çalışmadır. Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Eğitim Planlama Koordinasyon Kurulu'nun onayı alınmıştır. Etik kurul onayı, Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Komitesi'nin 070220121 sayılı kararıyla alınmıştır. Çalışmalar, T.C. Sağlık Bakanlığı Zekai Tahir Burak Kadın Hastalıkları ve Doğum Hastanesi Genetik Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

Hasta kabul kriterleri:

- 1) Seçilen kadınların,
 - a- Tromboza yatkınlık (trombofili) düşündüren bir hastalık geçirmiş olması ve
 - b- İkinci veya üçüncü trimesterde gebeliğinin sonlanmış olması (gebelik kaybı olan grup) ve gebeliğinin sağlıklı şekilde terme ulaşmış olması (gebelik kaybı olmayan grup)
- 2) Bu kadınlarda tromboza yatkınlık oluşturduğu düşünülen genlere yönelik mutasyon testinin [FV G1691A (Leiden), Protrombin G20210A, MTHFR C677T, MTHFR A1298C] çalışılmış olması
- 3) Sistemik bir hastalığının olmaması
- 4) Gebelik kaybının herhangi bir nedene bağlanmamış olması

Bu ölçülere göre retrospektif olarak hasta kayıtları incelenmiş olup, seçilen hasta sayısı toplam altmışsekizdir. Hastalardan, daha önce trombofiliye yatkınlık düşünülüp tromboza yatkınlık oluşturduğu düşünülen genlere yönelik mutasyon tayini yapılabilmesi açısından periferik kan alınması gerektiği için hastaların onamları alınmıştır.

Hastalardan yaklaşık 4cc. periferik venöz kan EDTA'lı tüplere alındıktan sonra, tromboza yatkınlık genlerine yönelik mutasyon araştırması yapılması için DNA ekstraksiyonu ve hedeflenen mutasyonlar için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yapılmıştır. Çalışmada FIX Padua mutasyonunun araştırılmasına yönelik test yapılırken, elde edilmiş olan DNA kullanılmıştır. Deneyle, 4 Temmuz 2012 –15 Ağustos 2012 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

3.1. DNA Ekstraksiyonu

EDTA'lı tüplere alınan kandan, DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak ve önerilen protokol uygulanarak (Vienna Lab Diagnostics GmbH, CVD Strip Assay, Avusturya), manuel olarak DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. PCR için kullanılacak DNA ayrılmıştır. Kalan DNA, -20°C'de saklanmıştır.

3.2. Trombofili Genlerine Yönelik PCR

Seçilen hastalar içinden yedi hastanın DNA'sı stripe mutasyon analizi yapılarak incelenmiştir. Diğer hasta numuneleri (altmışbir hasta), Real Time PCR yöntemi ile incelenmiştir.

3.2.1. Stripe Mutasyon Analizi

İzole edilen DNA, in vitro amplifikasyon, hibridizasyon, yıkama ve boyama işlemlerine tabi tutulmuştur (Vienna Lab Diagnostics GMBH, CVD Strip Assay). 12 mutasyon analizi yapılmıştır.

Değerlendirilen mutasyonlar:

FV G1691A (Leiden), Faktör V H1299R (R2), Protrombin G20210A, Faktör XIII V34L, β -Fibrinojen -455 G>A, PAI-1 4G/5G, HPA1 a/b, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, ACE I/D, Apo B R3500Q, Apo E (1),(2),(3) ve (4).

3.2.2. Real Time PCR

İzole edilen DNA'dan; FV G1691A (Leiden), Protrombin G20210A, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, PAI-1 mutasyonlarının çalışılması için Real Time (FRET) kitleri (NLM diagnostici,İtalya) ve önerilen protokolü, RotorGeneQ (QIAGEN, Almanya) cihazında uygulanmıştır.

3.3. DNA Saturasyonu Ölçümü

DNA saturasyonu ölçümü yapılarak, kalitesi uygun olmayan DNA'lar çalışma kapsamı dışında tutulmuştur. Spektrofotometre (Thermo Scientific Nanodrop Lite Spectrophotometer, Amerika) ile ölçüm yapılmıştır.

Ölçülen en düşük DNA konsantrasyonu (ng/ μ l) : 34,2

Ölçülen en yüksek DNA konsantrasyonu (ng/ μ l) : 172,6

Ölçülen en düşük oran : 1,19

Ölçülen en yüksek oran: 1,50

Çok yüksek konsantrasyona sahip hastaların DNA örnekleri, teste tabii tutulmamıştır.

3.4. Faktör IX Padua Mutasyonuna Yönelik PCR

PCR reaksiyonu, 2X Taq Master Mix (Vivantis DNA Amplification Product, PLMM01) kullanılarak, Palm-Cycler™ gradient thermal cycling (Corbett Life Science, Avustralya) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Primerler: Metabion International AG, Almanya

Forward: 5'-GCC AAT TAG GTC AGT GGT CC-3' [1]

Reverse : 5'-GAT TAG TTA GTG AGA GGC CCT G-3' [1]

PCR Mix Hazırlanışı:

	x1 (mikrolitre)
Master Mix	3,5
Nuclease Free Water	4,6
Primer - Forward	0,5
Primer - Reverse	0,5
TOPLAM	9,1
Tüp başına konulan karışım	9,1
Tüp başına konulan DNA	6,5
Son Hacim (Toplam)	15,6

PCR Koşulları:

Siklus 1 : 95°C - 05:00 1 döngü
Siklus 2 : 95°C - 00:30
60°C - 00:30
72°C - 01:20 } 30 döngü
Siklus 3 : 72°C - 10:00 1 döngü

Toplam altmışsekiz hasta örneği değerlendirilmiştir.

3.5. Pürifikasyon

PCR ürünleri elde edildikten sonra, nonspesifik bant ve primer artıklarını temizlemek ve daha net görüntü elde etmek amacıyla, jelde yürütülmeden önce, OIAQuick Purification Kiti OIACube cihazında (QIAGEN, Almanya), önerilen protokole uygun biçimde pürifikasyon işlemi yapılmıştır.

3.6. Jelde Yürütme ve Görüntüleme

%1'lik agarda, etidium bromid varlığında, PCR ürünleri yürütülmüştür.

Dye : Dr. Zeydanlı Yükleme Solüsyonu 6X Bromophenol Mavisi 10 ml.(Türkiye)

Marker : DNA Molecular Weight Marker XIII (50-750 baz çifti[bp.]) (Roche

Diagnostics, GmbH, Almanya)

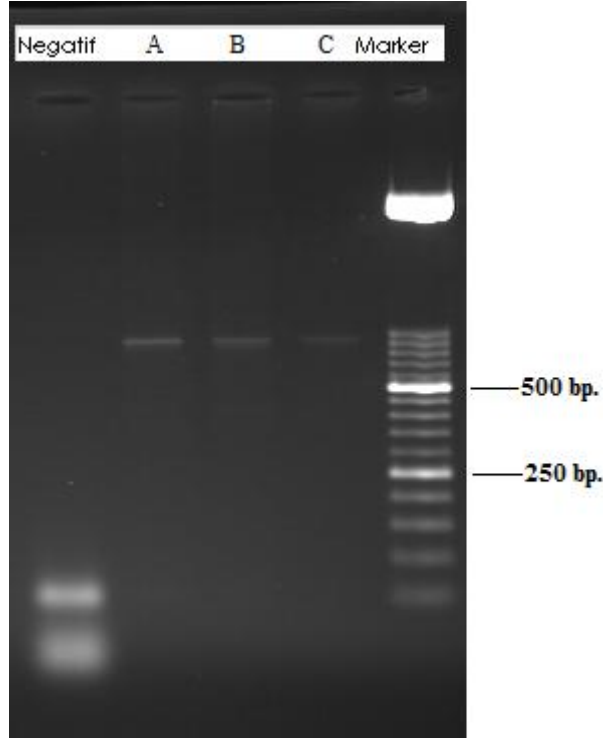
Jeldeki kuyulara konulan Pürifiye DNAmiktarı : 6.5 µl.

Her örnek için kullanılan yaklaşık dye miktarı : 0.5-1 µl.

Konulan marker miktarı : 1.5 µl.

Ürünler, 90 dakika süreyle, 70 volt enerjide yürütülmüştür.

Yürütme işleminden sonra jel, ultraviyole (U.V.) illuminatör cihazına (Syngene Ingenius, Syngene Bio Imaging UV Machine) konulduktan sonra, bilgisayar ortamında Genesnap from Syngene yazılımı kullanılarak görüntüler elde edilmiştir. Kayıt ortamına aktarılmıştır (Bkz. Resim 1).



Resim 1: 3 hastaya ait PCR ürünü (Ürün uzunluğu : 707 bp.)

3.7. TaqI Endonuclease Enzimi İle Kesim

Elde edilen PCR ürünleri, TaqI Endonukleaz enzimi (Fermentas, TaqI #ER0671) ile kesilmiştir.

TaqI enzimi, DNA dizisinde, 5'---TCGA---3' veya 3'---AGCT---5' dizisini tanır ve Timin (T) ve Sitozin (C) bazlarının arasından keser. Sonuçta, 5'---T CGA---3' ve 3'---AGC T---5' şeklinde ayrılmış olur.

Elde ettiğimiz PCR ürünüde bu enzimin tanıyacağı iki bölge vardır. Bu nedenle, mutasyon olmayan bireyin PCR ürünüde, TaqI enzimi iki kesim yapacak ve ürünü 304, 258 ve 145 bp'lik 3 parçaya ayıracaktır. Eğer, mutasyon var ise bu kesim noktalarından birisinin baz dizisi 5'---TCTA---3'veya 3'---ATCT---5' olacağından enzim bu bölgeyi tanıyamayacak ve sadece bir tane kesim yapabilecektir. Sonuçta, 562 bp (304+258 bp'nin kesilmemiş hali) ve 145 bp.'lik iki bant elde edilecektir. Eğer, homozigot mutasyon var ise hep tek kesim işlemi olacak ve hiç 304 ve 258 bp'lik bantlar görülmeyecektir. Bu durumda, sadece 562 ve 145 bp'lik iki bant elde edilecektir.

Enzim Kesim Mix Hazırlanışı:

	x1 (mikrolitre)
Nuclease Free Water	9
10x Taq Buffer	1
Taq I	2
TOPLAM	12
Tüp başına konulan karışım	12
Tüp başına konulan Pürifiye PCR ürünü	10
Son Hacim (Toplam)	22

Oluşan toplam karışım, , Palm-Cycler™ gradient thermal cycling (Corbett Life Science,Avusturalya) cihazı kullanılarak, 65°C'de 16 saat bekletilmiştir. 16 saat sonra, karışımın üzerlerine 0,5 Molar EDTA 'dan 1 µl konularak reaksiyon durdurulmuştur.

3.8. Jelde Yürütme ve Görüntüleme

%1'lik agarda, etidium bromid varlığında, kesim ürünleri yürütüldü.

Dye : Dr. Zeydanlı Yükleme Solüsyonu 6X Bromophenol Mavisi 10 ml.(Türkiye)

Marker : DNA Molecular Weight Marker XIII (50-750 bp.) (Roche Diagnostics, GmbH, Almanya)

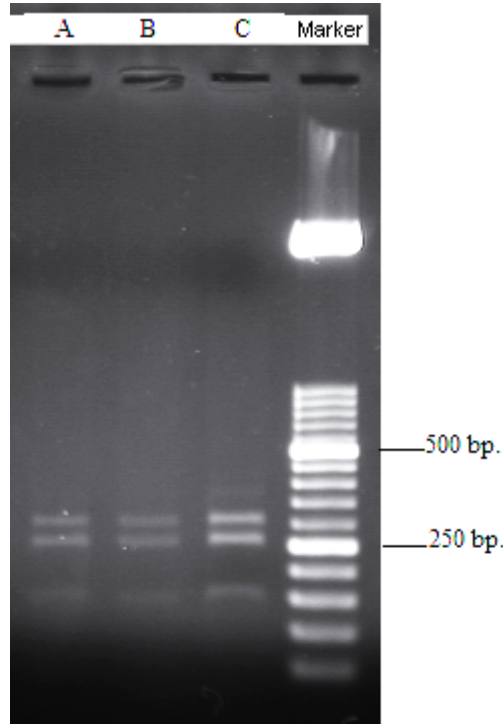
Jeldeki kuyulara konulan karışım miktarı : 6.5 µl.

Her örnek için kullanılan yaklaşık dye miktarı : 0.5-1 µl.

Konulan marker miktarı : 1.5 µl.

Ürünler, 90 dakika süreyle, 70 volt enerjide yürütülmüştür.

Yürütme işleminden sonra jel, ultraviyole (U.V.) illuminatör cihazına (Syngene Ingenius, Syngene Bio Imaging UV Machine) konulduktan sonra, bilgisayar ortamında Genesnap from Syngene yazılımı kullanılarak görüntüler elde edilmiştir. Kayıt ortamına aktarılmıştır (Bkz Resim 2).



Resim 2: Resim 1'de gösterilen hasta örneklerinin, TaqI enzimi ile kesildikten sonra elde edilen görüntüleri

4.BULGULAR

Çalışmada incelenen 68 hastanın örneklerinin hiçbirisinde FIX Padua mutasyonu tespit edilmemiştir.

Gebelik kaybı olmayan gruptaki hasta sayısı 33'tür. Bu gruptaki yaş ortalaması 31,4'tür. Beş hastada antikardiolipin IgG ve IgM değerleri incelenmiş olup, normal seviyede bulunmuştur. Beş hastanın trombofili genlerine yönelik test sonuçları, triple mutasyon analizi ile elde edilmiş olup, araştırmada hastaların DNA'sı kullanılmıştır. Seçilen hastalar içinde iki hasta, gebelik sırasında antikoagülan ilaç kullanmıştır.

Geliş tanıları açısından sınıflandığında;

- Derin ven trombozu / Emboli : 14 hasta
- Retinal damar tıkanıklığı : 3 hasta
- Ailede tromboz öyküsü : 3 hasta
- Diğer (PCOS, Preeklampsi,IUGR vb.) : 13 hasta

Gebelik kaybı olan gruptaki hasta sayısı 35'tir. Bu gruptaki yaş ortalaması 28'dir. Onbir hastada antikardiolipin IgG ve IgM değerleri incelenmiş olup, sadece bir tane hastanın kan örneğinde Antikardiolipin IgM yüksek düzeyde bulunmuş olup, kalan on hastanın örneklerinde normal seviyede bulunmuştur. İki hastanın trombofili genlerine yönelik test sonuçları, triple mutasyon analizi ile elde edilmiş olup, araştırmada hastaların DNA'sı kullanılmıştır. Seçilen hastalar içinde bir hasta, gebelik sırasında antikoagülan ilaç kullanmıştır.

Geliş tanıları açısından sınıflandığında;

- Tekrarlayan gebelik kaybı : 9 hasta
- Gebelik kaybı : 24 hasta
- Diğer : 2 hasta

Her iki grupta çalışılmış olan dört trombofili geni mutasyonu açısından değerlendirildiğinde:

FV Leiden			
	Gebelik kaybı olmayan grup	Gebelik kaybı olan grup	Toplam
Homozigot normal	26 (50%)	26 (50%)	52 (100%)
Heterozigot mutasyon	6 (40%)	9 (60 %)	15 (100%)
Homozigot mutasyon	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)

Protrombin G20210A			
	Gebelik kaybı olmayan grup	Gebelik kaybı olan grup	Toplam
Homozigot normal	25 (43,8%)	32 (46,2%)	57 (100%)
Heterozigot mutasyon	8 (72,72 %)	3 (27,28%)	11 (100%)
Homozigot mutasyon	0 (%)	0 (%)	0 (0%)

MTHFR C677T			
	Gebelik kaybı olmayan grup	Gebelik kaybı olan grup	Toplam
Homozigot normal	12 (41,37%)	17 (58,62%)	29 (100%)
Heterozigot mutasyon	16 (48,48 %)	17 (51,52%)	33 (100%)
Homozigot mutasyon	5 (83,3 %)	1 (16,7%)	6 (100%)

MTHFR A1298C			
	Gebelik kaybı olmayan grup	Gebelik kaybı olan grup	Toplam
Homozigot normal	10 (40%)	15 (60%)	25 (100%)
Heterozigot mutasyon	19 (57,57%)	14 (42,43%)	33 (100%)
Homozigot mutasyon	4 (40%)	6 (60%)	10 (100%)

5.TARTIŞMA

Gebelik kayıplarının pek çok nedeni vardır. Günümüze kadar tanımlanmış olan etkenler, tüm kayıpları açıklayamamaktadır. Birçok gebelik kaybı, etyolojik açıdan aydınlatılmayı beklemektedir. Gebelik, çok yönlü sistemik değişimlerin yaşandığı bir süreçtir. Tromboz, pek çok karmaşık mekanizma ve etkenin rol oynadığı bir reaksiyon dizisidir. Hem gebelik, hem de tromboz beraber ele alındığında, durum daha da karmaşık bir hal almaktadır.

Çalışmamızda, gebelik kayıplarının aydınlatılması açısından, FIX Padua mutasyonun etkisinin olup olmadığını, eğer anlamlı bir etki tespit edilirse bu etkinin ne kadar önemli olduğunu tespit etmeye yönelik test yapılmıştır. Gebelik kaybı olan kadınların seçiminde, gebelik kaybının herhangi bir nedene bağlan(a)mamış olmasına dikkat edildi. Araştırılmak istenen diğer bir nokta ise, tromboza yatkınlık oluşturduğu bilinen genler yönünden benzer bireylerde, FIX Padua mutasyonunun varlığının, gebelik kayıpları açısından ek olarak bir katkı yapıp yapmadığını belirlemek idi. Ancak, hiçbir hasta örneğinde mutasyon tespit edilemediği için cevabı merak edilen bu sorular, yanıtlanamadı. Bu nedenle, hasta örneklerinde daha önceden çalışılmış olan dört mutasyon çeşidinin hastalarımızda dağılımı üzerinde duruldu. Bu dört mutasyon ile ilgili yayımlanan veriler, meta-analizler değerlendirildi.

Araştırmacılar, trombofili genlerinin, gebelik komplikasyonları, derin ven trombozu gibi trombozun önemli rol aldığı durumlardaki etkinliğinin araştırılması sırasında elde edilen bazı çelişkili sonuçları, seçilen popülasyonun sayısının yetersizliğine, homojen olmayışına, muhtemel diğer etkenlerin ekarte edilemeyeşine, etnik farkların yeterli değerlendirilmeyişi gibi birtakım nedenlere bağlamaktadırlar. Çalışmamızda seçilen hasta sayısının yeterli düzeye çıkarılması gerekmektedir. Seçilen hastalar için gerçekleştirilen incelemeler, hastalar arasında farklılık göstermektedir. Çalışmamız, retrospektif bir çalışma olduğundan, veriler yeterli düzeyde aydınlatıcı olamamıştır. Bu nedenle, prospektif, yeterli sayıda popülasyonun seçildiği, gebelik kayıplarının etyolojisinde yer alan etkenlere sahip olmayan grupların dahil edildiği bir çalışmanın yapılması gerekmektedir.

Robertson ve ark., bir sistematik gözden geçirme çalışmasında, FV Leiden, Protrombin G20210A ve MTHFR C677T mutasyonları ile, Antitrombin eksikliği, Protein C eksikliği ve Protein S eksikliğinin, venöz tromboembolizm, erken ve geç gebelik kaybı, preeklampsi, plasental abrupsiyon, intrauterin gelişme geriliği ile ilişkisini araştıran yayınları bir arada değerlendirmişlerdir [78]. Bu çalışmaya göre, MTHFR C677T homozigot mutasyonları haricinde tüm kalıtsal trombofililer, artmış venöz tromboembolizm riski ile ilişkilidir. MTHFR mutasyonu açısından homozigot olan vakaların durumunun heterojenite gösterdiği belirtilmiştir. Trombofili ile erken gebelik kaybı arasındaki ilişkiyi inceleyen 25 çalışmanın, genel olarak pozitif ilişki gösterdiği, lupus antikoagülanları için anlamlı heterojenite ve tutarsızlık gözlemlendiği belirtilmiştir. Onbeş çalışma değerlendirilerek, geç gebelik kaybı ile heterozigot FV Leiden ve protrombin taşıyıcılığı, protein S eksikliği ve antikardiolipin antikorları arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Yirmibeş çalışma değerlendirilerek, preeklampsi ile heterozigot FV Leiden ve protrombin taşıyıcılığı,

homozigot MTHFR mutasyonu varlığı, antikardiolipin antikorları ve hiperhomosisteinemi arasında anlamlı bir ilişkinin gözlemlendiği, FV Leiden heterozigot mutasyon taşıyıcılığı açısından heterojenite olduğu bildirilmiştir. Yedi çalışma değerlendirilerek, bir bütün olarak bakılınca, trombofili ile artmış plasental abrupsiyon riski olduğu, ancak, anlamlı ilişkinin sadece heterozigot FV Leiden ve protrombin taşıyıcılığı ile kurulabildiği belirtilmiştir. Son olarak, beş çalışma irdelenerek, trombofilisi olan gebe kadınlarda artmış IUGR riski için genel bir eğilim olduğu ancak sadece bir çalışmaya dayanarak, anlamlı bir ilişkinin sadece antikardiolipin antikorları ile kurulabildiği belirtilmiştir.

Rodger ve ark. da benzer bir çalışma yapmıştır [29]. Bu çalışmada, FV Leiden ve Protrombin gen mutasyonu ile plasenta aracılı gebelik komplikasyonları arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. FV Leiden mutasyonu taşıyan kadınların, geç gebelik kaybı yönünden az da olsa net bir artmış risk taşıdıkları, buna karşın, FV Leiden veya protrombin gen mutasyonunu taşıyan kadınların artmış preeklampsi veya düşük doğum ağırlıklı bebek doğurma riski taşımadıkları belirtilmiştir.

Kovalevsky ve ark., rekürren gebelik kaybı (iki veya daha fazla spontan abortus olarak tanımlanmıştır) ile herediter trombofili arasındaki ilişkiyi değerlendiren bir meta-analiz çalışması yapmışlardır [79]. Bu çalışmada, FV Leiden ve protrombin G20210A taşıyıcılığının, rekürren gebelik kaybı riskini, bu mutasyonu taşımayan bireylere göre ikiye katladığını belirtmişlerdir.

Lissalde-Lavigne ve ark., FV Leiden ve protrombin G20210A taşıyıcılığının venöz tromboembolizm için ılımlı düzeyde bir risk ortaya koyduğunu ve gebeliğin 10. haftasından sonra gerçekleşen gebelik kaybı açısından ılımlı ama anlamlı düzeyde bir risk ortaya koyduğunu belirtmişlerdir [80].

Howley ve ark., FV Leiden ve protrombin gen varyantının, IUGR ile ilişkisini değerlendiren bir meta-analiz çalışması yapmışlardır [81]. Bu çalışmada, her iki mutasyonun, IUGR ile doğum riskini artırdığını tespit etmişlerdir.

6.SONUÇLAR

İkinci ve üçüncü trimester gebelik kayıplarında FIX Padua mutasyonunun etkisini araştırdığımız bu çalışmada, seçilen hasta örneklerinde FIX Padua mutasyonu tespit edilmemiştir. Bu nedenle, nedeni bilinmeyen gebelik kayıpları ile FIX Padua mutasyonu arasında bir ilişki kurulamamıştır.

Prospektif, gebelik kayıplarının etyolojisi açısından detaylı değerlendirilen ve herhangi bir nedene bağlanmayan yeterli sayıda hastanın seçildiği çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Literatürde, FIX Padua mutasyonunun gebelik kayıpları üzerindeki etkisini araştıran bir veri bulunmamaktadır. Bu nedenle, çalışmamız bu açıdan farklılık göstermektedir.

7.ÖZET

İKİNCİ VE ÜÇÜNCÜ TRİMESTER GEBELİK KAYIPLARINDA FIX PADUA MUTASYONUNUN ETKİSİ

Giriş ve amaç: Bu çalışmada amaç, ikinci ve üçüncü trimester gebelik kayıplarında FIX Padua mutasyonunun etkisini değerlendirmektir.

Materyal metod: Çalışmada, Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genetik Merkezi'nde trombofili genlerine yönelik çalışılmış olan test sonuçları ve hastane kayıtları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Gebelik kayıpları olan ve gebelik kaybı olmayan iki hasta grubu oluşturulmuştur. Hastaların saklı tutulan DNA materyalleri kullanılarak, PCR, pürifikasyon ve TaqI enzimi ile kesimleri yapılmıştır. Elde edilen ürünler jelde yürütülüp değerlendirilmiştir. Homozigot normal bir bireyde 304, 258 ve 145 bp.'lik üç bant görülmesi gerekmektedir. Hasta örnekleri, bu bilgi doğrultusunda değerlendirilmiştir.

Bulgular: Hasta örneklerinin hiçbirisinde FIX Padua mutasyonu tespit edilmemiştir. Hastaların trombofili genlerine yönelik çalışılmış olan test sonuçları değerlendirilerek, literatür verileri sunulmuştur.

Sonuç: FIX Padua mutasyonu ile gebelik kayıpları arasında bir ilişki kurulamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Gebelik kayıpları, FIX Padua, ikinci trimester, üçüncü trimester

8.ABSTRACT

THE EFFECT OF FIX PADUA MUTATION ON SECOND AND THIRD TRIMESTER PREGNANCY LOSSES

Introduction and Aim: The aim of this study is to evaluate the possible effect of FIX Padua mutation on the second and third trimester pregnancy losses.

Materials and Method: In this study, patient data and thrombophilia test results which are performed at Dr. Zekai Tahir Burak Woman's Health Education and Research Hospital Genetic Center were evaluated retrospectively. Two groups are designed which are defined as pregnancy loss negative and pregnancy loss positive, respectively. Stored DNA of patients' are used to perform PCR, purification and TaqI enzyme restriction. Products of these reactions are put to agarose gel electrophoresis. A homozygote normal patient sample will give three bands which are 305, 258 and 145 bp.. The samples are evaluated according to this information.

Findings: None of samples were carrying FIX Padua mutation. Thrombophilia test results are evaluated and literature data are given.

Conclusion: No association between FIX Padua mutation and pregnancy losses could be detected.

Key Words: Pregnancy losses, FIX Padua, second trimester, third trimester

9. KAYNAKLAR

1. Simioni, P., et al., *X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua)*. The New England journal of medicine, 2009. **361**(17): p. 1671-5.
2. Adams, R.L. and R.J. Bird, *Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants*. Nephrology, 2009. **14**(5): p. 462-70.
3. Key, N.S., J.G. Geng, and R.R. Bach, *Tissue factor; from Morawitz to microparticles*. Transactions of the American Clinical and Climatological Association, 2007. **118**: p. 165-73.
4. Romney, G. and M. Glick, *An updated concept of coagulation with clinical implications*. Journal of the American Dental Association, 2009. **140**(5): p. 567-74.
5. ANTIP Yayınları, Klinik Hematoloji Kitabı, Sayfa:243-244
6. Davie, E.W., *A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(51): p. 50819-32.
7. Bungay, S.D., *Modelling the effect of amplification pathway factors on thrombin generation: A comparison of hemophilias*. Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis, 2008. **38**(1): p. 41-7.
8. Mann, K.G., et al., *Models of blood coagulation*. Blood cells, molecules & diseases, 2006. **36**(2): p. 108-17.
9. Mackman, N., R.E. Tilley, and N.S. Key, *Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2007. **27**(8): p. 1687-93.
10. Drake, T.A., J.H. Morrissey, and T.S. Edgington, *Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis*. The American journal of pathology, 1989. **134**(5): p. 1087-97.
11. Butenas, S. and K.G. Mann, *Blood coagulation*. Biochemistry. Biokhimiia, 2002. **67**(1): p. 3-12.
12. Mann, K.G., S. Butenas, and K. Brummel, *The dynamics of thrombin formation*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2003. **23**(1): p. 17-25.
13. Monroe, D.M. and M. Hoffman, *What does it take to make the perfect clot? Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2006. **26**(1): p. 41-8.
14. Bouma, B.N. and L.O. Mosnier, *Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) at the interface between coagulation and fibrinolysis*. Pathophysiology of haemostasis and thrombosis, 2003. **33**(5-6): p. 375-381.
15. Sprengers, E.D. and C. Kluft, *Plasminogen activator inhibitors*. Blood, 1987. **69**(2): p. 381-7.
16. ANTIP Yayınları, Klinik Hematoloji Kitabı, Sayfa:252
17. Korte, W., S. Clarke, and J.B. Lefkowitz, *Short activated partial thromboplastin times are related to increased thrombin generation and an increased risk for thromboembolism*. American journal of clinical pathology, 2000. **113**(1): p. 123-7.
18. Yang, L., C. Manithody, and A.R. Rezaie, *Localization of the heparin binding exosite of factor IXa*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(52): p. 50756-60.
19. Lwaleed, B.A. and P.S. Bass, *Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease*. The Journal of pathology, 2006. **208**(3): p. 327-339.
20. Berkner, K.L., *The vitamin K-dependent carboxylase*. The Journal of nutrition, 2000. **130**(8): p. 1877-80.
21. Coutu, D.L., et al., *Periostin, a member of a novel family of vitamin K-dependent proteins, is expressed by mesenchymal stromal cells*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(26): p. 17991-8001.
22. Manfioletti, G., et al., *The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade*. Molecular and cellular biology, 1993. **13**(8): p. 4976-85.

23. Hafizi, S. and B. Dahlback, *Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily*. The FEBS journal, 2006. **273**(23): p. 5231-44.
24. Limdi, N.A. and D.L. Veenstra, *Warfarin pharmacogenetics*. Pharmacotherapy, 2008. **28**(9): p. 1084-97.
25. Scott, S.A., et al., *Warfarin pharmacogenetics: CYP2C9 and VKORC1 genotypes predict different sensitivity and resistance frequencies in the Ashkenazi and Sephardi Jewish populations*. American journal of human genetics, 2008. **82**(2): p. 495-500.
26. Chuang, Y.J., et al., *Heparin enhances the specificity of antithrombin for thrombin and factor Xa independent of the reactive center loop sequence. Evidence for an exosite determinant of factor Xa specificity in heparin-activated antithrombin*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(18): p. 14961-71.
27. Koulen, P. and B.E. Ehrlich, *Reversible block of the calcium release channel/ryanodine receptor by protamine, a heparin antidote*. Molecular biology of the cell, 2000. **11**(7): p. 2213-9.
28. Dresang, L.T., et al., *Venous thromboembolism during pregnancy*. American family physician, 2008. **77**(12): p. 1709-16.
29. Rodger, M.A., et al., *The association of factor V leiden and prothrombin gene mutation and placenta-mediated pregnancy complications: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies*. PLoS medicine, 2010. **7**(6): p. e1000292.
30. Greer, I.A., *Thrombophilia: implications for pregnancy outcome*. Thrombosis research, 2003. **109**(2-3): p. 73-81.
31. Farquharson, R.G., E. Jauniaux, and N. Exalto, *Updated and revised nomenclature for description of early pregnancy events*. Human reproduction, 2005. **20**(11): p. 3008-11.
32. Nguyen, R.H. and A.J. Wilcox, *Terms in reproductive and perinatal epidemiology: 2. Perinatal terms*. Journal of epidemiology and community health, 2005. **59**(12): p. 1019-21.
33. Nguyen, R.H. and A.J. Wilcox, *Terms in reproductive and perinatal epidemiology: 1. Reproductive terms*. Journal of epidemiology and community health, 2005. **59**(11): p. 916-9.
34. Michels, T.C. and A.Y. Tiu, *Second trimester pregnancy loss*. American family physician, 2007. **76**(9): p. 1341-6.
35. Pabinger, I. and R. Vormittag, *Thrombophilia and pregnancy outcomes*. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH, 2005. **3**(8): p. 1603-10.
36. van Walraven, C., et al., *Risk of subsequent thromboembolism for patients with pre-eclampsia*. BMJ, 2003. **326**(7393): p. 791-2.
37. Cugno, M., et al., *Antibodies to tissue-type plasminogen activator (tPA) in patients with antiphospholipid syndrome: evidence of interaction between the antibodies and the catalytic domain of tPA in 2 patients*. Blood, 2004. **103**(6): p. 2121-6.
38. Cesarman-Maus, G., et al., *Autoantibodies against the fibrinolytic receptor, annexin 2, in antiphospholipid syndrome*. Blood, 2006. **107**(11): p. 4375-82.
39. Yang, C.D., et al., *Identification of anti-plasmin antibodies in the antiphospholipid syndrome that inhibit degradation of fibrin*. Journal of immunology, 2004. **172**(9): p. 5765-73.
40. Giannakopoulos, B., et al., *Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome*. Blood, 2007. **109**(2): p. 422-30.
41. Lim, W., *Antiphospholipid antibody syndrome*. Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program, 2009: p. 233-9.
42. Miyakis, S., et al., *International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS)*. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH, 2006. **4**(2): p. 295-306.
43. Bates, S.M., *Consultative hematology: the pregnant patient pregnancy loss*. Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program, 2010. **2010**: p. 166-72.

44. Coppens, M., S.P. Kaandorp, and S. Middeldorp, *Inherited thrombophilias*. Obstetrics and gynecology clinics of North America, 2006. **33**(3): p. 357-74.
45. Gehring, N.H., et al., *Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia*. Nature genetics, 2001. **28**(4): p. 389-92.
46. Poort, S.R., et al., *A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis*. Blood, 1996. **88**(10): p. 3698-703.
47. Selhub, J. and J.W. Miller, *The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine*. The American journal of clinical nutrition, 1992. **55**(1): p. 131-8.
48. Brustolin, S., R. Giugliani, and T.M. Felix, *Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders*. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.], 2010. **43**(1): p. 1-7.
49. Smulders, Y.M. and H.J. Blom, *The homocysteine controversy*. Journal of inherited metabolic disease, 2011. **34**(1): p. 93-9.
50. Zhu, B.T., *On the mechanism of homocysteine pathophysiology and pathogenesis: a unifying hypothesis*. Histology and histopathology, 2002. **17**(4): p. 1283-91.
51. Stein, J.H. and P.E. McBride, *Hyperhomocysteinemia and atherosclerotic vascular disease: pathophysiology, screening, and treatment*. off. Archives of internal medicine, 1998. **158**(12): p. 1301-6.
52. Blom, H.J. and Y. Smulders, *Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects*. Journal of inherited metabolic disease, 2011. **34**(1): p. 75-81.
53. Foster, D.C., S. Yoshitake, and E.W. Davie, *The nucleotide sequence of the gene for human protein C*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1985. **82**(14): p. 4673-7.
54. Millar, D.S., et al., *Molecular genetic analysis of severe protein C deficiency*. Human genetics, 2000. **106**(6): p. 646-53.
55. Romeo, G., et al., *Hereditary thrombophilia: identification of nonsense and missense mutations in the protein C gene*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987. **84**(9): p. 2829-32.
56. Reitsma, P.H., *Protein C deficiency: summary of the 1995 database update*. Nucleic acids research, 1996. **24**(1): p. 157-9.
57. Formstone, C.J., et al., *Detection and characterization of seven novel protein S (PROS) gene lesions: evaluation of reverse transcript-polymerase chain reaction as a mutation screening strategy*. Blood, 1995. **86**(7): p. 2632-41.
58. Espinosa-Parrilla, Y., et al., *Protein S gene analysis reveals the presence of a cosegregating mutation in most pedigrees with type I but not type III PS deficiency*. Human mutation, 1999. **14**(1): p. 30-9.
59. Pintao, M.C., et al., *Gross deletions/duplications in PROS1 are relatively common in point mutation-negative hereditary protein S deficiency*. Human genetics, 2009. **126**(3): p. 449-56.
60. Fischer, D., et al., *Intracerebral mass bleeding in a term neonate: manifestation of hereditary protein S deficiency with a new mutation in the PROS1 gene*. Neonatology, 2010. **98**(4): p. 337-40.
61. Pung-amritt, P., et al., *Compound heterozygosity for one novel and one recurrent mutation in a Thai patient with severe protein S deficiency*. Thrombosis and haemostasis, 1999. **81**(2): p. 189-92.
62. Baglin, T., et al., *Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia*. British journal of haematology, 2010. **149**(2): p. 209-20.

63. Bates, S.M., et al., *Venous thromboembolism, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition)*. Chest, 2008. **133**(6 Suppl): p. 844S-886S.
64. Anson, D.S., et al., *The gene structure of human anti-haemophilic factor IX*. The EMBO journal, 1984. **3**(5): p. 1053-60.
65. Chen, S.H., et al., *An intragenic deletion of the factor IX gene in a family with hemophilia B*. The Journal of clinical investigation, 1985. **76**(6): p. 2161-4.
66. Matthews, R.J., et al., *Carrier detection through the use of abnormal deletion junction fragments in a case of haemophilia B involving complete deletion of the factor IX gene*. J Med Genet, 1988. **25**(11): p. 779-80.
67. Giannelli, F., et al., *Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions--fourth edition, 1993*. Nucleic acids research, 1993. **21**(13): p. 3075-87.
68. Ketterling, R.P., E. Vielhaber, and S.S. Sommer, *The rates of G:C-->T:A and G:C-->C:G transversions at CpG dinucleotides in the human factor IX gene*. American journal of human genetics, 1994. **54**(5): p. 831-5.
69. Giannelli, F., et al., *Haemophilia B (sixth edition): a database of point mutations and short additions and deletions*. Nucleic acids research, 1996. **24**(1): p. 103-18.
70. Giannelli, F., et al., *Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions, 7th edition*. Nucleic acids research, 1997. **25**(1): p. 133-5.
71. Ljung, R., et al., *Haemophilia B mutations in Sweden: a population-based study of mutational heterogeneity*. British journal of haematology, 2001. **113**(1): p. 81-6.
72. van Hylckama Vlieg, A., et al., *High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis*. Blood, 2000. **95**(12): p. 3678-82.
73. Bezemer, I.D., et al., *F9 Malmo, factor IX and deep vein thrombosis*. Haematologica, 2009. **94**(5): p. 693-9.
74. Chang, J., et al., *Changing residue 338 in human factor IX from arginine to alanine causes an increase in catalytic activity*. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(20): p. 12089-94.
75. Schuettrumpf, J., et al., *Factor IX variants improve gene therapy efficacy for hemophilia B*. Blood, 2005. **105**(6): p. 2316-23.
76. Mazetto Bde, M., et al., *Prevalence of Factor IX-R338L (Factor IX Padua) in a cohort of patients with venous thromboembolism and mild elevation of factor IX levels*. Thrombosis research, 2010. **126**(2): p. e165.
77. Koenderman, J.S., et al., *Factor IX-R338L (Factor IX Padua) screening in a Dutch population of sibpairs with early onset venous thromboembolism*. Thrombosis research, 2011. **128**(6): p. 603.
78. Robertson, L., et al., *Thrombophilia in pregnancy: a systematic review*. British journal of haematology, 2006. **132**(2): p. 171-96.
79. Kovalevsky, G., et al., *Evaluation of the association between hereditary thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis*. Archives of internal medicine, 2004. **164**(5): p. 558-63.
80. Lissalde-Lavigne, G., et al., *The association between hereditary thrombophilias and pregnancy loss*. Haematologica, 2005. **90**(9): p. 1223-30.
81. Howley, H.E., M. Walker, and M.A. Rodger, *A systematic review of the association between factor V Leiden or prothrombin gene variant and intrauterine growth restriction*. American journal of obstetrics and gynecology, 2005. **192**(3): p. 694-708.