

TC
ÇANAKKALE ON SEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI



ABORTUS ETİYOLOJİSİNDE EMBRİYONAL VE PARENTAL
GENETİK FAKTÖRLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr Sinem (ATİK) YALÇINTEPE

TEZ DANIŞMANI

Prof Dr Öztürk ÖZDEMİR

Çanakkale/2013

TC
ÇANAKKALE ON SEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**ABORTUS ETİYOLOJİSİNDE EMBRİYONAL VE PARENTAL
GENETİK FAKTÖRLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr Sinem (ATİK) YALÇINTEPE

TEZ DANIŞMANI

Prof Dr Öztürk ÖZDEMİR

Çanakkale/2013

Bu araştırma Çanakkale On Sekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar
Projeleri tarafından 2012/029 numaralı proje ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince bilgi ve deneyimleri ile yetişmemi sağlayan, bana akademik bakış açısı kazandıran değerli hocam Prof Dr Öztürk Özdemir'e,
Her konuda bilgileri ile eğitim süremde ve içtenliğiyle her durumda yanımda olan değerli hocam Prof Dr Fatma Sılan'a,
Asistanlık eğitimim boyunca gösterdiği ilgi ve yardımlarından dolayı değerli hocam Yrd Doç Dr Ahmet Uludağ'a,
Tez çalışmamda bana çok yardımcı olan Kadın Hastalıkları ve Doğum hocalarım ve asistanlarına,
Rotasyon eğitimlerim süresince bilgi ve becerilerimi kazanmamda katkılarını aldığım tüm hocalarıma,
Eğitimimiz için alt yapı sağlayan fakültemiz dekanlığı ve hastanemiz başhekimliğine,
Özel anılarımı paylaştığım, hayat boyu sevgiyle hatırlayacağım çalışma arkadaşlarım Şengül Türünz, Özlem Değirmenci Albayrakoğlu, Didem Uysal, Duygu Kankaya, Hülya Göveç, Çisem Akurut, Ümit Karadeli ve Mine Urfalı'ya,
Acı, tatlı her günümde yanımda olan, hayatıma renk katan çok sevgili arkadaşlarıma,
Yaşamım boyunca pozitifliğiyle iyi ve kötü günlerimde arkamda duran, sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen aileme,
Bana şanslı olduğumu hissettiren, kendisiyle gurur duyduğum, eğitimim ve tezim boyunca en büyük destekçim olan sevgili eşime,

EN İÇTEN TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM

ÖZET

Amaç: Spontan veya tekrarlayan gebelik kayıplarında genetik etiyojide sadece maternal değil, fetal ve paternal genetik faktörlerin de rolü olup olmadığının belirlenmesidir. Bu amaçla anne, baba ve düşük materyaline ait çeşitli polimorfizmlerin ve düşük materyalindeki sayısal kromozomal anomalilerin analizi hedeflenmiştir.

Yöntem: Bu çalışmaya iki ya da daha fazla düşüğü olan 56 kadın ve bu kadınların eşleri, kontrol grubu olarak en az iki yaşayan çocuğı olan ve hiç spontan abortusu olmayan 43 kadın ve bu kadınların eşleri, ayrıca herhangi bir gebeliğı spontan olarak sonlanan 22 anne ve bu annelere ait 23 düşük materyali dokusu dahil edilmiştir. Tüm gruplara ait toplam 243 örnekten genomik DNA izolasyonu sonrası, Faktör V Leiden (FVL), Protrombin G20210A, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, PAI-1 5G/4G, ACE I/D, eNOS E298D, Apo E E2/E3/E4, VEGF A C936T, VEGF A C2578A, VEGF A C405G, VEGF A C460T polimorfizm analizleri için Real Time PCR yöntemi, düşük materyallerine ait analiz için QF-PCR yöntemi kullanılmıştır. Tüm habituel abortus çiftlerine (112 birey) sitogenetik analiz yapılmıştır.

Bulgular: 23 düşük materyalinden 7 tanesinde sayısal kromozomal anomali (iki trizomi 21, iki trizomi 13, iki triploidi, bir monozomi X) saptanmıştır. Çalışılan polimorfizmlerden FVL, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, PAI-1 5G/4G, ACE I/D, eNOS E298D, Apo E E2/E3/E4, VEGF A C405G, VEGF A C936T, VEGF A C460T polimorfizmleri ile spontan veya tekrarlayan gebelik kayıpları arasında ilişki olduğu ($p<0.05$) bulunmuştur. Tekrarlayan gebelik kaybı olan çiftlerde kromozom anomalisi saptanmamıştır.

Sonuç: Gebelik kayıplarında sadece anneye değil, baba ve fetuse ait genetik faktörlerin de etiyojide araştırılmasında göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gebelik kayıpları, Polimorfizm, Trombofili, Real Time PCR, QF-PCR

ABSTRACT

Purpose: It was aimed to determine whether fetal and paternal genetic factors not only maternal factors have any role in genetic etiology of spontaneous or recurrent pregnancy losses. With this purpose, analysis of various polymorphisms in mother, father and abortion material, and numerical chromosomal anomalies in abortion materials were planned.

Material and Methods: 56 women with two or more spontaneous abortions and their husbands, 43 women with two or more living children, without any spontaneous abortion and their husbands as control group, and 22 women with a spontaneous abortion and their 23 abortion materials are included in this study. Real Time PCR was used for analysis of FVL, Protrombin G20210A, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, PAI-1 5G/4G, ACE I/D, eNOS E298D, Apo E E2/E3/E4, VEGF A C936T, VEGF A C2578A, VEGF A C405G, VEGF A C460T polymorphisms, QF-PCR was used for analysis of abortion materials after genomic DNA isolation in total of 243 samples of all groups. Cytogenetic analysis was done to all recurrent pregnancy couples (112 people).

Results: In 7 of 23 abortion materials, numerical chromosomal anomaly was detected (trisomy 21 in two, trisomy 13 in two, triploidy in two, monosomy X in one). Also we detected a relationship between FVL, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, PAI-1 5G/4G, ACE I/D, eNOS E298D, Apo E E2/E3/E4, VEGF A C405G, VEGF A C936T, VEGF A C460T polymorphisms and spontaneous or recurrent pregnancy losses ($p < 0.05$). There was not any chromosomal anomaly in recurrent pregnancy couples.

Conclusion: Genetic factors of father and fetus, not only of mother should be considered for searching etiologic factors in pregnancy losses.

Key Words: Abortions, Polymorphism, Trombophilia, Real Time PCR, QF-PCR

İÇİNDEKİLER

İç kapak	i
Kabul-onay sayfası	ii
Teşekkür	iii
Özet ve anahtar sözcükler	iv
İngilizce özet (Abstract and key words)	v
İçindekiler	vi
Kısaltmalar ve simgeler dizini	ix
Şekiller dizini	xii
Tablolar dizini	xiii
Giriş ve Amaç	1
Genel Bilgiler	3
2.1.Abortus	3
2.1.1.Spontan Abortus	3
2.1.1.1.Spontan Abortus Nedenleri	3
2.1.2. Habituel Abortus	3
2.1.2.1.Habituel Abortus Nedenleri	4
2.1.2.1.1.Genetik Nedenler	4
2.1.2.1.2.Anatomik Anomaliler	5
2.1.2.1.3.Endokrin Bozukluklar	7
2.1.2.1.4.Enfeksiyonlar	7
2.1.2.1.5.İmmunolojik Faktörler	8
2.1.2.1.6.Sistemik Hastalıklar	8
2.1.2.1.7.Çevresel Faktörler	8
2.1.2.1.8.Koagülasyon Sistemine ait Patolojiler	9
2.2.Kantitatif floresan PCR	11
[Quantitative Fluorescence PCR (QF-PCR)]	
2.3.Real Time PCR	13
2.3.1.LightCycler Sistemi	14

2.3.1.1.Cyber Green Sistemi	14
2.3.1.2.TaqMan Sistemi	14
2.4.Polimorfizm	15
2.4.1.Faktör V Leiden G1691A Polimorfizmi	16
2.4.2.Protrombin G20210A Polimorfizmi	17
2.4.3.MTHFR C677T ve A1298C Polimorfizmleri	19
2.4.4.PAI-1 5G/4G Polimorfizmi	22
2.4.5.ACE I/D Polimorfizmi	24
2.4.6.eNOS E298D Polimorfizmi	25
2.4.7.Apo E E2/E3/E4 Polimorfizmleri	27
2.4.8.VEGF C405G, C460T, C936T, C2578A Polimorfizmleri	28
Gereç ve Yöntem	32
3.1.Hasta Grupları	32
3.2.Sitogenetik Analiz	33
3.3.Polimorfizmlerin Analizi	34
3.3.1.DNA İzolasyonu	34
3.3.2.Real Time PCR (Roche, Mannheim, Almanya) ile Mutasyon Analizi	35
3.3.2.1.FVL G1691A	35
3.3.2.2.Faktör II (Protrombin) G20210A	36
3.3.2.3.MTHFR C677T	36
3.3.2.4.MTHFR A1298C	37
3.3.2.5.PAI-1 5G/4G	37
3.3.2.6.ACE I/D	38
3.3.2.7.eNOS E298D	39
3.3.2.8.Apo E E2/E3/E4	39
3.3.2.9.VEGF C405G	40
3.3.2.10.VEGFA C460T	41
3.3.2.11.VEGFA C936T	41
3.3.2.12.VEGFA C2578A	42
3.4.Düşük Materyalinden QF-PCR Analizi	42

3.4.1.DNA İzolasyonu	42
3.4.2.PCR Hazırlığı	43
İstatistik	45
Bulgular	45
5.1. Habituel Abortus ve Kontrol Grubu Bulguları	46
5.2.Spontan Abortuslara Ait Bulgular	63
Tartışma	85
Sonuç ve Öneriler	99
Kaynaklar	102
Ekler	121
9.1.Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	121
9.1.1.Kullanılan Cihaz Listesi	121
9.1.2.Kullanılan Malzeme Listesi	121
9.2.Özgeçmiş	123

KISALTMALAR VE SİMGELER

QF-PCR	:Kantitatif Floresan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Fluorescent Polimerase Chain Reaction)
FVL	:Faktör V Leiden
MTHFR	:Metilen Tetra Hidro Folat Redüktaz
PAI	:Plazminojen Aktivatör İnhibitör
ACE	:Angiotensin Converting Enzyme (Anjiotensin Dönüştürücü Enzim)
eNOS	:Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
Apo E	:Apolipoprotein E
VEGF	:Vascular Endotelial Growth Factor (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)
PCR	:Polimerase Chain Reaction (Poimeraz Zincir Reaksiyonu)
PCOS	:Polikistik Over Sendromu
TSH	:Tiroid Stimülan Hormon
HbA1C	:Hemoglobin A1C
HMW	:Heavy Molecular Weight (Yüksek molekül ağırlıklı)
PZ	:Protrombin Zamanı
aPTZ	:Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı
CVS	:Chorion Villus Sampling (Koryon Villus Biyopsisi)
DNA	:Deoksiribo Nükleik Asit
STR	:Short Tandem Repeat (Kısa dizi tekrarları)
CT	:Threshold Cycle
FRET	:Fluoresance Resonance Energy Transfer
6-FAM	:6-carboxyfluorescein
TAMRA	:6-carboxy-tetramethyl-rhodamine
Taq	:Termus Aquaticus
SNP	:Single Nucleotide Polymorphism
VNTR	:Variable Number of Tandem Repeats
kDa	:Kilodalton
3'-UTR	:3' untranslated region

VTE	:Venöz tromboemboli
A	:Adenin
T	:Timin
C	:Sitozin
G	:Guanin
ALL	:Akut Lenfoblastik Lösemi
bç	:Baz çifti
kb	:Kilobaz
I	:Insertion
D	:Deletion
cDNA	:Complementary DNA
mRNA	:Messennger RNA
TNP	:Tek Nükleotid Polimorfizmi
NO	:Nitrik Oksit
HDL	:High Density Lipoprotein
LDL	:Low Density Lipoprotein
VLDL	:Very Low Density Lipoprotein
ALS	:Amyotrofik Lateral Skleroz
TRR	:Tahmini Rölatif Risk
GTG	:Giemsa Bantlama
ml	:Mililitre
µl	:Mikrolitre
rpm	:Round Per Minute
KCl	:Potasyom Klorür
M	:Molar
ISCN	:International System for Human Cytogenetics
EDTA	:Ethylenediaminetetraacetic acid
PBS	:Phosphate Buffered Saline
RNA	:Ribo Nükleik Asit
dATP	:Deoxyadenosine Triphosphate
dCTP	:Deoxycytidine Triphosphate
dGTP	:Deoxyguanosine Triphosphate

dUTP	:Deoxyuridine Triphosphate
dTTP	:Deoxythymidine Triphosphate
H₂O	:Su
CRF	:Control Reaction Fluid
WT	:Wild Type
MUT	:Mutant Type
T_m	:Melting Temperature
Mg⁺²	:Magnezyum
RPL	:Recurrent Pregnancy Loss (Tekrarlayan Gebelik Kaybı)
CGH	:Comperative Genomic Hybridization
CNV	:Copy Number Variation
FISH	:Fluorescent in situ Hybridization

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. İntrensek ve ekstrensek yolları gösteren koagülasyon kaskadı	11
Şekil 2.2. Kromozomal anomali saptanmayan bir düşük materyaline ait QF-PCR analizi sonucunda elde edilen X22 (a), HPRT (b) ve D21S1414 (c) markerlarına ait piklerdeki 1:1 görüntüsü. Analizi yapılan örnekte iki adet X ile iki adet 21 numaralı kromozom bulunmakta	12
Şekil 2.3. Kromozomal anomali saptanmayan bir düşük materyaline ait QF-PCR analizi sonucunda elde edilen D13S631 (a) ve D21S1411 (b) markerlarına ait piklerdeki 1:1 görüntüsü. Analizi yapılan örnekte iki adet 13 ve iki adet 21 numaralı kromozom bulunmakta.	12
Şekil 2.4. MTHFR enziminin homosistein metabolizmasındaki rolü	21
Şekil 2.5. VEGF genine ait ekzonik ve intronik alt birimler	29
Şekil 5.1. MTHFR C677T polimorfizmine ait a. Homozigot wild-CC genotipi (Tm: 63 °C), b. Heterozigot mutant-CT genotipi (Tm: 54.5 °C ve 63 °C) , c. Homozigot mutant-TT (Tm: 54.5 °C) genotiplerinin Real Time PCR görüntüleri	52
Şekil 5.2. ACE I/D polimorfizmine ait a. I/I (Tm: 92°C), b. I/D (Tm: 85 ve 92°C), c. D/D (Tm: 85°C) genotiplerinin Real Time PCR görüntüleri	54
Şekil 5.3. Trizomi 13 sonucu elde edilen düşük materyalinde QF-PCR analizi sonucunda elde edilen D13S305 markerına ait piklerdeki 1:1:1 görüntüsü. Analizi yapılan örnekte üç adet 13 numaralı kromozom bulunmakta	65
Şekil 5.4. Triploidi saptanan bir düşük materyaline ait D21S1435 (a), D21S1446 (b) ve D13S305 (d) markerlarına ait QF-PCR cihaz görüntüsü. DXYS218 (c) markerında 1:2 oranı, diğer piklerde ise 1:1:1 oranı mevcut	66
Şekil 5.5. Trizomi 21 saptanan bir düşük materyaline ait D21S1414 markerına ait QF-PCR cihaz görüntüsü. Piklerde 1:1:1 oranı mevcut	67
Şekil 5.6. Triploidi saptanan bir düşük materyaline ait QF-PCR cihaz görüntüsü. AMXY 2:1, X22 2:1, D21S1414 1:1:1, D18S391 1:1:1, D13S631 1:1:1, D21S1411 1:1:1, D18S390 2:1 görünümünde	68

TABLULAR

Tablo 3.1. QF-PCR analizinde kullanılan S1-S2'ye ve M13-M18-M21-MXY'ye ait markerlar	44
Tablo 5.1. Araştırmaya dahil edilen habituel abortus ve kontrol grubu olgularına ait klinik parametreler	46
Tablo 5.2. RPL ve kontrol grubu bireylere ait FVL genotip yüzdeleri ve allel frekansları	47
Tablo 5.3. RPL ve kontrol grubu bireylere ait FVL karşılaştırmalı istatistik sonuçları	48
Tablo 5.4. RPL ve kontrol grubu bireylere ait Protrombin G20210A genotip yüzdeleri ve allel frekansları	48
Tablo 5.5. RPL ve kontrol grubu bireylere ait Protrombin G20210A karşılaştırmalı istatistik sonuçları	49
Tablo 5.6. RPL ve kontrol grubu bireylere ait PAI 5G/4G genotip yüzdeleri ve allel frekansları	49
Tablo 5.7. RPL ve kontrol grubu bireylere ait PAI 5G/4G karşılaştırmalı istatistik sonuçları	50
Tablo 5.8. RPL ve kontrol grubu bireylere ait MTHFR C677T genotip yüzdeleri ve allel frekansları	50
Tablo 5.9. RPL ve kontrol grubu bireylere ait MTHFR C677T karşılaştırmalı istatistik sonuçları	51
Tablo 5.10. RPL ve kontrol grubu bireylere ait MTHFR A1298C genotip yüzdeleri ve allel frekansları	52
Tablo 5.11. RPL ve kontrol grubu bireylere ait MTHFR A1298C karşılaştırmalı istatistik sonuçları	53
Tablo 5.12. RPL ve kontrol grubu bireylere ait ACE I/D genotip yüzdeleri ve allel frekansları	53
Tablo 5.13. RPL ve kontrol grubu bireylere ait ACE I/D karşılaştırmalı istatistik sonuçları	55
Tablo 5.14. RPL ve kontrol grubu bireylere ait eNOS E298D genotip yüzdeleri ve allel frekansları	55
Tablo 5.15. RPL ve kontrol grubu bireylere ait eNOS E298D karşılaştırmalı istatistik sonuçları	56

Tablo 5.16. RPL ve kontrol grubu bireylere ait Apo E2/E3/E4 genotip yüzdeleri ve allel frekansları	57
Tablo 5.17. RPL ve kontrol grubu bireylere ait Apo E E2/E3/E4 karşılaştırmalı istatistik sonuçları	57
Tablo 5.18. RPL ve kontrol grubu bireylere ait VEGF A C405G genotip yüzdeleri ve allel frekansları	58
Tablo 5.19. RPL ve kontrol grubu bireylere ait VEGF A C405G karşılaştırmalı istatistik sonuçları	59
Tablo 5.20. RPL ve kontrol grubu bireylere ait VEGF A C936T genotip yüzdeleri ve allel frekansları	59
Tablo 5.21. RPL ve kontrol grubu bireylere ait VEGF A C936T karşılaştırmalı istatistik sonuçları	60
Tablo 5.22. RPL ve kontrol grubu bireylere ait VEGF A C2578A genotip yüzdeleri ve allel frekansları	61
Tablo 5.23. RPL ve kontrol grubu bireylere ait VEGF A C2578A karşılaştırmalı istatistik sonuçları	61
Tablo 5.24. RPL ve kontrol grubu bireylere ait VEGF A C460T genotip yüzdeleri ve allel frekansları	62
Tablo 5.25. RPL ve kontrol grubu bireylere ait VEGF A C460T karşılaştırmalı istatistik sonuçları	62
Tablo 5.26. Spontan abortusu olan 22 anneye ait yaş, gebelik sayısı, doğum sayısı, düşük sayısı, düşük haftaları, ek hastalık varlığı ve 23 adet düşük materyaline ait QF-PCR analiz sonuçları	64
Tablo 5.27. Fetus ve anne grubuna ait FVL genotip yüzdeleri ve allel frekansları	69
Tablo 5.28. Fetus ve anne grubu bireyelerine ait FVL karşılaştırmalı istatistik sonuçları	69
Tablo 5.29. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireyelerine ait FVL karşılaştırmalı istatistik sonuçları	69
Tablo 5.30. Fetus ve anne grubuna ait Protrombin G20210A genotip yüzdeleri ve allel frekansları	70
Tablo 5.31. Fetus ve anne grubu bireyelerine ait Protrombin G20210A karşılaştırmalı istatistik sonuçları	70
Tablo 5.32. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireyelerine ait Protrombin G20210A karşılaştırmalı istatistik sonuçları	70

Tablo 5.33. Fetus ve anne grubuna ait PAI 5G/4G genotip yüzdeleri ve allel frekansları	70
Tablo 5.34. Fetus ve anne grubu bireyelerine ait PAI 5G/4G karşılaştırmalı istatistik sonuçları	71
Tablo 5.35. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireyelerine ait PAI 5G/4G karşılaştırmalı istatistik sonuçları	72
Tablo 5.36. Fetus ve anne grubuna ait MTHFR C677T genotip yüzdeleri ve allel frekansları	72
Tablo 5.37. Fetus ve anne grubu bireyelerine ait MTHFR C677T karşılaştırmalı istatistik sonuçları	72
Tablo 5.38. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireyelerine ait MTHFR C677T karşılaştırmalı istatistik sonuçları	73
Tablo 5.39. Fetus ve anne grubuna ait MTHFR A1298C genotip yüzdeleri ve allel frekansları	73
Tablo 5.40. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireyelerine ait MTHFR A1298C karşılaştırmalı istatistik sonuçları	74
Tablo 5.41. Fetus ve anne grubuna ait ACE I/D genotip yüzdeleri ve allel frekansları	74
Tablo 5.42. Fetus ve anne grubu bireyelerine ait ACE I/D karşılaştırmalı istatistik sonuçları	75
Tablo 5.43. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireyelerine ait ACE I/D karşılaştırmalı istatistik sonuçları	75
Tablo 5.44. Fetus ve anne grubuna ait eNOS E298D genotip yüzdeleri ve allel frekansları	76
Tablo 5.45. Fetus ve anne grubu bireyelerine ait eNOS E298D karşılaştırmalı istatistik sonuçları	76
Tablo 5.46. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireyelerine ait eNOS E298D karşılaştırmalı istatistik sonuçları	77
Tablo 5.47. Fetus ve anne grubuna ait Apo E E2/E3/E4 genotip yüzdeleri ve allel frekansları	77
Tablo 5.48. Fetus ve anne grubu bireyelerine ait Apo E E2/E3/E4 karşılaştırmalı istatistik sonuçları	78
Tablo 5.49. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireyelerine ait Apo E E2/E3/E4 karşılaştırmalı istatistik sonuçları	78

Tablo 5.50. Fetus ve anne grubuna ait VEGF A C405G genotip yüzdeleri ve allel frekansları	79
Tablo 5.51. Fetus ve anne grubu bireyelerine ait VEGF A C405G karşılaştırmalı istatistik sonuçları	79
Tablo 5.52. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireyelerine ait VEGF A C405G karşılaştırmalı istatistik sonuçları	80
Tablo 5.53. Fetus ve anne grubuna ait VEGF A C936T genotip yüzdeleri ve allel frekansları	80
Tablo 5.54. Fetus ve anne grubu bireyelerine ait VEGF A C936T karşılaştırmalı istatistik sonuçları	81
Tablo 5.55. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireyelerine ait VEGF A C936T karşılaştırmalı istatistik sonuçları	81
Tablo 5.56. Fetus ve anne grubuna ait VEGF A C2578A genotip yüzdeleri ve allel frekansları	82
Tablo 5.57. Fetus ve anne grubu bireyelerine ait VEGF A C2578A karşılaştırmalı istatistik sonuçları	82
Tablo 5.58. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireyelerine ait VEGF A C2578A karşılaştırmalı istatistik sonuçları	83
Tablo 5.59. Fetus ve anne grubuna ait VEGF A C460T genotip yüzdeleri ve allel frekansları	83
Tablo 5.60. Fetus ve anne grubu bireyelerine ait VEGF A C460T karşılaştırmalı istatistik sonuçları	84
Tablo 5.61. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireyelerine ait VEGF A C460T karşılaştırmalı istatistik sonuçları	84

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Gebelik kayıpları günümüzde hala tam aydınlatılmayan sebeplerden kaynaklanan, fiziksel ve psikolojik zararları yüksek olan jinekolojik problemlerdendir. Biyokimyasal belirteçlerin ve radyolojik görüntüleme yöntemlerinin zamanla daha da gelişmesi gebelik tespitini kolaylaştırmakta ve böylece abortus sıklığı daha kolay belirlenebilmektedir. Spontan abortusların % 62'si 12. gebelik haftasından önce, % 75'i ise 16. gebelik haftasından önce meydana gelmektedir. Kimyasal gebeliklerin %50-60 kadarı kendiliğinden sonlanmakta ve çoğu zaman yalnızca birkaç günlük adet gecikmesi olarak algılanıp fark edilememektedir. Kadınların yaklaşık % 10-20'si hayatı boyunca en az bir gebelik kaybı, % 5'i ardışık iki gebelik kaybı, %1'i ardışık üç gebelik kaybı yaşamaktadır.

Gebelik kayıplarının nedenleri çok fazla olabildiğinden nedenin belirlenmesi uzun ve maliyetli çalışmalar gerektirebilmektedir. Özellikle geçmiş gebelik kayıplarına sebep olan faktörün saptanması sürecinde, fetal materyalin bulunmaması nedeniyle araştırmalar anne, babaya ait analizlerle sınırlı kalmakta ve tanı başarısı düşmektedir. Tanı konulamayan bu durumlar hem hasta hem hekim açısından sorun yaratmaktadır.

Günümüzde ardışık iki düşük ve ardışık üç düşük sonrası izleyen gebeliğin düşükle sonuçlanma riskinin klinik olarak benzer olduğu ve iki gebelik kaybı ile üç gebelik kaybı olan kadınlarda yapılan tanısız incelemelerde bulunan patolojilerin sıklıklarının benzer olduğu tespit edilerek tekrarlayan düşük nedenine yönelik araştırmalara ikinci düşük sonrasında başlama eğilimi giderek yaygınlaşmaktadır. Bu yaklaşımda amaç; anne adayını bir diğer düşüğün yol açacağı psikolojik etkilerden korumak ve uzun süreli, geniş kapsamlı tetkiklere moral desteğini tamamen yitirmeden bir an önce başlamaktır.

Gebelik kayıplarında spontan veya habituel düşüklerin sebebi bazen belirlenebilse de sıklıkla kesin sebep saptanamamaktadır. Sebepler fetal veya maternal kaynaklı olarak düşünölmekte olup bu şekilde sınıflandırılmaktadır. Fakat bilinmektedir ki bir embriyoda anne ve babaya ait ortak genler bulunmaktadır. Bu yüzden çalışmamızda genetik etiyojjiyi belirlemek amacıyla embriyonal ve parental açıdan kromozomal ve polimorfik parametreler değerlendirmeye alınmıştır. Bu amaçla çalışmamızda elde edilen spontan olarak sonlanmış düşük materyallerine Kantitatif Floresan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QF-PCR) işlemleri yapılarak 13,18,21,X ve Y kromozomlarına ait sayısal anomaliler saptanmıştır; ayrıca bu düşük materyallerine ve annelerine, habituel abortus çiftlerine ve fertil kontrol grubuna ait Faktör V Leiden (FVL), Protrombin G20210A, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, PAI-1 5G/4G, ACE I/D, eNOS E298D, Apo E E2/E3/E4, VEGF A C936T, VEGF A C2578A, VEGF A C405G, VEGF A C460T polimorfizmleri Real Time (eş zamanlı) PCR yöntemiyle çalışılarak değerlendirilmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Abortus

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre (1977) abortus, 20. gebelik haftasından önce, 500 gramdan daha az embriyo veya fetus eklerinin, tamamının ya da bir kısmının uterus dışına atılmasıdır (1).

2.1.1.Spontan Abortus

Hastanın kendisinin veya bir hekimin müdahalesi olmadan kendiliğinden olan düşüklere spontan abortus adı verilir. 12. gebelik haftasına kadar olan abortuslar erken abortus, 12–20. gebelik haftaları arasında olan abortuslar ise geç abortus olarak adlandırılmaktadır (1).

2.1.1.1.Spontan Abortus Nedenleri

Spontan abortus nedenleri fetusa ait malformasyonlar, genetik nedenler, anoksi, anemi, anneye ait enfeksiyonlar, anatomik anomaliler, sistemik hastalıklar, toksik ve çevresel faktörler, travma, laparotomi olabilir. Babaya ait faktörler için kesin sebepler bilinmese de sperm anomalileri veya genetik sebepler etiyolojide düşünülmektedir (2).

2.1.2. Habituel Abortus

Birbirini izleyen en az iki ya da daha fazla gebeliğin 20. gebelik haftasından önce spontan olarak sonlanmasına habituel abortus adı verilir.

2.1.2.1.Habituel Abortus Nedenleri

2.1.2.1.1.Genetik Nedenler

Habituel abortusların % 3'ünden sorumlu olan genetik nedenler, birinci trimester kayıplarının % 60'ına, ikinci trimester kayıplarının % 10-15'ine, üçüncü trimester ölü doğumlarının ise % 5'ine sebep olmaktadır. Yapısal kromozom anomalileri içerisinde en sık translokasyonlar, translokasyonlar içerisinde ise resiprokal ve robertsonian tipi translokasyonlar görülmektedir. Düşüklerde ayrılmama ya da translokasyona bağlı otozomal trizomi en sık rastlanan anomalidir (3). Kromozom anomalisi saptanan spontan abortusların en büyük grubunu (%53) otozomal trizomiler oluşturmaktadır (4). Spontan abortuslarda tek başına en sık görülen kromozom anomalisi olan monozomi X (Turner sendromu) sitogenetik bozukluk saptanan fetuslerin %20-25'ini oluşturur. Triploidi ise %16 olguda izlenir (5).

Tekrarlayan gebelik kaybı olanlarda düşük materyalinde kromozom anomalisi sıklığı yaklaşık %50-60 civarındadır (6). Düşük materyalindeki kromozom anomalisi sıklığı açısından bakıldığında tekrarlayan gebelik kaybı ile spontan düşükler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (7). Buna rağmen tekrarlayan anöploid düşüklerin bulunduğu ve anöploid düşük yapan birinin diğer düşüğünün de anöploid olma olasılığının yüksek olduğu ve tekrarlayan anöploidinin bir tekrarlayan gebelik kaybı nedeni olduğu da bildirilmektedir (8). Düşüklerde tespit edilen kromozomal anomalilerin %90'ından fazlası sayısaldır (anöploidi, poliploidi gibi), geri kalanlar yapısal anomaliler (translokasyon, inversiyon gibi) ve mozaisizmdir. Diğer genetik anomaliler arasında anormal fertilizasyona bağlı olanlardan tetraploidi ve triploidi gibi anomaliler sayılabilir, ancak bunlar yaşamla bağdaşmamaktadırlar.

Genlere ait bazı mutasyonların da tekrarlayan gebelik kaybına neden olabilecek bozukluklara yol açabildiği bilinmektedir. Tekrarlayan gebelik kaybıyla ilgisi kanıtlanan tek gen bozukluklarının en iyi örneği otozomal

dominant bir hastalık olan myotonik distrofidir (5). Fetusu etkileyen ve düşüğe yol açan diğer otozomal dominant bozukluklar tanatoforik displazi ve tip II osteogenezis imperfekta gibi ölümcül iskelet displazileridir.

Tekrarlayan gebelik kaybı olan çiftlerin %2-5'inde ebeveynlerden birinde yapısal dengeli kromozom anomalisi saptanır. Normal popülasyonda ise bu oran %0.2'dir. Ebeveynlerde saptanan kromozom anomalileri çoğunlukla translokasyon ve inversiyondur ve daha yüksek oranda maternal kaynaklıdır (9). Paternal kromozom anomalisi saptanan çiftlerin canlı çocuk sahibi olma olasılıkları genel anlamda %50-70 dolayındadır (10). Ancak bu oran mevcut kromozom bozukluklarının tipi ile yakından ilişkilidir.

2.1.2.1.2. Anatomik Anomaliler

Genel popülasyonda müllerian anomali oranı %5 dolayındadır (9). Tekrarlayan gebelik kaybı olan olgularda bildirilen uterus anomalisi oranları ise %1.8 ile %37.6 arasında değişmektedir. Uterus anomalisi prevalansı, geç düşükleri olanlarda erken düşükleri olanlara kıyasla daha yüksektir (11). Gebelik kaybı riskini arttıran anatomik uterin anomaliler; konjenital malformasyonlar, uterin leiomyomlar, intrauterin adezyonlar, endometrial poliplerdir.

En sık rastlanan uterin anomaliler septat, bikornuat ve didelfis uteruslardır. Unikornuat uterus en nadir rastlanılan anomalidir. Reprodüktif dönemde kayba en fazla neden olan anomali bikornuat uterus iken (%47), en düşük kayıp oranı unikornuat uterusunda (%17) görülmektedir. En sık anormal doğumlar unikornuat ve didelfis uterusu sahip kadınlarda izlenmektedir. Uterus septus, normal olarak birleşmesi gereken iki hemiuterusu ayıran orta hat septumun yetersiz kaybı ile oluşmaktadır. Tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda (%3.5 sıklık) ve genel popülasyonda tüm major malformasyonların %80-90'ını oluşturmaktadır. Birçok çalışmadan elde edilen veriler, uterin septumu olan kadınlarda gebelik kayıp oranının %65 olduğunu göstermektedir (13).

Konjenital uterin malformasyonlarda gebelik kayıplarının patogenezi net olmamakla birlikte azalmış intrauterin volum ve vasküler yetersizlikle ilgili olduğu bildirilmektedir (12). Unikornuat uterusunda gebeliklerin yaklaşık yarısı kayıpla sonuçlanmaktadır (13). Didelfis uterus müller kanallarının tam olarak birleşmemesi sonucu oluşur. Ayrıca serviks ve hemiuterus mevcuttur. Bunlarda reproduktif sonuçlar birleşmiş iki kornu arası kollateral kan dolaşımı daha iyi olduğundan unikornuat uterusundan daha iyidir. Bununla birlikte uterin didelfisli kadınların gebeliklerinin yaklaşık %40'ı spontan kayıpla sonuçlanmaktadır (13).

Bikornuat uterus, fundus seviyesinde müller kanallarının yetersiz birleşmesi sonucu oluşur. Birleşik alt segmenti olan iki ayrı uterin kavite ve tek serviks vardır. Bikornuat uterusu olan kadınlardan elde edilen verilerde erken gebelik kayıp oranı %30, tüm gebeliklerde fetal kayıp oranı %40 olarak bildirilmektedir (13).

Uterin myomların tekrarlayan gebelik kaybı nedeni olduğunu gösteren kesinleşmiş kanıtlar yoktur. Myomların tekrarlayan gebelik kayıplarındaki mekanizmaların tümü bölgesel kan akımındaki yetersizliğe bağlanmıştır.

İntrauterin adezyonlardaki tekrarlayan gebelik kayıpları, azalmış fonksiyonel uterin hacim ve endometrial fibrozis ile plasental yetersizliğe neden olabilecek inflamasyondan kaynaklanmaktadır (14). Bu kişilerin gebelikleri genellikle gebelik kaybı (%40-80) veya preterm doğum (%25) ile sonuçlanmaktadır. Prognoz genellikle hastalık derecesiyle ilgilidir.

Servikal yetmezlik, serviksin fonksiyonel veya yapısal bozukluğuna bağlı olarak gebeliği miada kadar taşıyamaması anlamına gelir. Servikal yetmezlik tanısı konan olgularda 12-14 gebelik haftaları arasında profilaktik serklaj uygulaması önerilen tedavi metodudur ancak etkinliği tartışmalıdır (15).

2.1.2.1.3.Endokrin Bozukluklar

Gebelik kaybı riskini arttıran endokrin faktörler, tiroid hastalıkları, diabetes mellitus, polikistik over sendromu (PCOS) ve luteal faz defektidir.

Polikistik over sendromu tekrarlayan gebelik kaybı olgularında genel populasyona oranla daha yüksek oranda saptanmıştır. PCOS olgularında gözlenen luteinleştirici hormon aşırı salınımı ve hiperandrojenemi ile tekrarlayan gebelik kaybı arasında ilişki düşünülmekle birlikte son yıllardaki çalışmalar böyle bir ilişkinin bulunmadığını bildirmektedir (16).

Tedavi edilmemiş gizli veya subklinik hipotiroidizmde gebelik kaybı riski artmaktadır. Gebelik kaybı insidansı, normal tiroid fonksiyonları olan tedavi edilmiş hipotiroidik kadınlarda çok düşük olarak bildirilmekte, tedavi edilmemiş subklinik hastalığı olan ve yetersiz tiroid hormon replasmanı yapılan hastalarda TSH düzeyiyle birlikte yüksek olarak bildirilmektedir (17). Bu gözlemler tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda TSH taramasını da içeren erken incelemenin gerekliliğini belirtmektedir.

Diabetes mellitusu olan kadınlar metabolik kontrolleri iyi olduğu sürece normal kadınlardan daha fazla abortus yaşamamaktadırlar. Ancak diabetes mellitusu olan ve ilk trimesterde glukoz ile HbA1C düzeyleri yüksek olan kadınlarda hem fetal kayıp hem de fetal anomali oranı belirgin olarak artmıştır. Glukoz kontrolü yetersiz olan insulin kullanan diabetes mellituslu kadınlarda normal topluma göre 2 ya da 3 kat artmış spontan abortus oranı bildirilmektedir (18).

2.1.2.1.4.Enfeksiyonlar

Tekrarlayan gebelik kayıplarına yol açan enfeksiyöz bir ajan, kadınlarda semptomlara yol açmayan ve genital kanalda sürekli bulunan bir ajandır. Bakteriyel vaginosis ile tekrarlayan gebelik kaybı ve erken doğum arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda rutin bakteriyel vaginosis tarama ve tedavisinin

tekrarlayan gebelik kaybı ve erken doğumu önlemek açısından anlamlı bir yararı olmadığı bildirilmektedir. Erken doğum öyküsü olan olgularda bakteriyel vaginozis tedavisinin erken doğumun tekrarını önlemede yararlı olabileceği gösterilmiştir (19).

2.1.2.1.5.İmmunolojik Faktörler

Paternal antijenlere karşı oluşan aşırı veya dengesiz maternal immun cevap ve sitokin üretiminin tekrarlayan gebelik kaybına neden olabileceği kabul edilmektedir (20). Tekrarlayan gebelik kaybı olan gebelerin naturel killer hücre miktar ve aktivitelerinde farklılıklar olduğu bildirilmektedir (21). Maternal immun sistem, paternal human lökosit antijeni yabancı olarak algıladığında maternal immun sistemin ona karşı oluşturduğu alloantikolar fetusu kaplayarak reddini önleyebilmektedir. Koruyucu nitelikteki bu alloantikoların yetersizliği tekrarlayan gebelik kaybına yol açabilir. Tekrarlayan gebelik kaybı olan eşlerde HLA benzerliği ve buna bağlı olarak da alloantikoların yetersizliği gösterilmiştir (22).

2.1.2.1.6.Sistemik Hastalıklar

Kronik hipertansiyon, kronik renal hastalıklar ve kollajen doku hastalıklarında tekrarlayan gebelik kayıpları sık olarak görülmektedir. Ayrıca vitamin B12, folat eksiklikleri ve metionin-homosistein metabolizmasındaki eksikliklerin de rolü olduğu öne sürülmektedir (23) .

2.1.2.1.7.Çevresel Faktörler

Ağır metaller, sigara, alkol, anestezi gazları, organik çözücülere maruz kalmak, aşırı kahve tüketimi düşüklere sebep olabilmektedir (24).

2.1.2.1.8.Koagülasyon Sistemine ait Patolojiler

Hemostaz sistemi ekstrensek, intrensek ve ortak yoldan oluşmaktadır (Şekil 2.1). İntrensek yolak sadece kan komponentlerinden oluşur. Kümeleşmiş trombosit tıkaçı trombosit faktör 3 salgılar, bu da iki pıhtılaşma faktörü ile kombine olur ve trombosit tromboplastin enzimini oluşturur. Faktör XII (hageman faktörü) yaralanmış damarlara bağlanır ve aktif duruma gelir (faktör XIIa). Faktör XIIa (prekallikrein ve HMW kininojen ile birleşerek) faktör XI'i aktive eder (XIa). Faktör XIa kalsiyumla beraber faktör IX'u aktive eder. Aktive olmuş faktör IX, faktör VIII, kalsiyum, trombosit faktör III ile birlikte faktör X'u aktive eder. Faktör Xa, faktör V ile birlikte protrombini (faktör II) trombine çevirir. Fibrinojenden (faktör I) trombin aracılığıyla ufak peptidler ayrılarak fibrin monomerleri oluşur. Aynı zamanda fibrin tarafından aktive edilen faktör XIIIa fibrin monomerlerini çapraz bağlayarak stabil pıhtı oluşmasını sağlar. Faktör VII kalsiyum ve tromboplastin (faktör III) ile kompleks oluşturup, faktör X'u aktive eder.

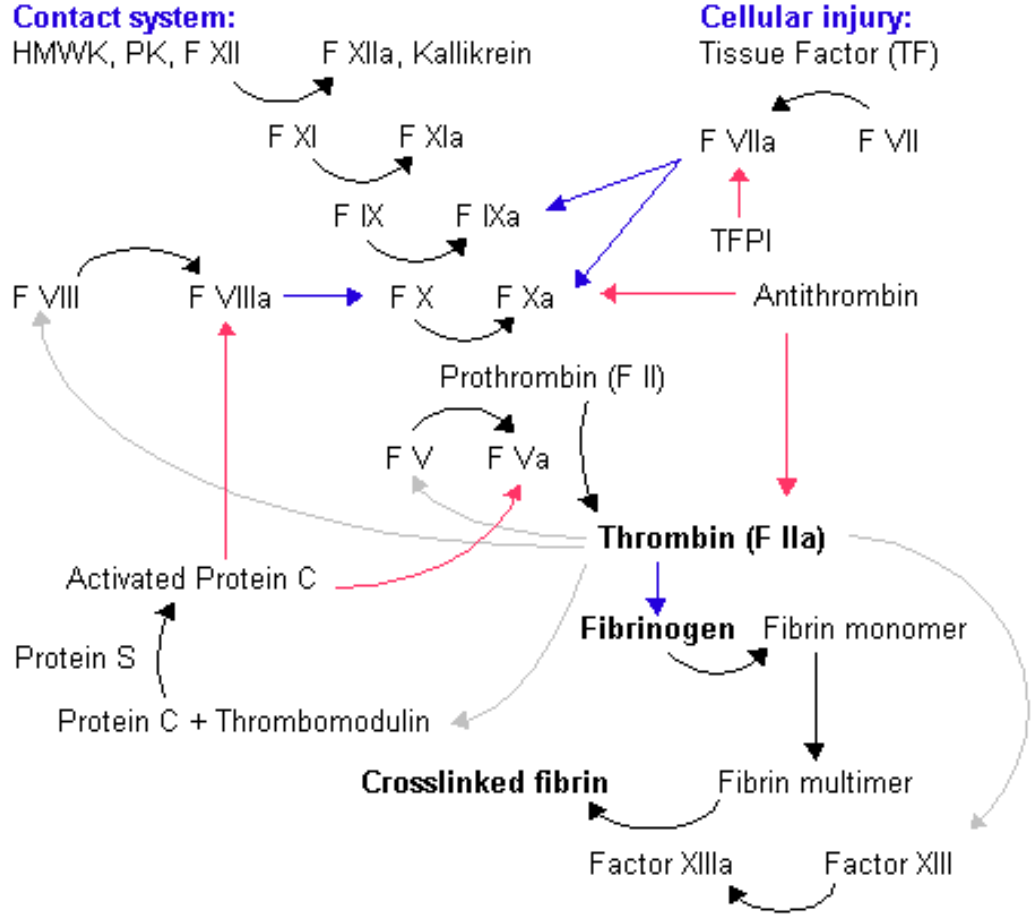
Ortak yol tromboplastinin iki tipinden biri şekillenince başlar. Bu olduğunda protrombin trombine dönüşür. Trombin fibrinojeni fibrine çevirerek koagülasyonun son basamağında yer alır. Faktör VIII (endotel tarafından yapılır), kalsiyum, tromboplastin ve trombosit faktörleri dışındaki tüm koagülasyon faktörleri karaciğerde üretilir. Ekstrensek yoldaki doku veya endotel hasarlandığında, doku faktörü salınır, doku tromboplastin enzimini oluşturmak için iki koagülasyon faktörü ile kompleks yapar. Doku faktörü (bir protein-fosfolipit kompleksi, damar hücrelerinde ve aktive monositlerde bulunur), kalsiyum varlığında faktör VII ile karşılaştığında koagülasyon hızla başlar. Aktive olan doku faktörü-Faktör VII kompleksi, faktör IX ve X'u aktive eder (Faktör IXa, Xa'nın yapımını özellikle ko-enzim VIIIa varlığında artırır) (25).

Ekstrensek yol, protrombin zamanı (PZ) ile ölçülür. FII, FV, FVII, FX ve fibrinojen eksikliğinde uzun olarak ölçülür. Klinikte kumadin grubu

antikoagülanların dozajı için sıklıkla kullanılır. Kumadin FII, FVII, FIX ve FX oluşumunda rol oynayan Vit K redüktaz enzimini inhibe eder.

İntrensek yol aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTZ) ile ölçülür. Ancak aPTZ klinikte standardizasyon amaçlı uluslararası normalize edilmiş değer olan INR ile de isimlendirilir. Normali 1 olarak kabul edilir. FVIII, FIX, FXI, FXII eksikliğinde ve heparin gibi sistemik antikoagülanların etkisiyle uzar.

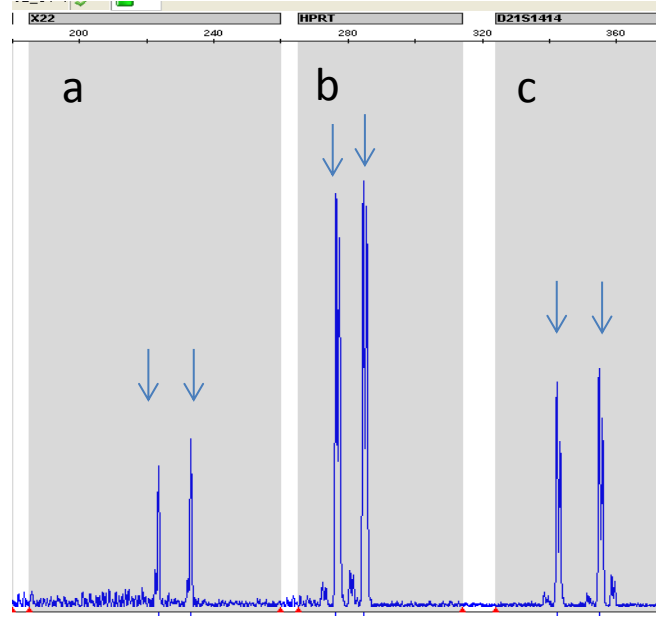
Koagülasyonun inhibisyonu, endotel yapısının düzgünlüğü, glikokaliks tabakası, trombomodulin kompleksi, fibrin iplikçikleri, antitrombin III, heparin, alfa 2 makroglobulin ile sağlanmaktadır. Bu antikoagülan mekanizmaların herhangi birinde oluşan bir sorun potansiyel olarak trombofiliye dolayısıyla plasental yetmezliğe ve fetal kayba yol açabilir. Hem konjenital hem kazanılmış trombofili faktörleri plasentanın trombotik hasarındaki patofizyolojik mekanizmalardan da sorumludur (26). En sık görülen edinsel trombofililer lupus antikoagülan ve antikardiolipin anikorlardır. Kalıtılabilir trombofililer tromboembolik hastalığın major nedenlerindedir ve anlamlı oranda maternal ve fetal sekellerden sorumludurlar.



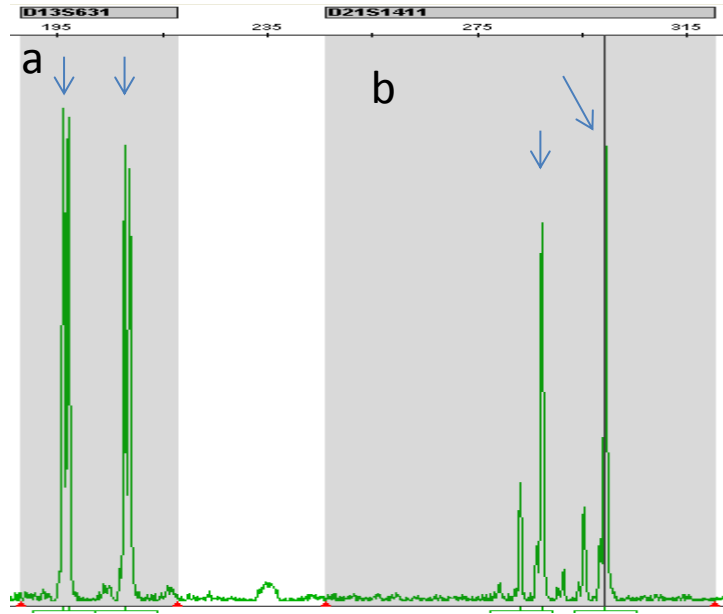
Şekil 2.1. İntrensek ve ekstrinsek yolları gösteren koagülasyon kaskadı

2.2.Kantitatif Floresan PCR [Quantitative Fluorescence PCR (QF-PCR)]

Prenatal dönemde karşılaşılan kromozomal bozukluklarının %90'a yakını, 13, 18, 21, X ve Y kromozomlarının sayısını saptayarak ölçen hızlı ve güvenilir bir metoddur. QF-PCR 2 ml amniosentez sıvısından elde edilen DNA ile 24-48 saat içinde sonuç verebilmektedir. Ayrıca koryon villus biyopsi (CVS) materyali ve kordosentez materyalinden elde edilecek DNA ile de 24-48 saat içerisinde sonuç verebilmektedir. Bu çalışmamızda düşük materyalinden elde edilen DNA örneklerinden QF-PCR analizi yapılmıştır (Şekil 2.2, 2.3).



Şekil 2.2. Kromozomal anomali saptanmayan bir düşük materyaline ait QF-PCR analizi sonucunda elde edilen X22 (a), HPRT (b) ve D21S1414 (c) markerlarına ait piklerdeki 1:1 görüntüsü. Analizi yapılan örnekte iki adet X ile iki adet 21 numaralı kromozom bulunmakta



Şekil 2.3. Kromozomal anomali saptanmayan bir düşük materyaline ait QF-PCR analizi sonucunda elde edilen D13S631 (a) ve D21S1411 (b) markerlarına ait piklerdeki 1:1 görüntüsü. Analizi yapılan örnekte iki adet 13 ve iki adet 21 numaralı kromozom bulunmakta

QF-PCR metodunun temeli 13, 18, 21, X ve Y kromozomlarına ait sayısal bozuklukların saptanması, kromozomlar üzerindeki kısa tekrar dizilerinin (STR-Short Tandem Repeats) PCR ile çoğaltılıp kantitatif olarak ölçümüne dayanmaktadır. Burada kullanılan STR'lar 4 nükleotidlik tekrarlardan oluşur ve sadece belirtilen kromozoma spesifiktir. Bu STR'ların en önemli özelliği kişiler arasında farklı uzunlukta olduğu gibi aynı kişiye ait 2 kromozomda da farklı olabilmesidir. Bu sayede homolog kromozomların ayrımı yapılabilen ve kişideki kromozom sayısı STR belirteçleri sayesinde belirlenebilmektedir. QF-PCR'in 22504 amniotik sıvı örneğinde 13,18, 21, X ve Y kromozomlarındaki sayısal bozuklukları saptama oranı %98,6 olarak saptanmıştır (27). Yapılan çalışmalarda yalancı pozitifliğe ve yalancı negatifliğe rastlanmamıştır. QF-PCR mozaik durumda olmayan bozuklukların tamamını saptayabilmektedir. QF-PCR yöntemi anormal hücre kuşağının tüm hücrelere oranı %15'ten fazla olduğunda mozaizmi tanıyabilmektedir. Yapılan bir çalışmada 8983 amniotik sıvı incelemesinde rastlanılan 18 mozaik olgunun QF-PCR 12'sini tanıırken, karyotip analizi ile 8 tanesi tanınabilmektedir (28). Bu yüzden pek çok araştırmacı prenatal tanıda sadece QF-PCR'in yeterli olduğu görüşündedir.

2.3.Real Time PCR

Real-time PCR, reaksiyon esnasında her bir PCR siklusunda yeterli miktarda ürünün verdiği floresan ışığa göre çalışıp aşama aşama sonuna kadar oluşan ürünü kontrol eden bir sistemdir. Işıma özelliğine sahip moleküller kullanarak PCR'ı oluşturken izler ve miktarını belirler. PCR devam ederken ortaya çıkan ürünler saptanmaya başladığı anda değerlendirmeye alınır. PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artış (CT-threshold cycle) hedef template'in başlangıç miktarı ile orantılıdır (29). Real Time PCR pek çok virüs, bakteri ve bazı mantar türleri gibi patojenlerin saptanmasında, hematolojik hastalıklarda, prenatal tanıda anne kanında fetal DNA tespitinde ve fetal Rh tayini gibi alanlarda kullanılmaktadır (30). Bu çalışmada da 12 adet polimorfizmin (Faktör V Leiden (FVL), Protrombin G20210A, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, PAI-1 5G/4G, ACE I/D, eNOS E298D, Apo E E2/E3/E4, VEGF A C936T, VEGF A

C2578A , VEGF A C405G , VEGF A C460T) saptanmasında Real Time PCR yöntemi kullanılarak Tm derecelerine göre sonuçlar elde edilmiştir.

2.3.1.LightCycler Sistemi

2.3.1.1.Cyber Green Sistemi

LightCycler sisteminin bir uygulamasında; yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (Cyber green I) kullanılarak, amplifikasyona bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarı ile ölçülmektedir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan cyber green miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarındaki artış gözlenmektedir. LightCycler'ın diğer bir uygulama şekli, hedefe özgül problemler kullanmaktır. Burada problemlerle testin özgüllüğü artırılmıştır. Problemlerden biri 3' ucundan floresans boya ile işaretli (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boya (acceptor dye) ile işaretlenmiştir. Problemler hedef amplikonlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotid uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji ikinci problem üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine diğeri bir ifade ile PCR siklusu süresince oluşan amplikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır.

2.3.1.2.TaqMan Sistemi

TaqMan sisteminde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli problem kullanılmaktadır. Problemun 5' ucunda raporör florokrom (6-carboxyfluorescein =6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine-TAMRA) bulunmaktadır. Problem, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Problem-hedef

molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen ampikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır.

2.4. Polimorfizm

Polimorfizm, populasyonun %1' i veya daha fazlasında bulunan genetik bir varyasyondur. Farklı şekillerde polimorfizm görülebilmektedir:

1. Tek nükleotid değişimleri SNP (single nucleotide polymorphism)
2. VNTR-variable number of tandem repeats
 - a. Minisatellitler (20-200 baz çifti tekrarları)
 - b. Mikrosatellitler (CA tekrarları; 2-10 baz çifti tekrarlar)-STR (Short tandem repeats)

Minisatellit tekrarların tekrar sayıları önemli derecede farklılıklar gösterir ve bu yüzden çoğu birey heterozigottur. Bunların kromozom içerisindeki dağılımı eşit değildir ve büyük kısmı (~%80) telomere yakın bölgelere yığılmışlardır. Akrabalık ilişkilerini belirlemede kullanılmaktadırlar.

Mikrosatellit tekrarlar ortalama 6 kb uzunlukta bir ortaya çıkarlar. Dinükleotid tekrarların (özellikle AC ve AG) her 30 kb'de bir olmak üzere çok sık tekrarladığı bilinmektedir. Bu polimorfizmden, hastalık görülen aile bireylerinde mutant genin izlenmesi ve gen haritalarının çıkarılmasında çok yararlanılmaktadır.

Tek nükleotid polimorfizmi tek bir nükleotidin bir başka nükleotidle yer değiştirmesi şeklindedir. İnsan genomunun yaklaşık %1.5'u kodlayan DNA dizileri içerir ve SNP'lerin çoğu intron ve intergenik diziler gibi kodlama yapmayan DNA bölgelerinde şekillenir. SNP'lerin pek çoğunun hücre fonksiyonları üzerine direkt etkisi yoktur; fakat kişilerin bir hastalığa yatkınlığı ya

da ilaçlara verdiği cevabı etkileyebilmektedir (31, 32). Kullanılan ilaçların farklı bireylere farklı etkileri ve yan etkileri SNP'ler ile açıklanabilmektedir. Aynı çevresel koşullarda yaşayan bireylerin bir enfeksiyon ajanına farklı şekillerde cevap vermesi de kısmen SNP'lerin etkisiyledir.

2.4.1.Faktör V Leiden G1691A Polimorfizmi

Faktör V geni kromozom 1q21-q25'te lokalize, 25 ekzonlu, 330.000 dalton ağırlığında bir gendir. Bir koagülasyon faktörüdür ve yarılanma ömrü 12-36 saattir. %80'i plazmada, %20'si trombositlerde olmak üzere endotelial hücrelerin ve monositlerin yüzeyinde bulunur. Lökositler ve megakaryositler tarafından üretilmekte ve selektin genlerine benzemektedir. Seruloplazminle homolog olan üç adet A domaini ve yağ globülleri ile homolog olan C domainleri bulunmaktadır. Lipid membranlara bağlanmada C2 domaini görevlidir. B domainleri çok daha az homoloji göstermekte ve Faktör V'in trombinle aktive olmasını kolaylaştırmaktadır. Trombinle etkileşimi sağlayan asidik bölgeler, aspartik asid ve glutamin içermektedir (33).

Faktör V, trombin aracılığıyla Faktör Va'ya çevrilmekte ve aktive edilmektedir. Faktör Va, Faktör Xa'nın protrombini trombine çevirmesinde kofaktör olarak görevlidir. Faktör Va aktive protein C tarafından inhibe edilir (34). 1993'te Dahlback ve arkadaşları bazı plazma moleküllerinin antikoagülan moleküllere karşı bir rezistans gösterdiğini bulmuşlar ve bu molekülleri aktive protein C (APC) olarak tanımlamışlardır (35). Protein C'nin aktivasyonu, endotelial hücre yüzeylerinde trombin-trombomodulin kompleksi ile gerçekleşmektedir. Protein C karaciğerde üretilen vitamin K'ya bağımlı bir glikoproteindir. Trombomodulinle etkileşmekte ve koagülasyon sırasında Faktör V ve Faktör VIII'in aktif formlarını inhibe etmektedir. Böylece antikoagülan etki oluşmakta ve koagülasyon dengesi düzenlenmektedir.

Aktive protein C rezistansı, Faktör V Leiden (G1691A, FVR506Q) mutasyonundan kaynaklanmaktadır. 1691. pozisyonundaki G>A nokta mutasyonu

glutamin yerine arjinin amino asitinin kodlanmasına sebep olmaktadır. Mutasyona uğramış Faktör Va, aktive protein C'nin proteolitik aktivasyonuna karşı direnç kazanır, kandaki trombin seviyesi artar. Artmış trombin seviyesi ise venöz tromboemboli riskini artırır (26). FVL heterozigot mutasyonu toplumda %3-6, homozigot mutasyonu % 0.1-0.02 oranında görülmektedir. Tromboz öyküsü olanlarda bu oran % 21 ve % 2 şeklindedir (26). FVL mutasyonunun sıklığı toplumlar ve ırklar arası farklılık göstermektedir. Avrupa popülasyonunda % 4–5 oranında mutasyon saptanmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda prevalansı Almanya'da % 7.8, Hollanda'da % 2-4 arası ve İsveç'te % 7 saptanmıştır. Ülkemiz ise mutasyonun en sık görüldüğü yerler arasındadır ve sıklığı % 8 civarındadır (34). Buna karşın Afrika popülasyonunda mutasyon tespit edilmemiştir ve Asya ülkeleri veya Asya kökenli oldukları düşünülen etnik grupların birçoğunda da mutasyon saptanmamıştır. Ortadoğu popülasyonunda ise Avrupa popülasyonuna yakın oranlar tespit edilmiştir (34).

FVL heterozigot bireylerde tromboz riski 3-8 kat, homozigot bireylerde ise 18-80 kat artmaktadır. Faktör V Leiden mutasyonu taşıyan bireylerde venöz tromboz, periferik vasküler hastalıklar, felç, pulmoner embolizm görülme riski artmaktadır. FVL mutasyonu tekrarlayan düşük, ikinci ve üçüncü trimester gebelik kayıpları, preeklampsi, plasental abrusyon, intrauterin gelişme geriliği ile de ilişkili bulunmuştur. Gebelik süresince gelişebilecek trombotik riski ise 5-52 kat arasında arttırmaktadır. Ayrıca Faktör V Leiden heterozigot mutasyon taşıyıcısı olan ve oral kontraseptif kullanan kadınlarda venöz tromboz oluşumunu % 20-60 oranında arttırdığı bildirilmektedir (36).

2.4.2. Protrombin G20210A Polimorfizmi

Protrombin geni 11p11.2 bölgesinde lokalize, 70 kDa ağırlığında bir gendir. Yarılanma ömrü 1.25–3.5 gündür ve 5 domain içermektedir: Propeptid, G1a domain, bir kringle domain, bir kringle-2 domain ve bir serin proteaz domain. Protrombin proteini, hafif (alfa) ve ağır (beta) zincirlerinden oluşan alfa-trombin aktif enzimini oluşturmak için defalarca parçalanmaktadır (37).

Protrombin fragman 1 ve 2'nin oluşması için protrombin, FXa/Va kompleksi tarafından 271. ve 320. pozisyonlardan kesilmektedir. Protrombin, fragman 1 ve 2, katalitik domain olan trombin ve plazma protrombin aktivasyonunun bir belirteçidir. Trombin, fibrinojenin fibrine dönüşümünde katalizördür, FV, VIII, XI, XIII ve trombositleri aktive etmektedir. Ayrıca trombomoduline bağlanarak protein C'yi aktive etmektedir.

Protrombin (Faktör II) G20210A mutasyonu taşıyan bireylerde protrombin düzeyi yüksektir. Bu mutasyon, genin translasyona uğramayan 3' bölgesindeki (3'-UTR) 20210. nükleotidde guaninin adenine dönüşmesi ile gelişmektedir. Protrombin G20210A mutasyonu taşıyıcılarında protrombin düzeyi artmıştır ve tromboz riski normal popülasyondan 2.8 kat daha fazladır. Bu mutasyona, sağlıklı bireylerde %2, tromboz öyküsü olanlarda %6 ve seçilmiş aile öyküsü olanlarda %18 oranında rastlanmaktadır. Mutasyon beyaz popülasyonda % 1–5 oranında bulunmaktadır. Mutasyon sıklığı Kuzey Avrupa'dan güneye inildikçe artar. Kuzey Avrupa'da % 1,7 olan insidans Güney Avrupa ve Akdenizde % 3-5'tir (37).

En sık görülen kalıtsal trombofililerden biridir. Venöz tromboemboli (VTE) riskini heterozigot mutasyon taşıyıcılarında 2-5 kat, pulmoner emboli riskini % 32 oranında arttırmaktadır. Protrombin mutasyonlarının ayrıca serebral ven trombozu, hepatik ve portal ven trombozu, retinal ven trombozu riskini arttırdığı da bildirilmektedir (38, 39, 40). Çocuklarda protrombin mutasyonlarına bakıldığında, mutasyon taşıyıcılarında venöz tromboemboli riskinin 3-4 kat attığı gözlenmektedir (41). Protrombin mutasyonu taşıyıcısı ve daha önceden VTE geçirme öyküsü olan kadınların gebeliklerinde tekrar VTE geçirme riski 3-4 kata kadar çıkabilmektedir (42). Ayrıca gebelik kayıplarını arttırdığı gibi preeklampsi, intrauterin gelişme geriliği ve plasenta dekolmanı riskini de arttırmaktadır. Protrombin G20210A heterozigositesinin tekrarlayan gebelik kayıplarını %4-9 arasında arttırdığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (43, 44). Protrombin mutasyonuna diğer trombofilik mutasyonlarının eşlik etme durumu nadir olmadığı gibi riskleri de çok daha fazla arttırmaktadır.

2.4.3.MTHFR C677T ve A1298C Polimorfizmleri

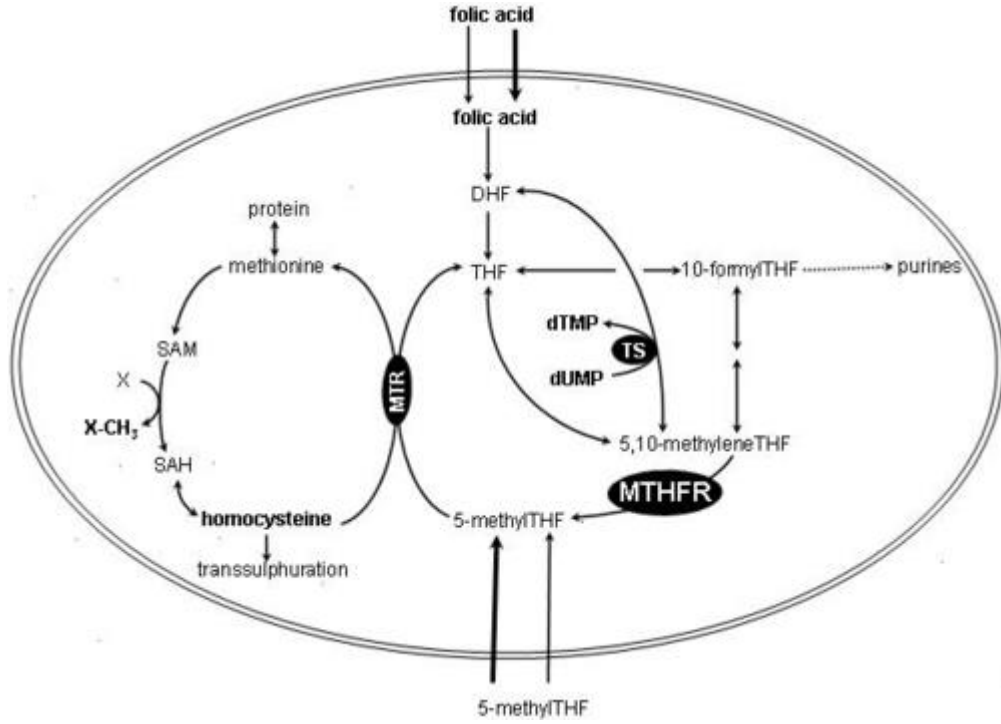
MTHFR (metilen tetra hidro folat redüktaz) geni 1p36.22 bölgesinde yer almaktadır. Genin total büyüklüğü 1980 baz çiftidir, molekül ağırlığı 74,6 kDa'dur. *MTHFR* geninin promotör bölgesi TATA kutusu içermemektedir (45). Bu gen bölgesinde alternatif splicing olayları olmakta ve böylece değişik dokularda farklı *MTHFR* transkriptleri oluşmaktadır (46). Bu enzimin görevi, 5,10-metilen tetrahidrofolatı 5-metil tetrahidrofolata dönüştürmektir (45). *MTHFR* gen mutasyonu homozigot bireylerde etkinlik normalin % 35'ine gerilemektedir. Heterozigot bireylerde de enzim etkinliği azalmakta, dolayısıyla homosistein düzeyi yükselmektedir (47). Homosistein, metionin metabolizması sırasında oluşan bir aminoasittir (Şekil 2.4). Transsülfürasyon yolu sırasında katabolize olur (sistationin B sentetaz) ya da remetilasyon yolu ile metionine geri çevrilmektedir (5,10 metilentetrahidrofolat redüktaz) (48). Homosistein endotelde ve vasküler düz kas hücrelerinde endotel ile koagülasyon sistemleri arası etkileşimde rol oynamaktadır. Serbest radikaller oluşturarak hızla otooksidasyona uğramaktadır.

MTHFR enzim etkinliğinin düşük olduğu iki ayrı genetik polimorfizm saptanmıştır. C677T polimorfizmi, *MTHFR* proteinin N terminal katalitik bölgesini etkileyen 4. ekzonda meydana gelmektedir (49). *MTHFR* C677T polimorfizminde, *MTHFR* enzimini kodlayan gende 677. nükleotid olan sitozinin timine değişimi sonucu ortaya çıkan bir nokta mutasyonu vardır (50). Bu mutasyon, genin ürünü olan proteinin 226. pozisyonunda alanin yerine valin geçmesine neden olmaktadır (50). Bunun sonucu olarak *MTHFR* aktivitesi azalmaktadır (51). Azalan *MTHFR* aktivitesi, 5-metil tetrahidrofolat seviyesinde azalmaya ve bunun sonucu olarak da homosisteinin metiyonine dönüşmemesi nedeniyle plazma homosistein seviyesinde artmaya neden olmaktadır (51).

MTHFR C677T mutasyonunun toplumda görülme sıklığı % 12, Çin'in kuzeyinde % 20, Güney İtalya'da % 26 ve Meksika'da % 32 olarak

bildirilmektedir (52). Türkiye’de yapılan çalışmalarda sağlıklı bireylerde homozigotluk % 5, heterozigotluk ise % 35 olarak bildirilmiştir (53). Tekrarlayan gebelik kaybı yaşayan bireylerde MTHFR mutasyonlarının ve hiperhomosisteineminin daha sık olduğu bildirilmektedir. (54). Gebelik kayıplarının özellikle homosistein yüksekliğinden kaynaklandığı ve 2-3 kat arttığı bildirilmektedir (55). MTHFR 677TT homozigotluğu olan bireylerde de homosistein düzeylerinin çok yükseldiği ve bu artışın tekrarlayan gebelik kayıpları ile anlamlı şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir (56). MTHFR C677T polimorfizminin, kardiyovasküler hastalıklar, nöral tüp defektleri, stroke, Down Sendromu, meme ve endometrial kanser gibi hastalıklarda bir risk faktörü olduğu bildirilmektedir (57). MTHFR 677TT homozigot genotipli bireylerde, akut lösemi, kolorektal ve akciğer kanserlerine yakalanma riskinin azaldığı, endometrial kansere ise yakalanma riskinin arttığı ileri sürülmektedir (58).

MTHFR geninde belirlenen diğer bir polimorfizm, enzimi kodlayan gende 1298. nükleotid olan adeninin sitozine (A→C) değişimi sonucu meydana gelmektedir. Bu mutasyon sonucu MTHFR proteinin C terminal bölgesinde glutamat alanine dönüşmektedir. Bu mutasyonda da diğer mutasyon tipinde olduğu gibi MTHFR aktivitesi azalır. A1298C polimorfizminin plazma homosistein konsantrasyonundaki artışı, C677T polimorfizmi kadar etkilemediği ileri sürülmektedir (59). MTHFR A1298C polimorfizmi için, çeşitli toplumlarda 1298CC genotip sıklığı %1-12 arasında değişmektedir (60). Nöral tüp kusurlarının gelişmesinde A1298C mutasyonunun etkisini bazı çalışmalar bildirmektedir (46, 59, 61). Bu çalışmalarda, nöral tüp defektli çocuklarda, bu mutasyonun görülme sıklığı yüksek olarak açıklanmaktadır (46, 61).



Şekil 2.4. MTHFR enziminin homosistein metabolizmasındaki rolü

C677T mutasyonu taşıyan bireylerde A1298C mutasyonu taşıyan bireylere göre MTHFR enzim aktivitesi daha fazla azalmaktadır; çünkü C677T mutasyonu MTHFR enziminin N-uç katalitik bölgesinde meydana gelmekte, A1298C mutasyonu ise C-uç regülatör bölgesinde meydana gelmektedir (59, 62). Hem heterozigot 677CT hem de homozigot mutant 677TT genotiplerinde, MTHFR enzim aktivitesi homozigot wild tip 677CC genotipine göre önemli derecede düşüktür. 677TT genotipi, termolabil MTHFR enzim özelliğine sahiptir (63). A1298C polimorfizminde enzimin termostabilitesini etkilemediği bildirilmektedir, çünkü azalan enzim aktivitelere rağmen ısı inkübasyonundan sonra A1298C genotipleri arasında artan aktivasyon yüzdesinde önemli bir farklılık görülmemektedir (63).

A1298C ve C677T polimorfizmlerinin birlikte heterozigot olduğu durumda, MTHFR enzim aktivitesi, iki allelin de normal homozigot olduğu durumdaki enzim aktivitesinin %50-60'ı kadardır. Bu aktivite, tek başına C677T heterozigot

olan bireylerin enzim aktivitesinden daha düşüktür. MTHFR mutasyonları birçok hastalık etiolojisinde araştırılmıştır ve çoğuyla ilişkili oldukları gösterilmiştir. MTHFR 677T/1298C heterozigot durumunun birlikte bulunduğu bireylerde, nöral tüp defektlerinde önemli bir artış olduğu ileri sürülmektedir (59, 64, 65). Her iki polimorfizm için de homozigot normal bireylerde (677CC/1298AA) akut lenfoblastik lösemi (ALL) gelişimi fazla iken, 677CT/1298AC heterozigot bireylerde, akut lösemi gelişiminin daha az görüldüğü bildirilmektedir (66). 677CC/1298AA genotipli bireylerde plazma total homosisteini 677CC/1298CC genotipli bireylere göre daha fazla olarak bildirilmektedir. 677TT homozigot mutasyonlu bireylerde de plazma homosisteini önemli oranda artmaktadır (46, 62). Her iki mutasyon bakımından çift heterozigot olan (A1298C/C677T) bireylerde total plazma homosistein konsantrasyonunun önemli derecede arttığı belirtilmektedir (61). Tekrarlayan gebelik kaybı olan hastalarda MTHFR gen mutasyon prevalansı yüksek olarak bildirilmektedir (67). Homosistein fazlalığının gebelik kayıplarına da sebep olduğu anlaşılmıştır.

2.4.4.PAI-1 5G/4G Polimorfizmi

İnsan *PAI-1* geni 7. kromozom uzun kolu üzerinde (q21.3-q22) bulunmaktadır ve dokuz ekzon içeren 12.2 kb büyüklüğünde bir gendir (68). *PAI-1* geninin ilk 187 bç'lik bölümünde güçlü doku spesifik bir promoter bölge bulunmaktadır (69). İnsanlarda tanımlanmış 3.2 kb ve 2.2 kb uzunluğunda iki adet mRNA transkripti bulunmaktadır. Bu transkriptler, farklı alternatif splicing ve poliadenilasyonlar sonucunda üretilmektedirler (70). İnsanlarda bu iki transkriptin fonksiyonel öneminin ne olduğu hala tam olarak bilinmemektedir. İki mRNA çeşidi arasında cis-elemanların varlığı ya da yokluğu *PAI-1*'in posttranskripsiyonel düzenlenmesinde çeşitliliklere neden olmaktadır.

PAI-1, damar duvarı (endotelial hücreler, düz kas hücreleri), makrofajlar, karaciğer, dalak ve adipoz doku tarafından sentezlenmektedir. Plazmada ve diğer biyolojik sıvılarda, aktif, inaktif ve latent PAI-1 olmak üzere, üç boyutlu yapısı birbirinden farklı olan üç formda bulunmaktadır. Hücrelerden aktif form

olarak salgılanmakta ve bu form dolaşımında spontan olarak hızlı bir yapısal değişikliğe uğramaktadır. Böylece yarılanma ömrü 1 saat olacak şekilde latent forma dönüşmektedir. Aktif PAI-1'in latent PAI-1'e dönüşüm mekanizması tam olarak bilinmemektedir (71).

PAI-1 geni için promoter (5' terminal sonlanma) ve 3'untranslated (3' terminal sonlanma) bölgede tanımlanmış çeşitli polimorfizmler bulunmaktadır: Tek nükleotid polimorfizmi (-844, 9785, 11053, 12078 bç'de), tek nükleotid insersiyon/delesyon polimorfizmi (-675 bç'de), dinükleotid tekrar polimorfizmi (-153 ve 7843 bç'de), 9 nükleotid insersiyon/delesyon polimorfizmi (-11,320 bç'de) (72). Bu polimorfizmlerin varlığı *PAI-1* üretiminde farklılıklara yol açmaktadır. Promoterın -675. pozisyonuna lokalize olan 4G/5G insersiyon/delesyon polimorfizmidir. Bu polimorfizm, 4 veya 5 guanin nükleotid dizisine neden olmakta (4G veya 5G) ve ortaya çıkan farklı alleller *PAI-1* ifadenmesinde değişikliklere yol açmaktadır. Tek nükleotid değişimine bağlı *PAI-1* transkripsiyon hızındaki artış sonucunda beliren plazma *PAI-1* seviyelerindeki bu değişiklikler serebral iskemi, miyokard infarktüsü, habituel abortus ve obezite gelişimi ile ilişkili olabilmektedir. Bu fonksiyonel polimorfizmin, *PAI-1* geninin sitokinler ve diğer stimulatör ajanlara cevabına ne tür etkileri olduğu ise bilinmemektedir.

Plazma *PAI-1* seviyeleri özellikle genetik faktörler tarafından belirlenir. *PAI-1* geni intron 3'te sekiz allel (CA)_n tekrar polimorfizminin ve 3' flanking bölgesinin yüksek plazma *PAI-1* seviyeleri ile ilişki olduğu düşünülmektedir (73). Bunun yanı sıra 4G/4G polimorfizmine sahip bireyler de daha yüksek plazma *PAI-1* seviyelerine sahiptir. 4G alleli için homozigot olan bu bireylerde ayrıca trombositlerde yüksek *PAI-1* aktivitesi ve yüksek antijen seviyeleri mevcuttur. Bu nedenle endojen ve eksternal plazminojen aktivasyonuna karşı daha yüksek rezistans göstermektedirler. 5G/4G promoter polimorfizminin hem sağlıklı bireylerdeki hem de koroner arter hastalığı, miyokard infarktüsü, venöz tromboz, allogreft koroner arter hastalığı, pulmoner embolizm gibi tromboembolik hastalıkları olan bireylerdeki plazma *PAI-1* yüksekliği ile ilişkili olduğu

bildirilmektedir (74). Bu polimorfizmin ayrıca kanserle ilişkili olduğu, 4G allelinin kolorektal ve endometrial kanser riskini arttırdığı da gösterilmiştir (75).

2.4.5.ACE I/D Polimorfizmi

Angiotensin Converting Enzyme (ACE) geni insan genomunun 17q23 lokusunda bulunmaktadır ve 26 ekzon içermektedir. 21 Kb ağırlığına sahip bir gendir. On altıncı introndaki 287 baz çiftinin olup olmamasına bağlı olarak Insertion / Deletion (I/D) polimorfizmi oluşmaktadır. Buna göre DD, ID ve II olmak üzere 3 genotip bulunmaktadır (76). Prevalans açısından bakılırsa insertion allelinin sıklığı %44, deletion allelinin sıklığı %56 olarak bildirilmektedir (77). Doku ve plazmadaki ACE düzeyi polimorfizme göre değişir. Gen polimorfizmi serum ACE düzeyi değişikliğini %47 oranında etkilemektedir. DD genotipli kişilerde ACE düzeyi en yüksek, II genotipli kişilerde ACE düzeyi en düşüktür. Bu durum hücre zarına bağlı ACE için de geçerlidir (78).

Vücutta su ve tuz kaybı olduğunda veya sempatik aktivasyon durumunda böbreğin juxtaglomerüler aparatustan renin salınımı meydana gelmektedir. Bu da karaciğerde sentezlenen anjiotensinojeni anjiotensin I'e dönüştürmektedir. Anjiotensin I ise birçok damarın endotelinde bulunan, pulmoner damarlarda yüksek konsantrasyonlarda var olan ACE ile anjiotensin II'ye dönüşmektedir. Kuvvetli bir vazokonstriktör olan anjiotensin II adrenal korteksten aldosteron salgılanmasını uyarmaktadır. Aldosteron ise sodyum iyonunun tutulmasına yol açmaktadır. Anjiotensin II aminopeptidaz A (anjiotensinaz) ile anjiotensin III'e dönüştürülmektedir. Anjiotensin III aldosteronun adrenal üretiminde güçlü bir stimülatördür. Tüm memeli dokularının endotel hücreleri luminal yüzlerinde ACE eksprese etmekte ve çözümlü formda salgılamaktadırlar. Akciğer ile beyin mikrovasküler ve kapiller hücreleri ACE'den zengindir. Ayrıca barsak, koroid pleksus ve böbrek tübül hücreleri de ACE'den zengindir. ACE anjiotensin I'i anjiotensin II'ye dönüştürmesinden başka vazoaaktif peptid metabolizmasında da önemlidir; çünkü endotelyal yüzeyde bir vazodilatör olan bradikinin degradasyonunu sağlamaktadır (79, 80).

ACE genindeki insertion ACE ekspresyonunu azaltmaktadır, bu yüzden II homozigotlara göre DD homozigotlar %65, ID heterozigotlar ise %31 daha fazla ACE düzeyine sahiptir (81). I allellilerde görülen düşük ACE aktivitesi, bradikininin yarı ömrünün artması ve anjiotensin II üretimindeki azalma, endotele bağlı artmış vazodilatasyon sebebiyle ACE geninin fizyolojik önemini vurgulamaktadır. ACE I/D polimorfizmi ile koroner kalp hastalığı, ventriküler hipertrofi, miyokard enfarktüsü, koroner anjioplasti sonrası restenoz, kardiyomiyopati ve ani kardiyak ölüm gibi birçok patolojik durumun gelişimi arasında ilişki bulunduğu bildirilmektedir (80). Türk toplumunda da koroner arter hastalığı ile D alleli arasında bir ilişki olabileceği gösterilmiştir (82). DD genotipli kişilerde sol ventrikül dilatasyonunda, kalp yetmezliğindeki hastaların mortalitesinde II genotipli kişilere göre bir artış olduğu bildirilmektedir (82). Türk toplumunda yapılan bir araştırmada hipertansiyonlu hastalarda DD genotipinin predispozan bir faktör olduğu ve ACE I/D polimorfizminin hipertansiyon üzerine etki edebileceği sonucuna varılmıştır (83). Ayrıca ACE DD genotipinin tekrarlayan gebelik kaybı (RPL) için bir risk faktörü olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir (84, 85).

2.4.6.eNOS E298D Polimorfizmi

eNOS geni kromozom 7q35-36'da lokalize olan 21 kb uzunluğunda ve 26 ekzon içermekte olan bir gendir (86). Genin 5'-ucu bölgesi, eNOS promoterının TATA dizisinin bulunmadığı ve proksimal promoter bölgesinin endotelial hücrelerde bulunan konstitüf olarak eksprese edilen gen ile uyumlu olduğunu göstermektedir. eNOS geninin cDNA'ları sığır ve insan endotelial hücrelerinden klonlanmıştır ve cDNA'ların 3609 nükleotidlik açık okuma çerçevesine sahip olduğu gösterilmiştir. 5'-ucu bölgesinde akut-faz cevabı (shear stress) ve sterol düzenleyici cis elementleri içermektedir (86, 87). Shear stressin hemodinamik gücünün ve kronik egzersizin eNOS mRNA ekspresyonunu arttırdığı bildirilmektedir. Bu durum promoter bölgesinde shear stress cevabının düzenleyici rolü olduğunu düşündürmektedir (87). Bugüne kadar koroner arter hastalığı, miyokard infarktüsü, hipertansiyon, stroke ve renal hastalıklar gibi pek

çok vasküler bozukluğun eNOS geni polimorfizmi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ancak çalışma sonuçları ırklar arasında değişkenlik göstermektedir.

Enzimin fonksiyonel aktivitesini etkileyen, eNOS genine ait çeşitli polimorfizmler olduğu bilinmektedir. Ekzon 7'de bulunan 894. nükleotiddeki guanin bazı yerine timin bazının (894G/T) gelmesiyle glutamik asid aspartik aside dönüşmektedir. Bu amino asit değişikliği NO düzeyinin azalmasına sebep olmakta ve preeklampsi riskini arttırmaktadır. Bu polimorfizm direkt olarak enzimin bir veya daha fazla fonksiyonel özelliğini değiştirebilme potansiyeline sahiptir. Diğer bir polimorfizm -786. nükleotidde timin yerine sitozin (-786T/C) gelmesiyle oluşmakta ve eNOS geninin promoter aktivitesini azaltmaktadır. Bu polimorfizmin şüpheli de olsa RPL ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir (88). Başka bir polimorfizm ise VNTR (variable number of tandem repeats) 27-bç'lik tekrar polimorfizmi olarak tanımlanmaktadır ve plazma NO konsantrasyonları ile plazma nitrit ve nitrat düzeylerini değiştirmektedir (88).

eNOS geninde tespit edilen varyasyonlar potansiyel olarak yüksek oranda polimorfik linkage markerları olarak kullanılmaktadır. Bu markerların multifaktöriyel kardiyovasküler hastalıklarda genetik linkage analizlerinin yapılmasında önemli olabileceği belirtilmektedir (86). Bu değişikliklerden bazıları: promoter bölgesinde tek nükleotid polimorfizmleri; -1468 T > A, -922 A > G, -786 T > C dir. Bu baz değişikliklerinden hiçbirinin transkripsiyon faktör bağlanıcı bölgede bulunmadığı ve endotelial hücrelerde sadece 144 bp'lik bir bölgenin promoter aktivitesinin olduğu ve bu bölgenin -3500 ile -3193 bç'leri arasında olan kısım olduğu öne sürülmektedir (89). eNOS geninde meydana gelen varyasyonların, eNOS enzimi ve eNOS enziminin etkilediği yollarda değişikliklere sebep olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (90, 91, 92). eNOS geninin kodladığı enzim, demir grubu içeren çeşitli kofaktörlere ihtiyaç duyulan bir reaksiyonda NO sentezlemektedir. 7. ekzondaki Glu298Asp varyantı demir bağlama ve kalsiyum/kalmodülün bağlama bölgesinin orta kısmında yer almaktadır. İntron 4a/b bölgesi ise demir bağlama bölgesinden sonraki kısımdadır. Plazma NO seviyesinin bu iki polimorfizmden etkilendiği buna bağlı

olarak, gen üzerindeki bu yerleşimleri ile bu polimorfizmlerin kan basıncı üzerine olan etkisiyle ilgili olabileceği bildirilmiş ve miyokard infarktüsü, tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir (89, 90, 93).

2.4.7. Apo E E2/E3/E4 Polimorfizmleri

Apolipoprotein E bir plazma glikoproteinidir ve apo gen ailesindedir. Apo E'yi kodlayan gen 19. kromozomun uzun kolunda 19q13.32 pozisyonunda lokalizedir ve 3597 nükleotid uzunluğundadır. Apo E geninin dört ekzonu mevcuttur, bu ekzonlar üç intron ile birbirinden ayrılmıştır. 299 aminoasitlik bir polipeptide sahiptir ve 5' translasyona uğramayan (untranslated) dizide 23. ve 24. bazlar arasında, translasyonu başlatan metionin kodonunun yukarısında yerleşmiştir (94). Bütün intronları GT nükleotidleri ile başlamakta ve AG nükleotidleri ile bitmektedir.

Apo E'nin üç ana izoformu bulunur ve tek bir genin üç allelik formunun (E2, E3 ve E4) ürünleridir. Apo E3 112. pozisyonda sistein, 158. pozisyonda arjinin içermektedir. Apo E2 her iki pozisyonda sistein içerirken E4 her ikisinde de arjinin içermektedir. Populasyon çalışmalarında en sık görülen üç farklı polimorfik allel (E2, E3 ve E4) üzerinde durulmaktadır. Genel olarak insanlarda en yaygın olarak görülen allel E3 (> % 60) iken, E2 ve E4 allelleri popülasyona göre sıklık sırasında yer değiştirmektedir. İzofomlar nedeniyle de bu polimorfizm 6 Apo E fenotipiyle sonuçlanmaktadır; homozigot E2/E2, E3/E3, E4/E4 ve heterozigot E3/E2, E4/E2, E4/E3. Apo E polimorfik allellerinin yaygınlığı genel popülasyonda E2 için 0.08, E3 için 0.75 ve E4 için 0.14 olarak saptanmıştır. Altı genotip görülme sıklıklarına göre şu sıradadır: 3/3, 4/3, 3/2, 4/4, 4/2 ve 2/2 (95, 96).

Apo E mRNA 1163 bç uzunluğundadır ve translasyona uğrayarak 317 amino asitlik bir proteinin oluşmasını sağlamaktadır. 18 amino asitlik metionin ile başlayan segment, 299 amino asitlik Apo E'yi oluşturmak amacıyla gerekli dokuya yönlenebilir. Apo E karaciğer, beyin, dalak, akciğer, adrenal bez,

böbrek, over, makrofajlar ve kas hücreleri tarafından sentezlenmektedir. Lipit metabolizmasında trigliseridden zengin artıkların plazmadan uzaklaştırılmasında görevlidir. Karaciğere periferik dokulardan kolesterol taşıyan HDL'nin, periferik dokularda daha fazla kolesterol almasını sağlamaktadır.

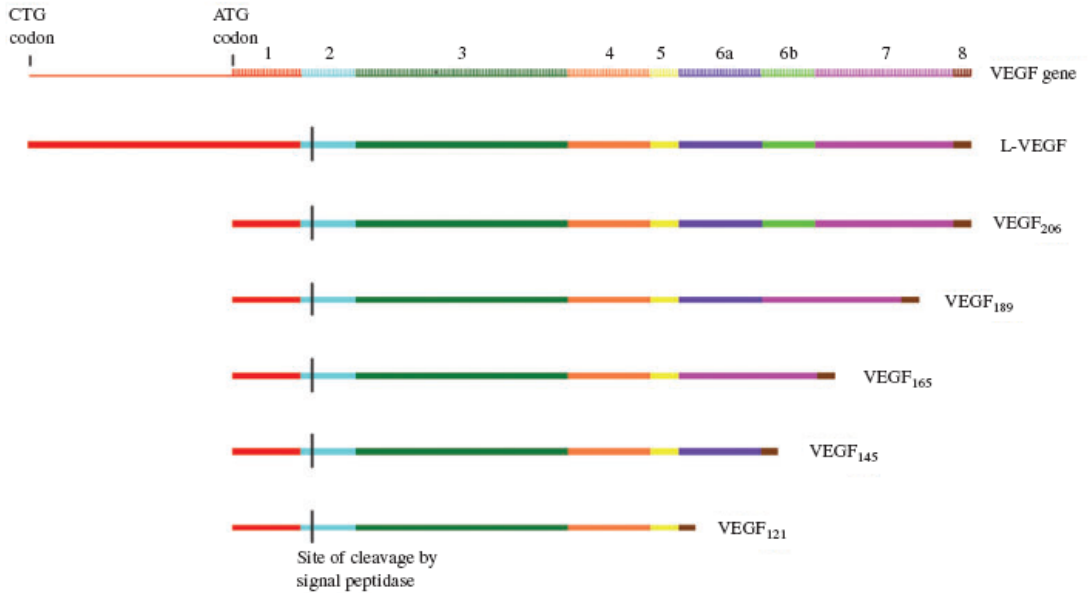
Serum kolesterolunun yaklaşık olarak % 50'sini etkileyen değişikliklerin genetik sebepler olduğu düşünülmektedir. Düşük dansiteli lipoprotein-LDL (low density lipoprotein)'deki % 16'lık genetik çeşitliliğin *Apo E* gen lokusundaki değişikliklerden kaynaklandığı bildirilmektedir (97). E3/E2 genotipine sahip bireylerde E3/E3 genotiplilere göre % 20 daha düşük, E3/E4 genotiplilerde ise % 10 daha yüksek LDL kolesterol seviyesi olduğu bildirilmektedir (98). Apo E2 Apo E'nin plazmadaki seviyesini artırarak LDL kolesterol seviyesini düşürmektedir ve koroner arter hastalığı riskini azaltmaktadır (99). Apo E4 ise plazma Apo E seviyesini azaltır, total kolesterol, LDL kolesterol ve VLDL kolesterolun artışına sebep olarak Apo E3 ile karşılaştırıldığında ateroskleroz ve koroner arter hastalığı riskini arttırmaktadır (99). Apo E4 allelinin Alzheimer Hastalığı riskini arttırıcı bir faktör olduğu da bilinmektedir (100). Trombofilik bir faktör kabul edilen Apo E bu etkisi sebebiyle tekrarlayan gebelik kaybı ve Apo E arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda, Apo E4 allelinin riski arttırıcı bir faktör olduğu bildirilmektedir (101, 102).

2.4.8.VEGF C405G, C460T, C936T, C2578A Polimorfizmleri

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF), 6. kromozomun kısa kolunda (6p21.1) lokalize olan, molekül ağırlığı 45 kDa olan bir sitokindir (Şekil 2.5). Dokularda mitojenik etkisi sayesinde anjiogenezisi uyarabilmektedir ve vasküler geçirgenliği arttırabilme özelliğine sahiptir (103). İlk olarak tümör hücrelerinde yapılan ve kapillerlerin proteinlere geçirgenliğini arttıran bir protein olarak tanımlanmıştır (103). Vasküler endotelyal büyüme faktörü glikozillenmiş bir glikoproteindir ve endotelyal hücreler için seçici mitojeniktir. Vaskülogenezde ve mikrovasküler permeabilite kontrolünde önemlidir. VEGF farklı dokularda

olduğu gibi insan plasentasında da bulunmaktadır. VEGF'in serum seviyeleri gebeliğin ilk yarısında gebeliğin karakteristik özellikleri olan trofoblast ve uterin vasküler olaylarla eř zamanlı olarak yükselmektedir.

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörünün seçici olarak endotel hücrelerindeki mitojenik etkisi sayesinde anjiogenezisi uyarmasının yanı sıra morfogenez ve kemotaksiste de önemli roller üstlendiği bilinmektedir (103). Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü epitel hücrelerinde, mezenkimal hücrelerde ve özellikle de tümör hücrelerinde fazla miktarda sentezlenmektedir. VEGF'in insanda 121, 165, 189 ve 206 amino asit içeren formları olup, çoğu sistemlerde VEGF–121 ve 165 asıl formlardır. VEGF ile ilişkili *VEGF B, C, D, E* olarak belirtilen genler ve plasental büyüme faktörü de tanımlanmıştır. Bunların her biri özgün işlevlere sahiptir (103). VEGF anjiogenezisi düzenleyen ve mitozu uyaran temel sitokinlerden bir tanesi olduğu gibi anjiogenezin hem normal hem de patolojik sürecinde yer almaktadır (103).



şekil 2.5. VEGF genine ait ekzonik ve intronik alt birimler

VEGF-A tümörler, yara iyileşmesi ve enflamasyon tarafından indüklenen anjiogenik yanıtın ilk basamaklarında vasküler tromboz ve ekstravasküler fibrin açığa çıkararak temel faktördür. Pıhtılaşma intravasküler de olsa ekstravasküler de olsa doku faktörü tarafından başlatılmakta ve trombin üretimine, platelet aktivasyonuna (ve bunun sonucunda çeşitli büyüme faktörlerinin salgılanmasına) ve fibrin formasyonuna yol açmaktadır ki bunların tümü proanjiogenik etkilidir (104). Çeşitli insan tümörlerinde mikrovasküler dansite ile doku faktörü ve VEGF-A ekspresyonu arasında sıkı bir korelasyon tespit edilmiştir. Daha yeni veriler, doku faktörünün pıhtılaşmadan bağımsız mekanizmalarla da anjiogenezi etkileyebildiğini göstermektedir. İlk olarak; doku faktörü VEGF-A ekspresyonunu upregüle etmekte ve anjiogenez inhibitörlerinden trombospondin-2'nin transkripsiyonunu downregüle etmektedir (105). Doku faktörü tarafından indüklenen VEGF-A upregülasyonu, kendi kendini devam ettirebilen bir feedback ,döngü kurabilme potansiyeline sahiptir; çünkü VEGF-A ekspresyonu da doku faktörünün ekspresyonunu upregüle etmektedir.

VEGF C2578A polimorfizminin miyokard infarktüsünde, AA genotipinin bir risk faktörü olduğu ve CC genotipinin koruyucu olduğu bildirilmektedir (106). Ayrıca Alzheimer hastalığında rol oynayabilmektedir. İtalyan hastalarla yapılan bir çalışmada 2578AA genotipinin Alzheimer hastası olanlarda olmayanlara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (tahmini rölatif risk: 3.37) (107). 2578AA genotipinin VEGF'in nöroprotektif etkisini azalttığı düşünülmektedir. Ayrıca başka bir çalışmada AA genotipinin erkeklerde amyotrofik lateral skleroz (ALS) açısından artmış bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (108). Psödoksantoma elastikum ilişkili retinopatideki koroidal neovaskülarizasyonun VEGF tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir. VEGF'e ait 10 adet polimorfizmin dahil edildiği bir çalışmada ciddi retinopati açısından en riskli olarak C460T polimorfizmi bulunmuştur (Tahmini rölatif risk: 3.83) (109). VEGF C405G polimorfizminin primer glomerulonefrit oluşumu ve gelişiminde GG genotipinin risk artışına sebep olduğu bildirilmektedir (110). C936T polimorfizmi ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada TT genotipinin

meme kanseri riskini azalttığı görölmüştür (111). Tekrarlayan gebelik kaybı ile VEGF ilişkisinde ise VEGF G1154A (93), C2578A ve C936T (112) polimorfizmlerinin etkili olduğu bildirilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Hasta Grupları

Çalışmamıza 56 habituel abortus çifti (56 kadın, 56 erkek olmak üzere 112 kişi), kontrol grubu olarak 43 çift (43 kadın, 43 erkek olmak üzere 86 kişi), spontan olarak sonlanmış 23 adet düşük materyali ve bu düşükleri yaşayan 22 anne olmak üzere toplam 243 olgu dahil edilmiştir. Habituel abortus grubundaki bireyler en az iki spontan abortusu olan, tekrarlayan gebelik kaybına sebep olabilecek bir anomali bulunmamış çiftlerden, kontrol grubu ise en az iki yaşayan ve sağlıklı çocuğu olup hiç spontan abortusu olmayan çiftlerden seçilmiştir. Düşük materyalleri ise sadece spontan olarak sonlanan gebeliklerden elde edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hastaların anamnezleri alınarak hasta bilgi formları dolduruldu. Hastaların yaşı, gebelik, parite sayıları, düşük sayıları, düşüklerin gebelik haftası, kadın hastaların jinekolojik öyküsü, geçirilmiş operasyonlar, sistemik hastalık varlığı (kalp-damar hastalıkları, diabetes mellitus, hipertansiyon, kronik karaciğer ve böbrek hastalığı, otoimmün hastalıklar gibi), kanama diyatezi veya trombozu şüphelendiren semptomlar ve eşi ile akraba evliliği olup olmadığı sorgulandı. Tekrarlayan düşükleri olan çiftlerin tümüne önceden yapılmış olan kromozom analizi sonuçları not edildi. Hastalara ve kontrol grubundaki bireylere çalışma hakkında bilgi verildi ve onamları alındı.

Tüm örneklerden Faktör V Leiden, Protrombin G20210A, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, PAI-1 5G/4G, ACE I/D, eNOS E298D, Apo E E2/E3/E4, VEGF A C936T, VEGF A C2578A , VEGF A C405G , VEGF A C460T polimorfizmleri Real Time PCR yöntemi ile Çanakkale On Sekiz Mart Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı'nda çalışılmıştır. 23 adet düşük materyalinden elde edilen dokulardan ayrıca QF-PCR çalışması yapılarak 13, 18, 21, X ve Y kromozomlarına ait sayısal

anomaliler araştırılmıştır. Düşük materyali 50 adet elde edilmiş olup, 27'sinde anne ve fetuse ait markerların QF-PCR'da korelasyonu ile maternal kontaminasyon tespit edilmiştir. Kontaminasyon tespit edilen bu materyaller çalışmadan çıkarılmıştır.

Tüm verilerin yüzde oranları, allel frekansları ve tahmini rölatif riskleri hesaplanmıştır.

Çalışmamız Çanakkale On Sekiz Mart Üniversitesi BAP-2012/029 numaralı proje ile desteklenmiştir ve çalışmamız için Çanakkale On Sekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan izin alınmıştır.

3.2.Sitogenetik Analiz

Habituel abortus çiftlerine daha önceden yapılan kromozom analizi GTG bantlama ile yapılmıştır. Periferik kan örnekleri heparinize enjektörle alınarak (8 damla) 10 ml'lik falkon tüplerde kültüre edilmiştir. Kültür için gerekli medyum içeriği şu şekildedir: 100 ml RPMI 1640 (Wisent Inc.), 20 ml fetal calf serum (Biological Industries), 2 ml L-Glutamine (Wisent Inc.), 1 ml fitohemaglütinin (Biological Industries) ve 2 ml penisilin-streptomisin (Biological Industries). 5-10 damla arası heparinize periferik kan, 5 ml medyum üzerine eklenmiştir. Kültür tüpleri 72 saat boyunca yatık pozisyonda 37°C'de inkube edilmiştir. Harvestten iki saat önce kültür tüplerine 100 µg/ml kolsemid (Biological Industries) eklenmiştir. 72 saatlik süre sonunda kültür tüpü 1200 rpm'de 8 dakika santrifüje edilip supernatan atılmış, hipotonik ortam elde etmek için üzerine KCl (0.075 M) çözeltisi eklenmiştir. 30 dakika hipotonik solüsyonla bekleyen tüp tekrar 1200 rpm'de 8 dakika santrifüje alınmış, supernatan atılmıştır. Üzerine fiksasyon amacıyla metanol/glacial asetik asid (3/1 hacimde) eklenmiş, bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır. Son santrifüj sonrası kalan pellet hazırlanan lamların üzerine lamı kaplayacak şekilde damlatılmıştır. Lamlar 60°C'lik kurutucu üzerinde birkaç saniye kurutulmuştur. Kurumuş lamlar 55-60°C'lik inkübatörde 24 saat boyunca eskitme amacıyla bekletilmiştir. Lamlar daha sonra bantlama amacıyla tripsin

solüsyonunda 10 saniye, ardından % 6'lık Giemsa solüsyonunda (Merck) 10 saniye bekletilmiş, kurutulmuş ve G bantlaması elde edilen kromozomlar mikroskop ve analiz programı (Cytovision, version 2000, Applied Imaging) kullanılarak analiz edilmiştir. Metafazlar incelenmiştir ve kromozomlar uluslararası insan sitogenetik nomenklatürüne (ISCN) göre sınıflandırılmıştır.

3.3.Polimorfizmlerin Analizi

3.3.1.DNA İzolasyonu

Total genomik DNA EDTAlı tüpe alınmış olan periferik kandan QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini Kit kullanılarak elde edilmiştir. DNA izolasyonu prosedürü şu şekilde yapılmıştır:

1. 20 µl QIAGEN Proteaz (ya da proteinaz K) 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünün dip kısmına alınmıştır.
2. Mikrosantrifüj tüpüne 200 µl örnek (periferik kan) eklenmiştir. Örnek miktarı 200 µl'den az ise gerekli miktar oluşana kadar PBS eklenmiştir. RNA-free genomik DNA kullanılacaksa 4 µl RNase solusyonu eklenmiştir.
3. Örneğe 200 µl Buffer AL eklenmiş, 15 saniye vortekslenmiştir.
4. 56 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
5. Mikrosantrifüj tüpü kısa santrifüj edilmiştir.
6. Örneğe % 96-100'lük 200 µl etanol eklenmiş ve 15 saniye vortekslenmiştir. Kısa santrifüj yapılmıştır.
7. Karışım QIAamp Mini spin kolona (2 ml'lik toplama tüpü) tüpün kenarları ıslatılmadan aktarılmıştır. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Spin kolon, temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne alınmıştır, filtratı içeren toplama tüpü atılmıştır.
8. Spin kolona 500 µl AW1 buffer eklenmiştir. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Spin kolon, temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne alınmıştır, filtratı içeren toplama tüpü atılmıştır.
9. Spin kolona 500 µl AW2 buffer eklenmiştir. 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

10. Spin kolon, temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne alınmıştır, filtratı içeren toplama tüpü atılmıştır. En yüksek devirde 1 dakika santrifüj edilmiştir.

11. Spin kolon, temiz bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır, filtratı içeren toplama tüpü atılmıştır. Spin kolona 200 µl AE buffer ya da distile su eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

3.3.2.Real Time PCR (Roche, Mannheim, Almanya) ile Mutasyon Analizi

3.3.2.1.FVL G1691A (rs6025)

PCR karışımı için FVL mutasyon tespit karışımı 1x78 µl (0.01 FVL forward ve revers primer, 0.01 FVL HybProbe prob Red 640, 0.01 FVL HybProbe prob Florescein), FVL reaksiyon karışımı 1x78 µl (Tris-HCL Tamponu, 0.01 Taq DNA polimeraz (wt), 0.07 dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dTTP), FVL dilüent 1x1 mL (H₂O- PCR kalitesinde) gereklidir. 11 µl dilüent, 2 µl ölçüm karışımı, 2 µl reaksiyon karışımı ile toplam 15 µl'lik PCR karışımı hazırlanmıştır. 5 µl kalıp DNA eklenerek 20 µl'lik son miktar ile PCR karışımı kapillere aktarılmıştır ve LightCycler 2.0 Roche cihazına yüklenmiştir. Kontrol DNA için FVL kontrol kalıbı 1x50 µl (0.01 kontrol kalıbı DNA pCRF5 WT ve pCRF5 MUT plazmid içerir) kullanılmıştır.

Protokol, denatürasyon 95 °C'de 10 dakika, kuantifikasyon 45 döngü 95 °C'de 5 saniye, 55 °C'de 10 saniye ve 72 °C'de 5 saniye, erime-melting 95 °C'de 20 saniye, 45 °C'de 1 dakika ve 80 °C'de 0.2 devamlı mod, soğutma 40 °C'de 30 saniye olarak uygulanmıştır.

Wild type (normal allel) 640 kanalında 65 °C'lik T_m'de (erime noktası), mutant allel ise 57 °C'lik T_m'de tespit edilmiştir.

3.3.2.2.Faktör II (Protrombin) G20210A (rs1799963)

PCR karışımı için FIIG20210A mutasyon tespit karışımı 1x78 µl (<%0.01 FIIG20210A forward ve revers primer, <%0.01 FIIG20210A HybProbe prob Red 640, <%0.01 FIIG20210A HybProbe prob Florescein), FVL reaksiyon karışımı 1x78 µl (Tris-HCL Tamponu, <%0.01 Taq DNA polimeraz (wt), <%0.07 dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dTTP), FIIG20210A dilüent 1x1 mL (H₂O- PCR kalitesinde) gereklidir. 11 µl dilüent, 2 µl ölçüm karışımı, 2 µl reaksiyon karışımı ile toplam 15 µl'lik PCR karışımı hazırlanmıştır. 5 µl kalıp DNA eklenerek 20 µl'lik son miktar ile PCR karışımı kapillere aktarılmıştır ve LightCycler 2.0 Roche cihazına yüklenmiştir. Kontrol DNA için FIIG20210A kontrol kalıbı 1x50 µl (<%0.01 kontrol kalıbı DNA pF2 WT ve pF2 MUT plazmid içerir) kullanılmıştır.

Protokol, denatürasyon 95 °C'de 10 dakika, kuantifikasyon 45 döngü 95 °C'de 5 saniye, 55 °C'de 10 saniye ve 72 °C'de 5 saniye, erime-melting 95 °C'de 1 dakika, 55 °C'de 30 saniye, 45 °C'de 30 saniye, 40 °C'de 2 dakika ve 70 °C'de 0.1 devamlı mod, soğutma 40 °C'de 30 saniye olarak uygulanmıştır.

Wild type (normal allel) 640 kanalında 59 °C'lik T_m'de, mutant allel ise 49 °C'lik T_m'de tespit edilmiştir.

3.3.2.3.MTHFR C677T (rs1801133)

Tüm primer ve problemleri içeren ajan tüpüne 66 µl PCR-grade su ilave edilmiştir, çözelti karıştırılmıştır. 20 µl PCR reaksiyonu için 4 µl ajan kullanılmıştır. Kontrol DNA'nın hazırlanması için 40 µl PCR-grade su ilave edilmiştir, çözelti karıştırılmıştır. 20 µl PCR reaksiyonu için 5 µl kontrol DNA kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı bir reaksiyon için 7.4 µl PCR-grade su, 1.6 µl Mg⁺² solüsyonu, 4 µl ajan miksi (primer ve problemleri içerir), 2 µl Roche Fast Start Master mix ile hazırlanmıştır. 5 µl kalıp DNA eklenerek son reaksiyon hacmi elde edilmiştir.

Protokol, denatürasyon 95 °C'de 10 dakika, kuantifikasyon 45 döngü 95 °C'de 5 saniye, 55 °C'de 10 saniye ve 72 °C'de 15 saniye, erime-melting 95 °C'de 20 saniye, 40 °C'de 20 saniye ve 85 °C'de 0.2 devamlı mod, soğutma 40 °C'de 30 saniye olarak uygulanmıştır.

Wild type (normal allel) *MTHFR* C677, 640 kanalında 63 °C'lik T_m'de tespit edilmiştir. Mutant *MTHFR* 677T ise 54.5 °C'lik T_m'de tespit edilmiştir.

3.3.2.4.MTHFR A1298C (rs1801131)

Tüm primer ve problemleri içeren ajan tüpüne 66 µl PCR-grade su ilave edilmiştir, çözelti karıştırılmıştır. 20 µl PCR reaksiyonu için 4 µl ajan kullanılmıştır. Kontrol DNA'nın hazırlanması için 40 µl PCR-grade su ilave edilmiştir, çözelti karıştırılmıştır. 20 µl PCR reaksiyonu için 5 µl kontrol DNA kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı bir reaksiyon için 7.4 µl PCR-grade su, 1.6 µl Mg⁺² solüsyonu, 4 µl ajan miksi (primer ve problemleri içerir), 2 µl Roche Fast Start Master mix ile hazırlanmıştır. 5 µl kalıp DNA eklenerek son reaksiyon hacmi elde edilmiştir.

Protokol, denatürasyon 95 °C'de 10 dakika, kuantifikasyon 40 döngü 95 °C'de 5 saniye, 62 °C'de 10 saniye ve 72 °C'de 6 saniye, erime-melting 72 °C'de 30 saniye, 95 °C'de 20 saniye, 40 °C'de 1 saniye 0.2 hız ile, 40°C'de 30 saniye, 85 °C'de 1 saniye 0.5 hız ile, soğutma 40 °C'de 30 saniye olarak uygulanmıştır.

Wild type (normal allel) *MTHFR* A1298, 640 kanalında 65 °C'lik T_m'de tespit edilmiştir. Mutant *MTHFR* 1298C ise 59 °C'lik T_m'de tespit edilmiştir.

3.3.2.5.PAI-1 5G/4G (rs1799889)

Tüm primer ve problemleri içeren ajan tüpüne 66 µl PCR-grade su ilave edilmiştir, çözelti karıştırılmıştır. 20 µl PCR reaksiyonu için 4 µl ajan

kullanılmıştır. Kontrol DNA'nın hazırlanması için 40 µl PCR-grade su ilave edilmiştir, çözelti karıştırılmıştır. 20 µl PCR reaksiyonu için 5 µl kontrol DNA kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı bir reaksiyon için 7.4 µl PCR-grade su, 1.6 µl Mg⁺² solüsyonu, 4 µl ajan miksi (primer ve problemleri içerir), 2 µl Roche Fast Start Master mix ile hazırlanmıştır. 5 µl kalıp DNA eklenerek son reaksiyon hacmi elde edilmiştir.

Protokol, denatürasyon 95 °C'de 10 dakika, kuantifikasyon 40 döngü 95 °C'de 3 saniye, 60 °C'de 10 saniye ve 72 °C'de 13 saniye, erime-melting 95 °C'de 30 saniye, 40 °C'de 1 dakika ve 85 °C'de 0.2 devamlı mod, soğutma 40 °C'de 30 saniye olarak uygulanmıştır.

Human Plasminogen Activator Inhibitor 5G genotipi kanal 640'ta 61 °C'lik T_m'de, 4G genotipi 54 °C'lik T_m'de saptanmıştır.

3.3.2.6.ACE I/D (rs1799752)

Primerler PCR-grade su eklenerek 100 µM olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı bir reaksiyon için 7.4 µl PCR-grade su, 1.6 µl Mg⁺² solüsyonu, 2 µl Master Mix SYBR Green, 2 µl Forward primer, 2 µl Reverse primer ile hazırlanmıştır. 5 µl kalıp DNA eklenerek 20 µl'lik son reaksiyon hacmi elde edilmiştir.

Protokol, denatürasyon 95 °C'de 10 dakika, kuantifikasyon 40 döngü 95 °C'de 15 saniye, 58 °C'de 15 saniye ve 72 °C'de 25 saniye, erime-melting 95 °C'de 15 saniye, 60 °C'de 15 saniye ve 98 °C'de 0.2 devamlı mod, soğutma 40 °C'de 30 saniye olarak uygulanmıştır.

Angiotensinogen Converting Enzyme Insertion genotipi kanal 530'da 92 °C'lik T_m'de, Deletion genotipi 85 °C'lik T_m'de saptanmıştır.

3.3.2.7.eNOS E298D (rs1799983)

Tüm primer ve problemleri içeren ajan tüpüne 66 µl PCR-grade su ilave edilmiştir, çözelti karıştırılmıştır. 20 µl PCR reaksiyonu için 4 µl ajan kullanılmıştır. Kontrol DNA'nın hazırlanması için 40 µl PCR-grade su ilave edilmiştir, çözelti karıştırılmıştır. 20 µl PCR reaksiyonu için 5 µl kontrol DNA kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı bir reaksiyon için 7.4 µl PCR-grade su, 1.6 µl Mg⁺² solüsyonu, 4 µl ajan miksi (primer ve problemleri içerir), 2 µl Roche Fast Start Master mix ile hazırlanmıştır. 5 µl kalıp DNA eklenerek son reaksiyon hacmi elde edilmiştir.

Protokol, denatürasyon 95 °C'de 10 dakika, kuantifikasyon 45 döngü 95 °C'de 5 saniye, 60 °C'de 10 saniye ve 72 °C'de 15 saniye, erime-melting 95 °C'de 20 saniye, 40 °C'de 20 saniye ve 85 °C'de 0.2 devamlı mod, soğutma 40 °C'de 30 saniye olarak uygulanmıştır.

Wild type (normal allel) 894G/G, 640 kanalında 52 °C'lik T_m'de (erime noktası) tespit edilmiştir. Mutant allel 894T/T ise 59 °C'lik T_m'de tespit edilmiştir.

3.3.2.8.Apo E E2/E3/E4 (rs429358)

Tüm primer ve problemleri içeren ajan tüpüne 66 µl PCR-grade su ilave edilmiştir, çözelti karıştırılmıştır. 20 µl PCR reaksiyonu için 4 µl ajan kullanılmıştır. Kontrol DNA'nın hazırlanması için 80 µl PCR-grade su ilave edilmiştir, çözelti karıştırılmıştır. 20 µl PCR reaksiyonu için 5 µl kontrol DNA kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı bir reaksiyon için 6.2 µl PCR-grade su, 1.6 µl Mg⁺² solüsyonu, 4 µl ajan miksi (primer ve problemleri içerir), 1.2 µl DMSO, 2 µl Roche Fast Start Master mix ile hazırlanır. 5 µl kalıp DNA eklenerek son reaksiyon hacmi elde edilmiştir.

Protokol, denatürasyon 95 °C'de 10 dakika, kuantifikasyon 45 döngü 95 °C'de 5 saniye, 60 °C'de 10 saniye ve 72 °C'de 15 saniye, erime-melting 95 °C'de 20 saniye, 40 °C'de 20 saniye ve 85 °C'de 0.2 devamlı mod, soğutma 40 °C'de 30 saniye olarak uygulanmıştır.

Analiz 530 ve 640'lık kanallarda yapılmıştır. 112C 158R (Apo E3) genotipi 49 °C (530)- 63 °C (640)- normal, 112C 158C (Apo E2) 49 °C (530)- 53 °C (640)- Tip III Hiperlipidemi ve 112R 158R (Apo E4) genotipi 59 °C (530)- 63 °C (640)- Kolesterol seviyesi yüksekliği ve homozigotluğunda Alzheimer hastalığı için yüksek risk olarak saptanmıştır.

3.3.2.9.VEGF C405G (rs2010963)

Tüm primer ve probları içeren ajan tüpüne 100 µl PCR-grade su ilave edilmiştir, çözelti karıştırılmıştır. 20 µl PCR reaksiyonu için 1 µl ajan kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı bir reaksiyon için 10.4 µl PCR-grade su, 1.6 µl Mg⁺² solüsyonu, 1 µl ajan miksi (primer ve probları içerir), 2 µl Roche Fast Start Master mix ile hazırlanmıştır. 5 µl kalıp DNA eklenerek son reaksiyon hacmi elde edilmiştir.

Protokol, denatürasyon 95 °C'de 10 dakika, kuantifikasyon 45 döngü 95 °C'de 10 saniye, 60 °C'de 10 saniye ve 72 °C'de 15 saniye, erime-melting 95 °C'de 20 saniye, 40 °C'de 20 saniye ve 85 °C'de 0.2 devamlı mod, soğutma 40 °C'de 30 saniye olarak uygulanmıştır.

Wild type (normal allel) 405 C/C, 530 kanalında 65 °C'lik Tm'de (erime noktası) tespit edilmiştir. Mutant allel 405 G/G ise 52 °C'lik Tm'de tespit edilmiştir.

3.3.2.10.VEGFA C460T (rs833061)

Tüm primer ve probları içeren ajan tüpüne 100 µl PCR-grade su ilave edilmiştir, çözelti karıştırılmıştır. 20 µl PCR reaksiyonu için 1 µl ajan kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı bir reaksiyon için 10.4 µl PCR-grade su, 1.6 µl Mg⁺² solüsyonu, 1 µl ajan miksi (primer ve probları içerir), 2 µl Roche Fast Start Master mix ile hazırlanmıştır. 5 µl kalıp DNA eklenerek son reaksiyon hacmi elde edilmiştir.

Protokol, denatürasyon 95 °C'de 10 dakika, kuantifikasyon 45 döngü 95 °C'de 10 saniye, 60 °C'de 10 saniye ve 72 °C'de 15 saniye, erime-melting 95 °C'de 20 saniye, 40 °C'de 20 saniye ve 85 °C'de 0.2 devamlı mod, soğutma 40 °C'de 30 saniye olarak uygulanmıştır.

Wild type (normal allel) 460 C/C, 530 kanalında 61 °C'lik T_m'de (erime noktası) tespit edilmiştir. Mutant allel 460T/T ise 54 °C'lik T_m'de tespit edilmiştir.

3.3.2.11.VEGFA C936T (rs3025039)

Tüm primer ve probları içeren ajan tüpüne 100 µl PCR-grade su ilave edilmiştir, çözelti karıştırılmıştır. 20 µl PCR reaksiyonu için 1 µl ajan kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı bir reaksiyon için 10.4 µl PCR-grade su, 1.6 µl Mg⁺² solüsyonu, 1 µl ajan miksi (primer ve probları içerir), 2 µl Roche Fast Start Master mix ile hazırlanmıştır. 5 µl kalıp DNA eklenerek son reaksiyon hacmi elde edilmiştir.

Protokol, denatürasyon 95 °C'de 10 dakika, kuantifikasyon 45 döngü 95 °C'de 10 saniye, 60 °C'de 10 saniye ve 72 °C'de 15 saniye, erime-melting 95 °C'de 20 saniye, 40 °C'de 20 saniye ve 85 °C'de 0.2 devamlı mod, soğutma 40 °C'de 30 saniye olarak uygulanmıştır.

Wild type (normal allel) 936 C/C, 530 kanalında 66 °C'lik T_m'de (erime noktası) tespit edilmiştir. Mutant allel 936 T/T ise 57 °C'lik T_m'de tespit edilmiştir.

3.3.2.12.VEGFA C2578A (rs699947)

Tüm primer ve probları içeren ajan tüpüne 100 µl PCR-grade su ilave edilmiştir, çözelti karıştırılmıştır. 20 µl PCR reaksiyonu için 1 µl ajan kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı bir reaksiyon için 10.4 µl PCR-grade su, 1.6 µl Mg²⁺ solüsyonu, 1 µl ajan miksi (primer ve probları içerir), 2 µl Roche Fast Start Master mix ile hazırlanmıştır. 5 µl kalıp DNA eklenerek son reaksiyon hacmi elde edilmiştir.

Protokol, denatürasyon 95 °C'de 10 dakika, kuantifikasyon 45 döngü 95 °C'de 10 saniye, 60 °C'de 10 saniye ve 72 °C'de 15 saniye, erime-melting 95 °C'de 20 saniye, 40 °C'de 20 saniye ve 85 °C'de 0.2 devamlı mod, soğutma 40 °C'de 30 saniye olarak uygulanmıştır.

Wild type (normal allel) 2578 C/C, 530 kanalında 55 °C'lik T_m'de (erime noktası) tespit edilmiştir. Mutant allel 2578 A/A ise 62 °C'lik T_m'de tespit edilmiştir.

3.4.Düşük Materyalinden QF-PCR Analizi

3.4.1.DNA İzolasyonu

Total genomik DNA düşük materyalinden QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit kullanılarak elde edilmiştir. DNA izolasyonu prosedürü şu şekildedir:

1. En fazla 25 mg doku kullanılmıştır.
2. Doku mekanik olarak çok küçük parçalara bölünmüştür.
 - 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır ve 180 µl ATL Buffer eklenmiştir.

3. 20 µl Proteinaz K eklenmiştir, vortekslenmiştir ve doku tamamen sıvılaşıncaya kadar 56 °C'de karıştırılarak inkübe edilmiştir.
4. 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü kısa santrifüj edilmiştir.
5. Örneğe 200 µl AL buffer eklenmiştir, 15 saniye vortekslenmiştir ve 70 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Kısa santrifüj edilmiştir.
6. Örneğe % 96-100'lük 200 µl etanol eklenmiştir, 15 saniye vortekslenmiştir. Kısa santrifüj edilmiştir.
7. Karışım QIAamp Mini spin kolona alınmıştır, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Spin kolon, temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne alınmıştır, filtratı içeren toplama tüpü atılmıştır.
8. Spin kolona 500 µl AW1 buffer eklenmiştir, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Spin kolon, temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne alınmıştır, filtratı içeren toplama tüpü atılmıştır.
9. Spin kolona 500 µl AW2 buffer eklenmiştir, 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
10. Spin kolon, temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne alınmıştır, filtratı içeren toplama tüpü atılmıştır. En yüksek devirde 1 dakika santrifüj edilmiştir.
11. Spin kolon 1.5 ml'lik temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır, filtratı içeren toplama tüpü atılmıştır. Spin kolona 200 µl AE buffer ya da distile su eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu basamak tekrar edilerek DNA elde edilmiştir.

3.4.2.PCR Hazırlığı

Aneufast V2 kiti içerisindeki S1, S2, M13, M18, M21 ve MXY olmak üzere 6 adet master mix kullanılmıştır (Tablo 3.1). Bunlardan S1 ve S2 13, 18, 21, X ve Y kromozomlarına ait 21 adet STR markeri içermektedir ve her hastaya rutin olarak kullanılmıştır. Analiz sonrası herhangi bir kromozom için karar verilemediyse ilgili kromozomun STR markerlerini içeren mix kullanılmıştır. PCR karışım oranları şu şekildedir: 10 µl multiplex PCR miksi ve 5 µl kalıp DNA.

Tablo 3.1. QF-PCR analizinde kullanılan S1-S2'ye ve M13-M18-M21-MXY'ye ait markerlar

S1-S2 markerları		M13-M18-M21-MXY markerları	
D13S258	13q21	D13S742	13q12.12
D13S305	13q12.1- 13q14.1	D13S628	13q31-q32
D13S631	13q31-32	D13S631	13q31-32
D13S634	13q14.3	D13S634	13q14.3
D13S797	13q32-q33	D18S386	18q22.1
D18S386	18q22.1	D18S391	18qpter-18p11.22
D18S390	18q22.2	D18S858	18q21.1
D18S391	18qpter-18p11.22	D18S499	18q21.32
D18S535	18q12.2	D18S1002	18q11.2
D18S976	18p11.31	D21S1411	21q22.3
D21S1411	21q22.3	D21S1435	21q21
D21S1414	21q21	D21S1437	21q21.1
D21S1435	21q21	D21S1412	21q22.2
D21S1446	21q22.3-ter	D21S1809	21q22.1
D21S1442	21q11.11	AMXY	Xp22.1-22.31-Yp11.2
AMXY	Xp22.1-22.31-Yp11.2	SRY	Yp11.2
SRY	Yp11.2	HPRT	Xq26.1
X22	Xq28 Yq (PAR2)	TAF9L	Xq13 3p24
HPRT	Xq26.1	DXYS156	Xq21.31 Yp11.31
DXYS218	Xp22.32 Yp11.3 (PAR1)	SBMA	Xq11.2- Xq12
DXYS267	Xq21.31 Yp11.31	DXS6803	Xq12-Xq21.33
		DXS6809	Xq
		DXS8377	Xq28

Protokol, denatürasyon 95 °C'de 15 dakika, amplifikasyon 28 döngü 95 °C'de 40 saniye, 60 °C'de 1.5 dakika ve 72 °C'de 40 saniye, 60°C'de 30 dakika ve son saklama sıcaklığı 4 °C olarak uygulanmıştır. Thermal Cycler cihazı olarak ABI 9700 kullanılmıştır.

PCR ürünleri kapiller elektroforezde (ABI 3130) şu karışım yapılarak incelenmiştir: Hidi formamid 40 µl (S1 ve S2 dışında 20 µl), PCR ürünü 1 µl, 250 liz size standart 0.5 µl. Karışım kapiller elektroforez cihazında yürütülmüştür ve analiz edilmiştir.

4. İSTATİSTİK

Çalışmamızda istatistiksel analizler Medcalc istatistik programı ile yapılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde ki-kare testi ve göreceli orantı (tahmini rölatif risk) kullanılmıştır. Genotiplerin heterozigot ve homozigot olmaları göz önüne alınarak allel frekansları hesaplanmıştır. Allel frekanslarının karşılaştırılmasının yanı sıra genotiplerin yüzdeleri göz önüne alınarak habituel abortus ve kontrol grubu arasındaki karşılaştırmalar ile anne grubu ve fetus grubu arasındaki karşılaştırmalar 1-) wild tip ile heterozigot mutant+homozigot mutant bireyler, 2-) wild tip+heterozigot mutant bireyler ile homozigot mutant bireyler, 3-) wild tip ile homozigot mutant bireylerin karşılaştırılması şeklinde yapılmıştır. Sonuçlar; anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde, %95'lik güven aralığında değerlendirilmiştir.

5. BULGULAR

Çalışmamıza 56 habituel abortus çifti (56 kadın, 56 erkek olmak üzere 112 kişi), kontrol grubu olarak 43 çift (43 kadın, 43 erkek olmak üzere 86 kişi), spontan olarak sonlanmış 23 adet düşük materyali ve bu düşükleri yaşayan 22 anne olmak üzere toplam 243 olgu dahil edilmiştir.

5.1. Habituel Abortus ve Kontrol Grubu Bulguları

Tablo 5.1. Araştırmaya dahil edilen habituel abortus ve kontrol grubu olgularına ait klinik parametreler

Klinik parametreler		Habituel abortus grubu	Kontrol grubu
Yaş ortalaması		30.9 (21-51)	46.5 (27-68)
Toplam düşük sayısı ortalaması		2.5 (2-5)	Ortalama çocuk sayısı: 2.18 (2-4)
Düşük haftası ortalaması		10 (3-18)	-
İlk trimester düşük sayısı		127	-
İkinci trimester düşük sayısı		8	-
En az 1 çocuğu yaşayan çift sayısı		13 çift	43 çift
Akraba evliliği		2 çift-uzaktan, 2 çift-aynı köyden	-
Ek hastalık	Körlük	2 kişi (1 çift)	-
	Sağırılık	1 kişi	-
	Migren	2 kişi	-
	Aritmi	1 kişi	-
	Hipotansiyon	1 kişi	-
Aile hikayesi	Annede düşük	14 kişi	-
	Annede ölü doğum veya doğduktan sonra ölen çocuk	19 kişi	-
	Koroner arter hastalığı	2 kişinin annesinde, 1 kişinin babasında	-
	Hipertansiyon	1 kişinin anne ve babasında	-
	Mental retardasyon	1 kişinin dayısında	-

56 çiftten oluşan habituel abortus grubunda (112 birey) yaş ortalaması 30.9 (21-51), 43 çiftten oluşan kontrol grubunda (86 birey) ise yaş ortalaması 46.5 (27-68) idi. Habituel abortus grubunda çiftlere ait toplam düşük sayısı ortalaması 2.5 (2-5), düşük haftası ortalaması ise 10 (3-18)'du. Sadece 8 düşük ikinci trimesterde, diğer 127 düşük ise ilk trimesterdeydi. Kontrol grubu bireylerinde (en az 2 çocuğu olup hiç düşüğü olmayan grup) ortalama çocuk sayısı 2.18 (2-4)'di. Habituel abortus grubundan 2 kişi görme engelliydi (evli bir çift), 2 kişide migren, 1 kişide aritmi, 1 kişide hipotansiyon, 1 kişide işitme kaybı mevcuttu. 2 çift arasında uzak akraba evliliği vardı, 2 çift ise aynı köydendi. Aile öyküsü sorgulandığında 14 kişinin annesinde düşük öyküsü, 19 kişinin annesinde ölü doğum veya doğduktan sonra ölen çocuk öyküsü, 2 kişinin annesinde, 1 kişinin ise babasında koroner arter hastalığı, 1 kişinin anne ve babasında hipertansiyon ve 1 kişinin dayısında mental retardasyon öyküsü mevcuttu. 56 çiftten 13'ünün en az 1 çocuğu hayatta ve sağlıklıydı (Tablo 5.1). Habituel abortus grubundaki 112 bireyin polimorfizm analizleri öncesi yapılan kromozom analizi sonuçları 56 kadında 46,XX ve 56 erkekte 46,XY olmak üzere tüm bireylerde normaldi. Polimorfizmler Real Time PCR yöntemi ile analiz edilmiştir (Şekil 5.1, 5.2) ve sonuçları aşağıda belirtilmiştir:

Tablo 5.2. RPL ve kontrol grubu bireylere ait FVL genotip yüzdeleri ve allel frekansları

Faktör V Leiden (G1691A)		Genotip (Sayı / %)			Allel frekansı	
		GG	GA	AA	G	A
Habituel Abortus Grubu	Kadın	51 / %91	5 / %9	-	0.96	0.04
	Erkek	49 / %90.7	3 / %5.6	2 / %3.7	0.94	0.06
	Toplam	100 / %91	8 / %7.2	2 / %1.8	0.95	0.05
Kontrol Grubu	Kadın	43 / %100	-	-	1	0
	Erkek	42 / %97.7	1 / %2.3	-	0.98	0.02
	Toplam	85 / %98.8	1 / %1.2	-	0.99	0.01

FVL mutasyonu için habituel abortus çiftlerinde 110 kişinin sonucu elde edilebilmiştir. Kadınların %9'unda heterozigot mutasyon, erkeklerin %5.6'sında heterozigot, %3.7'sinde ise homozigot mutasyon saptanmıştır. Kontrol grubundaki 86 kişiden erkeklerin %2.3'ünde heterozigot mutasyon saptanmıştır, kadınlarda ise mutasyon saptanmamıştır. (Tablo 5.2).

Tablo 5.3. RPL ve kontrol grubu bireylere ait FVL karşılaştırmalı istatistik sonuçları

FVL	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
Kadın	GG ve GA+AA	0.0372	20.8689	1.1976-363.6501
	GG ve AA	0.9627	1.0984	0.0216-55.9264
	Allel frekansı: G ve A	0.1351	9.3731	0.4979-176.4360
Erkek	GG ve GA+AA	0.0472	4.8462	1.0198-23.0284
	GG ve AA	0.1295	9.6885	0.5144-182.4660
	Allel frekansı: G ve A	0.1691	3.1277	0.6158-15.8861

FVL için habituel abortus grubu ile kontrol grubunda hem kadın bireyler hem de erkek bireyler açısından GA ve AA genotiplerinin tekrarlayan gebelik kaybı riskini arttırdığı bulunmuştur ($p=0.0372$, $p=0.0472$). GA ve AA genotipleri mutasyon pozitif kabul edildiğinde bu genotipleri taşıyan kadınlarda 20.8 kat, erkeklerde 4.8 kat tekrarlayan gebelik kaybı riski olduğu bulunmuştur (Tablo 5.3).

Tablo 5.4. RPL ve kontrol grubu bireylere ait Protrombin G20210A genotip yüzdeleri ve allel frekansları

Protrombin G20210A		Genotip (Sayı / %)			Allel frekansı	
		GG	GA	AA	G	A
Habituel Abortus Grubu	Kadın	54 / %98.2	1 / %1.8	-	0.99	0.01
	Erkek	52 / %94.5	3 / %5.5	-	0.97	0.03
	Toplam	106 / %96.4	4 / %3.6	-	0.98	0.02
Kontrol Grubu	Kadın	41 / %95.3	2 / %4.7	-	0.98	0.02
	Erkek	41 / %95.3	2 / %4.7	-	0.98	0.02
	Toplam	82 / %95.3	4 / %4.7	-	0.98	0.02

Protrombin G20210A mutasyonu için habituel abortus grubunda sonucu elde edilmiş olan 110 kişiden kadınların %1.8'inde, erkeklerin ise %5.5'unda heterozigot mutasyon tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise hem kadınların hem de erkeklerin %4.7'sinde heterozigot mutasyon saptanmıştır. Habituel abortus grubu ile kontrol grubunun allel frekansları eşit bulunmuştur (Tablo 5.4).

Tablo 5.5. RPL ve kontrol grubu bireylere ait Protrombin G20210A karşılaştırmalı istatistik sonuçları

Protrombin G20210A	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
Kadın	GG ve GA	0.2645	0.3878	0.0734-2.0474
	Allel frekansı: G ve A	0.5684	0.4949	0.0442-5.5478
Erkek	GG ve GA	0.7567	1.2128	0.3578-4.1104
	Allel frekansı: G ve A	0.6528	1.5155	0.2477-9.2705

Protrombin G20210A için her iki grup arasında mutasyon taşıyan ve taşımayan bireyler karşılaştırıldığında tekrarlayan gebelik kaybı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$). Aynı şekilde allel frekansları karşılaştırıldığında da anlamlı bir ilişki olmadığı görülmüştür. %95 CI aralık değerlerinin 1'i ihtiva etmesi bulunan risklerin çok önemli olmadığı yolunda bize bilgi vermektedir (Tablo 5.5).

Tablo 5.6. RPL ve kontrol grubu bireylere ait PAI 5G/4G genotip yüzdeleri ve allel frekansları

Plazminojen Aktivatör İnhibitör 5G/4G		Genotip (Sayı / %)			Allel frekansı	
		5G/5G	5G/4G	4G/4G	5G	4G
Habituel Abortus Grubu	Kadın	11 / %19.7	33 / %58.9	12 / %21.4	0.49	0.51
	Erkek	11 / %20	29 / %52.7	15 / %27.3	0.46	0.54
	Toplam	22 / %19.8	62 / %55.9	27 / %24.3	0.48	0.52
Kontrol Grubu	Kadın	14 / %32.6	23 / %53.5	6 / %13.9	0.59	0.41
	Erkek	9 / %20.9	23 / %53.5	11 / %25.6	0.48	0.52
	Toplam	23 / %26.7	46 / %53.5	17 / %19.8	0.53	0.47

Plazminojen aktivatör inhibitör 5G/4G polimorfizmi iki grup arasında karşılaştırıldığında habituel abortus grubunda 5G/5G genotipi kadınlarda %19.7, erkeklerde %20, 5G/4G genotipi kadınlarda %58.9, erkeklerde %52.7, 4G/4G genotipi kadınlarda %21.4, erkeklerde %27.3, kontrol grubunda ise 5G/5G genotipi kadınlarda %32.6, erkeklerde %20.9, 5G/4G genotipi kadınlarda ve erkeklerde %53.5, 4G/4G genotipi kadınlarda %13.9, erkeklerde %25.6 olarak bulunmuştur. Allel frekansları iki grupta da benzer bulunmuştur (Tablo 5.6).

Tablo 5.7. RPL ve kontrol grubu bireylere ait PAI 5G/4G karşılaştırmalı istatistik sonuçları

PAI-1 5G/4G	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
Kadın	5G/5G ve 5G/4G+4G/4G	0.0388	1.9701	1.0354-3.7487
	5G/5G+ 5G/4G ve 4G/4G	0.1952	1.6329	0.7775-3.4295
	5G/5G ve 4G/4G	0.0424	2.4750	1.0316-5.9379
	Allel frekansı: 5G ve 4G	0.1567	1.4978	0.8563-2.6196
Erkek	5G/5G ve 5G/4G+4G/4G	0.8610	1.0633	0.5350-2.1131
	5G/5G+ 5G/4G ve 4G/4G	0.8397	1.0669	0.5696-1.9984
	5G/5G ve 4G/4G	0.8353	1.0904	0.4824-2.4646
	Allel frekansı: 5G ve 4G	0.7769	1.0836	0.6218-1.8885

Kadınlarda 5G/4G ve 4G/4G genotip toplamları ile 5G/5G genotipi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0.03$). Yine kadınlarda 5G/5G genotipi ile 4G/4G genotipi hasta ve kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0.04$). Tahmini rölatif risk oranlarına bakacak olursak kadınlarda tekrarlayan gebelik kaybında 4G allel taşıyıcılığı gebelik kaybı riskini 1.9 ile 2.4 kat arasında arttırmaktadır şeklinde yorumlayabiliriz. Kadınlarda allel frekanslarının karşılaştırılması ve erkeklerde hem genotip hem allel frekansı karşılaştırması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Tablo 5.7).

Tablo 5.8. RPL ve kontrol grubu bireylere ait MTHFR C677T genotip yüzdeleri ve allel frekansları

MTHFR C677T		Genotip (Sayı / %)			Allel frekansı	
		CC	CT	TT	C	T
Habituel Abortus Grubu	Kadın	31 / %55.4	19 / %33.9	6 / %10.7	0.72	0.28
	Erkek	29 / %53.7	20 / %37	5 / %9.3	0.72	0.28
	Toplam	60 / %54.5	39 / %35.5	11 / %10	0.72	0.28
Kontrol Grubu	Kadın	20 / %46.5	18 / %41.9	5 / %11.6	0.67	0.33
	Erkek	22 / %51.2	20 / %46.5	1 / %2.3	0.74	0.26
	Toplam	42 / %48.8	38 / %44.2	6 / %7	0.71	0.29

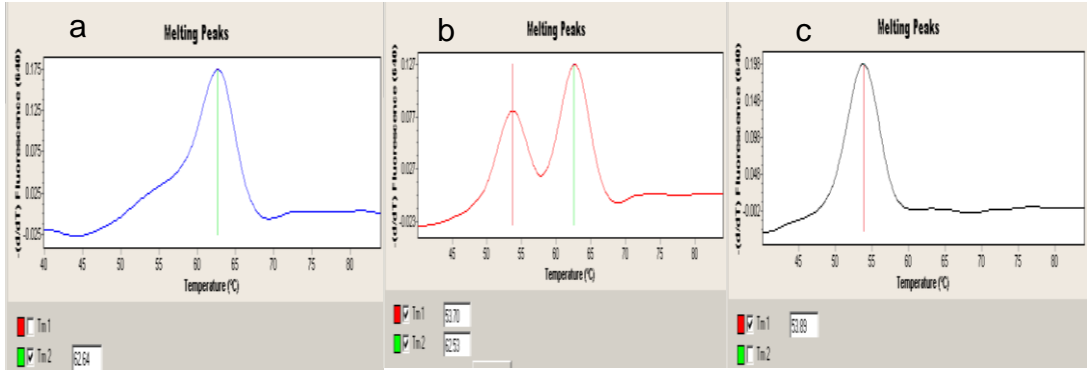
MTHFR C677T polimorfizminin habituel abortus grubundaki sonuçları şu şekildedir: Kadınlarda %55.4 677CC genotipi, %33.9 677CT genotipi, %10.7 677TT genotipi, erkeklerde %53.7 677CC genotipi, %37 677CT genotipi, %9.3 677TT genotipi saptanmıştır. Kontrol grubunda ise 677CC genotipi kadınlarda

%46.5, erkeklerde %51.2, 677CT genotipi kadınlarda %41.9, erkeklerde %46.5, 677TT genotipi kadınlarda %11.6, erkeklerde %2.3 olarak bulunmuştur (Tablo 5.8).

Tablo 5.9. RPL ve kontrol grubu bireylere ait MTHFR C677T karşılaştırmalı istatistik sonuçları

MTHFR C677T	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
Kadın	CC ve CT+TT	0.2037	0.6970	0.3994-1.2161
	CC+CT ve TT	0.8246	0.9064	0.3799-2.1625
	CC ve TT	0.5659	0.7667	0.3095-1.8990
	Allel frekansı: C ve T	0.4429	0.7896	0.4318-1.4438
Erkek	CC ve CT+TT	0.6710	0.8866	0.5088-1.5449
	CC+CT ve TT	0.0472	4.8462	1.0198-23.0284
	CC ve TT	0.0725	4.2500	0.8760-20.6186
	Allel frekansı: C ve T	0.7501	1.1068	0.5926-2.0672

MTHFR C677T polimorfizmine ait CC ve CT genotipleri toplamı TT genotipi ile erkeklerde hasta ve kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0.04$). TT genotipinin tekrarlayan düşük kaybı yaşayan ailelerde erkek bireylerde riski 4.8 kat artırdığı tespit edilmiştir. Erkeklerde diğer değerlerde ve kadınlarda tüm karşılaştırmalarda $p>0.05$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Ayrıca %95 CI değer aralıklarının 1'i içermesi sebebiyle riskin çok önemli olmadığı anlaşılmaktadır (Tablo 5.9).



Şekil 5.1. MTHFR C677T polimorfizmine ait a. Homozigot wild-CC genotipi (Tm: 63 °C), b. Heterozigot mutant-CT genotipi (Tm: 54.5 °C ve 63 °C) , c. Homozigot mutant-TT (Tm: 54.5 °C) genotiplerinin Real Time PCR görüntüleri

Tablo 5.10. RPL ve kontrol grubu bireylere ait MTHFR A1298C genotip yüzdeleri ve allel frekansları

MTHFR A1298C		Genotip (Sayı / %)			Allel frekansı	
		AA	AC	CC	A	C
Habituel Abortus Grubu	Kadın	17 / %31.5	27 / %50	10 / %18.5	0.56	0.44
	Erkek	19 / %34.6	28 / %50.9	8 / %14.5	0.60	0.40
	Toplam	36 / %33	55 / %50.5	18 / %16.5	0.58	0.42
Kontrol Grubu	Kadın	20 / %48.8	18 / %43.9	3 / %7.3	0.71	0.29
	Erkek	16 / %38	21 / %50	5 / %12	0.63	0.37
	Toplam	36 / %43.4	39 / %47	8 / %9.6	0.67	0.33

MTHFR A1298C polimorfizminde habituel abortus grubunda 109 kişinin sonucu elde edilebilmiştir. Kadınlarda %31.5 oranında 1298AA genotipi, %50 oranında 1298AC genotipi, %18.5 oranında 1298CC genotipi, erkeklerde oranında %34.6 1298AA genotipi, %50.9 oranında 1298AC genotipi, %14.5 oranında 1298CC genotipi saptanmıştır. Kontrol grubunda 1298AA genotipi kadınlarda %48.8, erkeklerde %38, 1298AC genotipi kadınlarda %43.9, erkeklerde % 50, 1298CC genotipi ise kadınlarda %7.3, erkeklerde %12 olarak bulunmuştur. C allel frekansları habituel abortus grubunda kadınlarda 0.44, erkeklerde 0.40 iken kontrol grubunda kadınlarda 0.29, erkeklerde 0.37 olarak saptanmıştır (Tablo 5.10).

Tablo 5.11. RPL ve kontrol grubu bireylere ait MTHFR A1298C karşılaştırmalı istatistik sonuçları

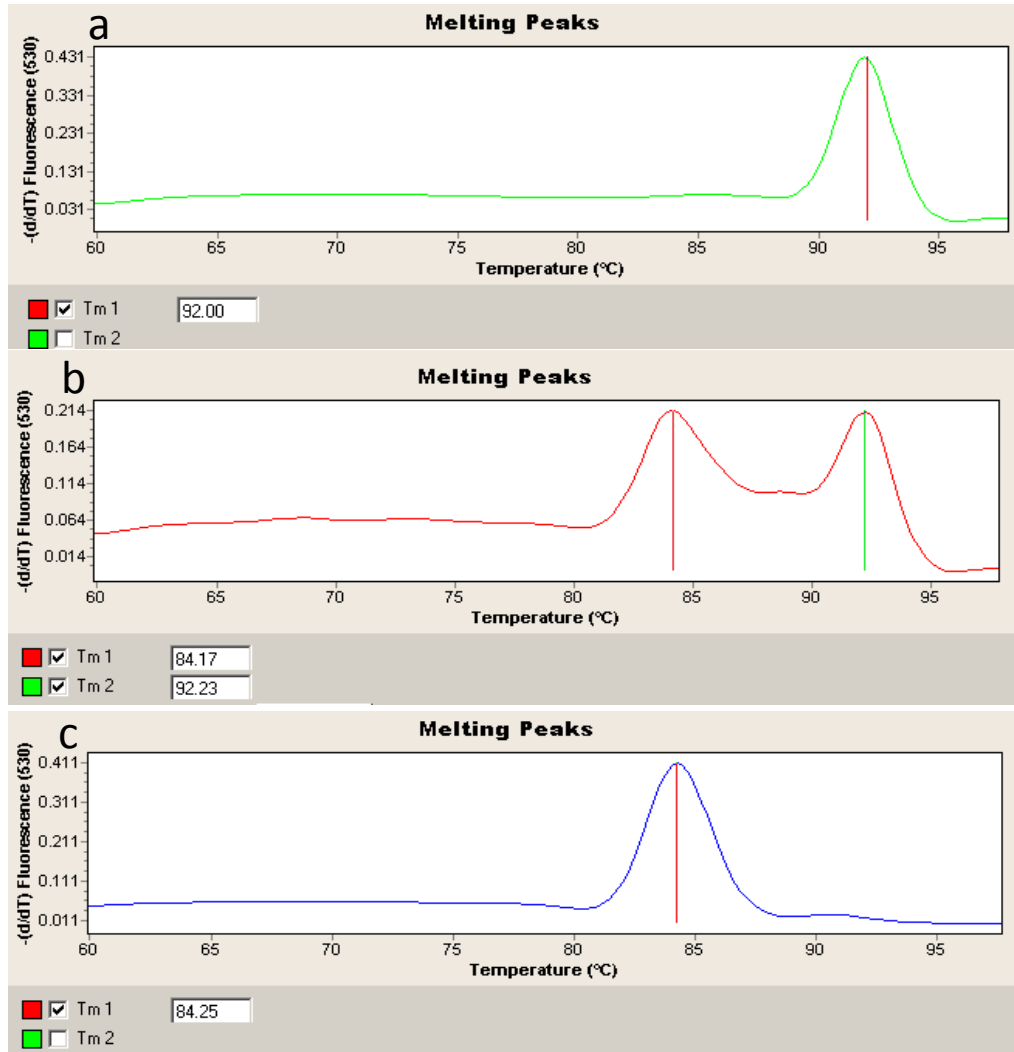
MTHFR A1298C	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
Kadın	AA ve AC+CC	0.0115	2.1075	1.1823-3.7568
	AA+AC ve CC	0.0378	2.5518	1.0540-6.1780
	AA ve CC	0.0086	3.5565	1.3802-9.1642
	Allel frekansı: A ve C	0.0284	1.9236	1.0714-3.4537
Erkek	AA ve AC+CC	0.6595	1.1382	0.6398-2.0251
	AA+AC ve CC	0.5540	1.2791	0.5660-2.8902
	AA ve CC	0.4999	1.3571	0.5589-3.2955
	Allel frekansı: A ve C	0.6629	1.1351	0.6420-2.0072

MTHFR A1298C polimorfizmine ait istatistiksel oranlara bakıldığında AC,CC genotipleri ile C allelinin kadınlarda tekrarlayan gebelik kaybı için riski istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmektedir ($p < 0.05$). Heterozigot ve homozigot bireyler hasta kabul edildiğinde $p = 0.01$, tahmini rölatif risk: 2.1 bulunmuştur. Sadece homozigot bireyler hasta kabul edildiğinde $p = 0.03$, tahmini rölatif risk: 2.5 bulunmuştur. Homozigot wild ve homozigot mutant bireyler karşılaştırıldığında $p = 0.008$, tahmini rölatif risk: 3.5 bulunmuştur. Bu durumda kadınlarda MTHFR 1298CC genotipinin gebelik kayıplarında riski 2 ile 3.5 kat arasında arttırdığını söyleyebiliriz. A ve C allel frekansları karşılaştırıldığında ise p değerine (0.02) göre yine istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuş ve C allelinin riski 1.9 kat arttırdığı görülmüştür. Erkek grubunda yapılan tüm karşılaştırmalarda $p > 0.05$ bulunduğu için MTHFR A1298C polimorfizmi ile tekrarlayan gebelik kaybı arasında erkek faktörü açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Tablo 5.11).

Tablo 5.12. RPL ve kontrol grubu bireylere ait ACE I/D genotip yüzdeleri ve allel frekansları

ACE I/D		Genotip (Sayı / %)			Allel frekansı	
		I/I	I/D	D/D	I	D
Habituel Abortus Grubu	Kadın	8 / %14.5	22 / %40	25 / %45.5	0.35	0.65
	Erkek	7 / %12.5	26 / %46.4	23 / %41.1	0.36	0.64
	Toplam	15 / %13.6	48 / %43.2	48 / %43.2	0.35	0.65
Kontrol Grubu	Kadın	6 / %14	20 / %46.5	17 / %39.5	0.37	0.63
	Erkek	6 / %14	25 / %58.1	12 / %27.9	0.43	0.57
	Toplam	12 / %14	45 / %52.3	29 / %33.7	0.40	0.60

Anjiotensin Konverting Enzim (ACE) I/D polimorfizmi için habituel abortus grubu sonuçları kadınlarda %14.5 I/I, %40 I/D, %45.5 D/D genotipi, erkeklerde %12.5 I/I, %46.4 I/D, %41.1 D/D genotipi şeklindeydi. Kontrol grubunda kadınlarda %14 I/I, %46.5 I/D, %39.5 D/D genotipi, erkeklerde %14 I/I, %58.1 I/D, %27.9 D/D genotipi saptanmıştır (Tablo 5.12).



Şekil 5.2. ACE I/D polimorfizmine ait a. I/I (Tm: 92 °C), b. I/D (Tm: 85 °C ve 92 °C), c. D/D (Tm: 85 °C) genotiplerinin Real Time PCR görüntüleri

Tablo 5.13. RPL ve kontrol grubu bireylere ait ACE I/D karşılaştırmalı istatistik sonuçları

ACE I/D	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
Kadın	II ve ID+DD	0.8636	0.9333	0.4247-2.0510
	II+ID ve DD	0.2789	1.3591	0.7799-2.3685
	II ve DD	0.8693	1.0733	0.4621-2.4928
	Allel frekansı: I ve D	0.7683	1.0907	0.6121-1.9434
Erkek	II ve ID+DD	0.8361	1.0894	0.4839-2.4530
	II+ID ve DD	0.0542	1.7869	0.9895-3.2270
	II ve DD	0.3185	1.5769	0.6444-3.8588
	Allel frekansı: I ve D	0.3118	1.3411	0.7594-2.3685

ACE I/D polimorfizmine ait hem kadın hem de erkeklerde habituel abortus ve kontrol grubu arasında yapılan karşılaştırmaların hiçbirinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 5.13). Bu durumda ACE I/D polimorfizmine ait genotiplerin tekrarlayan gebelik kaybı açısından etkili olmadığını söyleyebiliriz.

Tablo 5.14. RPL ve kontrol grubu bireylere ait eNOS E298D genotip yüzdeleri ve allel frekansları

eNOS E298D (G894T)		Genotip (Sayı / %)			Allel frekansı	
		GG	GT	TT	G	T
Habituel Abortus Grubu	Kadın	21 / %37.5	30 / %53.6	5 / %8.9	0.64	0.36
	Erkek	39 / %72.2	13 / %24.1	2 / %3.7	0.64	0.36
	Toplam	60 / %54.5	43 / %39.1	7 / %6.4	0.74	0.26
Kontrol Grubu	Kadın	27 / %62.8	15 / %34.9	1 / %2.3	0.80	0.20
	Erkek	27 / %62.8	14 / %32.6	2 / %4.6	0.79	0.21
	Toplam	54 / %62.8	29 / %33.7	3 / %3.5	0.80	0.20

Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) E298D (G894T) polimorfizmine ait habituel abortus grubu sonuçları kadınlarda %37.5 GG, %53.6 GT, %8.9 TT genotipi, erkeklerde %72.2 GG, %24.1 GT, %3.7 TT genotipi olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ise kadınlarda %62.8 GG, %34.9 GT, %2.3 TT genotipi, erkeklerde %62.8 GG, %32.6 GT, %4.6 TT genotipi saptanmıştır. Habituel abortus grubunda T allel frekansı kadınlarda 0.36, erkeklerde 0.16 iken, kontrol grubunda kadınlarda 0.20, erkeklerde 0.21 olarak bulunmuştur (Tablo 5.14).

Tablo 5.15. RPL ve kontrol grubu bireylere ait eNOS E298D karşılaştırmalı istatistik sonuçları

eNOS E298D	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
Kadın	GG ve GT+TT	0.0003	2.8992	1.6328-5.1477
	GG+GT ve TT	0.0472	4.8462	1.0198-23.0284
	GG ve TT	0.0118	7.6622	1.5702-37.3886
	Allel frekansı: G ve T	0.0127	2.2500	1.1890-4.2579
Erkek	GG ve GT+TT	0.1753	0.6622	0.3648-1.2019
	GG+GT ve TT	0.7335	0.7917	0.2062-3.0387
	GG ve TT	0.6066	0.7000	0.1801-2.7208
	Allel frekansı: G ve T	0.0199	2.1161	1.1258-3.9776

eNOS E298D polimorfizmine ait istatistiklere bakıldığında kadınlarda heterozigot mutant (GT) ve homozigot mutant (TT) hasta kabul edildiğinde homozigot wild (GG) genotipine karşı istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0.0003$) ve riskin 2.8 kat arttığı tespit edilmiştir. Hasta grup sadece TT kabul edildiğinde, GG ve GT toplamı ile karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0.04$) ve gebelik kaybı riskinin 4.8 kat arttığı tespit edilmiştir. Homozigot wild (GG) ve homozigot mutant (TT) bireyler karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0.01$) ve tekrarlayan gebelik kaybı riskinin 7.6 kat arttığı görülmüştür. Allel frekansları (G ve T) karşılaştırıldığında $p=0.01$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlıdır ve T allel taşıyıcılığının gebelik kaybı riskini 2.25 kat arttırdığı görülmüştür (Tablo 5.15).

Erkeklerde bu polimorfizm açısından sadece allel frekansları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ve T allelinin 2.1 kat risk arttırıcı olduğu görülmüştür. Genotipler açısından erkeklerde habituel abortus ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Tablo 5.15).

Tablo 5.16. RPL ve kontrol grubu bireylere ait Apo E2/E3/E4 genotip yüzdeleri ve allel frekansları

Apo E E2/E3/E4		Genotip (Sayı / %)						Allel frekansı		
		E3/E3	E3/E4	E3/E2	E2/E4	E4/E4	E2/E2	E3	E4	E2
Habituel Abortus Grubu	Kadın	40 / %72.7	9 / %16.4	4 / %7.3	2 / %3.6	-	-	0.85	0.10	0.05
	Erkek	28 / %68.3	3 / %7.3	8 / %19.5	-	2 / %4.9	-	0.82	0.08	0.10
	Toplam	68 / %70.8	12 / %12.5	12 / %12.5	2 / %2.1	2 / %2.1	-	0.83	0.09	0.08
Kontrol Grubu	Kadın	28 / %65.1	9 / %21	4 / %9.3	1 / %2.3	-	1 / %2.3	0.80	0.12	0.08
	Erkek	37 / %86	2 / %4.7	4 / %9.3	-	-	-	0.93	0.02	0.05
	Toplam	54 / %62.8	29 / %33.7	3 / %3.5	-	-	-	0.87	0.07	0.06

Apo E E2/E3/E4 polimorfizmi için habituel abortus grubunda 96 kişinin sonucu elde edilebilmiştir. Kadınlarda %72.7 E3/E3, %7.3 E3/E2, %16.4 E3/E4, %3.6 E2/E4 genotipleri, erkeklerde %68.3 E3/E3, %19.5 E3/E2, %7.3 E3/E4, %4.9 E4/E4 genotipleri saptanmıştır. Kontrol grubunda kadınlarda %65.1 E3/E3, %21 E3/E4, %9.3 E3/E2, %2.3 E2/E2, %2.3 E2/E4 genotipleri, erkeklerde %86 E3/E3, %4.7 E3/E4, 9.3 E3/E2 genotipleri saptanmıştır (Tablo 5.16).

Tablo 5.17. RPL ve kontrol grubu bireylere ait Apo E E2/E3/E4 karşılaştırmalı istatistik sonuçları

Apo E2/E3/E4	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
Kadın	E3/E3 ve E3/E4+E3/E2+E2/E4+E4/E4+E2/E2	0.2874	0.7222	0.3966-1.3153
	E3/E3+E3/E4+E3/E2 ve E2/E4+E4/E4+E2/E2	0.7335	0.7917	0.2062-3.0387
	Allel frekansı: E3 ve E2	0.3693	0.5882	0.1847-1.8733
	Allel frekansı: E3 ve E4	0.5939	0.7843	0.3211-1.9157
Erkek	E3/E3 ve E3/E4+E3/E2+E2/E4+E4/E4+E2/E2	0.0031	2.8908	1.4298-5.8446
	E3/E3+E3/E4+E3/E2 ve E2/E4+E4/E4+E2/E2	0.0989	11.5759	0.6315-212.2057
	Allel frekansı: E3 ve E2	0.1495	2.2683	0.7447-6.9093
	Allel frekansı: E3 ve E4	0.0603	4.5366	0.9366-21.9745

Apo E E2/E3/E4 polimorfizmine ait istatistiksel oranlar, hem kadınlarda hem erkeklerde E3/E3 genotipi ile diğer genotipler (E3/E4+E3/E2+E2/E4+E4/E4+E2/E2) arasında, E3 alleli içeren genotipler (E3/E3+E3/E4+E3/E2) ile E3 alleli içermeyen (E2/E4+E4/E4+E2/E2) genotipler arasında, allel frekansı olarak E3 ve E2 ile E3 ve E4 arasında karşılaştırma yapılarak hesaplanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı (Tablo 5.17) için Apo E E2/E3/E4 polimorfizmi ile tekrarlayan gebelik kaybı arasında hem kadın hem de erkek faktörü açısından bir ilişki olmadığı anlaşılmıştır.

Tablo 5.18. RPL ve kontrol grubu bireylere ait VEGF A C405G genotip yüzdeleri ve allel frekansları

VEGF A C405G		Genotip (Sayı / %)			Allel frekansı	
		CC	CG	GG	C	G
Habituel Abortus Grubu	Kadın	8 / %14.3	33 / %58.9	15 / %26.8	0.44	0.56
	Erkek	6 / %12.8	14 / %29.8	27 / %57.4	0.28	0.72
	Toplam	14 / %13.6	47 / %45.6	42 / %40.8	0.36	0.64
Kontrol Grubu	Kadın	4 / %9.3	25 / %58.1	14 / %32.6	0.38	0.62
	Erkek	5 / %11.6	26 / %60.5	12 / %27.9	0.42	0.58
	Toplam	9 / %10.5	51 / %59.3	26 / %30.2	0.40	0.60

VEGF A C405G polimorfizmi için habituel abortus grubunda 103 sonuç elde edilebilmiştir. Kadınlarda %14.3 CC, %58.9 CG, %26.8 GG genotipleri, erkeklerde %12.8 CC, %29.8 CG, %57.4 GG genotipleri; kontrol grubunda kadınlarda %9.3 CC, %58.1 CG, %32.6 GG genotipleri, erkeklerde %11.6 CC, %60.5 CG, %27.9 GG genotipleri saptanmıştır. Habituel abortus grubunda G allel frekansı kadınlarda 0.56 erkeklerde 0.72, kontrol grubunda kadınlarda 0.62, erkeklerde 0.58 olarak bulunmuştur (Tablo 5.18).

Tablo 5.19. RPL ve kontrol grubu bireylere ait VEGF A C405G karşılaştırmalı istatistik sonuçları

VEGF A C405G	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
Kadın	CC ve CG+GG	0.2712	0.6075	0.2500-1.4761
	CC+CG ve GG	0.3551	0.7509	0.4092-1.3781
	CC ve GG	0.1987	0.5260	0.1975-1.4011
	Allel frekansı: C ve G	0.3887	0.7801	0.4435-1.3722
Erkek	CC ve CG+GG	0.8729	0.9338	0.4034-2.1616
	CC+CG ve GG	<0.0001	3.4086	1.8908-6.1449
	CC ve GG	0.1722	1.8791	0.7597-4.6482
	Allel frekansı: C ve G	0.0389	1.8621	1.0321-3.3596

Kadınlarda habituel abortus grubu ile kontrol grubu yüzdeleri ve allel frekansları karşılaştırıldığında her biri için $p > 0.05$ bulunduğundan VEGF A C405G polimorfizmi ile tekrarkayan gebelik kaybı arasında kadınlar açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı anlaşılmıştır (Tablo 5.19).

Erkeklerde ise GG genotipine karşılık CC ve CG genotip yüzdeleri toplamı karşılaştırıldığında $p < 0.0001$ olduğu için GG genotipinin tekrarlayan gebelik kaybı açısından erkek faktörü için istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu ve riskin 3.4 kat arttığı tespit edilmiştir. C ve G allel frekansları iki grup arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu ($p = 0.03$) ve G allelinin riski 1.86 kat arttırdığı anlaşılmıştır (Tablo 5.19). VEGF A C405G polimorfizmi tekrarlayan gebelik kaybında erkeklerde GG genotipi ve G alleli varlığında etkilidir.

Tablo 5.20. RPL ve kontrol grubu bireylere ait VEGF A C936T genotip yüzdeleri ve allel frekansları

VEGF A C936T		Genotip (Sayı / %)			Allel frekansı	
		CC	CT	TT	C	T
Habituel Abortus Grubu	Kadın	36 / %64.3	19 / %33.9	1 / %1.8	0.81	0.19
	Erkek	31 / %66	15 / %31.9	1 / %2.1	0.82	0.18
	Toplam	67 / %65.1	34 / %33	2 / %1.9	0.82	0.18
Kontrol Grubu	Kadın	33 / %76.8	9 / %20.9	1 / %2.3	0.87	0.13
	Erkek	33 / %76.8	10 / %23.2	-	0.88	0.12
	Toplam	66 / %76.7	19 / %22.1	1 / %1.2	0.88	0.12

VEGF A C936T polimorfizmi sonuçları habituel abortus grubunda kadınlarda %64.3 CC, %33.9 CT, %1.8 TT genotipleri, erkeklerde %66 CC, %31.9 CT, %2.1 TT genotipleri şeklindedir. Kontrol grubunda kadınlarda %76.8 CC, %20.9 CT, %2.3 TT genotipleri, erkeklerde %76.8 CC, %23.2 CT genotipleri saptanmıştır (Tablo 5.20).

Tablo 5.21. RPL ve kontrol grubu bireylere ait VEGF A C936T karşılaştırmalı istatistik sonuçları

VEGF A C936T	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
Kadın	CC ve CT+TT	0.0452	1.8832	1.0136-3.4985
	CC+CT ve TT	0.6528	0.6599	0.1079-4.0366
	CC ve TT	0.8122	0.8021	0.1300-4.9488
	Allel frekansı: C ve T	0.2496	1.5698	0.7286-3.3824
Erkek	CC ve CT+TT	0.0864	1.7246	0.9250-3.2156
	CC+CT ve TT	0.2949	5.1015	0.2418-107.6245
	CC ve TT	0.2580	5.8271	0.2749-123.5390
	Allel frekansı: C ve T	0.2375	1.6098	0.7306-3.5468

Kadınlarda VEGF A C936T polimorfizmine ait CC genotip yüzdesi ile CT ve TT genotip yüzdeleri toplamı karşılaştırıldığında $p=0.04$ bulunduğu için istatistiksel olarak anlamlıdır ve CT, TT genotiplerinin tekrarlayan gebelik kaybı riskini 1.8 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Kadınlarda diğer genotip karşılaştırmalarında $p>0.05$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 5.21).

Erkeklerde VEGF A C936T polimorfizminin tekrarlayan gebelik kaybı açısından etkili olmadığı görülmüştür. Tüm genotip ve allel frekansı karşılaştırmalarında $p>0.05$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur ve %95 CI değer aralıkları 1'i içerdiği için önemli bir risk bulunmamaktadır (Tablo 5.21).

Tablo 5.22. RPL ve kontrol grubu bireylere ait VEGF A C2578A genotip yüzdeleri ve allel frekansları

VEGF A C2578A		Genotip (Sayı / %)			Allel frekansı	
		CC	CA	AA	C	A
Habituel Abortus Grubu	Kadın	20 / %35.7	28 / %50	8 / %14.3	0.60	0.40
	Erkek	11 / %23.4	27 / %57.4	9 / %19.2	0.52	0.48
	Toplam	31 / %30.1	55 / %53.4	17 / 16.5	0.57	0.43
Kontrol Grubu	Kadın	20 / %35.7	28 / %50	8 / %14.3	0.60	0.40
	Erkek	10 / %23.3	22 / %51.1	11 / %25.6	0.49	0.51
	Toplam	20 / %23.3	48 / %55.8	18 / %20.9	0.51	0.49

VEGF C2578A polimorfizmi için habituel abortus grubunda kadınlarda %35.7 CC, %50 CA, %14.3 AA genotipleri, erkeklerde %23.4 CC, %57.4 CA, %19.2 AA genotipleri; kontrol grubunda kadınlarda %23.3 CC, %60.4 CA, %16.3 AA genotipleri, erkeklerde %23.3 CC, %51.1 CA, %25.6 AA genotipleri saptanmıştır (Tablo 5.22).

Tablo 5.23. RPL ve kontrol grubu bireylere ait VEGF A C2578A karşılaştırmalı istatistik sonuçları

VEGF A C2578A	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
Kadın	CC ve CA+AA	1.0000	1.0000	0.5613-1.7815
	CC+CA ve AA	1.0000	1.0000	0.4499-2.2230
	CC ve AA	1.0000	1.0000	0.4177-2.3942
	Allel frekansı: C ve A	1.0000	1.0000	0.5679-1.7609
Erkek	CC ve CA+AA	1.0000	1.0000	0.5175-1.9322
	CC+CA ve AA	0.2374	0.6676	0.3415-1.3051
	CC ve AA	0.4573	0.7308	0.3196-1.6709
	Allel frekansı: C ve A	0.6714	0.8869	0.5093-1.5443

VEGF A C2578A polimorfizminin tekrarlayan gebelik kaybı açısından hem kadınlarda hem erkeklerde etkili olmadığı bulunmuştur. Kadınlarda genotip yüzdeleri ile allel frekansı karşılaştırmalarına bakıldığında $p=1$, tahmini rölatif risk=1 olduğundan habituel abortus grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ve bu polimorfizmin etkisiz olduğu anlaşılmıştır. Erkeklerde de aynı şekilde $p>0.05$ olduğu için ve %95 CI değer aralıkları 1'i içerdiği için önemli bir risk olmadığı anlaşılmıştır (Tablo 5.23).

Tablo 5.24. RPL ve kontrol grubu bireylere ait VEGF A C460T genotip yüzdeleri ve allel frekansları

VEGF A C460T		Genotip (Sayı / %)			Allel frekansı	
		CC	CT	TT	C	T
Habituel Abortus Grubu	Kadın	9 / %16.1	24 / %42.8	23 / %41.1	0.38	0.62
	Erkek	9 / %19.2	27 / %57.4	11 / %23.4	0.48	0.52
	Toplam	18 / %17.5	50 / %48.5	34 / %33	0.42	0.58
Kontrol Grubu	Kadın	7 / %16.3	26 / %60.4	10 / %23.3	0.47	0.53
	Erkek	11 / %25.6	22 / %51.1	10 / %23.3	0.51	0.49
	Toplam	18 / %20.9	48 / %55.8	20 / %23.3	0.49	0.51

VEGF C460T polimorfizmi için habituel abortus grubunda kadınlarda %16.1 CC, %42.8 CT, %41.1 TT genotipleri, erkeklerde %19.2 CC, %57.4 CT, %23.4 TT genotipleri; kontrol grubunda kadınlarda %16.3 CC, %60.4 CT, %23.3 TT genotipleri, erkeklerde %25.6 CC, %51.1 CT, %23.3 TT genotipleri saptanmıştır (Tablo 5.24).

Tablo 5.25. RPL ve kontrol grubu bireylere ait VEGF A C460T karşılaştırmalı istatistik sonuçları

VEGF A C460T	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
Kadın	CC ve CT+TT	1.0000	1.0000	0.4695-2.1299
	CC+CT ve TT	0.0069	2.3265	1.2603-4.2944
	CC ve TT	0.1881	1.7826	0.7538-4.2158
	Allel frekansı: C ve T	0.1987	1.4469	0.8238-2.5413
Erkek	CC ve CT+TT	0.2374	1.4979	0.7663-2.9280
	CC+CT ve TT	1.0000	1.0000	0.5175-1.9322
	CC ve TT	0.4573	1.3684	0.5985-3.1290
	Allel frekansı: C ve T	0.6714	1.1276	0.6475-1.9634

VEGF A C460T polimorfizmine ait TT genotip yüzdesi ile CC ve CT genotip yüzdeleri toplamı karşılaştırıldığında $p= 0.006$ olduğu için VEGF A C460T polimorfizmi ile kadınlarda tekrarlayan gebelik kaybı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu, TT genotipinin gebelik kaybı riskini 2.3 kat arttırdığı gösterilmiştir. Kadınlarda diğer genotipler ve allel frekansları karşılaştırıldığında $p>0.05$ bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı anlaşılmıştır (Tablo 5.25).

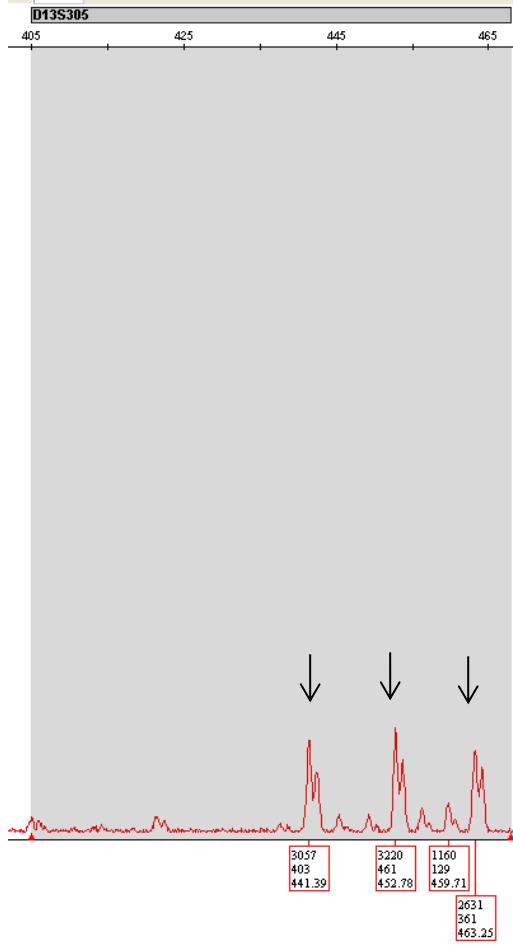
Erkeklerde ise tüm genotip karşılaştırmaları ile allel frekansı karşılaştırmasında $p>0.05$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı gösterilmiş ve %95 CI değer aralıkları 1'i içerdiği için tekrarlayan gebelik kaybı açısından önemli bir risk olmadığı anlaşılmıştır (Tablo 5.25).

5.2.Spontan Abortuslara ait Bulgular

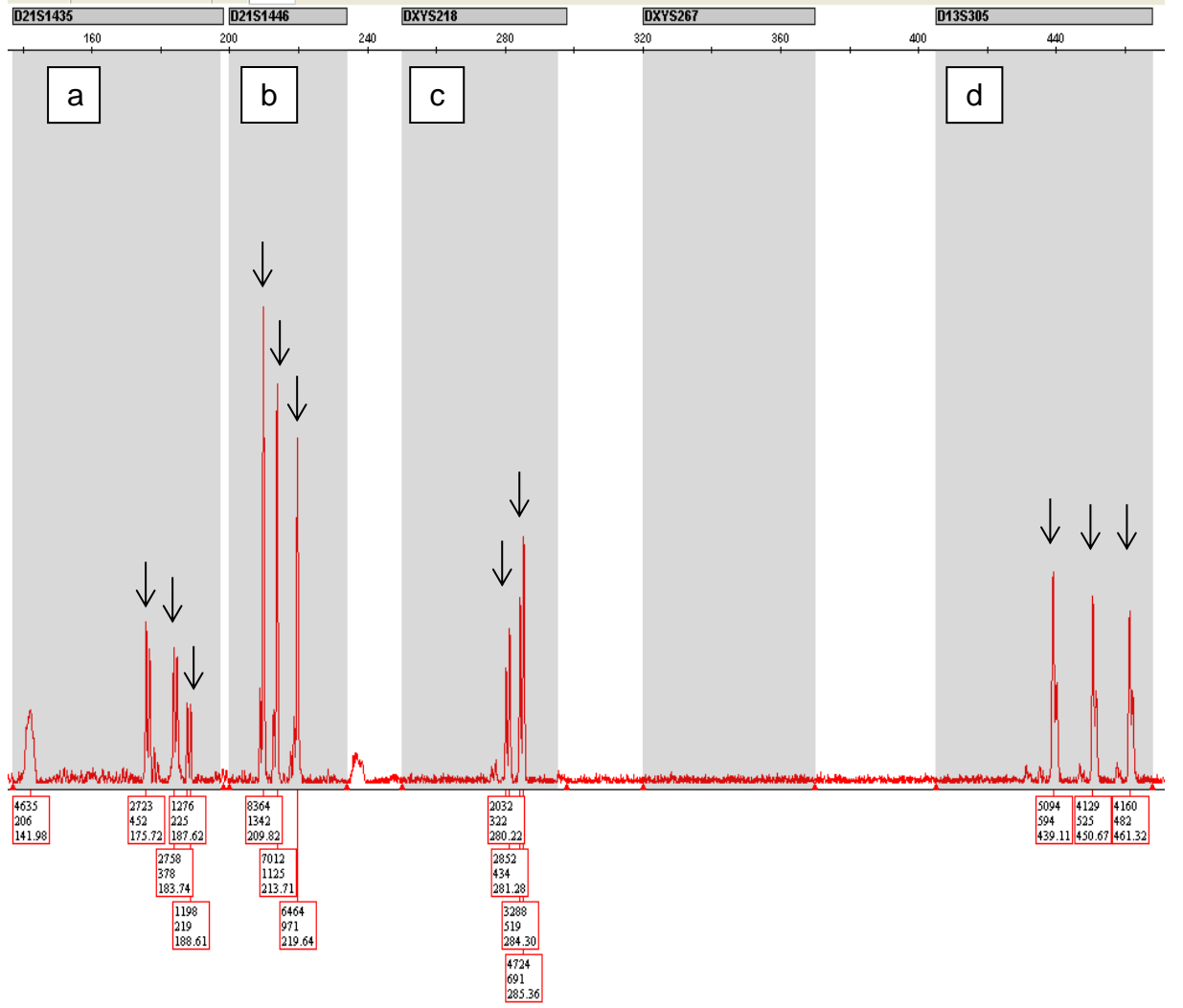
Spontan abortusu olan annelere ait klinik bilgiler ile fetal materyallere ait QF-PCR sonuçları tablo 5.26'da verilmiştir. Annelerin yaş ortalaması 29.6 (21-40) olarak bulunmuştur. Düşük haftaları ortalaması 9.4 olup sadece 3 düşük ikinci trimesterde, diğerleri ilk trimesterdedir. Düşük materyallerinin QF-PCR analizlerinin sonucunda iki trizomi 21 (maternal kökenli), iki trizomi 13 (maternal kökenli), iki triploidi (paternal kökenli), bir monozomi X (paternal kayıp) saptanmıştır (Şekil 5.3, 5.4, 5.5, 5.6). Sayısal kromozomal anomali saptanan fetuslerin ebeveynlerine de analiz yapıp sorunun maternal ya da paternal olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 5.26. Spontan abortusu olan 22 anneye ait yaş, gebelik sayısı, doğum sayısı, düşük sayısı, düşük haftaları, ek hastalık varlığı ve 23 adet düşük materyaline ait QF-PCR analiz sonuçları

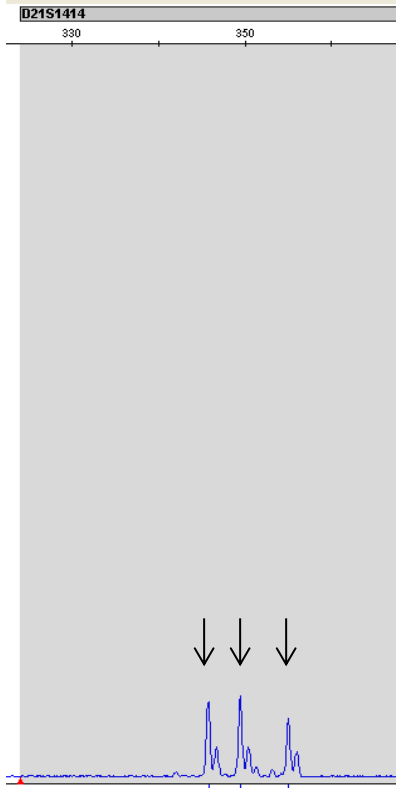
Hastalar	Yaş	Gebelik-Parite-Abortus sayısı	Düşük haftası	Annede ek hastalık	Akrabalarda ek hastalık	QF-PCR sonucu
1	40	G2P1A1	11			trizomi 21,XX (maternal)
2	35	G2P1A1	7	DVT	Anne-DVT, Teyze-İnfertilite	normal (XX)
3	24	G5P0A5	9			Triploidi (paternal)
4	29	G3A2P1	7			normal (XY)
5	32	G1P0A1	13		Erkek kardeşinde mental retardasyon	normal (XX)
6	34	G1P0A1 (IVF)	10			normal (XX)
7	23	G1P0A1	13			monozomi X (paternal)
8	29	G3P1A2	6			normal (XY)
9	21	G3P0A3	7			normal (XX)
10	34	G3P0A3	5			trizomi 21,XX (maternal)
11	28	G2P1A1	11			normal (XX)
12-1	38	G1P0A1	8			trizomi 13 (maternal)
12-2	38	G2P0A2	7			normal (XY)
13	21	G1P0A1	18			triploidi (paternal)
14	30	G2P0A2	5	Hipotiroidi		normal (XX)
15	33	G2P0A2 (IVF)	4			trizomi 13 (maternal)
16	34	G3P0A3	8		Ablasında infertilite	normal (XY)
17	37	G2P1A1	11			normal (XX)
18	21	G1P0A1	12		Babaanne-Koroner kalp hastalığı	normal (XY)
19	25	G4P1A3	9		Babasında hipotiroidi	normal (XX)
20	23	G2P0A2	6.5			normal (XX)
21	24	G1P0A1	7			normal (XY)
22	30	G1P0A1	8			normal (XX)



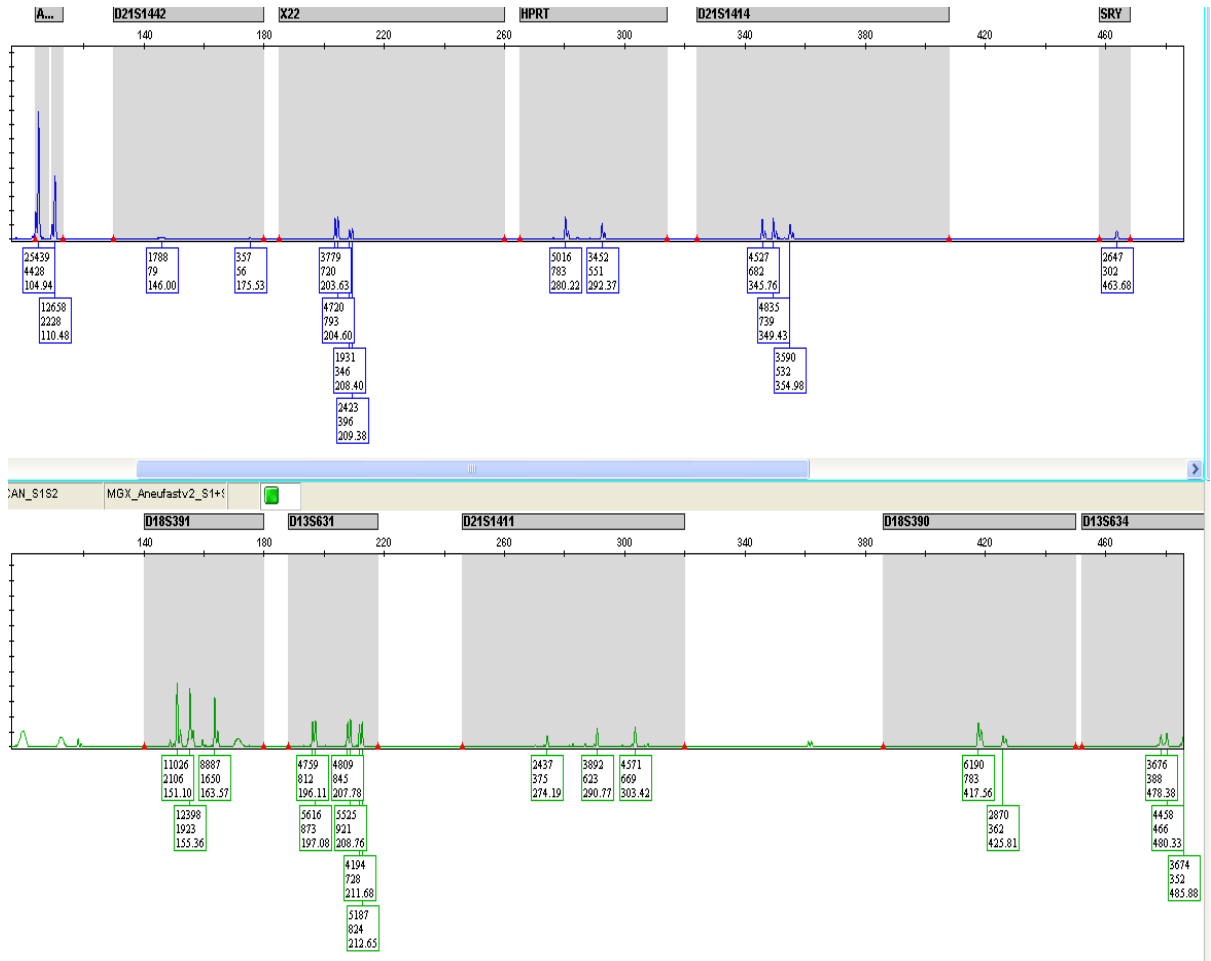
Şekil 5.3. Trizomi 13 sonucu elde edilen düşük materyalinde QF-PCR analizi sonucunda elde edilen D13S305 markerına ait piklerdeki 1:1:1 görüntüsü. Analizi yapılan örnekte üç adet 13 numaralı kromozom bulunmakta



Şekil 5.4. Triploidi saptanan bir düşük materyaline ait D21S1435 (a), D21S1446 (b) ve D13S305 (d) markerlarına ait QF-PCR cihaz görüntüsü. DXYS218 (c) markerında 1:2 oranı, diğer piklerde ise 1:1:1 oranı mevcut



Şekil 5.5. Trizomi 21 saptanan bir düşük materyaline ait D21S1414 markerına ait QF-PCR cihaz görüntüsü. Piklerde 1:1:1 oranı mevcut



Şekil 5.6. Triploidi saptanan bir düşük materyaline ait QF-PCR cihaz görüntüsü. AMXY 2:1, X22 2:1, D21S1414 1:1:1, D18S391 1:1:1, D13S631 1:1:1, D21S1411 1:1:1, D18S390 2:1 görünümünde

Gebeliği spontan abortusla sonlanan 22 anneden ve bu annelere ait 23 adet fetal materyalden yapılan Real Time PCR analizi ile Faktör V Leiden (FVL), Protrombin G20210A, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, PAI-1 5G/4G, ACE I/D, eNOS E298D, Apo E E2/E3/E4, VEGF A C936T, VEGF A C2578A, VEGF A C405G, VEGF A C460T polimorfizm sonuçları aşağıda verilmiştir.

Tablo 5.27. Fetus ve anne grubuna ait FVL genotip yüzdeleri ve allel frekansları

FVL	Genotip (Sayı/%)			Allel Frekansı	
	GG	GA	AA	G	A
Fetus Grubu	21 / %95.5	1 / %4.5	-	0.98	0.02
Anne Grubu	21 / %95.5	1 / %4.5	-	0.98	0.02
Sağlıklı Kontrol Grubu	85/ %98.8	1 / %1.2	-	0.99	0.01

Faktör V Leiden için fetus grubunda %95.5 GG genotipi, %4.5 GA genotipi saptanmıştır. G allel frekansı 0.98 iken, A allel frekansı 0.02 bulunmuştur. Sonuçlar annelerde de aynı şekildedir (Tablo 5.27).

Tablo 5.28. Fetus ve anne grubu bireylerine ait FVL karşılaştırmalı istatistik sonuçları

FVL	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	GG ve GA	1.0000	1.0000	0.2430-4.1157
	Allel frekansı: G ve A	1.0000	1.0000	0.1381-7.2420

İki grup karşılaştırıldığında FVL için fetus ve anne arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=1$) (Tablo 5.28).

Tablo 5.29. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireylerine ait FVL karşılaştırmalı istatistik sonuçları

FVL	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	GG ve GA	< 0.0001	3.8796	2.0396-7.3795
	Allel frekansı: G ve A	0.5684	2.0204	0.1803-22.6462

Fetus grubu ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında ise fetüste GA genotipi varlığı GG genotipine göre düşükler açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.0001$) ve düşük riskini 3.8 kat arttırmaktadır (Tablo 5.29).

Tablo 5.30. Fetus ve anne grubuna ait Protrombin G20210A genotip yüzdeleri ve allel frekansları

Protrombin G20210A	Genotip (Sayı/%)			Allel Frekansı	
	GG	GA	AA	G	A
Fetus Grubu	20 / %100	-	-	1	0
Anne Grubu	22 / %100	-	-	1	0
Sağlıklı Kontrol Grubu	82 / %95.3	4 / %4.7	-	0.98	0.02

Tablo 5.31. Fetus ve anne grubu bireylerine ait Protrombin G20210A karşılaştırmalı istatistik sonuçları

Protrombin G20210A	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	GG ve GA	1.0000	1.0000	0.0196-50.8937
	Allel frekansı: G ve A	1.0000	1.0000	0.0108-92.4276

Protrombin G20210A için hem fetuslarda hem anne grubunda %100 GG genotipi bulunduğu için diğer genotiplerle karşılaştırma yapılamamıştır ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=1) (Tablo 5.30, 5.31).

Tablo 5.32. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireylerine ait Protrombin G20210A karşılaştırmalı istatistik sonuçları

Protrombin G20210A	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	GG ve GA	0.0989	0.0864	0.0047-1.5836
	Allel frekansı: G ve A	0.2949	0.1960	0.0093-4.1353

Fetus grubu ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Tablo 5.32).

Tablo 5.33. Fetus ve anne grubuna ait PAI 5G/4G genotip yüzdeleri ve allel frekansları

PAI-1 5G/4G	Genotip (Sayı/%)			Allel Frekansı	
	5G/5G	5G/4G	4G/4G	5G	4G
Anne Grubu	2 / %12.5	9 / %56.2	5 / %31.3	0.40	0.60
Fetus Grubu	4 / %30.8	5 / %38.4	4 / %30.8	0.50	0.50
Sağlıklı Kontrol Grubu	23/%26.7	46 / %53.5	17 / %19.8	0.53	0.47

PAI-1 5G/4G polimorfizmi için fetus grubunda %30.8 oranında 5G/5G, %38.4 oranında 5G/4G, %30.8 oranında 4G/4G genotipi, anne grubunda ise %12.5 oranında 5G/5G, %56.2 oranında 5G/4G, %31.3 oranında 4G/4G genotipi saptanmıştır. Anne grubunda 5G allel frekansı 0.4, 4G allel frekansı 0.6, fetus grubunda 5G allel frekansı 0.5, 4G allel frekansı 0.5 olarak bulunmuştur (Tablo 5.33).

Tablo 5.34. Fetus ve anne grubu bireyelerine ait PAI 5G/4G karşılaştırmalı istatistik sonuçları

PAI-1 5G/4G	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	5G/5G ve 5G/4G+4G/4G	0.0017	3.2572	1.5580-6.8098
	5G/5G+ 5G/4G ve 4G/4G	1.0000	1.0000	0.5492-1.8209
	5G/5G ve 4G/4G	0.0253	2.5833	1.1244-5.9351
	Allel frekansı: 5G ve 4G	0.6537	1.5000	0.2552-8.8172

Anne grubuna karşı fetus grubu karşılaştırıldığında 5G/5G genotipi normal kabul edilip 5G/4G+4G/4G genotipleri mutasyon pozitif kabul edildiğinde $p=0.0017$ bulunmuştur. Spontan abortusta PAI-1 5G/4G polimorfizmi için mutasyon taşıyıcılığının annede bulunmasının bebekte bulunma durumuna göre düşük riskini 3.2 kat arttırdığı görülmüştür. 5G/5G genotipi ile 4G/4G genotipi karşılaştırıldığında $p=0.02$ olduğu için yine istatistiksel olarak anlamlıdır ve annede 4G/4G genotip varlığı fetuste bulunma durumuna göre düşük riskini 2.5 kat arttırmaktadır (Tablo 5.34).

Tablo 5.35. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireylerine ait PAI 5G/4G karşılaştırmalı istatistik sonuçları

PAI-1 5G/4G	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	5G/5G ve 5G/4G+4G/4G	0.5333	0.8232	0.4464-1.5181
	5G/5G+ 5G/4G ve 4G/4G	0.0762	1.7971	0.9402-3.4350
	5G/5G ve 4G/4G	0.4408	1.3500	0.6294-2.8954
	Allel frekansı: 5G ve 4G	0.6713	1.1277	0.6474-1.9641

Fetus grubu ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmamıştır (Tablo 5.35).

Tablo 5.36. Fetus ve anne grubuna ait MTHFR C677T genotip yüzdeleri ve allel frekansları

MTHFR C677T	Genotip (Sayı/%)			Allel Frekansı	
	CC	CT	TT	C	T
Anne Grubu	10 / %45.5	11 / %50	1 / %4.5	0.70	0.30
Fetus Grubu	11 / %47.8	11 / %47.8	1 / %4.4	0.70	0.30
Sağlıklı Kontrol Grubu	42 / %48.8	38 / %44.2	6 / %7	0.71	0.29

MTHFR C677T polimorfizmi için annelerde %45.5 CC, %50 CT, %4.5 TT genotipleri, fetuslarda %47.8 CC, %47.8 CT, %4.4 TT genotipleri saptanmıştır. T allel frekansı hem anne hem fetus grubunda 0.3 olarak bulunmuştur (Tablo 5.36).

Tablo 5.37. Fetus ve anne grubu bireylerine ait MTHFR C677T karşılaştırmalı istatistik sonuçları

MTHFR C677T	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	CC ve CT+TT	0.7757	1.0846	0.6204-1.8963
	CC+CT ve TT	1.0000	1.0000	0.2430-4.1145
	CC ve TT	0.9302	1.0667	0.2516-4.5218
	Allel frekansı: C ve T	1.0000	1.0000	0.1477-6.7718

Fetus ve anne grubu genotip yüzdeleri ve allel frekansları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 5.37).

Tablo 5.38. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireylerine ait MTHFR C677T karşılaştırmalı istatistik sonuçları

MTHFR C677T	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	CC ve CT+TT	0.8875	1.0408	0.5977-1.8125
	CC+CT ve TT	0.3581	0.5536	0.1568-1.9538
	CC ve TT	0.4133	0.5833	0.1604-2.1220
	Allel frekansı: C ve T	0.8768	1.0493	0.5713-1.9270

Fetus grubu ve sağlıklı kontrol grubu genotip yüzdeleri ve allel frekansları açısından karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 5.38).

Tablo 5.39. Fetus ve anne grubuna ait MTHFR A1298C genotip yüzdeleri ve allel frekansları

MTHFR A1298C	Genotip (Sayı/%)			Allel Frekansı	
	AA	AC	CC	A	C
Anne Grubu	5 / %31.3	9 / %56.2	2 / %12.5	0.60	0.40
Fetus Grubu	1 / %33.3	2 / %66.7	-	0.70	0.30
Sağlıklı Kontrol Grubu	36 / %43.4	39 / %47	8 / %9.6	0.67	0.33

MTHFR A1298C polimorfizmi için annelerde %31.3 AA, %56.2 AC, %12.5 CC genotipleri, fetuslarda %33.3 AA, %66.7 AC genotipleri saptanmıştır. C allel frekansı annelerde 0.4 iken fetus grubunda 0.3 bulunmuştur (Tablo 5.39).

Tablo 5.40. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireyelerine ait MTHFR A1298C karşılaştırmalı istatistik sonuçları

MTHFR	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
A1298C	AA ve AC+CC	0.0798	1.6791	0.9402-2.9988
	AA+AC ve CC	0.5072	1.3448	0.5603-3.2277
	AA ve CC	0.2214	1.8032	0.7009-4.6391
	Allel frekansı: A ve C	0.3045	1.3535	0.7595-2.4121

Fetuslerden ancak 3'ünün sonucu elde edilebildiği için fetus grubu ile herhangi bir karşılaştırma yapılmamış olup, anne grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında karşılaştırma yapılmıştır. Anne grubu ve sağlıklı kontrol grubu genotip yüzdeleri ve allel frekansları açısından karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 5.40).

Tablo 5.41. Fetus ve anne grubuna ait ACE I/D genotip yüzdeleri ve allel frekansları

ACE I/D	Genotip (Sayı/%)			Allel Frekansı	
	I/I	I/D	D/D	I	D
Fetus Grubu	5 / %21.7	6 / %26.1	12 / %52.2	0.35	0.65
Anne Grubu	4 / %20	7 / %35	9 / %45	0.38	0.62
Sağlıklı Kontrol Grubu	12 / %14	45 / %52.3	29 / %33.7	0.40	0.60

ACE I/D polimorfizmi için fetus grubunda %21.7 II, %26.1 ID, %52.2 DD genotipleri, anne grubunda %20 II, %35 ID, %45 DD genotipleri saptanmıştır. D allel frekansı fetus grubunda 0.65, anne grubunda 0.62 bulunmuştur (Tablo 5.41).

Tablo 5.42. Fetus ve anne grubu bireyelerine ait ACE I/D karşılaştırmalı istatistik sonuçları

ACE I/D	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	II ve ID+DD	0.7285	0.8864	0.4485-1.7516
	II+ID ve DD	0.3224	1.3241	0.7594-2.3087
	II ve DD	0.7973	1.1005	0.5299-2.2858
	Allel frekansı: I ve D	0.6595	1.1382	0.6398-2.0251

Fetus ve anne grubuna ait genotip yüzdeleri ile allel frekansları karşılaştırıldığında her durumda $p > 0.05$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Tablo 5.42).

Tablo 5.43. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireyelerine ait ACE I/D karşılaştırmalı istatistik sonuçları

ACE I/D	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	II ve ID+DD	0.1437	0.5772	0.2762-1.2059
	II+ID ve DD	0.0106	2.1029	1.1891-3.7192
	II ve DD	0.9469	0.9733	0.4384-2.1605
	Allel frekansı: I ve D	0.4655	1.2381	0.6977-2.1970

Fetus grubu ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında DD genotipinin fetuslerde bulunmasının düşük riskini 2.1 kat arttırdığı görülmüştür ($p=0.01$) (Tablo 5.43).

Tablo 5.44. Fetus ve anne grubuna ait eNOS E298D genotip yüzdeleri ve allel frekansları

eNOS E298D	Genotip (Sayı/%)			Allel Frekansı	
	GG	GT	TT	G	T
Anne Grubu	9 / %47.4	9 / %47.4	1 / %5.2	0.71	0.29
Fetus Grubu	16 / %69.6	7 / %30.4	-	0.85	0.15
Sağlıklı Kontrol Grubu	54 / %62.8	29 / %33.7	3 / %3.5	0.80	0.20

eNOS E298D polimorfizmi için anne grubunda %47.4 GG, %47.4 GT, %5.2 TT genotipleri, fetus grubunda %69.6 GG ve %30.4 GT genotipleri saptanmıştır. T allel frekansı anne grubunda 0.29, fetus grubunda 0.15 bulunmuştur (Tablo 5.44).

Tablo 5.45. Fetus ve anne grubu bireyelerine ait eNOS E298D karşılaştırmalı istatistik sonuçları

eNOS E298D	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	GG ve GT+TT	0.0011	2.6312	1.4723-4.7025
	GG+GT ve TT	0.4988	3.0302	0.1220-75.2834
	GG ve TT	0.3636	4.4526	0.1776-111.6355
	Allel frekansı: G ve T	0.0185	2.3146	1.1511-4.6539

GT ve TT genotipleri mutasyon pozitif kabul edilip GG genotipi ile fetus ve anne grubu arasında karşılaştırıldığında $p=0.001$ bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı olan bu sonuca göre annedeki mutasyon taşıyıcılığı fetustekine göre spontan abortus riskini 2.6 kat arttırmaktadır. İki grup arasında allel frekansları karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($p=0.01$). Annenin T allel taşıyıcısı olması fetusun T allel taşıyıcısı olması durumuna göre düşük riskini 2.3 kat arttırmaktadır (Tablo 5.45).

Tablo 5.46. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireyelerine ait eNOS E298D karşılaştırmalı istatistik sonuçları

eNOS E298D	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	GG ve GT+TT	0.2950	0.7297	0.4046-1.3160
	GG+GT ve TT	0.1351	0.1067	0.0057-2.0083
	GG ve TT	0.1251	0.1001	0.0053-1.8957
	Allel frekansı: G ve T	0.3535	0.7059	0.3382-1.4733

Fetus grubu ve sağlıklı kontrol grubu genotip yüzdeleri ve allel frekansları açısından karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 5.46).

Tablo 5.47. Fetus ve anne grubuna ait Apo E E2/E3/E4 genotip yüzdeleri ve allel frekansları

Apo E	Genotip (Sayı/%)				Allel Frekansı		
	E3/E3	E3/E2	E3/E4	E2/E4	E3	E2	E4
Fetus Grubu	7 / %33.3	11 / %52.4	2 / %9.5	1 / %4.8	0.64	0.290	0.070
Anne Grubu	14 / %70	5 / %25	1 / %5	-	0.85	0.125	0.025
Sağlıklı Kontrol Grubu	54 / %62.8	3 / %3.5	29 / %33.7	-	0.87	0.060	0.070

Apo E E2/E3/E4 polimorfizmi için fetus grubunda %33.3 E3/E3, %52.4 E3/E2, %9.5 E3/E4, %1 E2/E4 genotipleri, anne grubunda %70 E3/E3, %25 E3/E2, %5 E3/E4 genotipleri saptanmıştır. Fetus grubunda E2 allel frekansı 0.29, E4 allel frekansı 0.07, anne grubunda E2 allel frekansı 0.125, E4 allel frekansı 0.025 bulunmuştur (Tablo 5.47).

Tablo 5.48. Fetus ve anne grubu bireylerine ait Apo E E2/E3/E4 karşılaştırmalı istatistik sonuçları

Apo E2/E3/E4	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	E3/E3 ve E3/E4+ E3/E2+E2/E4	< 0.0001	4.7374	2.6071-8.6082
	E3/E3+E3/E4+E3/E2 ve E2/E4	0.4988	3.0302	0.1220-75.2834
	Allel frekansı: E3 ve E2	< 0.0001	3.0813	2.4397-3.8915
	Allel frekansı: E3 ve E4	< 0.0001	3.7188	2.3288-5.9384

Fetus grubuna karşı anne grubu karşılaştırıldığında E3/E3 genotip yüzdesi ile diğer genotiplerin yüzdeleri toplamı karşılaştırıldığında $p < 0.0001$ bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı olan bu duruma göre fetuslerde wild tip (E3/E3) dışındaki genotiplerin bulunması annelerde bu genotiplerin bulunma durumuna göre spontan abortus riskini 4.7 kat arttırmaktadır. Allel frekanslarından E3 ve E2 kendi arasında, E3 ve E4 kendi arasında karşılaştırıldığında $p < 0.0001$ bulunduğu için her iki durumda da istatistiksel olarak anlamlılık vardır. Fetusteki E2 veya E4 allel varlığı, annedeki E2 veya E4 allel varlığına göre spontan abortus riskini 3-3.7 kat arasında arttırmaktadır (Tablo 5.48).

Tablo 5.49. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireylerine ait Apo E E2/E3/E4 karşılaştırmalı istatistik sonuçları

Apo E2/E3/E4	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	E3/E3 ve E3/E4+ E3/E2+E2/E4	< 0.0001	3.4570	1.9320-6.1858
	E3/E3+E3/E4+E3/E2 ve E2/E4	0.0989	11.5759	0.6315-212.2057
	Allel frekansı: E3 ve E2	0.0001	6.5703	2.5757-16.7601
	Allel frekansı: E3 ve E4	0.5831	1.3594	0.4542-4.0685

Fetus grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında E3/E3 normal genotip kabul edilip diğer genotiplerle karşılaştırıldığında $p < 0.0001$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Buna göre E3/E3 dışındaki genotiplerin fetüste bulunması düşük riskini 3.4 kat arttırmaktadır. Yine fetus

grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasındaki allel frekansı karşılaştırmalarında fetusteki E2 allel varlığının E3 alleline göre düşük riskini 6.5 kat arttırdığı bulunmuştur (p=0.0001) (Tablo 5.49).

Tablo 5.50. Fetus ve anne grubuna ait VEGF A C405G genotip yüzdeleri ve allel frekansları

VEGF A C405G	Genotip (Sayı/%)			Allel Frekansı	
	CC	CG	GG	C	G
Fetus Grubu	1 / %4.3	10 / %43.5	12 / %52.2	0.26	0.74
Anne Grubu	2 / %10	12 / %60	6 / %30	0.40	0.60
Sağlıklı Kontrol Grubu	9 / %10.5	51 / %59.3	26 / %30.2	0.40	0.60

VEGF A C405G polimorfizmi için fetus grubunda %4.3 CC, %43.5 CG, %52.2 GG genotipleri, anne grubunda %10 CC, %60 CG, %30 GG genotipleri saptanmıştır. Fetus grubunda C allel frekansı 0.26, G allel frekansı 0.74, anne grubunda C allel frekansı 0.40, G allel frekansı 0.60 bulunmuştur (Tablo 5.50).

Tablo 5.51. Fetus ve anne grubu bireylerine ait VEGF A C405G karşılaştırmalı istatistik sonuçları

VEGF A C405G	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	CC ve CG+GG	0.1076	2.6667	0.8075-8.8067
	CC+CG ve GG	0.0017	2.5278	1.4148-4.5164
	CC ve GG	0.0208	4.3333	1.2495-15.0280
	Allel frekansı: C ve G	0.0363	1.8974	1.0416-3.4566

Fetus grubuna karşı anne grubu karşılaştırıldığında CC+CG genotipleri ile GG genotipi ve CC genotipi ile GG genotipi kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur (p değerleri sırasıyla 0.001 ve 0.02). Buna göre fetusun GG genotipinde olması spontan abortus riskini 2.5-4.3 kat arasında arttırmaktadır. Allel frekansları karşılaştırıldığında fetusteki G allel taşıyıcılığı riski 1.8 kat arttırmaktadır (p=0.03) (Tablo 5.51).

Tablo 5.52. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireyelerine ait VEGF A C405G karşılaştırmalı istatistik sonuçları

VEGF A C405G	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	CC ve CG+GG	0.1076	2.6667	0.8075-8.8067
	CC+CG ve GG	0.0017	2.5278	1.4148-4.5164
	CC ve GG	0.0208	4.3333	1.2495-15.0280
Allel frekansı: C ve G		0.0363	1.8974	1.0416-3.4566

Fetus grubu ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında fetusteki GG genotipinin düşük riskini 2.5 ile 4.3 kat arasında arttırdığı bulunmuştur ($p=0.0017$, $p=0.0208$). Fetusteki G allel varlığının da C allel varlığına göre düşük riskini 1.8 kat arttırdığı görülmüştür ($p=0.0363$) (Tablo 5.52).

Tablo 5.53. Fetus ve anne grubuna ait VEGF A C936T genotip yüzdeleri ve allel frekansları

VEGF A C936T	Genotip (Sayı/%)			Allel Frekansı	
	CC	CT	TT	C	T
Anne Grubu	12 / %60	5 / %25	3 / %15	0.725	0.275
Fetus Grubu	16 / %69.6	6 / %26.1	1 / %4.3	0.830	0.170
Sağlıklı Kontrol Grubu	66 / %76.7	19 / %22.1	1 / %1.2	0.880	0.120

VEGF A C936T polimorfizmi için anne grubunda %60 CC, %25 CT, %15 TT genotipleri, fetus grubunda %69.6 CC, %26.1 CT, %4.3 TT genotipleri saptanmıştır. T allel frekansı anne grubunda 0.275, fetus grubunda 0.170 bulunmuştur (Tablo 5.53).

Tablo 5.54. Fetus ve anne grubu bireyelerine ait VEGF A C936T karşılaştırmalı istatistik sonuçları

VEGF A C936T	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	CC ve CT+TT	0.1392	1.5556	0.8660-2.7941
	CC+CT ve TT	0.0131	4.2353	1.3533-13.2551
	CC ve TT	0.0123	4.3750	1.3775-13.8947
	Allel frekansı: C ve T	< 0.0001	1.8519	1.4927-2.2976

Anne grubuna karşı fetus grubu karşılaştırıldığında TT genotipi mutasyon pozitif kabul edildiğinde CC+CT genotipleri ile karşılaştırıldığında $p=0.01$, tahmini rölatif risk:4.2, sadece CC genotipi ile karşılaştırıldığında $p=0.01$, tahmini rölatif risk:4.3 bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlıdır. Allel frekansları karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir ($p<0.0001$, tahmini rölatif risk:1.8). Buna göre annedeki TT genotipi veya T allel taşıyıcılığı spontan abortus riskini arttırmaktadır (Tablo 5.54).

Tablo 5.55. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireyelerine ait VEGF A C936T karşılaştırmalı istatistik sonuçları

VEGF A C936T	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	CC ve CT+TT	0.2631	1.4348	0.7624-2.7003
	CC+CT ve TT	0.2087	4.1250	0.4529-37.5744
	CC ve TT	0.1899	4.4000	0.4802-40.3152
	Allel frekansı: C ve T	0.3174	1.5020	0.6766-3.3345

Fetus grubu ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Tablo 5.55).

Tablo 5.56. Fetus ve anne grubuna ait VEGF A C2578A genotip yüzdeleri ve allel frekansları

VEGF A C2578A	Genotip (Sayı/%)			Allel Frekansı	
	CC	CA	AA	C	A
Fetus Grubu	7 / %30.5	13 / %56.5	3 / %13	0.59	0.41
Anne Grubu	6 / %30	12 / %60	2 / %10	0.60	0.40
Sağlıklı Kontrol Grubu	20 / %23.3	48 / %55.8	18 / %20.9	0.51	0.49

VEGF A C2578A polimorfizmi için fetus grubunda %30.5 CC, %56.5 CA, %13 AA genotipleri, anne grubunda %30 CC, %60 CA, %10 AA genotipleri saptanmıştır. A allel frekansı fetus grubunda 0.41, anne grubunda 0.40 bulunmuştur (Tablo 5.56).

Tablo 5.57. Fetus ve anne grubu bireylerine ait VEGF A C2578A karşılaştırmalı istatistik sonuçları

VEGF A C2578A	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	CC ve CA+AA	1.0000	1.0000	0.5461-1.8310
	CC+CA ve AA	0.5072	1.3448	0.5603-3.2277
	CC ve AA	0.5950	1.3000	0.4941-3.4203
	Allel frekansı: C ve A	0.8855	1.0424	0.5926-1.8334

Fetus grubu ile anne grubu genotip yüzdeleri ve allel frekansları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 5.57).

Tablo 5.58. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireylerine ait VEGF A C2578A karşılaştırmalı istatistik sonuçları

VEGF A C2578A	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	CC ve CA+AA	0.2631	0.6970	0.3703-1.3117
	CC+CA ve AA	0.1352	0.5621	0.2640-1.1969
	CC ve AA	0.0967	0.4746	0.1970-1.1436
	Allel frekansı: C ve A	0.2560	0.7233	0.4135-1.2650

Fetus grubu ile sağlıklı kontrol grubu genotip yüzdeleri ve allel frekansları karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 5.58).

Tablo 5.59. Fetus ve anne grubuna ait VEGF A C460T genotip yüzdeleri ve allel frekansları

VEGF A C460T	Genotip (Sayı/%)			Allel Frekansı	
	CC	CT	TT	C	T
Anne Grubu	2 / %10	12 / %60	6 / %30	0.40	0.60
Fetus Grubu	5 / %21.7	11 / %47.8	7 / %30.5	0.46	0.54
Sağlıklı Kontrol Grubu	18 / %20.9	48 / %55.8	20 / %23.3	0.49	0.51

VEGF A C460T polimorfizmi için anne grubunda %10 CC, %60 CT, %30 TT genotipleri, fetus grubunda %21.7 CC, %47.8 CT, %30.5 TT genotipleri saptanmıştır. T allel frekansı anne grubunda 0.60, fetus grubunda 0.54 bulunmuştur (Tablo 5.59).

Tablo 5.60. Fetus ve anne grubu bireyelerine ait VEGF A C460T karşılaştırmalı istatistik sonuçları

VEGF A C460T	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	CC ve CT+TT	0.0351	2.3924	1.0628-5.3856
	CC+CT ve TT	1.0000	1.0000	0.5461-1.8310
	CC ve TT	0.1090	2.1000	0.8476-5.2030
	Allel frekansı: C ve T	0.3918	1.2778	0.7291-2.2392

Anne grubu ile fetus grubu karşılaştırıldığında CT+TT genotipleri mutasyon pozitif kabul edilmiş ve CC genotipine (wild tip) göre riskli bulunmuştur (p=0.03). İstatistiksel olarak anlamlı bu değere göre annedeki heterozigot ve homozigot mutasyon spontan abortus riskini 2.3 kat arttırmaktadır. Diğer genotip yüzdeleri ile allel frekansları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır (p>0.05) (Tablo 5.60).

Tablo 5.61. Fetus ve sağlıklı kontrol grubu bireyelerine ait VEGF A C460T karşılaştırmalı istatistik sonuçları

VEGF A C460T	Genotip	p değeri	Tahmini rölatif risk	%95 CI
	CC ve CT+TT	0.8634	0.9425	0.4799-1.8508
	CC+CT ve TT	0.2631	1.4348	0.7624-2.7003
	CC ve TT	0.5949	1.2451	0.5551-2.7928
	Allel frekansı: C ve T	0.6710	1.1279	0.6473-1.9653

Fetus grubu ile sağlıklı kontrol grubu genotip yüzdeleri ve allel frekansları karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir (p>0.05) (Tablo 5.61).

6.TARTIŞMA

Abortus/düşük gebeliğin 20.haftasından önce gerçekleşen gebelik kaybı veya fetusun 500 gr'dan düşük ağırlıklı olması şeklinde tanımlanmaktadır. Birinci ve ikinci trimester düşüklüğünün zamanlarına göre erken ve geç gebelik kaybı olarak ayrılmaktadırlar. Ölü doğum ise gebeliğin 20. haftasından sonra gerçekleşen ve fetusun 500 gr veya daha fazla ağırlıkta olduğu durumlarda geçerlidir (113). Gebelik kayıpları reproduktif dönemde görülen en sık problemlerdendir ve hem fiziksel hem de psikolojik sonuçları vardır. Sebeplerinin aydınlatılması, gebelik kayıplarının tekrarlama olasılığının öngörülmesi, sonraki gebeliklerde ortaya çıkabilecek sağlık problemlerinin bilinmesi, gelecek gebelikler için gerekli önlemlerin alınabilmesi açısından önemlidir.

Abortus etiyolojisinde pek çok faktör sorumlu tutulmakla birlikte olguların yaklaşık % 60'ında genetik sebeplerin etkili olduğu düşünülmektedir (114). Genetik nedenler arasında kromozomal sebepler olduğu gibi gen mutasyonları da bulunmaktadır. Kromozomal bozuklukların hem yapısal hem de sayısal anomalileri düşüklere sebep olurken pek çok gen mutasyonu da düşük etiyolojisinde önemlidir. Bu çalışmamızda tekrarlayan gebelik kaybı olan çiftlerde hem kadın hem erkek faktörünü araştırmak için Faktör V Leiden (FVL), Protrombin G20210A, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, PAI-1 5G/4G, ACE I/D, eNOS E298D, Apo E E2/E3/E4, VEGF A C936T, VEGF A C2578A, VEGF A C405G, VEGF A C460T polimorfizmleri çiftlerde çalışılmış ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca herhangi bir gebeliği spontan abortusla sonuçlanan annelere ve bu düşüklere elde edilen materyallerde de aynı polimorfizmler çalışılarak kendi aralarında ve fertil kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Düşük materyallerinde ayrıca QF-PCR ile 13, 18, 21, X ve Y kromozomlarına ait sayısal anomaliler araştırılmıştır.

Bu çalışmada yaş ortalamaları habituel abortus grubunda 30.9 (21-51), kontrol grubunda 46.5 (27-68), spontan abortus annelerinde ise 29.6 (21-40) olarak bulunmuştur.

Düşük materyallerinin QF-PCR analizlerinin sonucunda iki trizomi 21 (maternal kökenli), iki trizomi 13 (maternal kökenli), iki triploidi (paternal kökenli), bir monozomi X (paternal kayıp) saptanmıştır. 23 fetusten 7'sinde (% 30.4) kromozomlara ait sayısal anomali saptanması, spontan abortuslarda kromozomal anomalilerin ne kadar etkili olduğunun kanıtıdır. Spontan abortusların % 50'sinin kromozomal anomalilerden kaynaklandığı, bunların yaklaşık olarak % 60'ının trizomi olduğu bildirilmektedir. Bunlar arasında trizomi 16 en sık kromozomal anomali iken onu trizomi 21 ve 22 takip etmektedir (115). Zhang ve ark.'nın 252 missed abortus materyaline ait koryonik villus biyopsi materyali ve kontrol grubu olarak 50 normal gebelik ile yaptığı çalışmada tüm örneklerin kromozom analizi yapılmıştır. Koryon kromozom anomalisi hasta grubunda % 58.09, kontrol grubunda ise % 4.17 bulunmuştur ($p < 0.01$). 140 olgudan 81'i trizomi, 29'u monozomi X ve 17'si poliploidi olarak bulunmuştur (116). Bizim çalışmamızdaki olgu sayısı bu çalışmaya göre az olsa da anomaliler oransal olarak benzerlik göstermektedir. Rolnik ve ark. da benzer bir çalışma yaparak 428 abortus materyalinden 46'sında kültür başarısızlığı, 145'inde normal sonuç, 237'sinde ise kromozomal anomali saptamışlardır. En çok sayısal anomali bulduklarını, bunların 41'inin trizomi 16, 27'sinin triploidi, 26'sinin monozomi X, 13'ünün tetraploidi ve 13'ünün trizomi 15 olduğunu bildirmişlerdir (117). Bizim çalışmamızda da 23 düşük materyalinden 7'sinde sayısal kromozom anomalisi saptanmıştı. Kromozom analizi yerine QF-PCR yöntemini kullandığımız için ancak 13,18, 21, X ve Y kromozomlarına ait sayısal anomalilerin analizi yapılabildi. Yapılan diğer çalışmalara bakacak olursak anomali saptamadığımız diğer düşük materyallerinde trizomi 16, trizomi 15 gibi başka bir anomali saptama olasılığımız yüksektir. Ayrıca şunu da görmekteyiz ki QF-PCR tek başına kullanıldığında bile sayısal kromozomal anomalilerin pek çoğunu saptamaktadır.

Bizim çalışmamızdaki iki triploidi olgusunun da paternal orjinli olduğu tespit edilmiştir. Spontan abortuslarda triploidinin parental orjinini araştıran bir çalışmada 91 mozaik olmayan, triploid düşük materyalini incelemişlerdir. 87 fetusun sonucunu elde edebilmişler, 61'inin parental orjinini bulmuşlar ve

43'ünün paternal, 18'inin maternal kökenli olduğunu saptamışlardır (118). Triploidiler, dispermi sebebiyle en çok paternal kökenli (diandrik) olarak görülmektedir.

Maternal yaşın artmasıyla (>35) fetal kromozomal anomali olasılığının (özellikle trizomi) arttığı bilinmektedir. Bizim çalışmamızda spontan abortusu olan beş anne 35 yaş ve üzerindedir. 35, 37 ve 38 yaşındaki üç annenin düşük materyal analizi normal saptanmışken, 38 yaşındaki annenin düşük materyalinde trizomi 13, 40 yaşındaki annenin düşük materyalinde trizomi 21 saptanmıştır. Anne yaşı ile kromozomal anomali sıklığı ve tekrarlayan düşük ilişkisini araştıran bir çalışmada, çalışmaya dahil edilen 353 kadından 153'ü 35 yaş altında (73 sporadik, 48'i iki düşük ve 32'si tekrarlayan düşük), 200'ü 35 yaş ve üzerinde (81 sporadik, 55'i iki düşük, 64'ü tekrarlayan düşük) olarak sınıflandırılmıştır. Sonuçta maternal yaşın sadece kromozomal anomali sıklığı artışı ile ilişkili olduğu, spontan ve tekrarlayan düşükler arasında kromozomal anomaliler açısından farklılık olmadığı bulunmuştur (119).

Trombofili, kalıtsal ya da sonradan kazanılan, tromboza eğilimin arttığı bir grup pıhtılaşma bozukluklarını içermektedir. Tromboza eğilimi olan kişilerde gebelik kaybı riskinin arttığı bilinmektedir. Bu duruma farklı gen mutasyonları sebep olabilmektedir. Kalıtsal trombofililere bağlı fetal kayıplar, plasenta damarlarındaki artmış tromboz, infarktlar ve uteroplental yetmezlik sonucu oluşabilmektedir. Fetusteki trombofili de plasentanın fetal kısmında trombozlara ve implantasyon ve trofoblast farklılaşmasında sorunlara yol açarak fetal kayıp etiolojisinde etkili olabilmektedir (120).

Faktör V Leiden trombofili faktörleri arasında en sık kalıtılan mutasyonlardan birisi olarak bilinmektedir. FVL'nin protein C tarafından inaktive edilen bölgesindeki nokta mutasyonu sonucu tromboza eğilim olur. Ayrıca tekrarlayan düşüklerle ve pek çok gebelik komplikasyonunda etkili olduğu bilinmektedir. Bu mutasyon için bizim çalışmamızda da, habituel abortus grubu ile kontrol grubu arasında, spontan abortuslarda fetus grubu ile sağlıklı kontrol

grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p < 0.05$). Rodger ve ark. yaptıkları bir meta-analiz çalışmasında FVL mutasyonu ile gebelik kaybı arasında anlamlı bir ilişki olduğunu, preeklampsi ve düşük doğum ağırlığı ile aralarında bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir (121). Settin ve ark.'nın 72 RPL hastası ve 70 kontrol grubu bireyi ile yaptığı çalışmada, bizim çalışmamızda olduğu gibi tekrarlayan gebelik kaybında FVL mutasyonunun etkili olduğunu bildirmişlerdir (122). Abu-Asab ve ark.'nın daha sonra yaptığı bir çalışmada ise FVL mutasyonu ile tekrarlayan gebelik kaybı arasında bir ilişki olmadığını bildirilmiştir (123). Yusoff ve ark. tekrarlayan gebelik kaybı olan 46 Malezyalı hasta ve 46 bireyden oluşan kontrol grubunda FVL mutasyon prevalansını araştırmışlardır ve hem hasta grubunda hem de kontrol grubunda FVL mutasyonu saptamamışlardır (124). Bizim çalışmamızda FVL mutasyonunun tekrarlayan gebelik kaybı açısından hem kadınlarda hem de erkeklerde risk faktörü olduğu bulunmuştur. Toth ve ark.'nın 151 RPL çifti ile 157 kontrol grubu çifti dahil ederek yaptıkları çalışmada FVL mutasyonunun kadınlarda risk faktörü olduğunu, erkeklerde ise gebelik kaybı açısından etkili olmadığını bildirmişlerdir (125).

Protrombin G20210A mutasyonu için çalışmamızda habituel abortus grubunda kontrol grubuna göre, spontan abortuslarda fetus grubunda anne grubuna göre, yine fetus grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$). Pickering ve ark.'nın tekrarlayan gebelik kaybı olan 91 hasta ve 66 kontrol grubu arasında yaptıkları bir çalışmada, iki grup arasında heterozigot protrombin mutasyonunu bizim çalışmamızda olduğu gibi benzer oranlarda saptamışlardır (126). Reznikoff-Etievant ve ark.'nın tekrarlayan 1.trimester gebelik kaybı olan 260 hasta ve tromboembolizm öyküsü olmayan 240 kontrol olgusunda Faktör V Leiden ve Protrombin G20210A mutasyonları prevalansını inceledikleri çalışmada tekrarlayan 1.trimester gebelik kayıpları Faktör V Leiden veya Protrombin G20210A mutasyonları ile önemli derecede ilişkili bulunmuştur (44). Santoro ve ark. habituel abortus ile FVL ve Protrombin G20210A gen mutasyonu ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında 99 RPL olgusunda FVL geni için % 6.1, protrombin geni için

% 8,1, kontrol grubunda ise her iki gen için % 2,6'lık mutasyon oranlarını saptamışlardır (FVL için $p= 0.36$, Protrombin G20210A için $p=0.13$). Sebebi açıklanamayan erken ve geç gebelik kayıplarında bu mutasyonların analizinin faydalı olacağını bildirmişlerdir (127). Pauer ve ark. habituel abortusu olan 101 hastadan oluşan çalışma grubu ile 122 olgudan oluşan kontrol grubunda FVL ve protrombin gen mutasyonu prevalansını araştırmışlar ve bizim çalışmamızda olduğu gibi anlamlı bir ilişki bulmamışlardır (128). FVL ve Protrombin G20210A etkisini embriyonik ve postembriyonik döneme ayırarak araştıran bir çalışmada 153 hasta çalışmaya dahil edilmiştir: 10. haftaya kadar gebeliği abortusla sonlanan (embriyonik) 94 kadın ve 10-14 hafta arası gebeliği abortusla sonlanan (postembriyonik) 59 kadın. FVL postembriyonik düşüklerle ilişkili bulunurken, protrombin her iki grupta da etkili bulunmuştur (129).

MTHFR C677T polimorfizmi için çalışmamızda habituel abortus grubunda kontrol grubuna göre CC ve CT genotipleri toplamı TT genotipi ile erkeklerde hasta ve kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0.04$), spontan abortuslarda fetus grubunda anne grubuna göre ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). MTHFR A1298C polimorfizmi için habituel abortus grubunda kontrol grubuna göre AC,CC genotipleri ile C allelinin kadınlarda tekrarlayan gebelik kaybı için riski istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmektedir ($p<0.05$). Spontan abortuslarda ise fetus grubu ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$). Kumar ve ark.'nın tekrarlayan gebelik kaybı olan 24 hasta ve 24 kontrol grubu arasında yaptıkları çalışmada, hasta grubunda 5/24 (%13.4) kontrol grubunda 1/24 (%4.2) oranında homozigot MTHFR 677TT mutasyonu saptamış ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulmuşlardır ($p<0.001$) (130). Goodman ve ark.'nın toplam 550 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, çalışma grubunda 1956 hastadan oluşan kontrol grubuna göre homozigot MTHFR C667T mutasyonunun anlamlı ($p<0.0001$) olarak yüksek olduğunu saptamışlardır (131). Makino ve ark.'nın 85 tekrarlayan gebelik kaybı hastası ve 76 kontrol grubu arasında yaptıkları çalışmada, homozigot MTHFR mutasyonu

açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulmamışlardır ($p>0.05$) (132). Dissanayake ve ark.'nın tekrarlayan gebelik kaybı ve preeklampsisi olan hastalar ile kontrol grubunu karşılaştırdıkları çalışmada MTHFR C677T ve MTHFR A1298C polimorfizmleri ile habituel abortus ve preeklampsinin ilişkili olmadığını bildirmişlerdir (133). RPL ve spontan abortus ile MTHFR A1298C polimorfizmini ilişkili bulan çalışmalar da mevcuttur. Nair ve ark. ise hem RPL olan kadınlarda hem de fetuslerde 129 RPL hastası ile 202 kontrol birey ve 40 spontan abortus materyali ile 40 kontrol abortus materyali çalışmalarına dahil etmişlerdir. Meta-analiz için ise 1080 RPL hastası ile 709 bireyden oluşan kontrol grubu ve 375 düşük materyali ile kontrol grubu olarak 384 düşük materyali de çalışmaya alınmıştır. MTHFR A1298C polimorfizmine ait AC, CC genotipleri ile C allelinin düşük etiyolojisinde etkili olduğunu bildirmişlerdir (134). Bir başka çalışmada MTHFR C677T polimorfizminin değil; ama MTHFR A1298C polimorfizminin hem homosistein seviyesinde artışa hem de tekrarlayan gebelik kaybına etkili olduğu bildirilmiştir (135).

PAI-1 5G/4G polimorfizmi için çalışmamızda habituel abortus grubunda kontrol grubuna göre kadınlarda 5G/4G ve 4G/4G genotip toplamları ile 5G/5G genotipi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0.03$). Yine kadınlarda 5G/5G genotipi ile 4G/4G genotipi hasta ve kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0.04$). Spontan abortuslarda anne grubuna karşı fetus grubu karşılaştırıldığında 5G/5G genotipi normal kabul edilip 5G/4G+4G/4G genotipleri mutasyon pozitif kabul edildiğinde $p=0.0017$ bulunmuştur. 5G/5G genotipi ile 4G/4G genotipi karşılaştırıldığında $p=0.02$ olduğu için yine istatistiksel olarak anlamlıdır. Çalışmamızda hem tekrarlayan gebelik kayıplarında hem de diğer spontan abortuslarda anne ve fetus açısından bakıldığında PAI-1 5G/4G polimorfizminin etkili olduğu bulunmuştur. Parveen ve ark.'nın PAI-1 5G/4G VE MTHFR mutasyonları ile ilk trimestere ait tekrarlayan düşüklerin ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında 200 hasta ve 300 bireyden oluşan kontrol grubunu analiz etmişlerdir. MTHFR mutasyonlarının tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkili olduğunu PAI-1 5G/4G polimorfizminin ise ilişkili

olmadığını bildirmişlerdir (136). Subrt ve ark. ise 157 hasta ile yaptıkları çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi PAI-1 4G/4G genotipinin tekrarlayan düşüklerde etkili olduğunu bildirmişlerdir (137). Bir başka çalışmada tekrarlayan gebelik kaybı ile trombofili mutasyonlarının ilişkisi araştırılmış ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PAI-1 5G/4G polimorfizminin etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca 4G/4G genotipi tekrarlayan gebelik kaybı hastalarında görülen en sık genotip olarak bildirilmiştir (138).

ACE I/D polimorfizmi için çalışmamızda habituel abortus grubunda kontrol grubuna hem kadın hem de erkeklerde yapılan karşılaştırmaların hiçbirinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$). Spontan abortuslarda fetus ve anne grubuna ait genotip yüzdeleri ile allel frekansları karşılaştırıldığında $p>0.05$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Fetus grubu ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında ise DD genotipinin fetuslerde bulunmasının düşük riskini arttırdığı görülmüştür ($p=0.01$). Su ve ark. yaptığı bir meta-analiz çalışmasında RPL ile ACE I/D polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. 2820 RPL hastası ile 3009 bireyden oluşan kontrol grubu sonuçlarına göre ACE I/D polimorfizmi ile RPL arasında önemli bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir (85). Çalışmamız fetal genotip sonuçlarındaki anlamlılık ile bu çalışma benzerlik göstermektedir. Başka bir meta-analiz çalışmasında altı ülkeden dokuz çalışmaya ait toplam 1264 RPL hastası ile 845 kontrol grubu bireyi ACE I/D polimorfizmi açısından değerlendirilmiştir ve ACE D allelinin RPL riskini arttırdığı bildirilmiştir (84). Bizim çalışmamızda habituel abortus ve kontrol grubu arasında olduğu gibi ACE I/D polimorfizmi ile RPL ilişkisinin olmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Bagheri ve ark. İranlı Azeri Türkleri ile yaptıkları çalışmada 50 RPL hastası ile 63 fertil, sağlıklı bireyi kontrol grubu olarak ACE I/D açısından değerlendirmişlerdir. ACE I/D polimorfizmi ile RPL arasında bir ilişki saptamamışlardır (139). Goodman ve ark. da 120 tekrarlayan gebelik kaybı hastası ile 84 fertil kadından oluşan kontrol grubunda ACE I/D ve PAI-1 5G/4G polimorfizmleri ile RPL arasında bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir (140).

104 RPL hastası ve 120 kontrol grubu bireyi ile yapılan ACE I/D ve RPL ilişkisini araştıran başka bir çalışmada da ilişki olmadığı bildirilmiştir (141).

eNOS E298D polimorfizmi için çalışmamızda habituel abortus grubunda kontrol grubuna göre kadınlarda heterozigot mutant (GT) ve homozigot mutant (TT) hasta kabul edildiğinde homozigot wild (GG) genotipine karşı istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0.0003$). Hasta grup sadece TT kabul edildiğinde, GG ve GT toplamı ile karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0.04$). Homozigot wild (GG) ve homozigot mutant (TT) bireyler karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0.01$). Allel frekansları (G ve T) karşılaştırıldığında $p=0.01$ olduğu için yine istatistiksel olarak anlamlıdır. Spontan abortuslarda GT ve TT genotipleri mutasyon pozitif kabul edilip GG genotipi ile iki grup arasında karşılaştırıldığında $p=0.001$ bulunmuştur. İki grup arasında allel frekansları karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($p=0.01$). Annedeki T alleli veya TT genotipi ya GT genotipi varlığı abortus açısından riskli bulunmuştur. Makino ve ark.'nın 2004'te yaptığı 85 RPL hastası, 40 fetal kaybı olan hasta ve 76 bireyden oluşan kontrol grubunda MTHFR C677T ve eNOS E298D polimorfizmlerinin gebelik kaybı ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir (132). Zammiti ve ark. ise eNOS'un farklı polimorfizmlerini 350 RPL hastası ile 200 kontrol grubu bireyinde çalışmışlardır. Çalışılan polimorfizmler ile gebelik kayıpları arasında bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir (88). Shin ve ark. 340 RPL ve 115 kontrol grubu bireyde bizim çalışmamızda olduğu gibi eNOS E298D polimorfizmi ile tekrarlayan gebelik kaybı arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir (142). 145 RPL hastası ile 99 kontrol bireyin dahil edildiği çalışmada Suryanarayana ve ark. eNOS E298D polimorfizmi ile tekrarlayan gebelik kaybı arasında anlamlı bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir (143).

Apo E E2/E3/E4 polimorfizmi için çalışmamızda habituel abortus grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel oranlar, hem kadınlarda hem erkeklerde E3/E3 genotipi ile diğer genotipler (E3/E4+E3/E2+E2/E4+E4/E4+E2/E2) arasında, E3 alleli içeren genotipler

(E3/E3+E3/E4+E3/E2) ile E3 alleli içermeyen (E2/E4+E4/E4+E2/E2) genotipler arasında, allel frekansı olarak E3 ve E2 ile E3 ve E4 arasında karşılaştırma yapılarak hesaplanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Spontan abortuslarda fetus grubuna karşı anne grubu karşılaştırıldığında E3/E3 genotip yüzdesi ile diğer genotiplerin yüzdeleri toplamı karşılaştırıldığında $p < 0.0001$ bulunmuştur. Allel frekanslarından E3 ve E2, E3 ve E4 karşılaştırıldığında $p < 0.0001$ bulunduğu için her iki durumda da istatistiksel olarak anlamlılık vardır. Yine fetus grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasındaki allel frekansı karşılaştırmalarında fetusteki E2 allel varlığının E3 allele göre düşük riskini arttırdığı bulunmuştur ($p = 0.0001$). Korkmazer ve ark.'nın 45 RPL hastası ile 45 bireyden oluşan kontrol grubu ile yaptıkları çalışmada Apo E E2/E3/E4 polimorfizmi ile tekrarlayan gebelik kaybı arasında bizim çalışmamızda olduğu gibi ilişki olmadığı bildirilmiştir (144). Agarwal ve ark. 200 RPL hastası ile bu polimorfizmi değerlendirmişler ve yine tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkisi olmadığını bildirmişlerdir (145). Asgari ve ark. ise 81 RPL hastası ve 81 bireyden oluşan kontrol grubu ile yaptıkları çalışmada Apo E E2/E3/E4 polimorfizmi ve tekrarlayan gebelik kaybı arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir. E3/E4 ve E4/E4 genotiplerini RPL grubunda daha fazla oranda bulmuşlar ve E4 allelinin trombofilik bir faktör olarak RPL etiolojisinde etkili olduğunu öne sürmüşlerdir (102). Bizim çalışmamızda bulduğumuz, fetal Apo E2 veya E4 allel taşıyıcılığının spontan abortus riskini arttırması durumu ile ilgili literatürde henüz bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda trombofili etkisi olmayan, endotelial hücre proliferasyonu, migrasyonu ve diferansiyasyonunda görevli VEGF genine ait farklı polimorfizmlerin de abortusla ilişkisi araştırılmıştır.

VEGF A C405G polimorfizmi için çalışmamızda habituel abortus grubunda kontrol grubuna göre kadınlarda habituel abortus grubu ile kontrol grubu yüzdeleri ve allel frekansları karşılaştırıldığında her biri için $p > 0.05$ bulunduğu için VEGF A C405G polimorfizmi ile tekrarlayan gebelik kaybı arasında kadınlar açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı

anlaşılmıştır. Erkeklerde ise GG genotipine karşılık CC ve CG genotip yüzdeleri toplamı karşılaştırıldığında $p < 0.0001$ olduğu için GG genotipinin tekrarlayan gebelik kaybı açısından erkek faktörü için istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu, C ve G allel frekansları iki grup arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu ($p = 0.03$) anlaşılmıştır. VEGF A C405G polimorfizmi tekrarlayan gebelik kaybında erkeklerde GG genotipi ve G alleli açısından etkilidir. Spontan abortuslarda fetus grubuna karşı anne grubu karşılaştırıldığında CC+CG genotipleri ile GG genotipi ve CC genotipi ile GG genotipi kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur (p değerleri sırasıyla 0.001 ve 0.02). Fetus grubu ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında da fetusteki GG genotipinin düşük riskini arttırdığı bulunmuştur ($p = 0.0017$, $p = 0.0208$). Fetusteki G allel varlığının da C allel varlığına göre düşük riskini arttırdığı görülmüştür ($p = 0.0363$).

VEGF A C936T polimorfizmi için çalışmamızda habituel abortus grubunda kontrol grubuna göre kadınlarda CC genotip yüzdesi ile CT ve TT genotip yüzdeleri toplamı karşılaştırıldığında $p = 0.04$ bulunduğu için istatistiksel olarak anlamlıdır. Kadınlarda diğer genotip karşılaştırmalarında $p > 0.05$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Erkeklerde VEGF A C936T polimorfizminin tekrarlayan gebelik kaybı açısından etkili olmadığı görülmüştür. Tüm genotip ve allel frekansı karşılaştırmalarında $p > 0.05$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur. Spontan abortuslarda anne grubuna karşı fetus grubu karşılaştırıldığında TT genotipi mutasyon pozitif kabul edildiğinde CC+CT genotipleri ile karşılaştırıldığında $p = 0.01$, tahmini rölatif risk:4.2, sadece CC genotipi ile karşılaştırıldığında $p = 0.01$, tahmini rölatif risk:4.3 bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlıdır. Allel frekansları karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir ($p < 0.0001$, tahmini rölatif risk:1.8). Buna göre annedeki TT genotipi veya T allel taşıyıcılığı spontan abortus riskini arttırmaktadır. Fetus grubu ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

VEGF A C2578A polimorfizmi için çalışmamızda habituel abortus grubunda kontrol grubuna göre tekrarlayan gebelik kaybı açısından hem kadınlarda hem erkeklerde etkili olmadığı bulunmuştur. Kadınlarda genotip yüzdeleri ile allel frekansı karşılaştırmalarına bakıldığında $p=1$, tahmini rölatif risk=1 olduğundan habituel abortus grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ve bu polimorfizmin gebelik kayıplarında etkisiz olduğu anlaşılmıştır. Erkeklerde de aynı şekilde $p>0.05$ olduğu için ve %95 CI değer aralıkları 1'i içerdiği için önemli bir risk olmadığı anlaşılmıştır. Spontan abortuslarda fetus grubu ile anne grubu genotip yüzdeleri ve allel frekansları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiştir ($p>0.05$). Yine fetus grubu ile sağlıklı kontrol grubu genotip yüzdeleri ve allel frekansları karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir ($p>0.05$).

VEGF A C460T polimorfizmi için çalışmamızda habituel abortus grubunda kontrol grubuna göre TT genotip yüzdesi ile CC ve CT genotip yüzdeleri toplamı karşılaştırıldığında $p= 0.006$ olduğu için VEGF A C460T polimorfizmi ile kadınlarda tekrarlayan gebelik kaybı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu ve kadınlarda diğer genotipler ve allel frekansları karşılaştırıldığında $p>0.05$ bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı anlaşılmıştır. Erkeklerde ise tüm genotip karşılaştırmaları ile allel frekansı karşılaştırmasında $p>0.05$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı gösterilmiş ve tekrarlayan gebelik kaybı açısından önemli bir risk olmadığı anlaşılmıştır. Spontan abortuslarda anne grubu ile fetus grubu karşılaştırıldığında CT+TT genotipleri mutasyon pozitif kabul edilmiş ve CC genotipine (wild tip) göre riskli bulunmuştur ($p=0.03$). İstatistiksel olarak anlamlı bu değere göre annedeki heterozigot ve homozigot mutasyon spontan abortus riskini arttırmaktadır. Fetus grubu ile sağlıklı kontrol grubu genotip yüzdeleri ve allel frekansları karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir ($p>0.05$).

Şamlı ve ark.'nın Türk hastalarda yaptığı çalışmada 38 RPL hastası ile 30 kontrol olgusunda VEGF 1154 G/A, 2578 C/A, 460 C/T ve 936 C/T polimorfizmleri değerlendirilmiştir. Sadece 1154 G/A polimorfizmi ile RPL arasında ilişki bulunmuş, diğer polimorfizmler ile ilişki olmadığı bildirilmiştir. Gebelik kaybının VEGF fonksiyonuna bağlı olarak plasental anjiogenezi etkilemesiyle olabileceğini öne sürmüşlerdir (146). Su ve ark.'nın yaptıkları bir meta-analiz çalışmasında 2397 RPL hastası ve 1760 kontrol birey incelendiğinde VEGF 1154 G/A polimorfizmi ile tekrarlayan gebelik kaybı arasında önemli bir ilişki olduğu bildirilmiştir (93). Eller ve ark. da benzer bir çalışma yaparak RPL ile VEGF -2578 C/A, -1154 G/A, -634 G/C ve +936 C/T polimorfizmlerinin etkisini araştırmışlardır. RPL grubunda kontrol grubuna göre -2578 A allelinin daha düşük sayıda bulunduğu, -634 C allelinin ise RPL grubunda daha yüksek oranda bulunduğunu, -1154 G/A ve +936 C/T polimorfizmlerine ait allellerin ise benzer oranlarda bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu yüzden VEGF A gen ekspresyonu değişikliklerinin tekrarlayan gebelik kaybında etkili olduğunu öne sürmüşlerdir (112). Traina ve ark. 89 RPL hastası ile yaptıkları çalışmada VEGF -634 G/C ve +936 C/T polimorfizmleri ile tekrarlayan gebelik kaybı arasında ilişki olmadığını bildirmişlerdir (147). Galazios ve ark.'nın yaptığı bir derlemede VEGF C936T polimorfizminin preeklampsi ve preterm doğumla ilişkili olduğu, VEGF G1154A polimorfizminin tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (148). Bizim çalışmamızda VEGF C936T polimorfizmine ait TT genotipi ve T alleli tekrarlayan gebelik kayıplarında ve spontan abortuslarda anne ve fetus karşılaştırmasında ilişkili bulunmuştur. Lee ve ark. da RPL ile VEGF -2578C>A, -1154G>A, -634G>C, 936C>T polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. 215 RPL hastası ile 113 kontrol grubu bireyden oluşan çalışmada bu polimorfizmlerin tekrarlayan gebelik kaybında etkili olduğunu bildirmişlerdir (149). Papazoglou ve ark.'nın 52 RPL hastası ve 82 kişilik kontrol grubu ile yaptığı çalışmada VEGF -2578C/A, -1154G/A, -634G/C, and 936C/T polimorfizmleri ile RPL ilişkisi araştırılmış ve sadece -1154G/A polimorfizmi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. A allelinin G alleleline göre RPL için daha riskli olduğu bildirilmiştir (150). Bizim çalışmamızda VEGF 460TT genotipinin kadınlarda

tekrarlayan düşükler açısından riskli ve spontan abortuslarda da annenin CT veya TT genotipinde olmasının riskli olduğu bulunmuştur. Ayrıca VEGF C405G polimorfizmine ait GG genotipi ve G alleli erkek faktörü için tekrarlayan düşük açısından, spontan abortuslarda fetusteki GG genotipi varlığı düşüklere sebep olması açısından riskli bulunmuştur. Bizim bulduğumuz bu sonuçlarla ilgili olarak literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Gebelik kayıpları ile ilgili yapılan çalışmalar genellikle anneye ait genler üzerine yapılmış olup çiftlerde yapılan çalışmalar genellikle kromozomal faktörler üzerine yoğunlaşmıştır. Rajcan-Separovic ve ark. çiftler ve düşük materyalleri üzerinde array-CGH ile değerlendirme yapmışlardır. Çalışmaya 23 çift ve bu çiftlere ait düşüklerden kromozom analizi normal (46,XX veya 46,XY) olanlar dahil edilmiştir. 23 çiftten 20'si array CGH için uyumlu bulunmuş ve 27 düşük materyaline de array CGH yapılmıştır. Çalışma sonucunda bazı bölgelerde artma bazı bölgelerde ise delesyon saptanmış ve FISH, Real Time PCR gibi yöntemlerle doğruluğu test edilmiştir. 13 düşük materyalinde bir ebeveynden geçen CNV (copy number variation) varlığı tespit edilmiştir (151). Blumberg ve ark.'nın 103 tekrarlayan düşüğü olan kadın ve bu kadınların eşlerinden 81'inde Q-bantlama ile yaptıkları kromozom analizlerinde minör kromozomal polimorfizmlerin değil; ama major parental sitogenetik değişikliklerin tekrarlayan düşüklerde etkili olduğunu bildirmişlerdir (152). Govindaiah ve ark. gen düzeyinde bir etkiye bakarak MTHFR C677T polimorfizmi ile hiperhomosisteinemi araştırmışlardır. Parental hiperhomosisteineminin ve paternal MTHFR C677T polimorfizminin tekrarlayan gebelik kaybında etkili olduğunu bildirmişlerdir (153).

Tekrarlayan gebelik kaybı olan çiftlerde genetik etiyojijiyi saptamak açısından genel yaklaşım, erkek ve kadına kromozom analizi yapılması, kadına ayrıca trombofili analizi yapılması şeklindedir. Bu genel yaklaşıma uygun olarak literatürde gebelik kaybı ile ilgili olan çalışmalar çiftlerde genellikle kromozom anomalileri üzerinedir. Akbaş ve ark. 221 RPL çifti ve 234 kontrol grubu çifti ile yaptıkları çalışmada kromozomal heteromorfizmlerin RPL grubunda (% 8.4)

kontrol grubuna göre (% 4.9) daha fazla görüldüğünü, hastalarda ise erkeklerde (%11.3) kadınlara göre (% 5.4) daha fazla görüldüğünü bildirmişlerdir (154). Çiftlerdeki dengeli veya dengesiz translokasyon taşıyıcılıklarının da tekrarlayan gebelik kaybına sebep olduğu bilinmektedir. Ozdemir ve ark. yaptıkları bir çalışmada RPL çiftlerinde trombofili mutasyonlarını araştırmışlardır. Çalışmaya 543 kadın ve bu kadınlardan 327'sinin eşi, kontrol grubu olarak 106 fertil çift dahil edilmiştir. PAI-1 4G/4G homozigotluğu ve MTHFR 677TT homozigot genotipi tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda etkili bulunmuş, FVL, FVR2, ACE ve Apo E heterozigotluğu hem kadın hem de erkeklerde etkili bulunmuştur (155). Bu çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da polimorfik genlerin sadece tekrarlayan düşükleri olan kadınlarda değil erkeklerde de etkisi olduğu anlaşılmıştır. Bu testlerin sadece kadınlara yapılması ve yine sadece kadınlara tedavi verilmesinin yetersiz kaldığı ortadadır. Erkek faktörünü bilmeden sadece kadınların tedavi edilmesi ve tedavinin yetersiz kalması durumunda çiftler gebelik kaybı yaşamaya devam etmekte, hem manevi hem de maddi zarar görme durumları artmaktadır. Bu yüzden gebelik kaybı yaşayan çiftlerde sadece kadına değil, erkeğe de aynı testlerin yapılması gerekmektedir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırma sonuçları özetlenecek olursa;

- Çalışmaya dahil edilen habituel abortus çiftlerinde (toplam 112 birey), sayısal ve yapısal kromozomal aberasyona rastlanmamıştır.
- Spontan abortusla sonlanan 23 düşük materyalinin 7'sinde (%30.4) [iki trizomi 21 (% 8.7), iki trizomi 13 (% 8.7), iki triploidi (% 8.7), bir monozomi X (% 4.3)] kromozomal anomali saptanmıştır.

Habituel abortus grubuna ait sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tekrarlayan gebelik kaybı riskini arttırması açısından;

- Faktör V Leiden GA (heterozigot mutant) ve AA (homozigot mutant) genotiplerinin kadın ve erkeklerde yüksek bulunması sebebiyle etkili olduğu,
- PAI-1 5G/4G (heterozigot mutant) ve 4G/4G (homozigot mutant) genotiplerinin kadınlarda yüksek bulunması sebebiyle etkili olduğu,
- MTHFR C677T polimorfizmine ait TT (homozigot mutant) genotipinin erkeklerde yüksek bulunması sebebiyle etkili olduğu,
- MTHFR A1298C polimorfizmine ait AC (heterozigot mutant), CC (homozigot mutant) genotipleri ile C allel varlığının A allel varlığına göre kadınlarda yüksek bulunması sebebiyle etkili olduğu,
- eNOS E298D polimorfizmine ait ED (heterozigot mutant), DD (homozigot mutant) genotipleri ile D allel varlığının E allel varlığına göre kadınlarda; ayrıca D allel varlığının E alleline göre erkeklerde yüksek bulunması sebebiyle etkili olduğu,
- VEGF A C405G polimorfizmine ait GG (homozigot mutant) genotipi ile G allel varlığının C allel varlığına göre erkeklerde yüksek bulunması sebebiyle etkili olduğu,
- VEGF A C936T polimorfizmine ait CT (heterozigot mutant) ve TT (homozigot mutant) genotiplerinin kadınlarda yüksek bulunması sebebiyle etkili olduğu,

- VEGF A C460T polimorfizmine ait TT (homozigot mutant) genotipinin kadınlarda yüksek bulunması sebebiyle etkili olduğu bulunmuştur.

Spontan abortus grubu ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında düşük riski açısından;

- Faktör V Leiden GA (heterozigot mutant) genotipinin yüksek bulunması sebebiyle etkili olduğu,
- ACE DD (homozigot mutant) genotipinin yüksek bulunması sebebiyle etkili olduğu,
- Apo E E2/E3/E4 polimorfizmine ait E2 allelinin E3 allele göre yüksek bulunması sebebiyle etkili olduğu,
- VEGF A C405G polimorfizmine ait GG (homozigot mutant) genotipi ile G allelinin C allele göre yüksek bulunması sebebiyle etkili olduğu bulunmuştur.

Spontan abortus grubu ile anneleri karşılaştırıldığında düşük riski açısından;

- PAI-1 5G/4G (heterozigot mutant) ve 4G/4G (homozigot mutant) genotiplerinin annelere göre daha yüksek oranda bulunması sebebiyle etkili olduğu,
- eNOS E298D polimorfizmine ait ED (heterozigot mutant) ve DD (homozigot mutant) genotipi ile D allelinin E alleli ile karşılaştırıldığında annelere göre daha yüksek oranda bulunması sebebiyle etkili olduğu,
- Apo E E2/E3/E4 polimorfizmine ait E2 ve E4 allellerinin E3 alleli ile karşılaştırıldığında annelere göre daha yüksek oranda bulunması sebebiyle etkili olduğu,
- VEGF A C405G polimorfizmine ait GG (homozigot mutant) genotipi ile G allelinin C alleli ile karşılaştırıldığında annelere göre daha yüksek oranda bulunması sebebiyle etkili olduğu,
- VEGF A C936T polimorfizmine ait TT (homozigot mutant) genotipi ile T allelinin C alleli ile karşılaştırıldığında annelere göre daha yüksek oranda bulunması sebebiyle etkili olduğu,

- VEGF A C460T polimorfizmine ait CT (heterozigot mutant) ve TT (homozigot mutant) genotiplerinin annelere göre daha yüksek oranda bulunması sebebiyle etkili olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak çalışmamızda, düşük materyali genotipleri ile annelerine ait genotipleri elde etmemiz babalarına ait genotipler hakkında fikir sahibi olmamızı sağlamıştır. Düşük materyallerine ait mutant genotiplerin annelere göre daha yüksek bulunması, babalardaki mutant genotiplerin de daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu yüzden, gebelik kayıplarında sadece kadınlara ait mutasyonların değil, erkeklerdeki mutasyonların da etkili olduğunu anlıyoruz. Bir çiftte ait gebelik kaybı hem anneye ait hem de babaya ait genetik faktörlerden kaynaklanmaktadır; çünkü fetusun genotipi maternal ve paternal kökenlidir. Gebelik kayıplarında, fetal genetiği belirleyen anne ve babanın beraber incelenmesi gerekmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. CUNNINGHAM, F. G., LEVENO, K. L., BLOOM, S. L., HAUTH, J. C., ROUSE, D., SPONG, C. Y. (2010). *Williams Obstetrics*. 23 th edition. NEW YORK, NY: McGraw-Hill, Chapter 9.
2. RIBAS-MAYNOU, J., GARCIA-PEIRÓ, A., FERNANDEZ-ENCINAS, A., AMENGUAL, M. J., PRADA, E., CORTÉS, P., NAVARRO, J., BENET, J. (2012). Double stranded sperm DNA breaks, measured by comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS One*. 7(9):e44679.
3. SIERRA, S., STEPHENSON, M. (2006). Genetics of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med*. 24 (1): 17-24.
4. SIMPSON, J. L., GOLBUS, M. S. Genetics of Pregnancy Loses. *Genetics in Obstetrics&Gynecology*. SIMPSON, J. L., GOLBUS, M. S. (1992). 2nd Philadelphia: W. B. Saunders Company. S: 181-200.
5. BRYNE, J. L. B., WARD, K. (1994). Genetic factors in recurrent abortion. *Clin Obstet Gynecol*. 37: 693-704.
6. DAWOOD, F., FARQUHARSON, R., QUENBY, S. (2004). Recurrent miscarriage. *Curr Obstet Gynaecol*. 14: 247-253.
7. EXALTO, N., CHRISTIANSEN, O., FARQUHARSON, F., JAUNIAUX, E. (2007). Early pregnancy failure: a review. *Eur Clinics Obstet Gynaecol*. 2: 171-179.
8. SIMPSON J. (2007). Causes of Fetal Wastage. *Clin Obstet Gynecol*. 50: 10-30.
9. PORTER, T., SCOTT, J. (2005). Evidence-based care of recurrent miscarriage. *Best Prac Res Clin Obstet Gynaecol*. 19: 85-101.
10. STEPHENSON, M., KUTTEH, W. (2007). Evaluation and Management of Recurrent Early Pregnancy Loss. *Clin Obstet Gynecol*. 50: 132-145.

11. ACIEN, P., ACIEN, M. (2004). Evidence-based management of recurrent miscarriage. Surgical management. *International Congress Series*. 1266: 335-334.
12. LEIBLE, S., MUNOZ, H., WALTON, R., SABAJ, V., CUMSILLE, F., SEPULVEDA, W. (1998). Uterin arter blood flow velocity wave forms in pregnant women with mullerian duct anomaly. A biologic model for uteroplacental insufficiency. *Am J Obstet Gynecol*. 178: 1048.
13. PROPST, A., HILL, J. (2000). Anatomic factors associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med*. 18: 341.
14. PATTON, P., NOVY M. J. (1988). Reproductive potential of the anomalous uterus. *Semin Reprod Endocrinol*. 6: 217.
15. DRAKELEY, A. J., ROBERTS, D., AFIREVIC, Z. (2003). Cervical stitch (cerclage) for preventing pregnancy loss in women. *Cochrane Database Syst Rev*. (1):CD003253.
16. OKON, M., LAIRD, S., TUCKERMAN, E., LI, T. (1998). Serum androgen levels in women who have recurrent miscarriages and their correlation with markers of endometrial function. *Fertil Steril*. 69: 682-690.
17. ABALOVICH, M., GUTIERREZ, S., ALCARAZ, G., MACCALLINI, G., GARCIA, A., LEVALLE, O. (2002). Overt and subclinic hypothyroidism complicating pregnancy. *Thyroid*. 12: 63.
18. COULAM, C., STERN J. (1994). Endocrine factors associated with recurrent spontaneous abortion. *Clin Obstet Gynecol*. 37: 730-744.
19. BROCKLEHURST, P., HANNAH, M., MCDONALD, H. (2000). Interventions for treating bacterial vaginosis in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*. 262.
20. LAIRD, S. M., TUKERMAN, E. M., CORK, B. A., LINJAWI, S., BLAKEMORE, A. L., LI, T. C. (2003). A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update*. 9: 163-174.
21. JAUNIAUX, E., BURTON, G. (2005). Pathophysiology of Histological Changes in Early Pregnancy Loss. *Placenta*. 26: 114-123.

- 22.** PANDEY, M., RANI, R., AGRAWAL, S. (2005). An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet.* 272: 95-108.
- 23.** RAY, J. G., LASKIN, C. A. (1999). Folic acid and homocysteine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss. *Placenta*, 20: 519–529.
- 24.** GARDELLA, J., HILL, J. (2000). Environmental toxins associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med.* 18: 407.
- 25.** GUYTON, A. C., HALL, J. E. Abortus. *Tıbbi Fizyoloji.* ÇAVUŞOĞLU, H. N. (1996). 9. Baskı. Ankara: Nobel tıp kitabevi. S: 463-469.
- 26.** HAMMEROVA, L., CHABADA, J., DROBNY, J., BATOROVA, A. (2011). Factor V Leiden mutation and its impact on pregnancy complications. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 54 (3): 117-121.
- 27.** NICOLINI, U., LALATTA, F., NATACCI, F., CURCIO, C., BUI, T. H. (2004). The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration. *Hum Reprod Update.* 10 (6): 541-548.
- 28.** DONAGHUE, C., MANN, K., DOCHERTY, Z., OGILVIE, C., M. (2005). Detection of mosaicism for primary trisomies in prenatal samples by QF-PCR and karyotype analysis. *Prenat Diagn.* 25 (1): 65-72.
- 29.** BUSTIN, S. A., MUELLER, R. (2005). Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond).* 109 (4): 365-379.
- 30.** GÜNEL, T., AYDINLI, K. (2009). “Real-Time PCR” ve Uygulama Alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2 (2): 43-45.
- 31.** KORTUNAY, S. (2005). The pharmacogenetics of central nervous system drugs. *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci.* 1 (44): 76-80.
- 32.** TULUNAY M. (2006). Potential molecular targets in future sepsis therapy. *Turkiye Klinikleri J Surg Med Sci.* 2 (32): 49-64.
- 33.** CORRAL-RODRIGUEZ, M. Á., BOCK, P. E., HERNANDEZ-CARVAJAL, E., GUTIERREZ-GALLEGO, R., FUENTES-PRIOR, P. (2011). Structural basis of thrombin-mediated factor V activation: the Glu666-Glu672 sequence is critical for processing at the heavy chain-B domain junction. *Blood.* 30; 117 (26): 7164-7173.

- 34.** Erişim: [<http://omim.org/entry/612309>].
- 35.** DAHLBACK, B., CARLSSON, M., SVENSSON, P. J. (1993). Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1; 90 (3): 1004-1008.
- 36.** KUJOVICH, J.L. (2010). Factor V Leiden Trombophilia.
Erişim: [[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/boks\(NBK1368/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/boks(NBK1368/)].
- 37.** Erişim: [<http://omim.org/entry/176930>].
- 38.** DENTALI, F., CROWTHER, M., AGENO, W. (2006). Thrombophilic abnormalities, oral contraceptives, and risk of cerebral vein thrombosis: a meta-analysis. *Blood.* 107: 2766–2773.
- 39.** PRIMIGNANI, M., MARTINELLI, I., BUCCIARELLI, P., BATTAGLIOLI, T., REATI, R., FABRIS, F., DELLERA, A., PAPPALARDO, E., MANNUCCI, P. M. (2005). Risk factors for thrombophilia in extrahepatic portal vein obstruction. *Hepatology.* 41: 603–608.
- 40.** GLUECK, C. J., WANG, P. (2009). Ocular vascular thrombotic events: a diagnostic window to familial thrombophilia (compound factor V Leiden and prothrombin gene heterozygosity) and thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost.* 15: 12–18.
- 41.** JUNKER, R., KOCH, H. G., AUBERGER, K., MUNCHOW, N., EHRENFORTH, S., NOWAK-GOTTL, U. (1999). Prothrombin G20210A gene mutation and further prothrombotic risk factors in childhood thrombophilia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19: 2568–2572.
- 42.** PABINGER, I., GRAFENHOFER, H., KYRLE, P. A., QUEHENBERGER, P., MANNHALTER, C., LECHNER, K., KAIDER, A. (2002). Temporary increase in the risk for recurrence during pregnancy in women with a history of venous thromboembolism. *Blood.* 100: 1060–1062.
- 43.** PIHUSCH, R., BUCHHOLZ, T., LOHSE, P., RUBSAMEN, H., ROGENHOFER, N., HASBARGEN, U., HILLER, E., THALER, C. J. (2001). Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. *Am J Reprod Immunol.* 46: 124–131.

44. REZNIKOFF-ETIEVAN M. F., CAYOL, V., CARBONNE, B., ROBERT, A., COULET, F., MILLIEZ, J. (2001). Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutations are risk factors for very early recurrent miscarriage. *BJOG*. 108: 1251–1254.
45. HOMBERGER, A., LINNEBANK, M., WINTER, C., WILLENBRING, H., MARQUARDT, T., HARMS, E., KOCH, H. G. (2000). Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet*. 8 (9): 725-729.
46. BOTTO, L. D., YANG, Q. (2000). 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: A HuGE Review. *Am J Epidemiol*. 151: 862-877.
47. EFTYCHIOU, C., ANTONIADES, L., MAKRI, L., KOUMAS, L., COSTEAS, P. A., KYRIAKOU, E., NICOLAIDES E., PAPADOGIANNIS, D. (2012). Homocysteine levels and MTHFR polymorphisms in young patients with acute myocardial infarction: a case control study. *Hellenic J Cardiol*. 53 (3): 189-194.
48. UELAND, P. M., REFSUM, H., STABLER, S. P., MALINOW, M. R., ANDERSSON, A., ALLEN, R. H. (1993). Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem*. 39 (9): 1764-1779.
49. TONETTI, C., BURTSCHER, A., BORIES, D., TULLIEZ, M., ZITTOUN, J. (2000). Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency in four siblings: A clinical, biochemical, and molecular study of the family. *Am J Med Genet*. 91: 363-367.
50. SCHNEIDER, J. A., REES, D. C., LIU, Y. T., CLEGG, J. B. (1998). Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet*, 62: 1258-1260.
51. SELL, S. M., LUGEMWA, P. R. (1999). Development of a highly accurate, rapid PCR-RFLP genotyping assay for the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Genet Test*. 3: 287-289.
52. Erişim: [<http://omim.org/entry/607093>].
53. GÜLEÇ, S., ARAS, O., AKAR, E., TUTAR, E., OMURLU, K., AVCI, F., DİNÇER, I., AKAR, N., ORAL, D. (2001). MTHFR gene polymorphism and risk of premature myocardial infarction. *Clinical Cardiology*. 24 (4): 281-284.

- 54.** RAZIEL, A., KORNBERG, Y., FRIEDLER, S., SCHACHTER, M., SELA, B. A., RON-EL R. (2001). Hypercoagulable thrombophilic defects and hyperhomocysteinemia in patients with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol.* 45 (2): 65-71.
- 55.** NELEN W. L., BLOM, H. J., STEEGERS, E. A., DEN HEIJER, M., ESKES, T. K. (2000). Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 74: 1196-1199.
- 56.** KIM, N. K., CHOI, Y. K., KANG, M. S., CHOI, D. H., CHA, S. H., AN, M. O., LEE, S., JEUNG, M., KO, J. J., OH, D. (2006). Influence of combined methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and thymidylate synthase enhancer region (TSER) polymorphisms to plasma homocysteine levels in Korean patients with recurrent spontaneous abortion. *Thrombosis research.* 117: 653-658.
- 57.** SCHMITZ, C., LINDPAINTER, K., VERHOEF, P., GAZIANO, J. M., BURING, J. (1996). Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and myocardial infarction. *Circulation.* 94: 1812-1814.
- 58.** BOVA, I., CHAPMAN, J., SYLANTIEV, C., KORCZYN, A. D., BORNSTEIN, N. M. (1999). The A677C methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and carotid atherosclerosis. *Stroke.* 30: 2180-2182.
- 59.** FODINGER, M., HORL, W. H., SUNDER-PLASSMAN, G. (2000). Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol.* 13 (1): 20-33.
- 60.** SHARP, L., LITTLE, J. (2004). Polymorphism in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: A Huge Review. *Am J Epidemiol.* 159: 423-443.
- 61.** VAN DER PUT, N. M., GABREELS, F., STEVENS, E. M. B., SMEITINK, J. A., TRIJBELS, F. J., ESKES, T. K., VAN DEN HEUVEL, L. P., BLOM, H. J. (1998). A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: An additional risk factor for neural-tube defects. *Am J Hum Genet.* 62: 1044-1051.
- 62.** SIBANI, S., CHRISTENSEN, B., O'FERRALL, E., SAADI, I., HIOU-TIM, F., ROSENBLATT, D. S., ROZEN, R. (2000). Characterization of six novel mutations

in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. *Hum Mutat.* 15: 280-287.

63. LIEVERS, K. J., BOERS, G. H., VERHOEF, P., HEIJER, M., KLUIJTMANS, L. A., PUT, N. M., TRIJBELS, F. J., BLOM, H. J. (2001). 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*. Published online 2001. 79: 522-528.

64. KIM, Y. (2000). Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: A paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutr Rev.* 58: 205-217.

65. PENG, F., LABELLE, L. A., RAINEY, B. J., TSONGALIS, G. J. (2001). Single nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are common in US Caucasian and Hispanic American populations. *Int J Mol Med.* 8: 509-511.

66. SKIBOLA, C. F., SMITH, M. T., KANE, E., ROMAN, E., ROLLINSONS, S., CARTWRIGHT, R. A., MORGAN, G. (1996). Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Med Sci.* 96: 12810-12815.

67. LISSAK, A., SHARON, A., FRUCHTER, O., KASSEL, A., SANDEROVITZ, J., ABRAMOVICI, H. (1999). Polymorphism for mutation of cytosine to thymine at location 677 in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with recurrent early fetal loss. *Am J Obstet Gynecol.* 181 (1): 126-130.

68. KLINGER, K. W., WINQVIST, R., RICCIO, A., ANDREASEN, P. A., SARTORIO, R., NIELSEN, L., S., STUART, N., STANISLOVITIS, P., WATKINS, P., DOUGLAS, R., GRZESCHIK, K. H., ALITALO, K., BLASI, F., DANQ, K. (1987). Plasminogen activator inhibitor type 1 gene is located at region q21.3-q22 of chromosome 7 and genetically linked with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci.* 84: 8548-8552.

69. VAN ZONNEVELD, A. J., CURRIDEN, S. A., LOSKUTOFF, D. J. (1988). Type 1 plasminogen activator inhibitor gene: Functional analysis and glucocorticoid regulation of its promoter. *Proc Natl Acad Sci.* 85: 5525-5529.

- 70.** BOSMA, P. J., VAN DEN BERG, E. A., KOOISTRA, T., SIEMIENIAK, D. R., SLIGHTOM, J. L. (1988). Human plasminogen activator inhibitor-1 gene. Promoter and structural gene nucleotide sequences. *J Biol Chem.* 263: 9129–9141.
- 71.** DUPONT, D. M., MADSEN, J. B., KRISTENSEN, T., BODKER, J. S., BLOUSE, G. E., WIND, T., ANDREASEN, P. A. (2009). Biochemical properties of plasminogen activator inhibitor-1. *Front Biosci.* 1; 14: 1337-1361.
- 72.** UCHIYAMA, T., KURABAYASHI, M., OHYAMA, Y., UTSUGI, T., AKUZAWA, N., SATO, M., TOMONO, S., KAWAZU, S., NAGAI, R. (2000). Hypoxia induces transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene through genistein-sensitive tyrosine kinase pathways in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: 1155–1161.
- 73.** FALK, G., ALMQUIST, A., NORDENHEM, A., SVENSSON, H., WIMAN, B. (1995). Allele specific PCR for detection of a sequence polymorphism in the promoter region of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene. *Fibrinolysis.* 9: 170–174.
- 74.** MIKKELSSON, J., PEROLA, M., WARTIOVAARA, U., PELTONEN, L., PALOTIE, A., PENTTILA, A., KARHUNEN, P. J. (2000). Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G-5G polymorphism, coronary thrombosis, and myocardial infarction in middle-aged Finnish men who died suddenly. *Thromb Haemost.* 84: 78–82.
- 75.** WANG, S., CAO, Q., WANG, X., LI, B., TANG, M., YUAN, W., FANG, J., QIAN, J., QIN, C., ZHANG, W. (2013). PAI-1 4G/5G polymorphism contributes to cancer susceptibility: evidence from meta-analysis. *PLoS One.* 8 (2): 56797.
- 76.** BARIŞ, N., ÖZERKAN, F., ÖNDER, M. R., AKDENİZ, B., GÜNERİ, S. (2004). Esansiyel Hipertansiyonda hedef organ hasarı sayısı ile anjiyotensin dönüştürücü enzim gen polimorfizmi arasındaki ilişki. *Türk Kardiyolo.Dern. Arş.* 32: 107-114.

- 77.** BOSTAN, C., KARCIER-MÜNİBOĞLU, S. (2002). Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim Geni Polimorfizmi ve Kardiyovasküler Hastalıklar. *Türk Kardiyol Dern Arş - Arch Turk Soc Cardiol.* 30: 441-448.
- 78.** TIRET, L., RIGAT, B., VISVIKIS, S., BREDA, C., CORVOL, P., CAMBIENI F., SOUBRIER, F. (1992). Evidence from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet.* 51: 197-205.
- 79.** BEREKETOĞLU, C., KASAP, M., PAZARBAŞI, A. (2012). Studies on angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and genotype distributions in Turkish preeclampsia patients. *J Pregnancy.* 2012: 108206.
- 80.** CRISAN, D., CARR, J. (2000). Angiotensin I-converting enzyme: genotype and disease associations. *J Mol Diagn.* 2 (3): 105-115.
- 81.** LEE, Y. J., TSAI, J. C. (2002). ACE gene insertion/deletion polymorphism associated with 1998 World Health Organization definition of metabolic syndrome in Chinese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 25 (6): 1002-1008.
- 82.** AKBULUT, T., BİLSEL, T., UYAREL, H., TERZİ, S., SAYAR, N., AYDIN, A., ÜNAL- DAYI, Ş., ÇİLOĞLU, F., BAĞIRTAN, B., PEKER, İ., YEŞİLÇİMEN, K. (2004). Anjiyotensin dönüştürücü enzim gen polimorfizminin erken koroner arter hastalığı gelişimindeki rolü. *Türk Kardiyolo.Dern. Arş.* 32: 23-27.
- 83.** DEMIREL, Y., DOGAN, S., ULUDAG, A., SILAN, C., ATIK, S., SILAN, F., OZDEMIR, O. (2011). Combined effect of Factor V Leiden, MTHFR, and angiotensin-converting enzyme (insertion/deletion) gene mutations in hypertensive adult individuals: a population-based study from Sivas and Canakkale, Turkey. *Genet Test Mol Biomarkers.* 15 (11): 785-791.
- 84.** YANG, C., FANGFANG, W., JIE, L., YANLONG, Y., JIE, W., XUEFEI, L., XUERONG, Z., YANLING, H. (2012). Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion (I/D) polymorphisms and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet.* 29 (11): 1167-1173.

- 85.** SU, M. T., LIN, S. H., CHEN, Y. C., KUO, P. L. (2013). Genetic association studies of ACE and PAI-1 genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Thromb Haemost.* 109 (1): 8-15.
- 86.** MARSDEN, P. A., HENG, H. H., SCHERER, S. B., STERWARD, R. J., HALL, A. B., SHI, X. M. (1993). Structure and Chromosomal Localization of the Human Constitutive Endothelial nitric Oxide Synthase Gene. *J. Biol. Chem.* 268: 17478-17488.
- 87.** TAI, S. C, ROBB, G. B., MARSDEN, P. A. (2004). Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24 (3): 405-412.
- 88.** ZAMMITI, W., MTIRAOU, N., MAHJOUR, T. (2008). Lack of consistent association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms, homocysteine levels and recurrent pregnancy loss in tunisian women. *Am J Reprod Immunol.* 59 (2): 139-145.
- 89.** CASAS, J. P., BAUTISTA, L. E., HUMPHRIES, S. E., HINGORANI, A. D. (2004). Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation.* 23; 109 (11): 1359-1365.
- 90.** WANG, X. L., WANG, J. (2000). Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Sequence Variations and Vascular Disease. *Molecular Genetics and Metabolism.* 70: 241–251.
- 91.** COLOMBO, M. G., ANDREASSI, M. G., PARADOSSI, U., BOTTO, N., MANFREDI, S., MASETTI, S., ROSSI, G., CLERICO, A., BIAGINI, A. (2002) Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298-->Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease. *Heart.* 87 (6): 525-528.
- 92.** LEMBO, G., DE LUCA, N., BATTAGLI, C., IOVINO, G., ARETINI, A., MUSICCO, M., FRATI, G., POMPEO, F., VECCHIONE, C., TRIMARCO, B. (2001). A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is an independent risk factor for carotid atherosclerosis. *Stroke.* 32 (3): 735-740.

- 93.** SU, M. T., LIN, S. H., CHEN, Y. C. (2011). Genetic association studies of angiogenesis- and vasoconstriction-related genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 17 (6): 803-812.
- 94.** GABELLI, C., GREGG, R. E., ZECH, L. A., MANZATO, E., BREWER, H. B. (1986). Abnormal low density lipoprotein metabolism in apolipoprotein E deficiency. *J Lipid Res*. 27 (3): 326-333.
- 95.** KOLOVOU, G. D., ANAGNOSTOPOULOU, K. K., COKKINOS, D. V. (2009). Apolipoprotein E gene polymorphism and myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 133: 264-265.
- 96.** EICHNER, J. E., DUNN, S. T., PERVEEN, G., THOMPSON, D. M., STEWART, K. E., STROEHLA, B. C. (2002). Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 155: 487-495.
- 97.** SING, C. F., DAVIGNON, J. (1985). Role of the apoE polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *Am. J. Hum. Genet*. 37: 268-285.
- 98.** SCHAEFER, E. J., GREGG, R. E., GHISELLI, G., FORTE, T. M., ORDOVAS, J. M., ZECH, L. A., BREWER, H. B. (1986). Familial apoE deficiency. *J. Clin. Invest*. 78: 1206-1219.
- 99.** CHAUDHARY, R., LIKIDLILID, A., PEERAPATDIT, T., TRESUKOSOL, D., SRISUMA, S., RATANAMANEECHAT, S., SRIRATANASATHAVORN, C. (2012). Apolipoprotein E gene polymorphism: effects on plasma lipids and risk of type 2 diabetes and coronary artery disease. *Cardiovasc Diabetol*. 11: 36.
- 100.** PREMKUMAR, D. R., COHEN, D. L., HEDERA, P., FRIEDLAND, R. P., KALARIA, R. N. (1996). Apolipoprotein E-epsilon4 alleles in cerebral amyloid angiopathy and cerebrovascular pathology associated with Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 148 (6): 2083-2095.

- 101.** GOODMAN, C., GOODMAN, C. S., HUR, J., JEYENDRAN, R. S., COULAM, C.(2009). The association of Apoprotein E polymorphisms with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol.* 61 (1): 34-38.
- 102.** ASGARI, N., AKBARI, M. T., ZARE, S., BABAMOHAMMADI, G. (2013). Positive association of Apolipoprotein E4 polymorphism with recurrent pregnancy loss in Iranian patients. *J Assist Reprod Genet.* 30 (2): 265-268.
- 103.** Erişim: [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/?term=192240>].
- 104.** BAINBRIDGE, J. W. B., JIA, H., BAGHERZADEH, A., SELWOOD, D., ALI, R. R., ZACHARY, I. (2003). A peptide encoded by exon 6 of VEGF (EG3306) inhibits VEGF-induced angiogenesis in vitro and ischaemic retinal neovascularisation in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302: 793-799.
- 105.** GREENBERG, J. I., SHIELDS, D. J., BARILLAS, S. G., ACEVEDO, L. M., MURPHY, E., HUANG, J., SCHEPPKE, L., STOCKMANN, C., JOHNSON, R. S., ANGLE, N., CHERESH, D. A. (2008). A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature.* 456: 809-813. Note: Erratum: *Nature* 457: 1168 only, 2009.
- 106.** HOWELL, W. M., ALI, S., ROSE-ZERILLI, M. J., YE, S. (2005). VEGF polymorphisms and severity of atherosclerosis. *J. Med. Genet.* 42: 485-490.
- 107.** DEL BO, R., SCARLATO, M., GHEZZI, S., MARTINELLI BONESCHI, F., FENOGLIO, C., GALBIATI, S., VIRGILIO, R., GALIMBERTI, D., GALIMBERTI, G., CRIMI, M., FERRARESE, C., SCARPINI, E., BRESOLIN, N., COMI, G. P. (2005). Vascular endothelial growth factor gene variability is associated with increased risk for AD. *Ann. Neurol.* 57: 373-380.
- 108.** LAMBRECHTS, D., STORKEBAUM, E., MORIMOTO, M., DEL-FAVERO, J., DESMET, F., MARKLUND, S. L., WYNS, S., THIJS, V., ANDERSSON, J., VAN MARION, I., AL-CHALABI, A., BORNES, S., MUSSON, R., HANSEN, V., BECKMAN, L., ADOLFSSON, R., PALL, H. S., PRATS, H., VERMEIRE, S., RUTGEERTS, P., KATAYAMA, S., AWATA, T., LEIGH, N., LANG-LAZDUNSKI, L., DEWERCHIN, M., SHAW, C., MOONS, L., VLIETINCK, R., MORRISON, K. E., ROBBERECHT, W., BROECKHOVEN, C.V., COLLEN, D., ANDERSEN, P.

- M., CARMELIET, P. (2003). VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nature Genet.* 34: 383-394.
- 109.** ZARBOCK, R., HENDIG, D., SZLISKA, C., KLEESIEK, K., GOTTING, C. (2009). Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms as prognostic markers for ocular manifestations in pseudoxanthoma elasticum. *Hum. Molec. Genet.* 18: 3344-3351.
- 110.** CHOI, H. J., CHO, J. H., KIM, J. C., SEO, H. J., HYUN, S. H., KIM, G. H., CHOI, J. Y., CHOI, H. J., RYU, H. M., CHO, J. H., PARK, S. H., KIM, Y. L., HAN, S., KIM, C. D. (2010). Interleukin-18, transforming growth factor- β , and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and susceptibility to primary glomerulonephritis. *Tissue Antigens.* 76 (4): 289-296.
- 111.** KATAOKA, N., CAI, Q., WEN, W., SHU, X. O., JIN, F., GAO, Y. T., ZHENG, W. (2006). Population-based case-control study of VEGF gene polymorphisms and breast cancer risk among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15 (6): 1148-1152.
- 112.** ELLER, A. G., BRANCH, D. W., NELSON, L., PORTER, T. F., SILVER, R. M. (2011). Vascular endothelial growth factor-A gene polymorphisms in women with recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol.* 88 (1): 48-52.
- 113.** ZUPAN, J. Perinatal mortality in developing countries. *N Engl J Med.* 2005 May 19;352(20):2047-2048.
- 114.** FRANSSEN, M. T., KOREVAAR, J. C., LESCHOT, N. J., BOSSUYT, P. M., KNEGT, A. C., GERSSEN-SCHOORL, K. B., WOUTERS, C. H., HANSSON, K. B., HOCHSTENBACH, R., MADAN, K., VAN DER VEEN, F., GODDIJN, M. (2005). Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *BMJ.* 16; 331 (7509): 137-141.
- 115.** CULIC, V., LOZIC, B., KUZMIC-PRUSAC, I., MIJALJICA, G., PAVELIC, J. (2011). Full trisomy 5 in a sample of spontaneous abortion and Arias Stella reaction. *Med Sci Monit.* 17 (10): 116-119.

- 116.** ZHANG, H. K., LUO, F. W., GENG, Q., LI, J., LIU, Q. Z., CHEN, W. B., LI, F., XIE, J. S. (2011). Analysis of fetal chromosomal karyotype and etiology in 252 cases of early spontaneous abortion. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 28 (5): 575-578.
- 117.** ROLNIK, D. L., CARVALHO, M. H., CATELANI, A. L., PINTO, A. P., LIRA, J. B., KUSAGARI, N. K., BELLINE, P., CHAUFFAILLE MDE, L. (2010). Cytogenetic analysis of material from spontaneous abortion. *Rev Assoc Med Bras.* 56 (6): 681-683.
- 118.** ZARAGOZA, M. V., SURTI, U., REDLINE, R. W., MILLIE, E., CHAKRAVARTI, A., HASSOLD, T. J. (2000). Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole. *Am J Hum Genet.* 66 (6): 1807-1820.
- 119.** GRANDE, M., BORRELL, A., GARCIA-POSADA, R., BOROBIO, V., MUNOZ, M., CREUS, M., SOLER, A., SANCHEZ, A., BALASCH, J. (2012). The effect of maternal age on chromosomal anomaly rate and spectrum in recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 27 (10): 3109-3117.
- 120.** DIZON-TOWNSON, D. S., MELINE, L., NELSON, L. M., VARNER, M., WARD, K. (1997). Fetal carriers of the factor V Leiden mutation are prone to miscarriage and placental infarction. *Am J Obstet Gynecol.* 177 (2): 402-405.
- 121.** RODGER, M. A., BETANCOURT, M. T., CLARK, P., LINDQVIST, P. G., DIZON-TOWNSON, D., SAID, J., SELIGSOHN, U., CARRIER, M., SALOMON, O., GREER, I. A. (2010). 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 Med.* 15; 7 (6): 1000292.
- 122.** SETTIN, A., ALKASEM, R., ALI, E., ELBAZ, R., MASHALEY, A. M. (2011). Factor V Leiden and prothrombin gene mutations in Egyptian cases with unexplained recurrent pregnancy loss. *Hematology.* Jan;16(1):59-63.

- 123.** ABU-ASAB, N. S., AYESH, S. K., ATEEQ, R. O., NASSAR, S. M., EL-SHARIF, W. A. (2011). Association of inherited thrombophilia with recurrent pregnancy loss in palestinian women. *Obstet Gynecol Int.* 2011: 689684.
- 124.** YUSOFF, N. M., ABDULLAH, W. Z., GHAZALI, S., OTHMAN, M. S., BABA, A. A., ABDULLAH, N., ISA, M. N., CHONG, C. L. (2002). The absence of factor V Leiden mutation in Malays with recurrent spontaneous abortions. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 42 (2): 164-166.
- 125.** TOTH, B., VOCKE, F., ROGENHOFER, N., FRIESE, K., THALER, C. J., LOHSE, P. (2008). Paternal thrombophilic gene mutations are not associated with recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol.* Oct;60(4):325-32.
- 126.** PICKERING, W., MARRIOTT, K., REGAN, L. (2001). G20210A prothrombin gene mutation: prevalence in a recurrent miscarriage population. *Clin Appl Thromb Hemost.* 7 (1): 25-28.
- 127.** SANTORO, R., IANNACCARO, P., SOTTILOTTA, G. (2005). Prothrombotic gene mutations in women with recurrent abortions and intrauterine fetal death. *Minerva Ginecol.* 57 (4): 447-450.
- 128.** PAUER, H. U., VOIGT-TSCHIRSCHWITZ, T., HINNEY, B., BURFEIND, P., WOLF, C., EMONS, G., NEESEN, J. (2003). Analyzes of three common thrombophilic gene mutations in German women with recurrent abortions. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 82 (10): 942-947.
- 129.** IVANOV, P. D., KOMSA-PENKOVA, R. S., KONOVA, E. I., KOVACHEVA, K. S., SIMEONOVA, M. N., POPOV, J. D. (2009). Association of inherited thrombophilia with embryonic and postembryonic recurrent pregnancy loss. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 20 (2): 134-140.
- 130.** KUMAR, K. S., GOVINDAIAH, V., NAUSHAD, S. E., DEVI, R. R., JYOTHY, A. (2003). Plasma homocysteine levels correlated to interactions between folate status and methylene tetrahydrofolate reductase gene mutation in women with unexplained recurrent pregnancy loss. *J Obstet Gynaecol.* 23 (1): 55-58.

- 131.** GOODMAN, C. S., COULAM, C. B., JEYENDRAN, R. S., ACOSTA, V. A., ROUSSEV, R. (2006). Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? *Am J Reprod Immunol.* 56 (4): 230-236.
- 132.** MAKINO, A., NAKANISHI, T., SUGIURA-OGASAWARA, M., OZAKI, Y., SUZUMORI, N., SUZUMORI, K. (2004). No association of C677T methylenetetrahydrofolate reductase and an endothelial nitric oxide synthase polymorphism with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol.* 52 (1): 60-66.
- 133.** DISSANAYAKE, V. H., SIRISENA, N. D., WEERASEKERA, L. Y., GAMMULLA, C. G., SENEVIRATNE, H. R., JAYASEKARA, R. W. (2012). Candidate gene study of genetic thrombophilic polymorphisms in pre-eclampsia and recurrent pregnancy loss in Sinhalese women. *J Obstet Gynaecol Res.* 38 (9): 1168-1176.
- 134.** NAIR, R. R., KHANNA, A., SINGH, R., SINGH, K. (2013). Association of maternal and fetal MTHFR A1298C polymorphism with the risk of pregnancy loss: a study of an Indian population and a meta-analysis. *Fertil Steril.* 99 (5): 1311-1318. e4.
- 135.** KLAI, S., FEKIH-MRISSA, N., EL HOUSAINI, S., KAABECHI, N., NSIRI, B., RACHDI, R., GRITLI, N. (2011). Association of MTHFR A1298C polymorphism (but not of MTHFR C677T) with elevated homocysteine levels and placental vasculopathies. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 22 (5): 374-378.
- 136.** PARVEEN, F., TUTEJA, M., AGRAWAL, S. (2013). Polymorphisms in MTHFR, MTHFD, and PAI-1 and recurrent miscarriage among North Indian women. *Arch Gynecol Obstet.* [Epub ahead of print].
- 137.** SUBRT, I., ULCOVA-GALLOVA, Z., CERNA, M., HEJNALOVA, M., SLOVANOVA, J., BIBKOVA, K., MICANOVA, Z. (2013). Recurrent Pregnancy Loss, Plasminogen Activator Inhibitor-1 (-675) 4G/5G Polymorphism and Antiphospholipid Antibodies in Czech Women. *Am J Reprod Immunol.* 70 (1): 54-58.

- 138.** COULAM, C. B., WALLIS, D., WEINSTEIN, J., DASGUPTA, D. S., JEYENDRAN, R. S. (2008). Comparison of thrombophilic gene mutations among patients experiencing recurrent miscarriage and deep vein thrombosis. *Am J Reprod Immunol.* 60 (5): 426-431.
- 139.** BAGHERI, M., ABDI RAD, I., OMRANI, M. D., NANBAKSH, F. (2010). Polymorphisms of the angiotensin converting enzyme gene in Iranian Azeri Turkish women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Hum Fertil (Camb).* 13 (2): 79-82.
- 140.** GOODMAN, C., HUR, J., GOODMAN, C. S., JEYENDRAN, R. S., COULAM, C. (2009). Are polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes associated with recurrent spontaneous miscarriages? *Am J Reprod Immunol.* 62 (6): 365-370.
- 141.** VETTRISELVI, V., VIJAYALAKSHMI, K., PAUL, S. F., VENKATACHALAM, P. (2008). ACE and MTHFR gene polymorphisms in unexplained recurrent pregnancy loss. *J Obstet Gynaecol Res.* 34 (3): 301-306.
- 142.** SHIN, S. J., LEE, H. H., CHA, S. H., KIM, J. H., SHIM, S. H., CHOI, D. H., KIM, N. K. (2010). Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) and haplotypes in Korean patients with recurrent spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 152 (1): 64-67.
- 143.** SURYANARAYANA, V., RAO, L., KANAKAVALLIM, M., PADMALATHA, V., DEENADAYAL, M., SINGH, L. (2006). Recurrent early pregnancy loss and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms. *Arch Gynecol Obstet.* 274 (2): 119-124.
- 144.** KORKMAZER, E., USTUNYURT, E., TEKİN, B., CİLİNGİR, O. (2013). Study on potential role of apolipoprotein E in recurrent pregnancy loss. *Exp Ther Med.* 5 (5): 1408-1410.
- 145.** AGARWAL, M., PARVEEN, F., FARIDI, R. M., PHADKE, S. R., DAS, V., AGRAWAL, S. (2010). Recurrent pregnancy loss and apolipoprotein E gene polymorphisms: a case-control study from north India. *Am J Reprod Immunol.* 64 (3): 172-178.

- 146.** ŞAMLI, H., DEMİR, B. Ç., ÖZGÖZ, A., ATALAY, M. A., UNCU, G. (2012). Vascular endothelial growth factor gene 1154 G/A, 2578 C/A, 460 C/T, 936 C/T polymorphisms and association with recurrent pregnancy losses. *Genet Mol Res.* 21; 11 (4): 4739-4745.
- 147.** TRAINA, E., DAHER, S., MORON, A. F., SUN, S. Y., FRANCHIM, C. S., MATTAR, R. (2011). Polymorphisms in VEGF, progesterone receptor and IL-1 receptor genes in women with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol.* 88 (1): 53-57.
- 148.** GALAZIOS, G., PAPAZOGLU, D., TSIKOURAS, P., KOLIOS, G. (2009). Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 22 (5): 371-378.
- 149.** LEE, H. H., HONG, S. H., SHIN, S. J., KO, J. J., OH, D., KIM, N. K. (2010). Association study of vascular endothelial growth factor polymorphisms with the risk of recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril.* 1; 93 (4): 1244-1247.
- 150.** PAPAZOGLU, D., GALAZIOS, G., PAPTAEODOROU, K., LIBERIS, V., PAPANAS, N., MALTEZOS, E., MAROULIS, G. B. (2005). Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 83 (4): 959-963.
- 151.** RAJCAN-SEPAROVIC, E., DIEGO-ALVAREZ, D., ROBINSON, W. P., TYSON, C., QIAO, Y., HARVARD, C., FAWCETT, C., KALOUSEK, D., PHILIPP, T., SOMERVILLE, M. J., STEPHENSON, M. D. (2010). Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod.* 25 (11): 2913-2922.
- 152.** BLUMBERG, B. D., SHULKIN, J. D., ROTTER, J. I., MOHANDAS, T., KABACK, M. M. (1982). Minor chromosomal variants and major chromosomal anomalies in couples with recurrent abortion. *Am J Hum Genet.* 34 (6): 948-960.
- 153.** GOVINDAIAH, V., NAUSHAD, S. M., PRABHAKARA, K., KRISHNA, P. C., RADHA RAMA DEVI, A. (2009). Association of parental hyperhomocysteinemia

and C677T methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism with recurrent pregnancy loss. *Clin Biochem.* 42 (4-5): 380-386.

154. AKBAŞ, H., ISI, H., ORAL, D., TÜRKYILMAZ, A., KALKANLI-TAŞ, S., ŞİMŞEK, S., BALKAN, M., SAKAR, M. N., FİDANBOY, M., ALP, M. N., BUDAK, T. (2012). Chromosome heteromorphisms are more frequent in couples with recurrent abortions. *Genet Mol Res.* 12; 11 (4): 3847-3851.

155. OZDEMIR, O., YENICESU, G. I., SILAN, F., KOKSAL, B., ATIK, S., OZEN, F., GOL, M., CETIN, A. (2012). Recurrent pregnancy loss and its relation to combined parental thrombophilic gene mutations. *Genet Test Mol Biomarkers.* 16 (4): 279-286.

9.EKLER

9.1.Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

9.1.1.Kullanılan Cihaz Listesi

DNA izolasyonu için:

- Santrifüj (Mikro 120- Hettich Zentrifugen)
- Vorteks (IKA Vorteks Genius 3)

Sitogenetik Analiz için:

- Nüve EN 500 inkubatör
- Rotofix 32 A santrifüj
- IKA MS3 Digital vortex
- IKA C-MAG HS 7 kuru blok ısıtıcı
- Nüve BM302 benmari
- Cytovision, version 2000, Applied Imaging karyotip görüntüleme sistemi

QF-PCR için:

- BIOSAN Combi-Spin mikrosantrifüj
- ABI 9700 Thermal Cyclers
- ABI 3130 Genetic Analyzer

Real Time PCR için:

- Santrifüj (Thermo Scientific)
- LightCycler 2.0 Roche

9.1.2.Kullanılan Malzeme Listesi

DNA izolasyonu için:

- QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini Kit (periferik kan için)
- QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit (solid doku için)
- Thermo Scientific mikropipet (10,100 ve 1000 µl'lik)
- Mikrosantrifüj tüpü (1.5 ve 2 ml'lik)

Sitogenetik Analiz için:

- RPMI 1640 (Wisent Inc.)
- Fetal Calf Serum (Biological Industries)

- L-Glutamin (Wisent Inc.)
- Penisilin-Streptomisin (Biological Industries)
- Fitohemaglütinin (Biological Industries)
- Kolsemid solüsyonu (Biological Industries)
- Falkon Tüp 10 ml
- PBS 10xsolüsyon
- Potasyum Klorür (KCl) (Merck)
- Metanol (Merck)
- Glacial asetik asid % 100 (Merck)
- Gurr Buffer tablet (Merck)
- Tripsin (Biological Industries)
- Giemsa (Merck)

QF-PCR için:

- Thermo Scientific mikropipet (10 ve 100 µl'lik)
- 0.2 ml'lik mikrosantrifüj tüpü
- Aneufast QF-PCR kiti
- Applied Biosystems Hidi Formamid
- GeneScan-500 LIZ- size standard
- Applied Biosystems well plate (96'lık)
- POP 7 polimer

Real Time PCR için:

- Thermo Scientific mikropipet (10 ve 100 µl'lik)
- Fast Start DNA Master HybProbe Mix (Roche)
- Fast Start DNA Master SYBR Green (Roche)
- PCR grade su (Roche)
- Mg⁺ solüsyonu (Roche)
- Reagent mix (spesifik primer ve problemleri içerir) (Roche)
- LightCycler kapiller tüpleri (20 µl)

9.2.Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler	
Adı-Soyadı	: Sinem (ATİK) YALÇINTEPE
Doğum Yeri / Doğum Tarihi	: Bandırma / 18.11.1984

Öğrenim Durumu	
LİSANS	
Üniversite	: Ege Üniversitesi
Akademik Birim	: Tıp Fakültesi
Program/Bölüm/Diğer	: Tıp
Ülke	: Türkiye
Mezuniyet Yılı	: 2009

Makaleler	
	Yıl
SCI (Science Citation Index), SSCI (Social Science Citation Index), AHCI (Arts and Humanities Citation Index) tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makaleler	
1	Ozdemir S, Uludag A, Silan F, Atik SY , Turgut B, Ozdemir O. Possible Roles of the Xenobiotic Transporter P-glycoproteins Encoded by the MDR1 3435 C>T Gene Polymorphism in Differentiated Thyroid Cancers. Asian Pac J Cancer Prev. 2013;14(5):3213-7. 2013
2	Silan C, Dogan OT, Silan F, Kukulguven FM, Asgun HF, Ozdemir S, Uludag A, Atik S , Gungor B, Akdur S, Aksulu HE, Ozdemir O. The prevalence of VKORC1 1639 G>A and CYP2C9*2*3 genotypes in patients that requiring anticoagulant therapy in Turkish population. Mol Biol Rep. 2012 Dec;39(12):11017-22. doi: 10.1007/s11033-012-2004-2. Epub 2012 Oct 14. 2012
3	Ozdemir S, Silan F, Hasbek Z, Uludag A, Atik S , Erselcan T, Ozdemir O. Increased T-allele frequency of 677 C>T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene in differentiated thyroid carcinoma. Genet Test Mol Biomarkers. 2012 Jul;16(7):780-4. Epub 2012 Apr 26. 2012
4	Demirel Y, Dogan SA, Uludag A, Silan C, Atik S , Silan F, Ozdemir O. Combined effect of Factor V Leiden, MTHFR and Angiotensin converting enzyme (insertion/deletion) gene mutations in hypertensive adult individuals: a population-based study from Sivas and Canakkale, TURKEY. Genetic Testing and Molecular Biomarkers 2011 Nov;15(11):785-91 2011
5	Silan F, Gültekin Y, Atik S , Kilinc D, Alan C, Yildiz F, Uludag A, Ozdemir O. Combined point mutations in codon 12 and 13 of KRAS oncogene in prostate carcinomas. Molecular Biology Reports 2012 Feb;39(2):1595-9. Epub 2011 May 24 2011
6	Ozdemir O, Yenicesu GI, Silan F, Köksal B, Atik S , Ozen F, Göl M, Cetin A. Recurrent Pregnancy Loss and Its Relation to Combined Parental Thrombophilic Gene Mutations. Genet Test Mol Biomarkers, Nov 2. 2011

7	Ozen F, Silan C, Uludag A, Candan F, Silan F, Ozdemir S, Atik S , Ozdemir O. Association between ABCB1 (MDR1) Gene 3435 C>T Polymorphism and Colchicine Unresponsiveness of FMF Patients. Ren Fail. 22011;33(9):899-903	2011
SCI, SSCI, ve AHCI dışındaki indeks ve özler tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar		
1	Silan, F. , Gur, S. , Kadioglu, L. , Yalcintepe. S , Ukin, K. , Uludag, A. and Ozdemir, O. (2013) Characteristic findings of alstrom syndrome with a case report. Open Journal of Clinical Diagnostics, 3, 75-77. doi: 10.4236/ojcd.2013.33014.	2013
Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar		
1	Sinem Yalcintepe , Meryem Gencer, Ahmet Uludağ, Ayşe Nur Çakır Güngör, Tuncer Kumcular, Emine Coşar, Fatma Silan, Öztürk Özdemir. Onsekiz Haftalık Spontan Olarak Sonlanan ve QF-PCR ile Saptanan Triploidik Fetus: Olgu Sunumu. IJCR 587, 11-28, Cilt 1, Sayı 1.	2013
2	Silan F, Atik S , Kadioğlu LE, Koşar Ş, Yıldız Y, Özdemir Ö. Cornelia De Lange Sendromu: Urakus kalıntısı birlikteliği olan bir olgu sunumu. Abant İzzet Baysal Tıp Dergisi	2011

Bildiriler		
		Yıl
Uluslararası kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunularak, programda yer alan özet metin olarak yayınlanan bildiri ya da poster veya gösteri		
1	O. OZDEMİR, S. CETINKAYA, M. KAYATAS, F. SILAN, M. E. YILDIRIM, H. KUCUK KURTULGAN, B. KOKSAL, S. ATIK YALCINTEPE , E. AKAR, F. CANDAN. The MEFV mutation profiles and SAA1 gene BcII polymorphism in chronic renal failure patients that requiring long-term haemodialysis in Turkish population. ESHG Conference, June 8-11 2013, Paris. European Journal of Human Genetics, 41(suplement 2), P04.49	2013
2	Uludag A, Silan C, Yalcintepe SA , Akurut C, Uludag A, Silan F, Ozdemir O. Relationship between response to colchicine treatment and MDR1 polymorphism in FMF patients. ESHG Conference, June 8-11 2013, Paris. European Journal of Human Genetics, 41(suplement 2), P04.57	2013
3	Silan F, Yalcintepe SA , Uysal D, Uludag U, Cosar E, Cakirgungor AN, Ozdemir O. High Incidence of Chromosomal Aberrations in Couples with Reproductive Failure in Canakkale. ESHG Conference, June 8-11 2013, Paris. European Journal of Human Genetics, 41(suplement 2), J19.87	2013
4	S. Yalcintepe , E. Simsek. Clinical Findings of Stuve-Wiedemann Syndrome from Turkey: Case Report. ESHG Conference, June 8-11 2013, Paris. European Journal of Human Genetics, 41(suplement 2), J02.40	2013
5	A. Uludag, S. Ozdemir, C. Silan, A. Uludag, S. Atik , F. Silan, O. Ozdemir. Evaluation of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 gene polymorphisms in thyroid cancer. ESHG 2012 Nürnberg-Germany	2012
6	A. Uludag, F. Silan, A. Uludag, C. Silan, S. Atik , E. M. Sahin, O. Ozdemir. What about the relatives who have MTHFR C677T polymorphism? ESHG 2012 Nürnberg-Germany	2012
7	F. Silan, S. Atik , Y. Gultekin, D. Kılinc, C. Alan, A. Uludag, A. Colak, O. Ozdemir. Combined point mutations in codon 12 and 13 of KRAS oncogene in prostate carcinomas with high gleason score. ESHG 2012 Nürnberg-Germany	2012
8	S. Atik , F. Ozen, S. Gur, A. Uludag, C. Silan, F. Silan, O. Ozdemir. Polymorphism in gene encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzyme CYP2D6 as a risk factor for drug response in colchicine unresponsive FMF patients. ESHG 2012 Nürnberg-Germany	2012
9	S. Ozdemir, A. Uludag, F. Silan, S. Atik , B. Turgut, O. Ozdemir. The possible role of the xenobiotic transporter P-glycoprotein polymorphism that encoded by the MDR1 3435 C>T gene in the susceptibility of differentiated thyroid cancer. ESHG 2012 Nürnberg-Germany	2012

10	C. Silan, O. T. Dogan, F. Silan, F. M. Kukulguven, H. F. Asgun, S. Ozdemir, A. Uludag, S. Atik , B. Gungor, S. Akdur, H. E. Aksulu, O. Ozdemir. The prevalence of VKORC1 1639 G>A and CYP2C9*2*3 genotypes in patients that requiring anticoagulant therapy in Turkish population. ESHG 2012 Nürnberg-Germany	2012
11	Atik S. Ozen F, Silan C, Uludag A, Candan F, Silan F, Ozdemir S, Ozdemir O. Increased T allele frequency in multidrug transporter ABCB1 (MDR1) gene in FMF patients of colchicine unresponsiveness. European Human Genetics Conference, 28-31st May, Amsterdam-Netherlands	2011
12	Ozdemir O, Yenicesu GI, Silan F, Cetin M, Koksall B, Atik S. Ozen F, Gol M, Cetin A. Recurrent Pregnancy Loss and Its Relation to Combined Parental Thrombophilic Gene Mutations. European Human Genetics Conference, 28-31st May, Amsterdam-Netherlands	2011
13	Silan F, Guclu O, Kadioglu LE, Silan C, Atik S. Uludag A, Demiray A, Derekoy FS, Ozdemir O. GJB2 35delG and Mitochondrial A1555G mutations and etiology of deafness at the Gelibolu School for the Deaf in Turkey. European Human Genetics Conference, 28-31st May, Amsterdam-Netherlands	2011
14	Uludag A, Demirel Y, Gunes AS, Silan C, Atik S. Silan F, Ozdemir O. Combined effect of Factor V Leiden, MTHFR and Angiotensin converting enzyme (insertion/deletion) gene mutations in hypertensive adult individuals: a population-based study from Sivas and Canakkale, TURKEY. European Human Genetics Conference, 28-31st May, Amsterdam-Netherlands	2011
Ulusal kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunularak, programda yer alan özet metin olarak yayımlanan bildiri ya da poster veya gösteri		
1	Fatma SILAN, Oğuz GÜÇLÜ, Volkan TÜRÜNZ, Laliz Esin KADIOĞLU, Coşkun SILAN, Sinem ATİK , Ahmet ULUDAĞ, Aslı DEMİRAY, Öztürk ÖZDEMİR, Fevzi Sefa DEREKÖY. Çocukluk Çağı İşitme Kaybında Aminoglikozid Ototoksitesitesi: Mitokondrial A1555G ve GJB2 Mutasyonları Etkileşiyor mu? 34. Pediatri Günleri ve 13. Pediatri Hemşirelik Günleri- İstanbul 3-6 Nisan 2012	2012
2	Sinem Atik Yalcıntepe , Ayşe Nur Çakır Güngör, Ahmet Uludağ, Emine Coşar, Yavuz Şahbat, Fatma Silan, Öztürk Özdemir. IUMF'de Klinefelter Sendromu Olgusu. 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi 19-23 Aralık Bursa	2012
3	Sinem Atik Yalcıntepe , Meryem Gencer, Ahmet Uludağ, Ayşe Nur Çakır Güngör, Tuncer Kumcular, Emine Coşar, Fatma Silan, Öztürk Özdemir. 18. Haftada Spontan Abortus Sonrası Elde Edilen Düşük Materyalinden Triploidi Tanısı Alan Bir Olgu. 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi 19-23 Aralık Bursa	2012
4	Öztürk Özdemir, Ahmet Uludağ, Ayşe Nur Çakır Güngör, Emine Coşar, Sinem Atik Yalcıntepe , Diğdem Uysal, Duygu Güven Kankaya, Yeşim Demir, Fatma Silan. Fetal Anöploidilerin Analizinde QF PCR: Çanakkale Deneyimi. 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi 19-23 Aralık Bursa	2012
5	Fatma Silan, Sinem Atik Yalcıntepe , Diğdem Uysal, Ahmet Uludağ, Emine Coşar, Ayşe Nur Çakır Güngör, Öztürk Özdemir. İnfertilite Ve Tekrarlayan Gebelik Kayıpları Olan Çiftlerde Sayısal ve Yapısal Kromozom Anomalileri; Çomü Tıp Fakültesi Deneyimi. 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi 19-23 Aralık Bursa	2012
6	Öztürk Özdemir, Selma Çetinkaya, Mansur Kayataş, Fatma Silan, Binnur Köksal, Sinem Yalcıntepe , Emine Akar, Malik Ejder Yıldırım, Dursun İnan, Ferhan Candan. Kronik Böbrek Yetmezliği Olgularında FMF Gen (MEFV) Ve SAA1 Mutasyonlarının Oranı, Mutasyonların Sıklığı Ve Klinik Ve Genetik Zeminde Risk Analizi. 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi 19-23 Aralık Bursa	2012
7	Ahmet Uludağ, Fatma Silan, Ayşegül Uludağ, Duygu Güven Kankaya, Coşkun Silan, Sinem Atik Yalcıntepe , Erkan Melih Şahin, Öztürk Özdemir. MTHFR Polimorfizmlerinin Kanser Riski ile İlişkisi. 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi 19-23 Aralık Bursa	2012
8	Ahmet Uludağ, Coşkun Silan, Sinem Atik Yalcıntepe , Çisem Akurut, Ayşegül Uludağ, Fatma Silan, Öztürk Özdemir. FMF Hastalarının Kolşisine Yanıtında MDR1 C3435T polimorfizmi etkili mi? 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi 19-23 Aralık Bursa	2012
9	Fatma Silan, Ahmet Uludağ, Duygu Güven Kankaya, Fahri Güneş, Ahmet Uysal, Sinem Atik Yalcıntepe , Ümit Karadeli, Öztürk Özdemir. Çanakkale popülasyonunda Beta-Talasemi mutasyon profilleri ve sıklığı. 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi 19-23 Aralık Bursa	2012
10	Fatma SILAN, Yener GULTEKIN, Sinem ATİK , Davran KILINC, Cabir ALAN, Fazilet YILDIZ, Ahmet ULUDAG, Ozturk OZDEMIR. Prevalence of single and combined point mutations in codon 12 and 13 of KRAS oncogene in prostate carcinomas Uluslararası Katılımlı Uludağ Onkoloji Sempozyumu- Bursa Poster Sunum	2011

11	Sılan C, F. Silan, Ö.T. Doğan, S. Özdemir, A. Uludağ, S. Atik , B Güngör, S. Akdur, H. E. Aksulu, Ö. Özdemir.; "Türk popülasyonunda antikoagülan tedavi kullanımı gereken hastalarda VKORC1 1639 G>A ve CYP2C9 *2 ve *3 genotipleri" 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi, P-145, 311, Eskişehir	2011
12	Türünz V, C. Silan, S. Akdur, S. Özdemir, A. Uludağ, S. Atik , F. Silan, Ö. Özdemir. "Mitokondrial A1555G mutasyonunun sağlıklı etiyolojisindeki yeri ve aminoglikozid toksisitesi ile ilişkisi" 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi, P-144, 310, Eskişehir	2011
13	Sinem ATİK , Yeltekin DEMİREL, Fatma SILAN, A. Sezai DOĞAN, H. Fatih AŞGÜN, Öztürk ÖZDEMİR. Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizmi (I/D) ve Esansiyel Hipertansiyon Arasındaki ilişki: Populasyon Çalışması. 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Sempozyumu-Samsun Poster sunum	2010
14	Sinem ATİK , Fatma SILAN, Laliz Esin KADIOĞLU, Öztürk ÖZDEMİR, Şule KOŞAR, Yavuz YILDIZ. CORNELIA DE LANGE SENDROMU: URAKUS KALINTISI BİRLİKTELİĞİ OLAN BİR OLGU SUNUMU. 9.Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-Poster sunum Clinical Genetics November/December 2010 Vol. 78 Supp.1: 27 -Özet metin	2010
15	Fatma SILAN, Savas GUR, Laliz Esin KADIOGLU , Sinem ATİK , Kubilay UKINC, Ozturk OZDEMİR. ALSTROM SYNDROME AT PUBERTY: CASE REPORT. 9.Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-Poster sunum. Clinical Genetics November/December 2010 Vol. 78 Supp.1: 28 -Özet metin	2010
16	Ozturk OZDEMİR, Gonca Imir YENICESU, Fatma SILAN, Meral CETIN, Binnur KOKSAL, Sinem ATİK , Mert GOL, Ilhan SEZGIN, Ali CETIN. Recurrent Pregnancy Loss and Its Relation to Combined Parental Thrombophilic Gene Mutations 9.Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-Poster sunum. Clinical Genetics November/December 2010 Vol. 78 Supp.1: 130 -Özet metin	2010