

**AFYONKARAHİSAR KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARINDA
FAKTÖR V (G1691A), PROTROMBİN (G20210A) VE
METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ (C677T)
GEN POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Hale ŞAMLI

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Necat İMİRZALIOĞLU**

Tez No: 2007-003

2007-Afyonkarahisar

AFYONKARAHİSAR KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARINDA FAKTÖR V
(G1691A), PROTROMBİN (G20210A) VE
METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ (C677T) GEN
POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Hale ŞAMLI

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Necat İMİRZALIOĞLU

Bu Tez Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 06-Tıp-26
proje numarası ile desteklenmiştir.

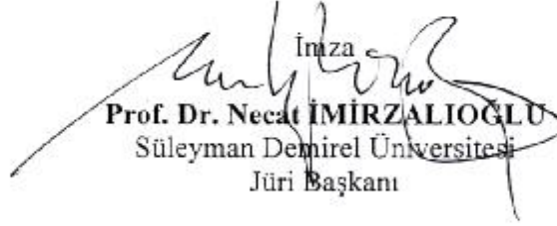
Tez No: 2007-003

2007-Afyonkarahisar

KABUL VE ONAY

Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Genetik Doktora Programı
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 16. 04. 2007

İmza

Prof. Dr. Necat İMİRZALIOĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza

Doç. Dr. Serap DEMİR
Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi

İmza

Doç. Dr. Mehmet Ali ERGUN
Gazi Üniversitesi

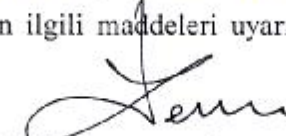
İmza

Doç. Dr. Özgür ÇOĞULU
Ege Üniversitesi

İmza

Doç. Dr. Mehmet YILMAZER
Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Doktora programı öğrencisi Dr. Hale ŞAMLI'nın "Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Faktör V (G1691A), Protrombin (G20210A) Ve Methylenetetrahydrofolate Reductase (C677T) Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi" başlıklı tezi 16.04.2007 günü saat 14.00... da Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Yavuz DEMİR
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Doktora eğitimimin ve meslek hayatımın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle her zaman arkamda olan ve yetişmemde büyük katkıları olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Necat İmirzaloğlu'na,

Çalışmalarım için gerekli ortamı ve imkanını sağlayan Anabilim Dalı Başkanım Sayın Doç. Dr. Serap Demir'e,

Tezime olan destekleri ve yardımları için Sayın Doç. Dr. Serdar Ceylaner ve Sayın Dr. Gülay Ceylaner'e,

Eğitimim ve tezim süresince beni hiç yalnız bırakmayan, desteğini heran hissettiğim Enstitü Müdürüm ve Dekan Yardımcım Sayın Doç. Dr. Yavuz Demir'e,

Tezimin hazırlanması sırasında laboratuvarında benimle birlikte yorulan Sayın Yük. Bio. Asuman Özgöz'e,

Hayatıma bilimselliği ve sevgiyi sokan, sevgisini ve desteğini hiç bir zaman esirgemeyen sevgili eşim Doç. Dr. Murat Şamlı'ya,

Hayatıma anlam katan, yaşama sevincim olan sevgili yavrumun eğitimim süresince annesiz geçirdiği günlerdeki anlayışı ve büyük sabrı için canım kızım Duru Talya Şamlı'ya,

Mutluluğumun ve huzurumun en büyük kaynağı olan canım annem Fatma Azkın ve babam Halis Azkın'a her konuda verdikleri büyük destek için teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Hale ŞAMLI

Nisan, 2007

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	II
ÖNSÖZ	III
İÇİNDEKİLER	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR	VI
ŞEKİLLER	VII
ÇİZELGELER	
VIII	
ÖZET	1
1 SUMMARY	2
1. GİRİŞ	4
1. 1. Tekrarlayan Gebelik Kaybı	4
1.1.1. Tekrarlayan Gebelik Kaybında Etyolojik Faktörler	5
1. 1. 1. 1. Genetik Nedenler	7
1. 1. 1. 2. Anatomik nedenler	7
1. 1. 1. 3. Endokrinolojik Nedenler	7
1. 1. 1. 4. Enfeksiyöz Nedenler	8
1. 1. 1. 5. İmmunolojik Nedenler	8
1. 1. 1. 6. Çevresel Nedenler	9
1. 2. Hemostaz	9
1. 2. 1. Koagülasyon Sistemi	9
1. 2. 1. 1. İntrinsik Yol	10
1. 2. 1. 2. Ekstrinsik Yol	10
1. 2. 1. 3. Ortak Yol	11
1. 2. 1. 4. Düzeltilen Pıhtılaşma Hipotezi	11
1. 2. 2. Faktör V Geni	15
1. 2. 3. Faktör V Proteini	16
1. 2. 4. Protrombin (Faktör II) Geni	17
1. 2. 5. Protrombin (Faktör II) Proteini	17
1. 2. 6. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Geni	18

1. 2. 7. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Enzimi	18
1. 3. Gebelikte Trombofili	19
1. 3. 1. Aktive Protein C Rezistansı	20
1. 3. 2. Anormal Homosistein Metabolizması	21
1. 3. 3. Son Dönemde Trombofili İçin Önerilen Aday Genler	21
1. 4. DNA'nın Yapısı Ve Özellikleri	22
1. 5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	23
1.5. 1. PCR Çeşitleri	24
1. 6. Restriksiyon Enzimleri	25
1.7. Restriksiyon Fragmentinin Uzunluk Polimorfizimleri	25
2. GEREÇ VE YÖNTEM	27
2. 1. Hasta Grubu	27
2. 2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	31
2. 3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar Ve Sarf Malzemeler	32
2. 4. Ortam Tamponları Ve Boyaların Hazırlanması	34
2. 5. %2'lik Agaroz Jelin Hazırlanması	35
2. 6. %3'luk Nusieve Agoroz Jelin Hazırlanması	35
2. 6. %10'luk Poliakrilamid Jelin Hazırlanması	35
2. 7. Kandan DNA İzolasyonu	36
2. 8. PCR Koşulları	37
2.9.Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agoroz Jelde Kontrolünün Yapılması	40
2. 10. Enzim Kesimi	40
2. 10. 1. FV Leiden İçin Hind III Enzim Kesimi	40
2. 10. 2. Protrombin G20210a Mutasyonu İçin Hind III Enzim Kesimi	40
2. 10. 3. MTHFR C677T Mutasyonu İçin Hinf I Enzim Kesimi	41
2. 10. İstatistiksel Değerlendirme	42
3. BULGULAR	43
4.TARTIŞMA	51
5. SONUÇ	59
6. KAYNAKLAR	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

HA	: Habitüel abortus
FV	: Faktör V
MTHFR	: Metilentetrahidrofolat Redüktaz
A	: Adenin
G	: Guanin
C	: Sitozin
T	: Timin
APC	: Aktif protein C
Kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
UPA	: Ürokinaz plaminojen aktivatörü
IUGR	: İntra Uterin Gelişme Geriliği
TFPI	: Pathway Inhibitörü I
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksi Nükleotit Fosfat
RFLP	: Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmleri
EDTA	: Disodyum etilen diamin tetraasetik asit
UV	: Ultra Viyole
ml	: Mililitre
gr	: Gram
µl	: Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil 1. 1. İntrensik Pıhtılaşma Mekanizması	12
Şekil 1. 2. Ekstrinsik Pıhtılaşma Mekanizması	13
Şekil 1. 3. Yeni Pıhtılaşma Hipotezi	14
Şekil 3. 1. FV Leiden 241 bp'lik aplifikasyon ürününün %2'lik agoroz jelde görüntülenmesi.	44
Şekil 3. 2. FV Leiden 241 bp'lik aplifikasyon ürününün HindIII Enzimi ile yapılan RFLP sonuçlarının %3'lük Nusieve Agoroz jelde görüntülenmesi.	44
Şekil 3. 3. Protrombin G20210A mutasyonu için 506 bp'lik aplifikasyon ürününün %2'lik agoroz jelde görüntülenmesi.	45
Şekil 3. 4. Protrombin G20210A mutasyonu 506 bp'lik aplifikasyon ürününün HindIII enzimi ile yapılan RFLP sonuçlarının %3'lük Nusieve agoroz jelde görüntülenmesi.	45
Şekil 3. 5. MTHFR C677T mutasyonu için 198 bp'lik aplifikasyon ürününün %2'lik agoroz jelde görüntülenmesi.	46
Şekil 3. 6. MTHFR C677T mutasyonu 198 bp'lik aplifikasyon ürününün Hinfl enzimi ile yapılan RFLP sonuçlarının %3'lük Nusieve agoroz jelde görüntülenmesi.	46

ÇİZELGELER

Tablo 1. 1. Tekrarlayan Gebelik Kaybında Etyolojik Faktörler	6
Tablo 1. 2. Bazı Ülkelerde FV Leiden Mutasyon Sıklığı.	16
Tablo 2. 1. Olgulara ait değerlendirme kriterleri ve kişisel özellikleri.	27
Tablo 3. 1. Gruplardaki akraba evliliği sıklıkları.	43
Tablo 3. 2. HA ve kontrol grubunda FV Leiden (G1691A) mutasyonu bulunma sıklığı.	47
Tablo 3. 3. HA ve kontrol grubunda Protrombin (G20210A) mutasyonu bulunma sıklığı.	47
Tablo 3. 4. HA ve kontrol grubunda MTHFR (C677T) mutasyonu bulunma sıklığı.	47
Tablo 3. 5. HA grubunda abortus sayısı ile FV Leiden mutasyon bulunma sıklığı.	48
Tablo 3. 6. HA grubunda abortus sayısı ile Protrombin mutasyon bulunma sıklığı.	49
Tablo 3. 7. HA grubunda abortus sayısı ile MTHFR mutasyon bulunma sıklığı.	50

ÖZET

Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Faktör V (G1691A), Protrombin (G20210A) Ve Metilentetrahidrofolat Redüktaz (C677T) Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi

Gebe kalmaya çalışan kadınların %75'inde erken gebelik kaybı olmaktadır. Habitüel Abortus birbirini izleyen en az iki yada daha fazla 20. gebelik haftasından önce gebeliğin spontan olarak sonlanmasıdır.

Tekrarlayan gebelik kayıplarında çeşitli etyolojik faktörler sayılmaktadır. Yapılan çalışmalarda yaklaşık olarak %7 kromozomal anomaliler, %10 anatomik sorunlar, %15 hormonal düzensizlikler, %6 açıklanamayan sebepler ve %55-62 koagülasyon protein/platelet kusurları olarak bildirilmektedir. Koagülasyon sisteminde aksaklığa neden olacak genetik kusurların son dönemde önemi daha iyi anlaşılmıştır. Bunlar arasında en sık ilişkilendirilen Faktör V, Protrombin ve MTHFR genlerinde yer alan bazı mutasyonlardır.

Bu çalışmada iki ve üzerinde gebelik kaybı olan 110 kadın ve gebelik kaybı olmayan, sağlıklı çocuk sahibi olan 30 kadında FV Leiden (G1691A), Protrombin (G20210A) ve MTHFR (C677T) gen mutasyonlarının varlığını araştırmayı amaçladık. Tüm olguların değerlendirilmesine anamnez alınması ve hasta onay formu doldurularak başlandı. Kan örnekleri alınıp DNA izolasyonu yapılan örneklerle Hind III ve Hinf I restriksiyon enzimleri kullanılarak PCR-RFLP yöntemi ile mutasyon taraması yapıldı.

FV Leiden (G1691A) mutasyonu HA grubunda %13.6, kontrol grubunda %6.7, Protrombin (G20210A) mutasyonu HA grubunda %6.4, kontrol grubunda %6.7, MTHFR (C677T) mutasyonu HA grubunda %55.5, kontrol grubunda %53.3 olguda tespit edilmiştir. Mutasyonların bulunması sıklığına bakıldığında HA ve kontrol grubu arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir.

Gebelik kaybı riskinin, sipesifik bir mutasyondan çok trombofilik mutasyonların kombine birikimine bağlı olabileceği düşünülmüştür. Belkide HA'lu kadınlarda daha fazla trombofilik gen mutasyonunun prevalansının araştırılması daha anlamlı olacaktır.

Anahtar Sözcükler: Habitüel abortus, FV Leiden, Protrombin, MTHFR

SUMMARY

INVESTIGATING FACTOR V (G1691A), PROTHROMBIN (G20210A) AND METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE (C677T) GENE POLYMORPHISMS IN RECURRENT PREGNANCY LOSS

In 75% of women trying to be pregnant, early pregnancy loss occurs. Habitual abortion is the termination of two or more consecutive pregnancies before 20th gestational week.

Various etiologic factors are responsible for recurrent pregnancy loss. In the performed studies these reasons are reported to be, 7% chromosomal abnormalities, 10% anatomic problems, 15% hormonal irregularities, 6% unclear reasons and 55-62% coagulation protein/platelet problems, approximately. The importance of genetic defects causing deficiency in the coagulation system are better understood recently. Among them the most frequently related ones are some of the mutations take place in the Factor V, Prothrombin and the MTHFR genes.

In our study we objected to investigate the existence of the FV Leiden (G1691A), Prothrombin (G20210A) and MTHFR (C677T) gene mutations in 110 women with recurrent pregnancy loss and in 30 women with no pregnancy loss and having healthy children. Evaluation of all the cases was begun by taking anamnesis and filling patient approval form. Mutation screening was performed by PCR-RFLP method using Hind III and Hinf I restriction enzymes for the blood samples of which DNAs were isolated.

FV Leiden (G1691A) mutation was detected to be 13.6 % in the case and 6.7% in the control group, Prothrombin (G20210A) mutation was detected to be 6.4% in the case and 6.7% in the control group, MTHFR (C677T) mutation was detected to be 55.5% in the case and 53.3% in the control group. No significant differences were detected between the case and the control group according to the mutation frequencies.

It is thought that the risk of pregnancy loss is related to the combined augmentation of the thrombophilic mutations rather than a specific mutation.

Probably, investigating prevalence of more thrombophilic mutations in women with habitual abortion will be more significant.

Keywords: Habitual abortion, FV Leiden, Prothrombin, MTHFR.

1. GİRİŞ

1. 1. Tekrarlayan Gebelik Kaybı:

Tekrarlayan gebelik kayıpları (Habitüel Abortus, HA) hekim ve hasta açısından oldukça zor ve stresli bir sorun olup, gebe kalmak isteyen çiftlerin %0,5-1'inde görülmektedir. Gebeliğin 20. haftasında önce yada fetal ağırlığın 500 gramın altında olduğu gebeliklerin herhangi bir mekanik veya farmakolojik etkene bağlı olmadan sonlanmasına *erken gebelik kaybı* denir.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ise düşüğü 1977 yılında ağırlığı 500 gramdan az olan bir gebelik ürününün vücut dışına atılması olarak tanımlanmıştır (1). Bu tanımlamada fetal ağırlığın en az kaç olması gerektiği belirtilmemiştir. Bu tanımlamaya missed abortuslar ve kimyasal olarak tespit edilen gebelik kayıpları alınmamıştır. Ayrıca fetal ağırlığın 500 gramın üstünde olduğu gebelik kayıpları da olabilir. Bu nedenle düşük veya habituel abortus gibi deyimlerin yerini "*tekrarlayan gebelik kaybı*" deyimini almaktadır.

Gebe kalmaya çalışan kadınların %75'inde erken gebelik kaybı olmaktadır (2-4). HA birbirini izleyen en az iki yada daha fazla 20. gebelik haftasından önce gebeliğin spontan olarak sonlanmasıdır (5) Gebeliğin 20. haftasına kadar olan dönemde klinik olarak tanımlanabilen spontan düşük oranı %15 dir. Ovülasyondan sonra geçen süre gebelik kaybının abortus olarak adlandırılmasında önemli olmakla birlikte bu gün halen bu süre için araştırmacılar arasında tam bir görüş birliği bulunmamaktadır (6). Ektopik ve molar gebelikler yüzünden sonlanan gebeliklerde bu başlık altında toplanmaktadır. Canlı bir gebeliğin kaybı ile missed abortus yada blighted ovumun ayırt edilmesi gereği araştırmacılar tarafından kabul edilen ortak görüşdür (7-9). Düşüğün tekrarlama olasılığı ile ilgili literatürde çelişkili oranlar vardır. Gebelik isteyen çiftlerin yaklaşık %5'i iki ardışık gebelik kaybı yaşarken, üç yada daha fazla kayıp yaşayan ailelerin oranı %1 civarındadır. Erken gebelik kayıplarının bir çoğunda olay beklenen adet tarihinden önce yada adet sırasında gerçekleştiği için pek çok kadın durumu farketmeyebilir (2-4). Spontan abortus oranının tesbitindeki bu güçlükler HA sıklığının belirlenmesine de yansımıştır. Ardışık üç düşüktan sonra dördüncünün olma olasılığı %40-50 olarak

bildirilmektedir (1). Malpas ve arkadaşlarının çalışmasında ilk abortustan sonraki gebeliklerin abortusla sonlanma riski %22, %38 ve %73 olarak bildirilmiştir. Whitehouse ise 2000 gebede yaptığı çalışmada spontan abortus sıklığını %17.6 olarak bildirmiştir. Olasılık hesaplamalarına dayanan bu iki çalışmada da artan düşük sayısının bir sonraki gebeliğinde düşükle sonlanma ihtimalini artıracığı yönündedir. Klinik olarak yapılan çalışmalarda ise ardarda 3 düşüktan sonra gebelik kaybı riski %30-45 olarak bildirilmiştir.

Spontan düşük oranı pek çok çalışmada %10-15 arasında bildirilmektedir, fakat bu rakamın %50 civarında olduğu, pek çok kadının konsepsiyon sonrası 2-4 haftalık gebeliklerden çoğunlukla haberdar olmamasıdır (2-4). Yapılan çalışmalarda döllenmiş ovumların yaklaşık %50'si canlı bir gebeliğe ulaşırken geri kalanı farklı dönemlerde kaybedildiği bildirilmektedir. İmplantasyondan sonraki ilk altı hafta gerçekleşen gebelik kayıpları yapılan biyokimyasal testler ile ortaya konmuştur. Buna göre implantasyonla ilk altı hafta arasındaki gebeliklerin %30'u kaybedilmektedir. Gebelik kayıpları sıklıkla gebeliğin ilk aylarında (1-12 gebelik haftalarında) olmaktadır. Yapılan literatür taramasında ilk aylarda yaşanan gebelik kayıp oranı %80 dolayında bulunmuştur. Gebelik kayıplarında anne adaylarının yaşlarına bakıldığında, klinik olarak tanımlanan düşük 20 yaşından genç kadınların yalnızca %12'sinde olurken, sıklık 40 yaşından büyüklerde %26'ya yükselir. 40 yaş üstü kadınlarda tüm düşük riski (farkedilen ve farkedilmeyen) yaklaşık %75'tir.

Gebelik kayıplarının toplumdaki sıklığı %15 olarak bildirilmiştir. Fakat her gebelik kaybı bir sonraki gebeliğinde düşükle sonlanma ihtimalini artırmaktadır.

1.1.1. Tekrarlayan Gebelik Kaybında Etyolojik Faktörler:

Tekrarlayan gebelik kayıplarının etyolojisi çok çeşitli ve bir o kadar da tartışmalıdır. Genelde birden fazla etyolojik faktör saptanmaktadır, bunlardan en sık rastlananlar tablo 1.1 de listelenmiştir.

Tablo 1.1: Tekrarlayan gebelik kaybında etyolojik faktörler.

Genetik dengeli parental translokasyonlar
Mendelyan
Multifaktöryel
Diğer
Robertsonyan
Resiprokal
Uterin Konjenital Anomaliler
Mülleryan anomali
Dietilstilbestrol'a bağlı
Kazanılmış defektler
Iyatrojenik
Uterin septum
Hemiuterus
Asherman Sendromu
Çift uterus
Servikal yetmezlik
Leiomyomlar
İmmün-otoimmün
Alloimmün
Hümorale immünite ile ilgili
Hücresele immünite ile ilgili
Endokrin
Luteal Faz Defekti
Diğer endokrin hastalıklar
Antitiroid antikorlar
Artmış LH sentezi
İnfeksiyöz
Hematolojik
Çevresel

1. 1. 1. 1. Genetik Nedenler:

Gebelik kayıplarında en sık genetik düzensizlikler sorumlu tutulmaktadır. Embriyonun anormal karyotipe sahip olması gebeliğin sonlanmasına neden

olmaktadır. Embriyodaki genetik düzensizlik fetal veya maternal kaynaklı olabilir. Gebelik haftası ile genetik düzensizlik sıklığı ters orantılıdır; birinci trimester kayıplarının %50'si, ikinci trimester kayıplarının %5-10'u, üçüncü trimester ölü doğumlarının ise %5'i ve canlı doğumların %1'inde sitogenetik anormallik mevcuttur (10, 11).

Tekrarlayan gebelik kayıplarının %2-4'ünde anne veya babadan gelen dengeli kromozomal düzensizlikler görülür. Genetik düzensizlikleri yapısal ve sayısal olarak sınıflamak mümkündür. Düşük metaryalinden yapılan kültürlerde maternal kontaminasyon ve gelen dokunun nekroze olması nedeniyle başarı oranı %65 dolayındadır. Yapılan sitogenetik incelemelerde saptanan anomalilerin %49'unun otozomal trizomilere, %20'sinin cinsiyet kromozomu monozomilerine, %19'unun poliploidiler, %3.8'inin yapısal düzensizliklere ve %3.2'nin miksoploidilere ait olduğu bildirilmiştir (12)

1. 1. 1. 2. Anatomik nedenler:

Tekrarlayan gebelik kayıplarının etyolojisinde yaklaşık %27 oranında anatomik nedenler sorumludur. En sık rastlanan uterin anomaliler septat, bikornuat ve didelfis uteruslardır. Unikornuat uterus en nadir rastlanan anomalidir (13-15). Uterus anomalilerinin birinci trimester gebelik kayıplarından çok canlı fetusların ikinci trimesterde düşüklerine neden olduğu fikri yaygındır. Tekrarlayan birinci trimester gebelik kayıpları olan olgularda uterin anomalilerin bulunması büyük olasılıkla tesadüfi olarak değerlendirilmektedir (12). Geç ikinci trimester gebelik kayıplarında luminal yetmezliğin görülme sıklığı daha fazladır.

1. 1. 1. 3. Endokrinolojik Nedenler:

Ovülasyon, implantasyon ve gebeliğin erken safhaları maternal endokrin sisteme bağımlıdır. Çok uzun zamandır bütün dikkatler maternal sistemik endokrin bozukluklara yönelmiştir, bunlar luteal faz bozuklukları ve erken gebelikteki progesteron bozuklukları gibi konsepsiyon sonrası hormonal değişikliklerdir (12).

Luteal faz yetmezliği dışında diabetes mellitus ve tiroit hastalıkları da gebelik kayıplarına neden olmaktadır. Hipotiroidizm, ovulasyon ve korpus luteum

disfonksiyonuna neden olur. Bunların dışında otoimmünite ile ilgili olabilen antitiroit antikolar da gebelik kayıplarına neden olabilir (16).

1. 1. 1. 4. Enfeksiyöz Nedenler:

Enfeksiyöz ajanların gebelik kayıplarına yol açabileceği teorisi literatürde 1917 yılından bu yana yer almaktadır. Bu ilk çalışmada Forest ve arkadaşları Brusellalı çiftlik hayvanlarıyla uğraşan insanlarda tekrarlayan gebelik kayıplarına dikkat çekmiştir. Her ne kadar enfeksiyonlar gebelik kaybına neden olarak bildirilsede bu konuda çalışma sayısı azdır ve sonuçlar birbiriyle pek tutarlı değildir. Herhangi bir mikroorganizma ile tekrarlayan gebelik kaybı arasında pozitif bir ilişki var diyebilmek için mikroorganizmanın plasentada, fetüste veya annede tespit edilmesi gerekir. Gebelik kayıplarıyla ilişkilendirilen mikroorganizmalar; Toxoplasma Gondii, Listeria Monositogenes, Mycoplasma Hominis, Herpes Simplex Virus ve Sitomegalo Virustur.

1. 1. 1. 5. İmmunolojik Nedenler:

Gebelik kayıplarına neden olan immunolojik problemler oto immunité ve alloimmünite olarak ayrılmaktadır. Oto immünitede humoral veya hücreli yanıt, konakçının kendine özgü bir parçasına yönelir. Antifosfolipid antikolarının tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olan faktörler arasında olabileceği fikri 1980 lerde ortaya atıldı. Bu düşüncüyü destekleyen veriler lupus antikoagulanı (LA) ve antikardiolipin (aCL) ile birinci trimester sonu ve ikinci trimesterdaki fetal ölüm arasındaki ilişkidir. Lupus antikoagulan ve antikardiyolipin antikolar otoimmün bir hastalık sonucu artan antifosfolipit antikolarıdır. Tekrarlayan gebelik kayıpları olan olguların yaklaşık %5'inde LA, aCL veya her ikisinde vardır.

Alloimmünite plasental veya fetal dokulardaki antijenlere karşı anormal maternal bağışık yanıtla ilişkili tüm tekrarlayan düşük nedenlerini içerir. Normal durumlarda gebeliğin devamı için annenin fetal antijenleri reddetmemesi için bloklama faktörlerini oluşması gereklidir. Tekrarlayan gebelik kayıplarında ise annede bloklama antikolarının yapımıyla ilgili problemler olduğu tartışılmaktadır.

1. 1. 1. 6. Çevresel Nedenler:

Bu tür etkenler insanlardaki malformasyonların %10'nundan sorumludur (17). Tüm insanların malformasyonlarının ancak %1'i reçetli ilaçlara, kimyasallara yada radyasyona bağlıdır (18). Korunulabilirlik açısından bu etkenlerin iyi bilinmesi önemlidir.

Sigara, alkol ve aşırı kahve tüketimi tekrarlayan gebelik kayıplarıyla ilişkilendirilmiştir. Bunun dışında özellikle teratojen maddeler ve organik çözücüler iyonize radyasyon ve ağır metal zehirlenmesi gibi çevresel toksinler, antiprogesterinler, antineoplastik ajanlar gibi ilaçlar, inhalasyon anesteziikleri ve uterin kan akımını bozan kronik medikal hastalıklar diğer çevresel faktörler olarak sayılabilir. (19).

1. 2. Hemostaz

Damarın herhangi bir nedenle zedelenmesi sonucunda oluşabilecek kan kaybının önlenmesidir. Üç ana elementten oluşur (20-24);

1. Vasküler Endotel
2. Trombositler
3. Koagülasyon Sistemi

1. 2. 1. Koagülasyon Sistemi

Kanın sıvı haldeki durumundan katı hale yani akamaz duruma geçmesine koagülasyon denir (20). Pek çok enzimin ve proteinin yer aldığı oldukça kompleks bir mekanizmadır (24). Bu mekanizmada yer alan proteinleri başlıca üç grup altında toplayabiliriz (25).

1. Fibrinojen grubu proteinler; Faktör I, V, VIII, XIII.
2. Protrombin grubu proteinler; Faktör II, VII, IX, X.
3. Kontakt grubu proteinler; Faktör XI, XII, prekallikrein, Yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMWK)

Koagülasyon reaksiyonu; a) İntrensik yol (Şekil 1)

- b) Ekstrinsik yol (Şekil 2)
- c) Ortak yol

olmak üzere üç farklı sisteme bağlı olarak gerçekleşir (20, 24).

1. 2. 1. 1. İntrinsik Yol

Kontak aktivasyonu tarafından başlatılan bir seri enzimatik reaksiyondur. Kontak aktivasyonda vasküler travma ile uyarılan bazı değişikliklerle başlatılır. İnaktif olan FXII aktif FXII'ye dönüşür. Aktif FXII, FXI'yi aktif FXI'e dönüştürür. Aktif FXI ise FIX'u aktif FIX'a dönüştürür. Aktif FIX da fosfolipid, iyonize kalsiyum ve aktiflenmiş FVIII ile birlikte protrombin aktivatör kompleks oluşumunda başlatıcı olan FX'u aktif FX'a dönüştürür.

Aktif FX, FV ve trombosit fosfolipidi ile kompleks oluşturur ve bu komplekste protrombini trombine parçalar ve trombinde fibrinojenin fibrine dönüşümünü katalizler.

1. 2. 1. 2. Ekstrinsik Yol

Bu reaksiyon zincirinin aktivitesi doku faktörü üzerine odaklanmıştır. FVII'nin aktif FVII'ye dönüşmesi ekstrinsik yoldaki reaksiyonlar sonucu oluşur. Aktif FVII Ca^{+} iyonunun varlığında FX'un aktif FX'a dönüşmesini sağlar. Oluşan aktif FX fosfolipid ve FV ile protrombin aktivatörünü yapar. Bu da protrombini trombine parçalar.

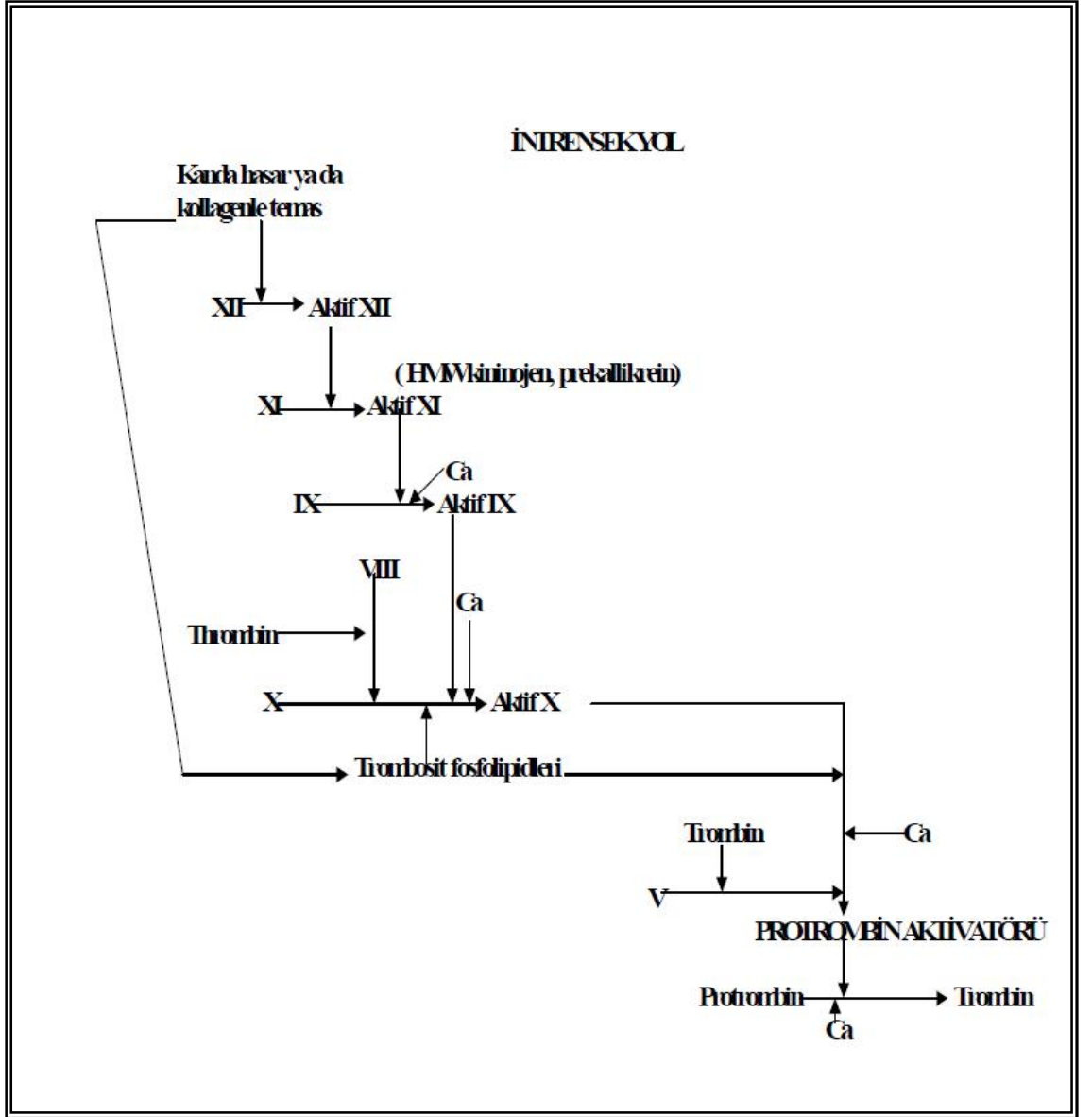
1.2.1.3. Ortak Yol

Kan koagülasyon sisteminde intrinsik ve ekstrinsik yol reaksiyonları sonucunda FX aktive olur. Aktif FX protrombinaz kompleksini oluşturur. Bu kompleks protrombinin trombine dönüşümünü katalizler. Trombin fibrinojenin fibrine dönüşümünü katalizler. 1964 yılında öne sürülen kaskad hipotezine göre; ekstrinsik ve intrinsik sistemler Faktör X'un Faktör Xa'ya aktive olmasıyla birleşirler. Aktif FX, FII, FV, Ca^{++} iyonları ve fosfolipidlerle birleşerek protrombin

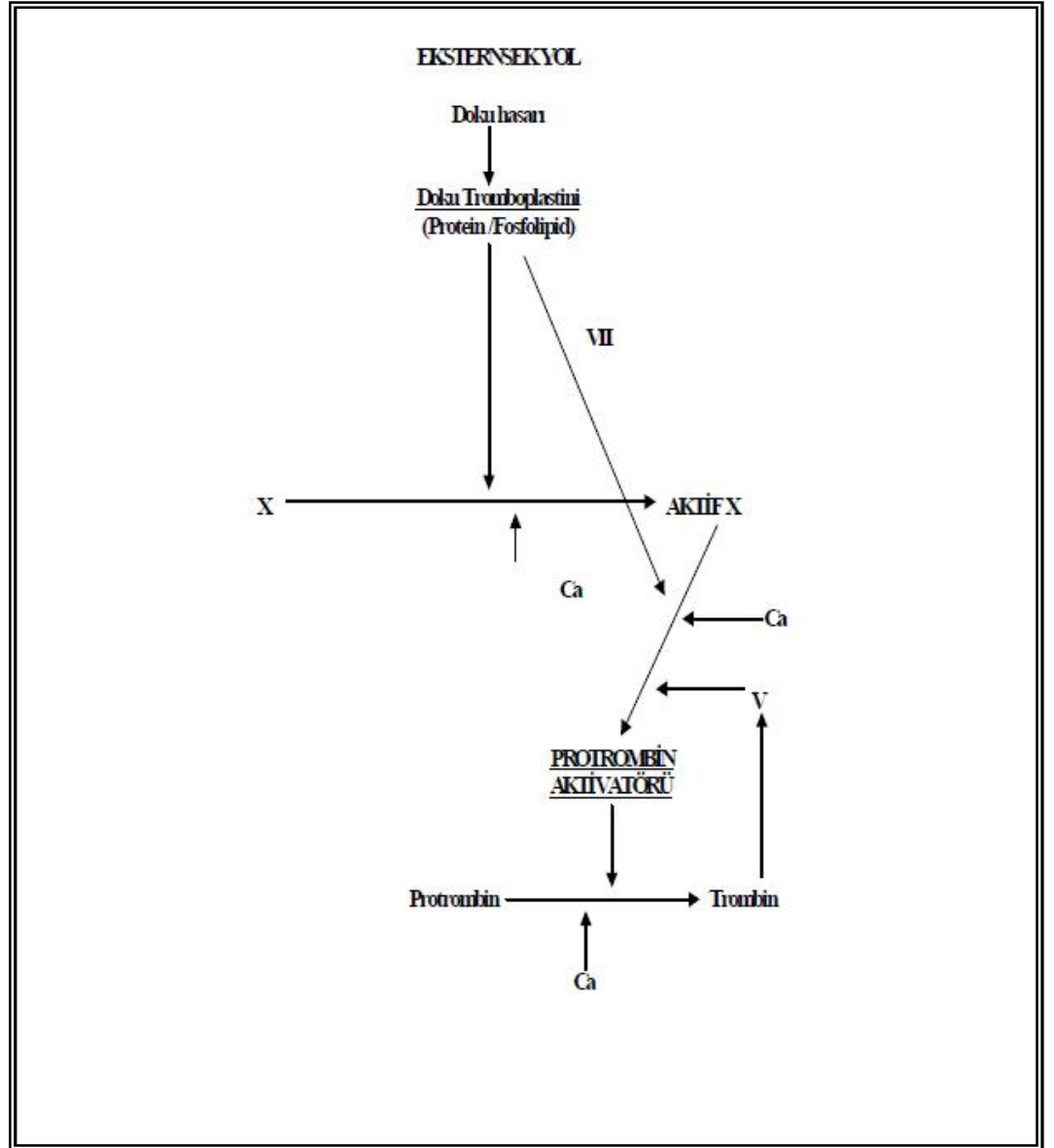
aktivatör kompleksini oluşturur. Bu kompleks FII'nin FIIa'ya dönüşümünü katalizler (26, 24). Trombinin fibrinojen üzerinde proteolitik etkisiyle fibrin monomerleri polimerize olarak uzun fibrin liflerini oluştururlar. Trombin aynı zamanda, Ca^{++} iyonları varlığında faktör XIII'ü aktive eder ve fibrin satbilizasyonunun sağlanmasıyla koagulasyon süreci sonlanır (22, 27).

1. 2. 1. 4. Düzeltilen Pıhtılaşma Hipotezi

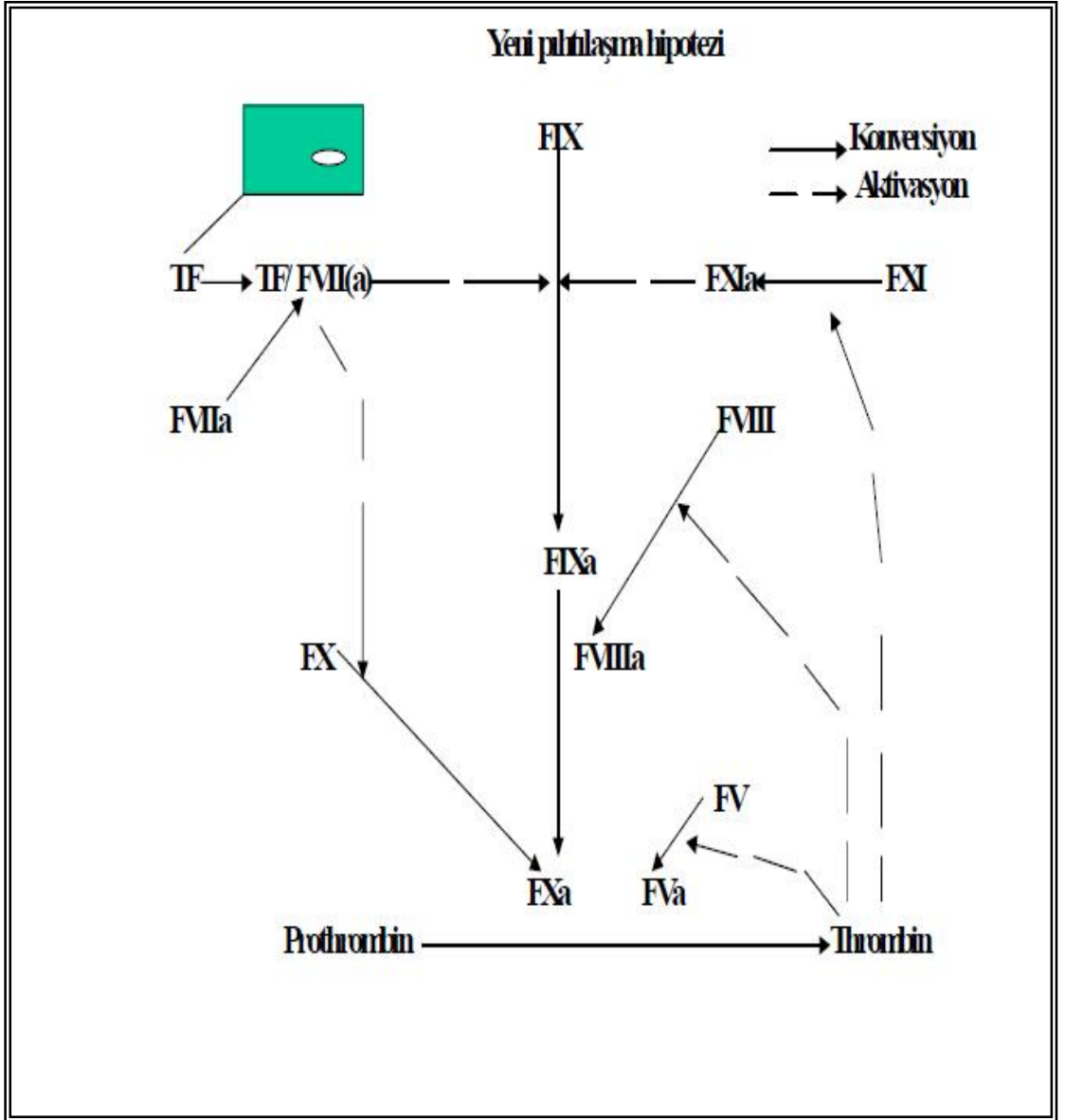
Yapılan yeni çalışmalarda doku faktörü yolu inhibitörünün (tissue factor pathway inhibitor, TFPI) pıhtılaşma reaksiyonlarında yaptığı görev daha iyi çalışılmış ve tespit edilmiştir. Bu sonuç pıhtılaşma sistemine ait hipotezde önemli değişikliklere neden olmuştur. Böylece yeni hipotezde pek çok konu daha önce Kaskad hipotezinin yanıtlayamadığı sorular yanıt bulmuştur (28).



Şekil 1.1: İntrinsik Pıhtılaşma Mekanizması



Şekil 1.2: Ekstrinsik Pıhtılaşma Mekanizması



Şekil 1.3: Yeni Pıhtılaşma Hipotezi

1. 2. 2. Faktör V Geni:

1992 yılında Cripe ve arkadaşları tarafından tanımlanan FV geni 1q23-q25 bölgesinde yer almaktadır. Genin toplam uzunluğu 80 kilobazdır, 24 intron ve 25 ekzondan oluşmaktadır. Ekzon uzunlukları 72 ile 2820 baz arasında değişmektedir (26, 29, 30). Gen de faktör V protein eksiliği ve fonksiyon bozukluğu nedeni olarak birden fazla mutasyon tanımlanmıştır (31, 32);

- * 13. ekzonda 4 bazlık bir delesyon
- * 13. ekzonda 2856. nükleotidde 4 bazlık bir insersiyon
- * 7. ekzonda yer alan G/C mutasyonu
- * 13. ekzonda 4070. bazda mutasyon (His1299Arg)
- * 10. ekzonda 1691. bazda G/A mutasyonu(FV Leiden)

Mutasyona uğramış Faktör V'e "*Faktör V Leiden*" adı verilmiştir ve bu mutasyonlar içinde en iyi bilinen ve en yaygın olanıdır. FV Leiden Aktif Protein C (APC) Direnci olarak adlandırılmaktadır (32, 33). APC Rezistanı 1990 yılında Dahlback ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (34, 35). Daha sonra APC Rezistanı'nın kalıtsal trombozda da en fazla rastlanan etken olduğu pek çok çalışmacı tarafından bildirilmiştir (35-38). 1994 yılında ise Bertina APC Direnci'nin en önemli nedeninin FV Leiden mutasyonu olduğunu açıklamıştır (34, 35, 39, 40). Bu mutasyon genin ürününün fonksiyon kaybına değil kazanımına neden olur. FV geni 10. ekzonunda 506. aminoasidi kodlayan kodonda guanin olan 1691. nükleotidin adenine dönüşmesi ile, arginin glutamine dönüşür (36, 41). Bunun sonucu olarak FV'in doğal antikoagulan proteinC-proteinS sistemine karşı duyarlılığı azalır ve FV a APC tarafından inaktive edilmeye karşı dirençli hale gelir (42-51). Otozomal dominant kalıtılan FV Leiden mutasyonu APC direncinin %90-95'inden sorumludur (47-49, 52). Heterozigot FV Leiden mutasyonu tromboz riskini 7-10 kat artırırken (39, 49), homozigot olanlarda bu risk 50-100 kat artmaktadır (45). Toplumdaki heterozigot bulunma sıklığı %0.05 dir (49). Ülkemizde ve bazı diğer ülkelerde toplumda FV Leiden mutasyon bulunma sıklığı Tablo 2'de verilmiştir (53).

Tablo 1.2: Bazı Ülkelerde FV Leiden Mutasyon Sıklığı

Ülke	Bulunma sıklığı (%)
Yunanistan	13.3
K.K.T.C	12.2
Türkiye	9.8
Almanya	7
Arjantin	5.1
Polonya	5
Finlandiya	4.2
Hollanda	2.9
Hindistan	1.3

1. 2. 3. Faktör V Proteini:

330 kDa büyüklüğünde ve 2196 aminoasitten oluşan bir protein olup, karaciğer, monosit makrofaj sisteminde ve megakaryositlerde de yapılır. 1943 yılında tanımlanmıştır (29, 47). Bir koagülasyon proteini. Tek zincirli ve labil bir glikoproteindir, aktifleşince çift zincire dissosiyeye olur. Koagülasyon mekanizmasının hem intrinsik hem de ekstrinsik yollarında görev yapan bir kofaktördür. Trombin tarafında aktif formu olan FVa'ya dönüştürülür. FVa, FXa ve protrombinle etkileşime girerek protrombinin trombine dönüşümü aktive etmektedir. FVa'nın bu fonksiyonu APC tarafından engellenmektedir (54). FXa'nın kofaktörüdür, yarılanma ömrü 12-14 saattir. 1993'te Dahlback ve arkadaşları APC rezistansının kalıtımı ile karakterize ailesel trombofili için yeni bir açıklama getirmiştir. Bu değişiklik, FVa'nın, APC'nin inhibe edici etkisine dirençli hale gelmesine neden olduğundan bu mutasyonu taşıyan kişilerde venöz tromboz oluşumuna yatkınlık olduğu belirtilmektedir (55, 56).

1. 2. 4. Protrombin (Faktör II, FII) Geni:

11p11-q12 yer alan Protrombin geni 14 ekzon ve 13 introndan oluşmuş 21 kilobaz büyüklüğünde bir gendir (57-60). Ekzonlar 25-315 baz, intronlar 84-9447 baz büyüklüğündedir (57, 60). Gen de 5'-translasyonu yapılmayan (5'-UTR) ve 3' translasyonu yapılmayan (3'-UTR) bölgeleri vardır (57, 58, 60, 61). Gen de Protrombin yapımına engel olan pek çok mutasyon tanımlanmıştır (21, 31, 37, 45, 47, 52, 53, 57, 58, 62);

- * Protrombin-BARCELONA
- * Protrombin-TOKUSHIMA
- * Protrombin-QUICK I
- * Protrombin- QUIK II
- * Protrombin-HIMI
- * Protrombin-G20210A

1996 yılında Poort ve arkadaşları tarafından tanımlanan ve Protrombin geninin 3'-UTR bölgesinde bulunan 20210. nükleotitte guanin yerine adenin geçmesiyle oluşan G20210A mutasyonun plazma protrombin miktarının artmasına neden olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir (35, 38, 41, 63-65). Bu mutasyonun tromboz riskini 2.7-3.8 kat artırdığı ve venöz tromboz için en yaygın ikinci kalıtsal risk faktörü olduğu bildirilmiştir (45). Bu mutasyonu heterozigot olarak toplumda bulunma sıklığı %2-2.3 iken trombozlu hasta grubunda %6-6.2 ve ailede tromboz öyküsü olanlarda %18 olarak tespit edilmiştir (34, 58, 66- 61, 70-72).

1. 2. 5. Protrombin Proteini:

Protrombin 72 kDa ağırlığında, 569 aminoasit içeren ve K vitamini varlığında karaciğerde sentezlenen tek zincirli bir glikoproteindir (73). Protrombinin yarılanma ömrü 1.25-3.5 gündür. Protrombin dört bölgeden oluşur; 1. Öncü dizi (271 aa), 2. Hafif zincir (49 aa), 3. Katalitik zincir (259 aa), 4. Dolaşıma katılmayan amino terminal zinciri (43 aa) (57). Protrombinin trombine dönüşümü tüm pıhtılaşma sistemindeki en karmaşık reaksiyon dizisidir.

Bu reaksiyonların gerçekleşmesi için FXa, FVa, Ca⁺⁺ ve fosfolipide ihtiyaç vardır (57, 60).

1. 2. 6. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Geni:

MTHFR 1p36.23-p34.3 yer alan 2.2 kb uzunluğunda ve 11 ekzondan oluşur (74). Ekzonlar 102-432 baz uzunluğunda iken intronlar 250-1500 baz uzunluğundadır. Genin promotör bölgesi, transkripsiyon faktörlerinin bağlanabilmesi için bazı özel dizilere sahiptir, fakat TATA kutusu içermez (75). Bu bölgede farklı splayzing işlemleri yapılabilmekte ve farklı dokularda farklı ürünler elde edilebilmektedir (75-80). Gen üzerinde 15 farklı mutasyon bildirilmiştir. Dördüncü ekzon bölgesinde yer alan 677. baz olan sitozin yerine timin geçmesiyle oluşan mutasyon translasyon ürününde 226. sırada yer alan alanin yerine valinin geçmesiyle neticelenir (80, 81).

1. 2. 7. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Enzimi:

Enzimin 70 ve 77 kDa'luk iki alt birimi olup, stoplazmik bir proteindir. Folat metabolizmasında önemli bir fonksiyona sahiptir. Enzimin yapısını MTHFR geninde meydana gelen C677T mutasyonu enzim aktivitesini azaltmaktadır. Bu da 5-metiltetrahidrofolat seviyesinde azalmasına ve homosisteinin metiyonine dönüşmemesine ve bunun sonucunda plazma homosistein seviyesinin yükselmesine neden olur (82-89).

1. 3. Gebelikte Trombofilik

Gebelik kayıplarında plasentasyon bozukluğu ve plasenta damar yapısında mikrotubuluslar dikkat çekici ölçüde artmış olarak tespit edilmiştir. Koagülasyon

ve fibrinolitik yolların çoğu embriyonun plasantasyonu ve trofoblastların invazyonu sırasında görev yapar (12).

Prokoagulan faktörlerin düzeyindeki artış, doğal antikoagulanların düzeyindeki azalma ve fibrinolizdeki azalma gebelikte hiperkoagulatatif durumun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Gebelikte özellikle ovulasyon, implantasyon ve plasantasyon aşamasında hemostatik sistem çok önemlidir. Gebelikte hemostatik sistemde önemli değişiklikler olmakta ve bunun neticesinde hemostatik mekanizmalar trombus oluşmasına yatkın olan yeni bir dengeye kavuşmaktadır. Fetoplasental dolaşımın sağlıklı olması gebeliğin devamlılığında çok önemlidir. Hemostatik sistemdeki gebelik boyunca oluşan değişiklikler işte bu çok önemli olan fetoplasental dolaşımın gerçekleşmesini sağlar (90, 91).

Gebeliğin ikinci trimesterından itibaren Faktör VII, VIII, X ve fibrinojen düzeyleri yükselmeye başlarken bunları dengelemesi gereken antitrombin III, protein C ve S ise koagulanları dengeleyecek oranda artmaz. Protein S düzeyleri %40-50 oranlarında düşerken antitrombin III ve protein C düzeyleri sabit kalır (92). Plasminojen aktivatör inhibitörü 1 (PAI-1) ve plasminojen aktivatör inhibitörü 2 düzeyleri gebelik boyunca sürekli artar. PAI-1 endotelial hücreler tarafından salgınır ve plasminojen aktivatörünü inhibe eder. PAI-2 ise trofoblastlar tarafından üretilir ve plasental gelişimi kontrol eder. Trombosit aktivasyonunda da belirgin artış görülür, tromboksan üretimindeki artış prostasiklinin antiagreguar etkisine karşı trombosit sensitivitesindeki azalma gebeliğin protrombik durumuna katkıda bulunur. Gebelikteki hemostatik değişiklikler koagulasyonu tetikler (12).

İmplantasyonun kolaylaşmasında ürokinaz plasminojen aktivatörü (UPA) önemli bir ajandır. Maternal venöz sinüslerde bulunan UPA plazminin üretimini tetikler. Bu ajan gebelikte birinci trimester boyunca eksprese edilir (12).

Gebelikte trofoblast invazyonu plasminojen düzeyinin dengelenmesiyle direkt bağlantılıdır. Trofoblast invazyon bozulduğu tekrarlayan gebelik kaybı olanlarda, preeklamsili ve IUGR'li gebelerin plasentalarından yapılan plasental yatak biopsilerinde gözlenmiştir.

Sağlıklı gebeliklerde plasentada hemostatik, fibrinolitik, protein C bağımlı antikoagulan (Faktör V Leiden) yolaklar mevcuttur ve bunlar hemostazın devamlılığını sağlarlar. Kayıpların olduğu gebeliklerde fibrinin plasental dağılımı

da değişmiştir ve sitokinler gibi bazı faktörlerin üretimi normalde trombo-resistan olan endotelin trombojenik bir endotele dönüşmesine yol açar.

Tekrarlayan gebelik kayıpları olan kadınlarda tromboxan artışı ve prostasiklin düşüşü olduğu bazı çalışmalarda tespit edilmiştir (93). Tromboksanın prostasiklin oranındaki bu kayma vazospazm ve trombosit agregasyonuna yol açmaktadır, bu da mikrotrombuslar ve plasental nekroza yol açar. Protein C ve fibrinopeptid A düzeylerinde de düşüklerden hemen önce bir düşüş görülmekte bu da koagulasyon mekanizmasının aktive olduğunu göstermektedir (12).

1. 3. 1. Aktif Protein C Rezistansı:

Trombus oluşumunu kontrol eden pek çok mekanizma vardır. Bu mekanizmalardaki aksaklıklar klinik olarak teklikeli sonuçlar doğurur. Çok fazla mekanizma ve enzimi içeren koagülasyon sistemi patolojik trombin oluşmasını engeller. Son dönemde üzerinde sıklıkla durulan antitrombin III, vitamin K bağımlı Protein C sistemi, ve “Tissue Factor Pathway Inhibitor 1” (TFPI) koagülasyon sisteminde önemli mekanizmalardır (92, 94). Kalıtsal kusurlar antikoagülan ve antitrombus mekanizmalarının işleyişini bozabilir. Bunlar arasında Antitrombin III eksikliği, Protein C ve S eksiklikleri Displazminojemiler, Disfibrinojemiler, Homocystinuria sayılmaktadır (92, 95).

Aktive Protein C Rezistansına neden olan trombofilik bozukluklar içinde son dönemde önem kazanan kalıtsal bir kusur Faktör V Leiden (FV Leiden) mutasyonudur. O.D. aktarılan bu mutasyon aktive Protein C (APC)'nin Faktör V üzerindeki bağlanma yerlerinden birinde bozulmaya sebep olur. APC sağlam halinde koagülasyon faktörleri Va ve VIIa'yı kofaktör protein S varlığında inaktive eder. Mutant Faktör V APC ile inaktive olmaz, bu da artmış trombin oluşumu ve hiperkoagulatif bir ortama yol açar (96, 97). Sağlıklı insanlara göre bu mutasyonu homozigot olarak taşıyanlarda 50-100, heterozigotlarda 5-10 kat fazla tromboz riski vardır. APC rezistansı gösterilen olguların %80'inde FV Leiden mutasyonu bulunduğu bildirilmiştir.

Gebelikte tromboz eğilimi artar, bu nedenle trombofilik bozukluklar gebelikte çok önemli komplikasyonlara neden olabilir (98). Tekrarlayan gebelik

kaybı bulunan olgularda FV Leiden mutasyonunun taranmasını anlamlı bulan pek çok çalışma mevcuttur (95, 99-105-108). Bu konuda yapılan bir çalışmada tekrarlayan gebelik kaybı olan 120 kadın değerlendirilmiş ve ilk trimestir gebelik kaybı olan kadınlara göre ikinci trimestir kaybı olan kadınlarda APC rezistansı prevalansı daha yüksek bulunmuştur (%5.7 ve %20) (109).

1. 3. 2. Anormal Homosistein Metabolizması

Homosistein metyoninin sisteine dönüşümü sırasında oluşan bir aminoasittir. Hiperhomosistinemi tromboz ve prematür vasküler hastalıklara neden olmaktadır. Tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda hiperhomosistinemi insidansı daha yüksek bulunmuştur. O.R. olarak kalıtılmaktadır (12).

1. 3. 3. Son Dönemde Trombofili İçin Önerilen Aday Genler:

Son yıllarda yapılan çalışmalarda trombofili için FV Leiden, Protrombin (G20210A) ve MTHFR (C677T) mutasyonları dışında farklı aşamalarda devreye giren ürünler ve bu ürünlere ait genler üzerinde çalışmalar yapılmaya başlanmıştır.

Hemostas koagülasyon ve fibrinolizis arasında bir denge olduğu için her iki işlemi içeren gen mutasyonları kadar MTHFR (C677T ve A1298C) ve trombosit antijenglikoprotein IIB/IIIA'yı çalışılmaya başlanan mutasyonlar arasındadır. Koagülasyona karışan FV (G1691A, Y1702C ve H1299R) ve Protrombin (G20210A) mutasyonlarına ek olarak β -fibrinogen ve faktör XIII'ü de yeni çalışılmaya başlanan mutasyonlardan bir diğeridir. Hatalı fibrinolizis de trombozise etki edebileceğinden ve tromboz hikayesi olan hastalar yüksek prevalanslı yüksek PAI-1 seviyelerine sahip olduğu için PAI-1 4G/5G gen insersiyon polimorfizminin çalışılması anlamlı kabul edilmiştir (110).

Konjenital disfibrinojenemi tromboz için risk faktörüdür. β -fibrinogen genindeki (-455G/A) bir polimorfizim yüksek plazma fibrinojen seviyeleri ile ilişkilidir (111).

Transglutaminas Faktör XIII trombin tarafından aktive edilir ve fibrin monomerlerini karşılıklı kovalent bağlarla bağlayarak fibrin pıhtısını stabilize eder. Faktör XIII genindeki bir varyasyon, Val34Leu polimorfizmi heterozigot veya homozigot olsun tekrarlayan gebelik kayıplarıyla ilişkili olan Phe204 polimorfizmi ve trombozla korelasyon gösterir (112). PAI bozulmuş plazmin bağımlı proteoliz ile başlıca fibrinoliz inhibitörü olarak erken plasental dolaşımında fibrin salınımını düzenleyerek veya trofoblast göçünü sınırlandırarak tekrarlayan gebelik kaybına sebep olabilir (113). Koagülasyon ve fibrinolize ek olarak trombozda trombositlerde rol oynaya bilir. Bu nedenden dolayı antijenglikoprotein IIB/IIIA de çalışılması önerilen bir diğer genidir (111-115).

1. 4. DNA'nın Yapısı Ve Özellikleri:

1868 yılında Friedrich Miesher hücre çekirdeğinde protein dışında yapıların olduğunu yaptığı pek çok çalışma ile gösterip bu materyale *nüklein* adını vermiştir. Bu gün de hala nükleik asit olarak adlandırılan kalıtsal materyalin temel yapısını şeker, fosfat ve bazlar oluşturmaktadır.

Şeker, 5 karbonlu bir pentoz olan deoksiriboz molekülüdür, fosfat grubu ise monofosfat molekülüdür. Deoksiriboz ve monofosfat tüm nükleotidlerde aynıdır. Bazlar ise pürin ve pirimidin bazları olmak üzere iki gruba ayrılır. Pürin bazları adenin ve guanin, pirimidin bazları ise sitozin ve timin'dir. Deoksiribonükleotidler, içerdikleri baza göre adlandırılmaktadır: deoksiadenozin monofosfat (dAMP), deoksisitidin monofosfat (dCMP), deoksiguanozin monofosfat (dGMP) ve deoksitimidin monofosfat (dTMP).

DNA molekülünün yapısı Watson-Crick tarafından 1953 gösterilmiştir. Bu modele göre DNA çift iplikli sağa doğru dönüş yapan ve her dönüşünde 10 nükleotid içeren, her iki zinciri birbirine eşit uzaklıkta tutacak şekilde bazların spesifik yerleşimi olan ve bu bazlar arasında hidrojen bağları bulunan elektrik yükü negatif bir moleküldür. Yine, DNA çift zincirinde zincirler birbirine antiparalel yerleşimlidir, zincirlerden biri 5'→3' yönünde yer alırken diğer zincir 3'→5' yönünde bulunur (116).

1. 5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):

PCR, spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi olup invitro bir yöntemdir. Yöntem 1980'li yıllarda Cetus firması çalışanları tarafından geliştirilmiş olup, o günden bu güne kadar pek çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır; Klonlama, dizi analizi, DNA haritalaması, ve pek çok hastalığın DNA temeline dayalı tanısını koymada. PCR ile insan genomik DNA'sı gibi kompleks DNA kalıplarından spesifik DNA parçalarının sentezi 1-2 saat içinde yapılabilmektedir. Tüm bu sebepler PCR tekniğinin moleküler tıpta yaygın kullanılmasına neden olmuştur.

Polimeraz zincir reaksiyonu çift iplikli DNA molekülünden hedef dizilere iki oligonükleotit primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Amplimer olarak da adlandırılan oligonükleotid primerler , kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklıkta denatüre edildikten sonra tek iplikli DNA molekülü üzerine uygun sıcaklıkta kendileri için kalıp olan bölgeye hibridize olurlar. Bu işlem düşük sıcaklıkta gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid (dNTP) varlığında primerlerin serbest 3' hidroksil uçlarına kalıp diziyeye uygun olan bazları bağlar. Böylece kalıp ipliğe tamamlayıcı yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Bir PCR döngüsünde denatürasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olarak adlandırılan başlıca üç aşama vardır. Ardışık tekrarlar ile hedef DNA bölgesi istenilen miktarda çoğaltılabilir. Reaksiyonu gerçekleşmesi için ortamda bulunması gereken moleküller ve enzimleri şu şekilde sıralayabiliriz:

1. Kalıp DNA
2. DNA polimeraz enzimi
3. Primerler
4. Dört çeşit dNTP
5. MgCl₂
6. Tampon

2. 5. 1. PCR Çeşitleri:

Moleküler çalışmalarda kullanılan amaca yönelik birden fazla PCR çeşidi bulunmaktadır. Çalışılan DNA kaynağına ve hedef DNA bölgesine göre farklı yöntemler tercih edilebilir. Temelde aynı mekanizma kullanılmakla birlikte birbirlerinden farklılıkları bulunmaktadır. Bunların listesini vercek olursak;

1. Nested PCR (Yuvalanmış PCR)
2. Anchored PCR (Demirlenmiş PCR)
3. Revers Transkripsiyon PCR (RT-PCR, Geri PCR)
4. Asimetrik PCR
5. Inverse PCR (IPCR, Ters PCR)
6. In situ PCR
7. Multiplex PCR (Çoklu PCR)
8. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)
9. İmmuno PCR

1. 6. Restriksiyon Enzimleri

Rekombinant DNA teknolojisinde çok önemli bir yeri olan bu enzimler bakterilerden izole edilirler. Bakterinin viruslardan kendini korumada bu enzimlerin rol aynadığı ve virus DNA'sını keserek parçaladığını gördükleri için bunlara Restriksiyon Enzimi adını vermişlerdir. Bu enzimler DNA'yı özgül dizilerden tanıyarak her iki zincirde keserler. Kesme yönü her zaman her iki zincirde de 5'---3' yönünde olur. Rekombinant DNA teknolojisinde önemi DNA'yı her zaman özgül bölgelerden tanıyıp kesmesidir. Pek çok bakteriden farklı enzim elde edilmiştir, bu gün 200'ün üzerinde restriksiyon enzim çeşidi bilinmektedir. DNA daki palindromik dizilerden kesim yaparlar ve kesimler sonucunda bazen yapışkan (sticky) uçlar oluştururlarken bazen küt (blunt) uçlar oluştururlar. Enzim adlandırılırken izole edildiği bakterinin ismi, suşu ve o bakteriden izole edilen enzim sayısına göre adlandırılır.

1.7. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizimi

“Restriksiyon Fragmentinin Uzunluk Polimorfizimleri” (*RFLP*), genomik DNA daki farklı dizi bölgeleri bulunması nedeniyle restriksiyon enzimleri için farklı özgül tanıma bölgeleri oluşmasıdır. Bundan dolayı farklı bireylerde aynı enzimle muamele de bile farklı uzunlukta DNA parçaları oluşur. Southern blot tekniğinin uygulanmasıyla restriksiyon enzimlerinin kesim bölgelerinin insanlar arasında aynı olmadığı anlaşılmıştır. Southern blot ile belirlenen enzim kesim yerlerindeki DNA farklılıkları Restriction Fragment Length polymorphisms olarak adlandırılmıştır. RFLP ler tek nükleotit mutasyonlarında çok delesyon ve insersiyonlardan dolayı oluşur. Enzimin tanı bölgesinde oluşan bir mutasyon kesim ürünlerinin boyutlarında farklılık oluşturacaktır. Endonükleazların bu özelliğinden faydalanılarak moleküler çalışmalarda bazı hastalıkların tanısında kullanılmaktadır (117). Oluşan mutasyon noktasını özgün tanıma noktası olarak kullanan uygun endonükleazın kullanılmasıyla hastalığın tanısı konulabilir. Mutasyon hedef DNA bölgesinde endonükleazın tanıma dizisini ortadan kaldırarak yada tanıma noktası oluşturularak farklı uzunlukta ürünlerin oluşmasına neden olur. Bu prensipten yararlanılarak moleküler genetik laboratuvarında çok sayıda çalışma yapılmaktadır.

55	36	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
56	22	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	29	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58	23	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
59	35	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
60	35	3(Kuzen)	2	0	0	2	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
61	35	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
62	28	0	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
63	31	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
64	23	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
65	22	2(Kuzen)	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
66	34	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	4	0	0	0	0
67	40	1(Kuzen)	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
68	21	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69	20	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
70	37	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71	28	0	0	0	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
72	32	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
73	21	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
74	23	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
75	30	2(Kuzen)	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
76	23	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1	1	0
77	22	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
78	23	3	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
79	26	1(Kuzen)	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
80	31	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
81	27	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
82	28	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
83	24	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
84	24	1(Kuzen)	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
85	39	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
86	33	1(Kuzen)	3	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0
87	28	1(Kuzen)	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88	22	1(Kuzen)	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
89	29	1(Kuzen)	0	1	0	1	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0
90	22	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
91	35	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92	44	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
93	34	1(Kuzen)	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94	29	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
95	36	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
96	33	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
97	25	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
98	36	0	2	1	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
99	26	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
100	30	0	4	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
101	24	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

102	24	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
103	55	1(Kuzen)	1	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
104	35	0		0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
105	24	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
106	25	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
107	34	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
108	23	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
109	28	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
110	37	1(Kuzen)	2	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K1	32	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K2	34	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K3	28	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K4	26	1(Kuzen)	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K5	17	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K6	23	1(Kuzen)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K7	34	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K8	28	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K9	24	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K10	26	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K11	22	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K12	21	1(Kuzen)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K13	45	1(Kuzen)	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K14	31	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K15	44	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K16	31	1(Kuzen)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K17	34	1(Kuzen)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K18	52	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K19	27	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K20	25	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K21	31	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K22	33	1(Kuzen)	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K23	37	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K24	28	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K25	36	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K26	43	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K27	35	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K28	60	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K29	42	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K30	29	1(Kuzen)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

K: Kontrol

Tüm olgulardan alınan 2ml EDTA'lı kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılarak FV Leiden, Protrombin (G20210A) ve MTHFR (C677T) mutasyonlarının incelemesi yapıldı.

2. 2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Hassas terazi (**Sartorius**)

Mikro santrifüj (**Heraeus – Biofuge pico**)

Soğutmalı santrifüj (**Thermo**)

Hot plate (**Nüve**)

PH metre (**Hanna**)

Spektrofotometre (**NanoDrop ND-1000**)

Termal Cycler (**MWG AG BIOTECH Primus 96**)

Mikropipetler (1-10 µl ve 10-100 µl) (**Eppendorf Research**)

Çeker ocak

Distile su cihazı (**Barnstead**)

Dikey elektroforez tankı (**Thermo**)

Yatay elektroforez tankı (**Thermo**)

Mikrodalga fırın (**Arçelik**)

Buz dolabı (**Profilo**)

Derin dondurucu(-20) (**Bosch**)

UV transluminatör (**UVP**)

Fotoğraf makinesi (**Fujifilm S7000 Digital Camera**)

Güç kaynağı (**Apelex**)

Vorteks (**Nüve**)

Su banyosu (**Nüve**)

Etüv (**Nüve**)

2. 3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar Ve Sarf Malzemeler

FV Leiden için primerler (MWG Biotech-AG)

5' TCA GGC AGG AAC AAC ACC 3'

5' GTT ACT TCA AGG ACA AAA TAC CTG TAA AGC T3'

Protrombin için primerler (MWG Biotech-AG)

5' GCA CAG ACG GCT GTT CTC TT 3'

5' ATA GCA CTG GGA GCA TTG AAG C 3'

MTHFR için primerler (MWG Biotech-AG)

5' TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA 3'

5' AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG 3'

Hind III restriksiyon enzimi (**Fermentas**)

Hinf I restriksiyon enzimi (**Fermentas**)

Taq DNA polimeraz (**Bioron**)

MgCl₂ (**Bioron**)

PCR tamponu (**Bioron**)

PCR mix (**Larova GMBH PCR Mix 3**)

dH₂O

Isopropanol (**Sigma**)

Absolu alkol (**Tekel**)

Agaroz (**Amresco Agarose I**)

Nusieve GTG Agarose (**Cambrex**)

Sodium dodecyl sulfate (**Sigma**)

Moleküler weight marker (**Amresco**)

Tris (**Amresco**)

Borik asit (**Amresco**)

Etidyum bromür (**Sigma**)

Bromphenol blue (**sodium salt %0.25, Ficoll 400 %15**) (**Applichem**)

Glasiyal asetik asit (**Merck**)

Na₂EDTA (**Sigma**)

Akrilamid (**Sigma**)

Bisakrilamid (**Bio basic inc.**)

TEMED (**Sigma**)

Amonyum persulfat (**Sigma**)

Erlen mayer (**Isolab**)

Mezürler (50 ml, 100 ml, 500 ml) (**Isolab**)

Pipetler (2 ml, 1.5 ml, 10 ml)
Steril sarı ve beyaz pipet ucu (**Corning**)
0.5-1.5 ml'lik Ependorf tüpleri (**Corning**)
0,2 µl lik PCR tüpleri (**Corning**)
Pens
Çeşitli boyutta cam şişeler (**Isolab**)
Alüminyum folyo ve stretch film (**Sera**)
Eldiven
Kağıt havlu

2. 4. Ortam Tamponları Ve Boyaların Hazırlanması

10XTAE (Tris Asetat Tampon) Elektroforez Tamponu:

- Tris baz48 gr.
- G. asetik asit.....11,42 ml.
- 0,5 M Na₂EDTA.....20 ml.
- Ultrapure (deiyonize) su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

Tris tartılıp bir miktar suda iyice çözülür. EDTA ve asetik asit eklenir.

Karıştırılır ve pH 8'e ayarlanır. Elektroforez sırasında ve agaroz jel hazırlanırken 0,5XTAE kullanılır.

10XTBE (Tris Borat Tampon) Elektroforez Tamponu:

- Tris baz.....108 gr.
- Borik asit.....55 gr.
- Na-EDTA.....8.3 gr

Deionize su ile 1000 ml'ye tamamlanır. pH:8.3 olacak şekilde ayarlanır.

Etidyum Bromür (10 mgr/ml):

- Etidyum bromid.....1 gr.
- Ultrapure (deiyonize) su.....100 ml.

Manyetik karıştırıcıda birkaç saat karıştırılarak hazırlanır. +4°C'de karanlık cam şişede saklanır.

Yükleme Tamponu

-Bromfenol blue %0.09

-Ksilen Cyanol FF %0.09

-EDTA 60mM

2. 5. %2'lik Agoroz Jelin Hazırlanması

PCR ürünleri amplifikasyonun kontrolü %2'lik agaroz jelde yapıldı. 100 ml'lik erlen içerisinde 2 gr agaroz ve 100 ml 0,5XTAE konulup saydamlaşmaya kadar erlen içindeki karışım mikrodalga fırında eritildi. Berraklaştıktan sonra çeker ocak altında 15 µl etidyum bromür eklenip karıştırıldı ve hazırlanan jel tepsisine döküldü. Jel donduktan sonra üzerine içinde 0,5XTAE tampon bulunan elektroforez tankına yerleştirildi ve tarak çıkarıldı. Bir parça parafilm üzerinde 5 µl yükleme tamponu ve 10 µl PCR ürünü karıştırılıp jeldeki kuyucuklara yüklendi. Değerlendirmenin kolay olması amacıyla yükleme sırasında 50 bp'lik marker DNA da jele yüklendi. 120 voltta 2,5-3 cm yürütüldükten sonra jel görüntüleme sisteminde sonuçlar incelendi.

2. 6. %3'luk Nusieve Agoroz Jelin Hazırlanması

Enzim kesim ürünlerinin kontrolü %3'luk Nusieve agoroz jelde yapıldı. 100 ml'lik erlen içerisinde 3 gr Nusieve agaroz ve 1 gr agaroz kondu üzerine 100 ml 0,5XTAE konulup saydamlaşmaya kadar erlen içindeki karışım mikrodalga fırında eritildi. Eritirken köpürmemesine dikkat edildi. Berraklaştıktan sonra çeker ocak altında 15 µl etidyum bromür eklenip karıştırıldı ve hazırlanan jel tepsisine döküldü. Jel donduktan sonra üzerine içinde 0,5XTAE tampon bulunan elektroforez tankına yerleştirildi ve tarak çıkarıldı. Bir parça parafilm üzerinde 5 µl yükleme tamponu ve 10 µl PCR ürünü karıştırılıp jeldeki kuyucuklara yüklendi. Değerlendirmenin kolay olması amacıyla yükleme sırasında 50 bp'lik marker DNA da jele yüklendi. 90 voltta 3-3.5 cm yürütüldükten sonra jel görüntüleme sisteminde sonuçlar incelendi.

2. 6. %10'luk Poliakrilamid Jelin Hazırlanması

Poliakrilamid jeli dökmek için kullanılan 29x22x0,04 cm ölçülerindeki 2 cam yüzey, önce deterjan ile yıkanıp iyice durulandıktan sonra kağıt havlu ile kurulandı. Jelin döküleceği yüzeyler %70'lik etanol ve izopropanol ile silindi. Jelin döküleceği cam yüzeylerin yan kenarları arasına 0,04 cm kalınlığında 2 aralayıcı yerleştirilip, kısıkaçlar kullanılarak sabitlendi. Düzenek hazırlandıktan sonra aşağıdaki malzemelerle hazırlanan jel karışımı 50 ml'lik enjektöre çekilerek, 45° eğimle tutulan cam yüzeyler arasına karışımın donmaması ve hava kabarcığı oluşmaması için hızlı bir şekilde boşaltıldı. Jel donmadan üst kısma tarak yerleştirildi ve jel donması için 2 saat oda ısısında bekletildi.

Poliakrilamid jel için hazırlanan 50 ml'lik jel karışımı:

- _ 0,1 g amonyum persulfat (APS) + 1000 µl distile su
- _ 12,5 µl TEMED
- _ 4,9 g akrilamid
- _ 0,12 g bisakrilamid
- _ Malzemeler bir araya getirildikten sonra üzerine 0,5X TBE buffer eklenerek toplam volüm 50 ml'ye tamamlandı.

2. 7. Kandan DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda *Puregene DNA izolasyon kiti* kullanıldı. İşlem basamakları aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

1. 1,5 ml'lik ependorf tüpe 900 µl **RBC Lysis Solution** konuldu.
2. 300 µl tam kan ilave edildi. Ters yüz edilerek oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. Hücrelerin iyi bir şekilde lize olmaları için bu süre uzatıldı.
3. 16.000 rpm'de 20 saniye santrifüj edildi.
4. Tüpün dibindeki beyaz pellet ile 10-20 µl sıvı kalacak şekilde süpernatant (üst kısım) atıldı. Pellet ile sıvının karışması için 10 saniye vortekslendi.
5. 1,5 µl RNase A solution eklenip tüp vortekslendi. 37°C etüvde 20 dakika inkübe edildi.

6. Üzerine 300 µl **Cell Lysis Solution** eklenerek vortekslendi.
7. 100 µl **Protein Precipitation Solution** eklendi, bu aşamada fazla bekletilmeden 10 saniye vortekslendi.
8. 16.000 rpm'de 2-3 dakika santrifüj edildi.
9. Başka bir 1,5 ml'lik boş tüpe 300 µl % 100'lük isopropanol kondu.
10. DNA'yı içeren süpernatant kısım alınarak isopropanol üzerine ilave edildi ve içinde DNA'yı görene dek yavaşça karıştırıldı.
11. 16.000 rpm'de 2-3 dakika santrifüj edildi.
12. Süpernatant dikkatlice dökülüp ve tüpler kurutma kağıdı üzerinde kurutuldu.
13. DNA pelletini yıkamak için 300 µl %70'lik etanol ilave edilip birkaç kez ters çevrildi.
14. 16.000 rpm'de 2-3 dakika santrifüj edildi.
15. Etanol dikkatlice döküldü. Tüpler kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek kurutuldu.
16. 100 µl **DNA Hydration Solution** ilave edilip ve 5 saniye vortekslendi.
17. 65°C'de 5 dakika inkübe edildi.

Elde edilen DNA spektrofotometrede ölçüldü. Hemen kullanılmayacak olan örnekler -20C⁰ de saklandı.

2. 8. PCR Koşulları

Faktör V geninin ekzon 10 da yer alan 1691. nükleotidi olan Guanin Adenine değişimini tespit etmek amacıyla mutasyonu taşıyan 241 bazlık bölge PCR ile çoğaltıldı. Bunun için toplam 50 µl'lik PCR MİX'si hazırlandı.

FV Leiden mutasyonu için hazırlanan 50 µl'lik PCR MİX'i:

- 10X PCR Buffer 5µl
- MgCl²(25 mM) 5µl
- dNTP mix (25 mM) 0.5µl
- F primer (10 pmol) 0.65µl
- R primer (10 pmol) 0.65µl

- Taq DNA polimeraz 0.5µl
- dH₂O 32.7µl
- Kalıp DNA 5µl

Ependorf tüpler içinde hazırlanan mix pipetaj ve kısa bir santrüfuj işleminden sonra ısı döngüsü aşağıdaki şekilde hazırlanmış olan Thermal Cycler'a yerleştirildi.

FV Leiden mutasyonu için hazırlanan Thermal Cycler ısı döngüsü:

95 C ⁰	5 dk		
95 C ⁰	15 sn	}	35 döngü
58 C ⁰	1 dk		
4C ⁰	Saklama		

Protrombin geninin 14. ekzonda yer alan 3'-UTR bölgesinde bulunan 20210. nükleotitte guanin yerine adenin geçmesiyle oluşan G20210A mutasyonunu tespit etmek amacıyla mutasyonu taşıyan 506 bazlık bölge PCR ile çoğaltıldı. Bunun için toplam 50 µl'lik PCR MİX'si hazırlandı.

Protrombin G20210A mutasyonu için hazırlanan 50 µl'lik PCR MİX'i:

- 10X PCR Buffer 5µl
- MgCl₂(25 mM) 5µl
- dNTP mix (25 mM) 0.5µl
- F primer (10 pmol) 0.5µl
- R primer (10 pmol) 0.5µl
- Taq DNA polimeraz 0.5µl
- dH₂O 33µl
- Kalıp DNA 5µl

Ependorf tüpler içinde hazırlanan mix pipetaj ve kısa bir santrüfuj işleminden sonra ısı döngüsü aşağıdaki şekilde hazırlanmış olan Thermal Cycler'a yerleştirildi.

Protrombin G20210A mutasyonu için hazırlanan Thermal Cycler ısı döngüsü:

95 C ⁰	5 dk		
95 C ⁰	15 sn	}	35 döngü
58 C ⁰	1 dk		
4C ⁰	Saklama		

MTHFR geninin 4. ekzon bölgesinde yer alan 677. baz olan sitozin yerine timin geçmesiyle oluşan mutasyon translasyon ürününde 226. sırada yer alan alanin yerine valinin geçmesiyle neticelenir. Baz değişimini tespit etmek amacıyla mutasyonu taşıyan 198 bazlık bölge PCR ile çoğaltıldı. Bunun için toplam 50 µl'lik PCR MİX'si hazırlandı.

MTHFR C677T mutasyonu için hazırlanan 50 µl'lik PCR MİX'i:

- 10X PCR Buffer 5µl
- MgCl²(25 mM) 5µl
- dNTP mix (25 mM) 0.5µl
- F primer (10 pmol) 0.75µl
- R primer (10 pmol) 0.75µl
- Taq DNA polimeraz 0.5µl
- dH₂O 32.5µl
- Kalıp DNA 5µl

Ependorf tüpler içinde hazırlanan mix pipetaj ve kısa bir santrüfuj işleminden sonra ısı döngüsü aşağıdaki şekilde hazırlanmış olan Thermal Cycler'a yerleştirildi.

MTHFR C677T mutasyonu için hazırlanan Thermal Cycler ısı döngüsü:

95 C ⁰	5 dk		
95 C ⁰	15 sn	}	35 döngü
58 C ⁰	1 dk		
4C ⁰	Saklama		

2. 9. Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agoroz Jel De Kontrolünün Yapılması

PCR ürünleri hazırlanan %2 lik agoroz jele 5µl yükleme tamponu (Bromfenol blue) 10µl PCR ürünü olacak şekilde karıştırılarak yüklendi. 120 V da 3cm yürütüldü. UV trnsluminatörde kontrol edildi.

2. 10. Enzim Kesimi

2. 10. 1. FV Leiden İçin HindIII Enzim Kesimi

Birinci PCR dan sonra kontrol edilen ve amplifikasyon ürünü olan örneklerle HindIII enzim kesimi uygulandı. Bunun için hazırlanan mix listesi aşağıda verilmiştir.

- I. PCR ürünü 10µl
- sdH₂O 16µl
- 10X Buffer R 2µl
- HindIII 2µl

Eppendorf tüpler içinde hazırlanan karışım hafifçe pipetaj yaparak karıştırıldı ve santrüfuj yapıldı. 37C⁰ de 3 saat inkübe edildi. Sürenin sonunda elde edilen ürünler %3'lük Nusieve agoroz jelde kontrol edildi. RFLP analizi sonucunda üç farklı genotip belirlendi:

- Homozigot normal : 241 bp büyüklüğünde tek bant
- Heterezigot mutant : 241 bp, 209 bp, 32 bp büyüklüğünde 3 bant
- Homozigot mutant : 209 bp, 32 bp büyüklüğünde 2 bant

2. 10. 2. Protrombin G20210A Mutasyonu İçin HindIII Enzim Kesimi

Birinci PCR dan sonra kontrol edilen ve amplifikasyon ürünü olan örneklerle HindIII enzim kesimi uygulandı. Bunun için hazırlanan mix listesi aşağıda verilmiştir.

- I. PCR ürünü 10µl
- sdH₂O 16µl
- 10X Buffer R 2µl
- HindIII 2µl

Eppendorf tüpler içinde hazırlanan karışım hafifçe pipetaj yaparak karıştırıldı ve santrüfuj yapıldı. 37C⁰ de 3 saat inkübe edildi. Sürenin sonunda elde edilen

ürünler %3'lük Nusieve agoroz jelde kontrol edildi. RFLP analizi sonucunda üç farklı genotip belirlendi:

Homozigot normal	: 506 bp büyüklüğünde tek bant
Heterezigot mutant	: 407 bp, 384 bp, 99 bp, 23 bp büyüklüğünde 4 bant
Homozigot mutant	: 384 bp, 99 bp, 23 bp büyüklüğünde 3 bant

2. 10. 3. MTHFR C677T Mutasyonu İçin HinfI Enzim Kesimi

Birinci PCR dan sonra kontrol edilen ve aplifikasyon ürünü olan örneklere HinfI enzim kesimi uygulandı. Bunun için hazırlanan mix listesi aşağıda verilmiştir.

- I. PCR ürünü 10µl
- sdH₂O 16µl
- 10X Buffer R 2µl
- HinfI 2µl

Eppendorf tüpler içinde hazırlanan karışım hafifçe pipetaj yaparak karıştırıldı ve santrüfuj yapıldı. 37C⁰ de 3 saat inkübe edildi. Sürenin sonunda elde edilen ürünler %3'lük Nusieve agoroz jelde kontrol edildi. RFLP analizi sonucunda üç farklı genotip belirlendi:

Homozigot normal	: 198 bp, büyüklüğünde tek bant
Heterezigot mutant	: 198 bp, 175 bp, 23 bp büyüklüğünde 3 bant
Homozigot mutant	: 175 bp, 23 bp büyüklüğünde 2 bant

2. 10. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analiz *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS for Windows Release version 12, SPSS Inc. Headquarters, 223 S. Wacker Drive, 11th floor, Chicago, Illinois 60606) programı kullanılarak yapılmıştır. Tüm sonuçlar ortalama \pm standart sapma (S.D.) olarak verilmiştir. Kontrol ve çalışma grupları arasındaki yaş, canlı doğum, ölü doğum ve total abortus sayıları t-testi ile karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu ile hasta grubuna ait dataların ve hasta grubunda

mutasyon tespit edilen ve edilmeyen grupların nominal ve ordinal parametrelerinin karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanılmıştır. Bir gözdeki değer <5 ise Fisher'in ki-kare testi kullanılmıştır. P değeri <0.05 olduğunda karşılaştırılan gruplar arası farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

Tekrarlayan gebelik kaybı olan (HA) (Vaka Grubu) 110 kadın ve çocuk sahibi olup, hiç gebelik kaybı olmayan (Kontrol Grubu) 30 sağlıklı kadından EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden Puregene DNA izolasyon kiti (Gentra Systems) kullanılarak yapılan DNA izolasyonu sonrasında spektrofotometre ile ölçülerek DNA miktarı (ng/µl olarak) ve DNA'nın saflığı (260/280 nm dalga boyunda absorbanı ölçülerek) belirlendi. DNA miktarı yetersiz olan olgulardan tekrar kan alınarak DNA izolasyonu tekrarlandı.

HA grubundaki olguların yaş ortalaması 29.6 iken kontrol grubunun yaş ortalaması 32.6 dır. Kontrol grubunun yaş ortalaması çalışma grubundan istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

Yapılan pedigre de; HA grubunda 27(%24.5) kadının, kontrol grubunda ise 8(%26.7) kadının akraba evliliği yapıldığı tespit edilmiştir. Gruplar arasında akraba evliliği açısından istatistiksel fark yoktur ($p > 0.05$) (Tablo 3.1).

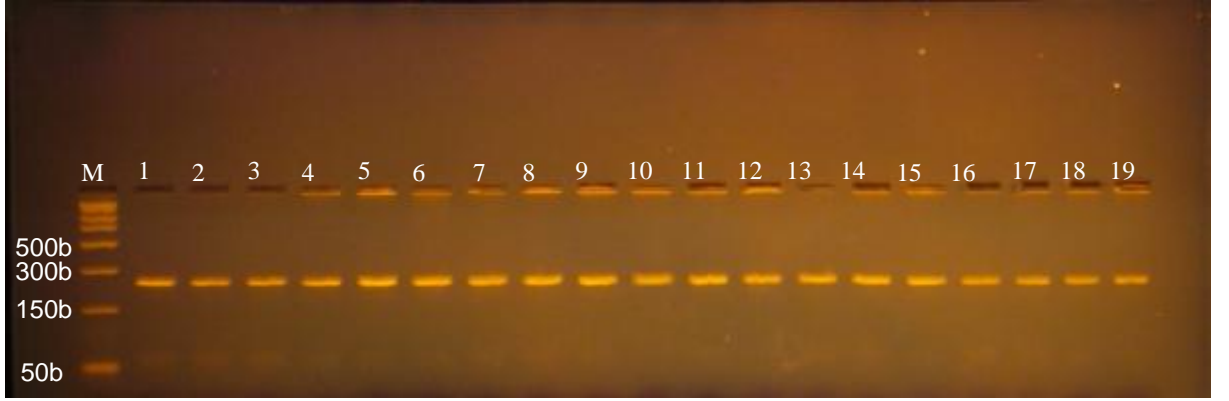
Tablo 3.1 : Gruplardaki akraba evliliği sıklıkları.

Akraba Evliliği	Var	Yok	p
HA Grubu (n=110)	27 (%24.5)	83(%75.5)	0.091
Kontrol Grubu (n=30)	8 (%26.7)	22 (73.3)	

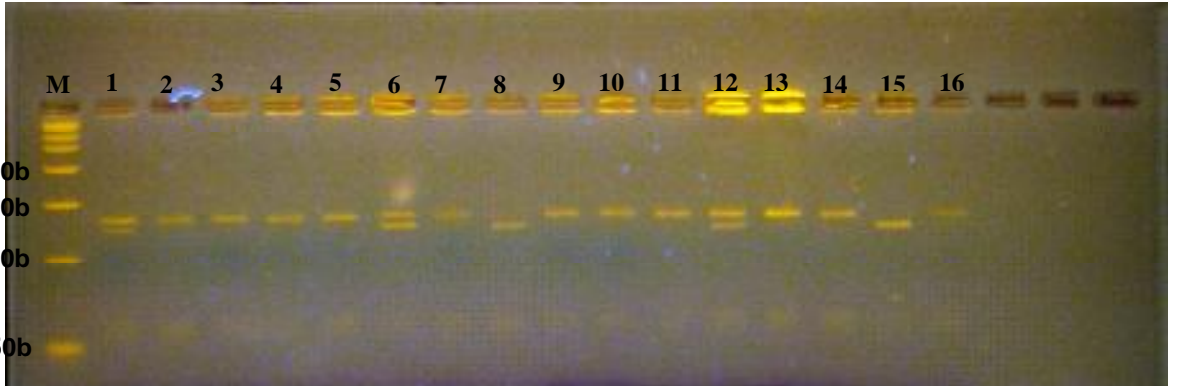
HA'lu 110 olgunun 31(%28.2) tanesinin canlı doğum ve 8(%7.3) tanesinin de ölü doğum yapıldığı tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile çalışma grubu arasında canlı doğum sayıları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken ($p < 0.05$), ölü doğum açısından iki grup arasında istatistiksel fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

FV geni 10. ekzonda 1691. bazda G/A mutasyonunu tespitinde PCR uygulaması sonucu 241 bp'lik ilk ürünün kontrolü %2'lik agoroz jelde yapılmıştır, bazı olgulara ait agoroz jel görüntüleri verilmiştir (Şekil 3. 1). Birinci PCR dan sonra kontrol edilen ve amplifikasyon ürünü olan örnekler HindIII enzim kesimi uygulandı. Ürünler %3'lük Nusieve agoroz jelde kontrol edildi (Şekil 3.2).

Homozigot normal : 241 bp büyüklüğünde tek bant
Heterozigot mutant : 241 bp, 209 bp, 32 bp büyüklüğünde 3 bant
Homozigot mutant : 209 bp, 32 bp büyüklüğünde 2 bant



Şekil 3. 1: FV Leiden 241 bp'lik amplifikasyon ürününün %2'lik agoroz jelde görüntülenmesi. M: Marker DNA(50bp, 150bp, 300bp, 500bp, 750bp, 1000bp, 1500bp, 2000bp). 1-19: Olgulara ait amplifikasyon ürünü.



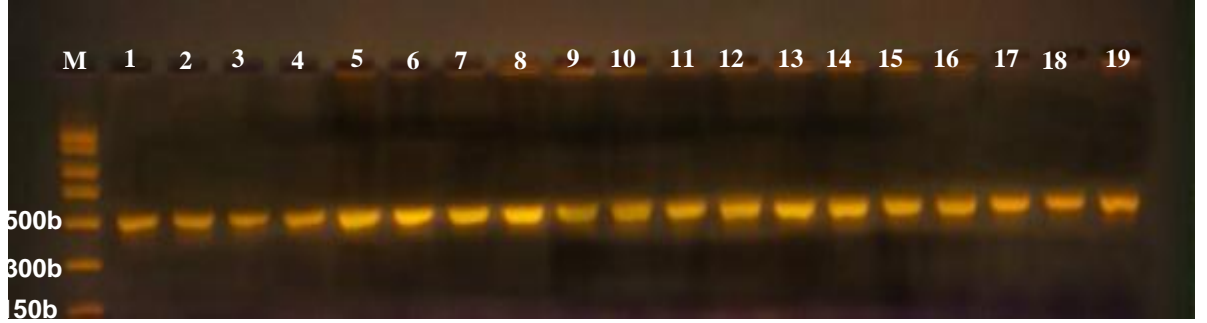
Şekil 3. 2: FV Leiden 241 bp'lik amplifikasyon ürününün HindIII enzimi ile yapılan RFLP sonuçlarının %3'lük Nusieve agoroz jelde görüntülenmesi. M: Marker DNA(50bp, 150bp, 300bp, 500bp, 750bp, 1000bp, 1500bp, 2000bp). 1-16: Olgulara ait HindIII enzim kesim ürünleri. Heterozigot mutant: 241 bp, 209 bp, 32 bp büyüklüğünde 3 bant. Homozigot mutant: 209 bp, 32 bp büyüklüğünde 2 bant.

Protrombin geninin 3'-UTR bölgesindeki 20210. bazda bulunan G/A mutasyonunun tespitinde PCR uygulaması sonucu 506 bp'lik ilk ürünün kontrolü %2'lik agoroz jelde yapılmıştır, bazı olgulara ait agoroz jel görüntüleri verilmiştir (Şekil 3. 3). Birinci PCR dan sonra kontrol edilen ve amplifikasyon ürünü olan örneklerle HindIII enzim kesimi uygulandı. Ürünler %3'lük Nusieve agoroz jelde kontrol edildi (Şekil 3. 4).

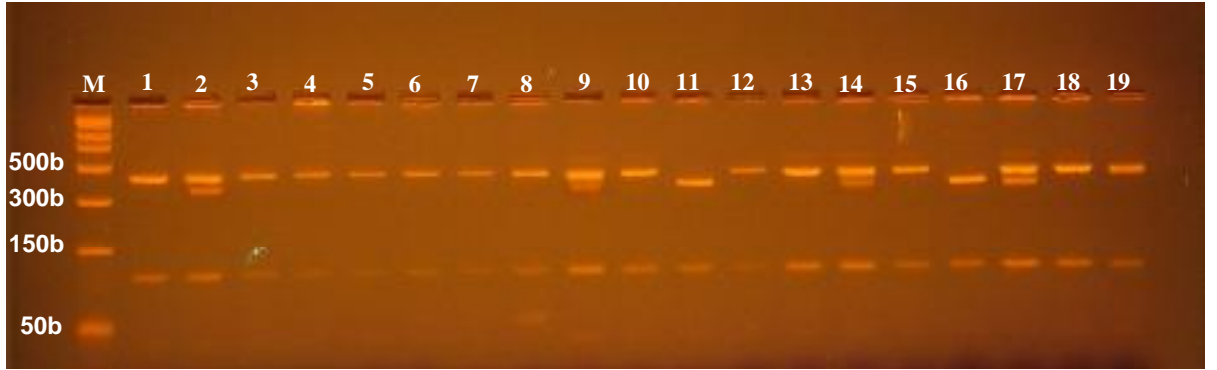
Homozigot normal : 407 bp büyüklüğünde 1 bant

Heterezigot mutant : 407 bp, 384 bp, 99 bp, 23 bp büyüklüğünde 4 bant

Homozigot mutant : 384 bp, 99 bp, 23 bp büyüklüğünde 3 bant



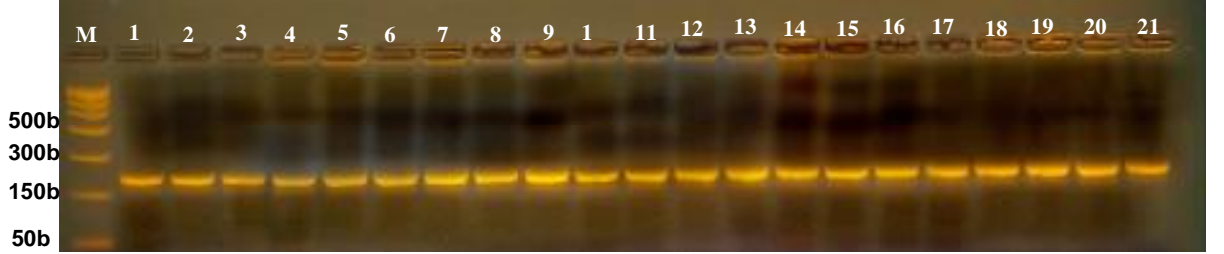
Şekil 3. 3: Protrombin G20210A mutasyonu için 506 bp'lik amplifikasyon ürününün %2'lik agoroz jelde görüntülenmesi. M: Marker DNA(150bp, 300bp, 500bp, 750bp, 1000bp, 1500bp, 2000bp). 1-19: Olgulara ait amplifikasyon ürünü.



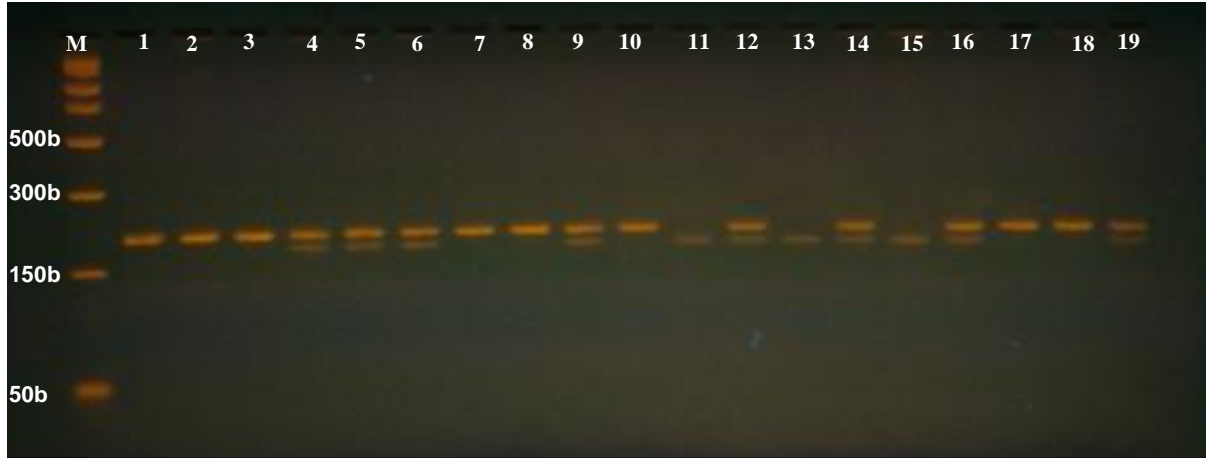
Şekil 3. 4: Protrombin G20210A mutasyonu 506 bp'lik amplifikasyon ürününün HindIII enzimi ile yapılan RFLP sonuçlarının %3'lük Nusieve agoroz jelde görüntülenmesi. M: Marker DNA(50bp, 150bp, 300bp, 500bp, 750bp, 1000bp, 1500bp, 2000bp). 1-19: Olgulara ait HindIII enzim kesim ürünleri. Homozigot normal: 407 bp, 99 bp büyüklüğünde 2 bant. Heterezigot mutant: 407 bp, 384 bp, 99 bp, 23 bp büyüklüğünde 4 bant. Homozigot mutant: 384 bp, 99 bp, 23 bp büyüklüğünde 3 bant. 2, 9, 14, 17 nolu örnekler heterozigot mutasyonu olan, 11, 16 nolu örnekler homozigot mutasyonu olan (çalışmaya dahil olmayan) olgulara ait ürünler.

MTHFR geninin 4. ekzon bölgesindeki 677. bazda bulunan C/T mutasyonunun tespitinde PCR uygulaması sonucu 198 bp'lik ilk ürünün kontrolü %2'lik agoroz jelde yapılmıştır, bazı olgulara ait agoroz jel görüntüleri verilmiştir (Şekil 3. 5). Birinci PCR dan sonra kontrol edilen ve amplifikasyon ürünü olan örnekler Hinf I enzim kesimi uygulandı. Ürünler %3'lük Nusieve agoroz jelde kontrol edildi (Şekil 3. 6).

Homozigot normal : 198 bp, büyüklüğünde tek bant
Heterozigot mutant : 198 bp, 175 bp, 23 bp büyüklüğünde 3 bant
Homozigot mutant : 175 bp, 23 bp büyüklüğünde 2 bant



Şekil 3. 5: MTHFR C677T mutasyonu için 198 bp'lik amplifikasyon ürününün %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi. M: Marker DNA(50bp, 150bp, 300bp, 500bp, 750bp, 1000bp, 1500bp, 2000bp). 1-21: Olgulara ait amplifikasyon ürünü.



Şekil 3. 6: MTHFR C677T mutasyonu 198 bp'lik amplifikasyon ürününün Hinfl enzimi ile yapılan RFLP sonuçlarının %3'lük Nusieve agaroz jelde görüntülenmesi. M: Marker DNA(50bp, 150bp, 300bp, 500bp, 750bp, 1000bp, 1500bp, 2000bp). 1-19: Olgulara ait Hinfl enzim kesim ürünleri. Homozigot normal: 198 bp, büyüklüğünde tek bant. Heterozigot mutant: 198 bp, 175 bp, 23 bp büyüklüğünde 3 bant. Homozigot mutant: 175 bp, 23 bp büyüklüğünde 2 bant. 4, 5, 6, 9, 12, 14, 16, 19 nolu örnekler heterozigot mutasyonu olan, 11, 13, 15 nolu örnekler homozigot mutasyonu olan olgulara ait ürünler.

110 HA'lu kadın ve 30 sağlıklı, hiç gebelik kaybı olmayan kadından oluşan toplam 140 olgunun FV Leiden, Protrombin ve MTHFR genotipleri PCR-RFLP yöntemi ile belirlendi. 110 HA'lu kadının 15(%13.6) tanesinde, kontrol grubunda ise 30 olgunun 2(%6.7) tanesinde FV Leiden mutasyonu tespit edilmiştir. Gruplar arasında FV Leiden mutasyonu bulunma sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.5$) (Tablo 3. 2). Protrombin (G20210A) mutasyonu HA grubunda 7(%6.4) olguda tespit edilirken, kontrol grubunda ise 2(%6.7) olguda

tespit edilmiştir. Gruplar arasında Protrombin (G20210A) mutasyon bulunma sıklığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 3.3). MTHFR mutasyonu HA olgularının 61(%55.5) tanesinde tespit edilirken kontrol grubun da 16(%53.3) olguda bulunmuştur. Kontrol grubu ile HA grubu MTHFR mutasyonu bulunma sıklığı açısından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.$) (Tablo 3.4).

Tablo 3. 2: HA ve kontrol grubunda FV Leiden (G1691A), mutasyonu bulunma sıklığı.

Gruplar	GG Genotip Sıklığı (n/%)	GA Genotip Sıklığı (n/%)	AA Genotip Sıklığı (n/%)
HA (n=110)	95(%86.4)	12(%10.9)	3(%2.7)
Kontrol (n=30)	28(%93.4)	2(%6.7)	0

Tablo 3. 3: HA ve kontrol grubunda Protrombin (G20210A), mutasyonu bulunma sıklığı.

Gruplar	GG Genotip Sıklığı (n/%)	GA Genotip Sıklığı (n/%)	AA Genotip Sıklığı (n/%)
HA (n=110)	103(%93.6)	7(%6.4)	0
Kontrol (n=30)	28(%93.4)	2(%6.7)	0

Tablo 3. 4: HA ve kontrol grubunda MTHFR (C677T), mutasyonu bulunma sıklığı.

Gruplar	CC Genotip Sıklığı (n/%)	CT Genotip Sıklığı (n/%)	TT Genotip Sıklığı (n/%)
HA (n=110)	49(%44.5)	49(%44.5)	12(%10.9)
Kontrol (n=30)	14(%46.7)	14(%46.7)	2(%6.7)

HA'lu 110 olgudan FV Leiden mutasyonunu taşıyan 15 kadının 4(%26.7) tanesinde canlı doğum, mutasyon taşımayan 95 kadının 26(%27.4) tanesinde canlı doğum ve 7(%7.4) tanesinde ölü doğum bulunmaktadır, aralarında istatistiksel anlamlı bir fark yoktur (canlı doğum; $p=0.9$, ölü doğum; 0.55).

FV Leiden mutasyonu taşıyan 15 kadının toplam abortus sayısı 46 iken mutasyon bulunmayan 95 kadının toplam abortus sayısı 297 dir. Mutasyon taşıyan ve taşımayan kadınlar arasında abortus sayısı bakımından anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0.05$). HA'lu olgularda abortus sayısı ile mutasyon bulunma sıklığı Tablo 3. 5 verilmiştir. Birinci trimesterde abortusu olan kadın sayısı 110 olup bunlardan 15(%13.6) tanesinde FV leiden mutasyonu bulunmuştur. İkinci trimester gebelik kaybı olan kadınsayısı 16 olup bunlardan sadece 2(%12.5) tanesinde mutasyon tespit edilmiştir. Üçüncü trimesterde gebelik kaybı olan kadın sayısı ise 5 olup, bunlardan 1(%20) tanesinde mutasyon tespit edilmiştir. Trimesterlar arasında FV Leiden mutasyonunun bulunma sıklığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 3. 5: HA grubunda abortus sayısı ile FV Leiden mutasyon bulunma sıklığı.

		FV		Toplam
		Mutasyon Yok	Mutasyon Var	
Abortus Sayısı	2	38	9(%19.1)	47
	3	30	2(%6.3)	32
	4	14	2(%12.5)	16
	5	6	0	6
	6	5	1(%16.7)	6
	7	1	0	1
	8	1	1(%50)	2
Toplam		95	15(13.6)	110

$P>0.05$

HA'lu 110 olgunun Protrombin mutasyonunu taşıyan 7 kadından 3(%42.9) tanesinin canlı doğumu ve 2(%28.6) tanesinde ölü doğum bulunurken, mutasyon taşımayan 103 kadının 28(%27.2) tanesinde canlı doğum ve 5(%4.9) tanesinde ölü doğum bulunmaktadır, canlı doğum yapma sıklığı açısından aralarında anlamlı fark yokken ($p>0.05$), ölü doğum yönünden mutasyon taşıyan ve taşımayanlar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Protrombin mutasyonu taşıyan 7 kadının toplam abortus sayısı 23 iken mutasyon bulunmayan 103 kadının toplam abortus sayısı 320 dir. Mutasyon taşıyan ve taşımayan kadınlar arasında abortus sayısı bakımından anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 3. 6). Birinci trimesterde abortusu olan kadın sayısı 110 olup bunlardan 7(%6.4) tanesinde Protrombin mutasyonu bulunmuştur. İkinci trimester gebelik kaybı olan kadınsayısı 16, üçüncü trimesterde gebelik kaybı olan

kadın sayısı 5 olup hiç birinde mutasyon tespit edilmemiştir. Trimesterlar arasında Protrombin mutasyonunun bulunma sıklığına bakıldığında birinci trimesterde gebelik kaybı olan kadınlarda daha yüksek bulunmuştur, bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

HA'lu 110 olgu da MTHFR mutasyonunu taşıyan 61 kadının 17(%27.7) tanesinin canlı doğumu ve 3(%4.9) tanesinde ölü doğum bulunurken, mutasyon taşımayan 49 kadının 14(%28.6) tanesinde canlı doğum ve 4(%8.2) tanesinde ölü doğum bulunmaktadır, canlı ve ölü doğum yapma sıklığı açısından aralarında anlamlı fark tespit edilmemiştir (canlı doğum; $p>0.05$, ölü doğum; $p>0.05$).

Tablo 3. 6: HA grubunda abortus sayısı ile Protrombin mutasyon bulunma sıklığı.

Abortus Sayısı	Protrombin		Toplam
	Mutasyon Yok	Mutasyon Var	
2	44	3	47
3	31	1	32
4	14	2	16
5	6	0	6
6	5	1	6
7	1	0	1
8	2	0	2
Toplam	103	7	110

$p>0.05$

MTHFR mutasyonu taşıyan 61 kadının toplam abortus sayısı 184 iken mutasyon bulunmayan 49 kadının toplam abortus sayısı 159 dur. Diğer iki mutasyonda olduğu gibi bu mutasyonda da mutasyon taşıyan ve taşımayan kadınlar arasında abortus sayısı bakımından anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 3. 7). Birinci trimesterde abortusu olan kadın sayısı 110 olup bunlardan 61(%55.5) tanesinde MTHFR mutasyonu bulunmuştur. İkinci trimester gebelik kaybı olan kadınsayısı 16 olup bunlardan 9(%56.3), üçüncü trimesterde gebelik kaybı olan kadın sayısı 5 olup bunlardan 1(%20) tanesinde mutasyon tespit edilmiştir. Trimesterlar arasında MTHFR mutasyonunun bulunma sıklığına bakıldığında 1. ve 2. trimester arasında mutasyon bulunma sıklığı farklı bulunmazken, 1. ve 3., 2. ve 3. trimesterler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). 1. trimesterde %55.5, 2. trimesterde %50, 3. trimesterde %20 vakada mutasyon tespit edilmiştir.

Tablo 3. 7: HAgrubunda abortus sayısı ile MTHFR mutasyon bulunma sıklığı.

Abortus Sayısı	MTHFR		Toplam
	Mutasyon Yok	Mutasyon Var	
2	21	26	47
3	11	21	32
4	7	9	16
5	6	0	6
6	3	3	6
7	0	1	1
8	1	1	2
Toplam	49	61	110

p>0.05

4. TARTIŞMA

Tekrarlayan gebelik kayıplarında çeşitli etyolojik faktörler sayılmaktadır. Ebeveynlere ait anormal karyotipler ve antipfosfolipid antikolar bu etkenler içinde ilk sayılanlar olmakla birlikte kan koagülasyon sisteminin düzenli çalışmasında sağlıklı bir gebeliğin devamı için önemlidir. Çünkü sağlıklı bir gebelikte sağlıklı bir uteroplasental dolaşım olması mutlakdır (118). Tekrarlayan gebelik kayıplarıyla ilgili yapılan çalışmalarda yaklaşık olarak %7 kromozomal anomaliler, %10 anatomik sorunlar, %15 hormonal düzensizlikler, %6 açıklanamayan sebepler ve %55-62 koagülasyon protein/platelet kusurları olarak bildirilmektedir (119). Erken plasenta dekolmanı, fetal ölüm, fetal gelişme geriliği ve preeklampsinin nedenleri arasında en büyük yeri maternal-fetal dolaşımın tam olmaması almaktadır. Bunun da hemostaz ve vaskülarizasyon dağılımındaki anormalliklerle ilişkili olduğu bilinmektedir (120). Koagülasyon faktörleri olan protein C, protein S ve antitrombin III eksikliği yaygın bir koagülasyon problemi (121, 122). Tüm bunlara ilaveten koagülasyon sisteminde aksaklığa neden olacak genetik kusurların son dönemde önemi daha iyi anlaşılmıştır. Bunlar arasında en sık ilişkilendirilen Faktör V, Protrombin ve MTHFR genlerinde yer alan bazı mutasyonlardır.

Bu çalışmada iki ve üzerinde gebelik kaybı olan 110 kadın ve hiç gebelik kaybı olmayan, sağlıklı çocuk sahibi olan 30 kadında FV Leiden, Protrombin ve MTHFR gen mutasyonlarının varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma grubumuzdaki tekrarlayan gebelik kaybı olan 110 kadının 31(%28.2) tanesinin canlı doğum ve 8(%7.3) tanesinde ölü doğum yaptığı tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile vaka grubu arasında canlı doğum sayıları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken ($p<0.05$), ölü doğum açısından iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Çalışmaya dahil ettiğimiz HA'lu kadınların yaş ortalaması 29.6 iken kontrol grubunda 32.6 dır, kontrol grubundaki yaş ortalaması daha yüksek olmakla birlikte, kontrol grubunun oluşturulmasındaki kriter hiç gebelik kaybı olmadan çocuk sahibi olmaktır. Bu nedenle bu grubu oluşturan kadınların yaş ortalaması daha yüksek olmasının DNA daki mutasyonu etkilemeyeceği gerçeğiyle çalışılmıştır ve iki grup arasındaki yaş farkı önemsizdir.

Erken gebelik kayıplarında genetik düzensizlikler önemli bir faktördür, özellikle akraba evliliklerinde toplumda insidansı düşük olan resesif genetik kusurların homozigot olarak bir araya gelme olasılıkları artmaktadır. Bu durum yaşama bağdaşmayan fetusların oluşma insidansını artırarak erken gebelik kayıplarına neden olmaktadır. Bu nedenle çalışma gruplarımızdaki oluşan gebelik kayıplarını bu ihtimalden uzaklaştırabilmek için akraba evliliği yönünden birbirinden fark olamayacak şekilde değerlendirerek tespit edilmiştir. 110 olguluk HA grubunda akraba evliliği yapan sayısı 27(%24.5) iken 30 sağlıklı kadından oluşan kontrol grubunda 8(%26.7) tane akraba evliliği olduğu tespit edilmiştir. Aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

FV Leiden mutasyonu kalıtsal tromboz nedenlerinin başında yer almaktadır (59, 61). FV geninin 10. ekzonunda 1691. nükleotidde *guanin* yerine *adenin* geçmesi ile oluşan (G1691A) mutasyon gen ürünüde 506. aminoasit olan *argininin glutamine* değişmesine neden olur. Bu da doğal antikoagülan olan protein C ye karşı bir direnç oluşturur (123). FV Leiden mutasyonunun toplumdaki sıklığı heterozigot %5, homozigot %0.05 olarak bildirilmiştir (32, 39, 49). Türk toplumunda yapılan bir çalışmada FV Leiden mutasyon sıklığı %10 olarak bildirilmiştir (124).

Çalışmamızda 110 tanesi tekrarlayan gebelik kaybı (HA) olan kadın, 30 tanesi gebelik kaybı olmayan, sağlıklı toplam 140 kadın da FV Leiden mutasyonu PCR-RFLP yöntemiyle incelenmiştir. Vaka grubunda mutasyon sıklığı %13.6(n=15) bulunurken, kontrol grubunda %6.7(n=2) bulunmuştur. HA grubundaki mutasyon sıklığı kontrol grubundan daha yüksek yüzdeyle bulunmakla birlikte aralarındaki fark istatistik olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). HA grubunda G/A genotip sıklığı %10.9 iken A/A genotip sıklığı %2.7 dir. Kontrol grubunda tespit edilen mutasyonların tümü ise G/A genotipindedir.

Pauer ve arkadaşlarının 2003 yılında benzer vaka grubunda yaptıkları çalışmada FV Leiden mutasyon sıklığı vaka grubunda %11.9 bulunurken kontrol grubunda %7.4 bulunmuştur. Vaka ve kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı fark belirlenememiştir (125). Carp ve arkadaşlarının vaka-kontrollü benzer çalışmasında mutasyon sıklığı %6.1 (126), Tal J ve arkadaşlarının çalışmasında ise bu oran %14 (127) olarak bildirilmiştir. Aksoy ve arkadaşlarının ülkemizde benzer hasta grubunda vaka-kontrollü yaptıkları çalışmada hasta grubunda %24.4 ve kontrol

grubunda %10 mutasyon tespit etmişlerdir (128). Aksoy'un çalışmasında da kontrol ve vaka grubu arasındaki mutasyon sıklığı çalışmamızda olduğu gibi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (128).

Yapılan pek çok çalışmada topluluklar arasından FV Leiden mutasyon bulunma sıklığı farklı tespit edilmiştir. Hollanda da %2.9, Yunanistan da %13.3, Amerika da Afrika kökenli olanlarda %1.4, beyaz ırkta %6 olarak bildirilmiştir (53, 124).

Bu çalışmada HA grubunda FV Leiden mutasyonunun bulunma sıklığının gebelik kaybı sayısı ile olan ilişkisine bakıldığında mutasyonun azalan yüzdelerle sırasıyla sekiz, iki, altı, dört ve üç gebelik kaybında olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.2).

Bir çok çalışmada özellikle ikinci trimester gebelik kaybının olduğu hastalarda mutasyonun daha yüksek sıklıkta bulunduğu gösterilmiştir (5, 129-132). Bu çalışmada FV Leiden mutasyonu üçüncü trimester gebelik kaybı olanlarda %20, birinci trimester gebelik kaybı olanlarda %13.6 ve ikinci trimester gebelik kaybı olan kadınlarda %12.5 tespit edilmiş olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Benzer sonuç Kutteh ve Aksoy'un vaka kontrollu yaptıkları çalışmalarında da verilmiştir (132, 133). Pauer ve arkadaşlarının çalışmasında da geç gebelik kayıplarında mutasyon sıklığının diğer trimester kayıplarından fazla olmakla birlikte anlamlı bulunmadığı bildirilmiştir (125). Pek çok çalışmada FV Leiden mutasyonunun ikinci trimesterde daha yüksek bulunmasının oluşan koagülasyon problemlerinin uteroplental dolaşımı bozmasıyla gebelik kayıplarına neden olduğunu bildirmekle birlikte sonuçlarımız bunu doğrulamadı.

Protrombin 20210 mutasyonu kalıtsal venöz trombozda önemli bir diğer risk faktörüdür. FV Leiden den sonra en sık karşılaşılan mutasyondur. Protrombin geninin translasyonu yapılmayan 3' bölgesinde bulunan 20210. baz olan *guanin* yerine *adeninin* geçmesiyle oluşur (58, 69, 134). Mutasyonu taşımayanlarla heterozigot taşıyanlarda yapılan çalışmalarda plazma protrombin miktarında farklılık tespit edilmiştir. G/G genotiplilerde %1.05U/ml, G/A genotipli bireylerde ise %1.32U/ml olduğu mutasyona bağlı plazma protrombin seviyesinde artış olduğu bildirilmiştir (41, 69, 134). Mutasyonun toplumda bulunma sıklığı %2-2.3 olarak bazı çalışmalarda bildirilmiştir (135).

Çalışmamızda Protrombin (G20210A) mutasyonu vaka grubunda 7(%6.4) olguda tespit edilirken, kontrol grubunda 2(%6.7) olguda tespit edilmiştir. Gruplar arasında Protrombin (G20210A) mutasyon bulunma sıklığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 3. 3). Vaka ve kontrol grubunda tespit edilen mutasyonların hepsi G/A dır. M.L. Wramsby ve arkadaşlarının çalışmasında HA kadınlarda mutasyon oranı kontrol grubundan farklı bulunmamışlardır (65). Aksoyun çalışmasında ise vaka grubunda mutasyon sıklığı %0 olarak bulunurken, kontrol grubunda %4 olarak tespit edilmiştir (128). Dilley ve arkadaşlarının çalışmasında da çalışmamıza benzer şekilde vaka ve kontrol grubu arasında protrombin mutasyon sıklığı açısından anlamlı fark bulunamamıştır (136). Coulam ve arkadaşlarının en az iki gebelik kaybı olan 150 kişilik çalışmasında gruplar arasında mutasyon prevalansında fark tespit edilmemiştir (115). Goodman ve arkadaşlarının 2006 yılındaki 550 olguluk vaka kontrollü çalışmalarında ise Protrombin için gruplar arası anlamlı fark bildirmişlerdir (137). Benzer sonuçlar farklı çalışma gruplarında da verilmiştir (115, 138). Pauer 101 hasta ve 122 kontrol grubundan oluşan çalışmasında Protrombin mutasyon sıklığını HA grubunda %2, kontrol grubunda %2,5 olarak bildirmiştir (125).

HA grubundaki 110 olgunun Protrombin mutasyonunu taşıyan 7 kadından 3(%42.9) tanesinin canlı doğumu ve 2(%28.6) tanesinde ölü doğum bulunurken, mutasyon taşımayan 103 kadının 28(%27.2) tanesinde canlı doğum ve 5(%4.9) tanesinde ölü doğum bulunmaktadır, canlı doğum yapma sıklığı açısından gruplar arasında anlamlı fark yokken ($p>0.05$), ölü doğum yönünden mutasyon taşıyan ve taşımayanlar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). Mutasyon taşıyan ve taşımayan kadınlardaki gebelik kaybı sayısına bakıldığında ise bir fark bulunamamıştır (Tablo 3. 6).

Birinci trimesterde gebelik kaybı olan kadın sayısı 110 olup bunlardan 7(%6.4) tanesinde Protrombin mutasyonu bulunmuştur. İkinci trimester gebelik kaybı olan kadınsayısı 16, üçüncü trimesterde gebelik kaybı olan kadın sayısı 5 olup hiç birinde mutasyon tespit edilmemiştir. Trimesterlar arasında Protrombin mutasyonunun bulunma sıklığına bakıldığında birinci trimesterde gebelik kaybı olan kadınlarda daha yüksek bulunmuştur, bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

Kalıtsal trombofili nedenleri arasında yer alan Protrombin G20210A mutasyonu dolaşımdaki protrombin miktarının artışına neden olmaktadır (139). Bu

mutasyonla ilgili çalışmalar FV Leiden kadar fazla olmamakla birlikte son yıllarda dikkat çekici ölçüde artmıştır. Çalışmamızda tekrarlayan gebelik kaybı ve protrombin mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulamadık. Çalışma sonuçlarımız Pauer, Kutteh ve Wrambsy'un çalışma sonuçlarıyla paralellik göstermektedir (106, 125, 140).

Bu çalışmada da olduğu gibi, Protrombin G20210A mutasyonunun özellikle 12. gebelik haftasından önceki oluşan kayıplarda risk oluşturduğu ve kontrol grubuna göre 2-8 kat fazla sıklıkta bulunduğu bazı araştırmacılar tarafından bildirilirken, (141, 142), Kutteh ve arkadaşları ise çalışmalarında erken gebelik kayıpları ve Protrombin mutasyonu sıklığı ile bir ilişki kuramamışlardır (143).

Metilenhidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi folat metabolizmasında önemli bir göreve sahiptir. Bu enzim 5,10 metilen tetrahidrofolatı 5-metil tetrahidrofolata dönüştürür. 5-metil tetrahidrofolat DNA metilasyonunda ve metiyonin sentezinde metil grubu kaynağıdır. 5,10 metilen tetrahidrofolat pürin sentezinde ve deoksiüridilatın timidilata dönüşümünde kullanılır (144-148).

MTHFR C677T mutasyonu nokta mutasyonu olup, genin 677. bazı olan sitozin yerine timin geçmesiyle oluşur. Bu mutasyon sonucu MTHFR enziminin aktivitesinde azalma olur ve bunun sonucu olarak 5-metil tetrahidrofolat düzeyi azalmakta, 5,10-metilen tetrahidrofolat miktarı ve plazma homosistein düzeyi önemli oranda artmaktadır (83-87, 144-148). Hiperhomosisteinemi tromboz, pek çok kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalık için risk oluşturur (81).

Bu çalışmada değerlendirilen HA'lu kadınların 61(%55.5) tanesinde MTHFR (C677T) mutasyonu tespit edilmiştir, bunlardan 49(%44.5) tanesi C/T, 12(%10.9) tanesi T/T genotipine sahiptir. Kontrol grubunda ise 16(%53.3) olguda mutasyon tespit edilmiştir, bunlardan 14(%46.7) tanesi C/T, 2(%6.7) tanesi T/T genotipine sahiptir. HA'lu hasta grubu ile kontrol grubu MTHFR mutasyonu bulunma sıklığı açısından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p \geq 0.05$) (Tablo 3.4). Yapılan çalışmalarda MTHFR mutasyonunun bulunma sıklığının istatistiksel olarak vaka ve kontrol grubunda farklı olmadığı ancak T/T genotipinin vaka grubunda daha yüksek sıklıkta bulunduğu bildirilmiştir (115, 137, 142, 143, 149, 150). Nelen ve arkadaşları HA'u olan kadınlarda %16 homozigot MTHFR mutasyon sıklığı tespit ederken, kontrol grubunda %5 olarak tespit etmişlerdir, MTHFR genindeki homozigotluğun HA riskini 3 kat artırdığını

bildirmişlerdir (151, 152). Goodman ve arkadaşlarının 550 HA'lu olguyla yaptıkları çalışmada MTHFR mutasyon sıklığının kontrol grubundan farklı olmadığını ancak homozigot mutasyon taşıyanların kontrol grubundan anlamlı derecede fazla olduğunu bildirmişlerdir (137). Holmes ve arkadaşlarının 137 HA'lu kadında yaptığı çalışmada gebelik kaybı ve MTHFR mutasyonu arasında ilişki saptamamışlardır (153). Bizim çalışmamızda da en yüksek homozigot mutasyon sıklığı MTHFR mutasyonunda tespit edilmiş olup vaka grubundaki sayısı kontrol grubundan daha yüksektir (Tablo 3.4). Bu mutasyonu taşıyan ve taşımayan kadınlardaki gebelik kaybı sayısına bakıldığında diğer iki mutasyonda olduğu gibi aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 3.7). Trimesterler arasında MTHFR mutasyonu bulunma sıklığına bakıldığında en yüksek mutasyon sıklığı birinci trimester da gebelik kaybı olan kadınlarda tespit edilmiştir.

Çalışılan bu üç mutasyonun trombotik olayların riskini yükselttiği pek çok araştırmacı tarafından bildirilmektedir (154-156). Bu mutasyonlar ve tekrarlayan gebelik kaybının patogenezi düşünüldüğünde olgu sayısı fazla olan çalışmalarda sadece FV Leiden mutasyonu ile korelasyon bildirilmiştir, FV Leidenin HA'a yatkınlık nedeni olduğunu bildiren pek çok çalışma bulunmakla birlikte (130, 157-159) ilişki bildirmeyen çalışma grupları da bulunmaktadır (143, 160-162). Bu çelişki hasta ve kontrol grubu seçim kriterleri farklılıklarından kaynaklanmış olabilir. Balasch ve Kutteh in sadece birinci trimesterdaki HA vakalarında yaptıkları taramada FV Leiden açısından fark bildirmemişlerdir (143, 160). Bu sonucun nedeni olarak erken gebelik kayıplarının yaklaşık %50'sinin sitogenetik anomalilerden kaynaklanıyor olamasıdır diye düşünülebilir (163). FV Leiden ve HA çalışmalarının çoğu 2. trimester gebelik kaybı olan ve plasental yetersizlikleri olan kadınlar arasında anlamlı oranda yüksek mutasyon oranı bildirmişlerdir (130, 159, 164).

Wramsby ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları 36 kişilik bir çalışmada HA için olası diğer nedenler değerlendirme dışı bırakılmış ve FV Leiden mutasyon sıklığı %27.8 olarak bulunmuştur (140). 1000 HA olan kadını içeren Rai ve arkadaşlarının çalışmasında da mutasyon sıklığı ve gebelik kayıpları arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamıştır (102).

Tekrarlayan Gebelik kayıplarının etyolojisinde kazanılmış trombofilinin rolü kabul edilmiş olsada (166), kalıtsal trombofililerin işe karışması tam net değildir

(167). Litarütürde tartışma sonuçlarının çelişkili raporları en yaygın üç kalıtsal trombofililerin mutasyonlarının prevalansı ile ilgilidir; FV, Protrombin ve MTHFR.

Kalıtsal trombofilide en yaygın bulgu FV Leiden Mutasyonudur (168). Bu nokta mutasyonu aktive edilmiş FV'in aktive edilmiş protein C tarafından yıkılmasına kısmi olarak dirençli hale getirir. Protrombin aktivitesini devam ettirerek hiper koagüle bir duruma yol açar. FV Leiden'in taşıyıcılarının kontrol grubuna göre 2-3 kez daha yüksek risk gösterdiğini prospektif çalışmalar belirtmiştir (169, 170). Kalıtsal trombofilinin ikinci en yaygın şekli Protrombin G20210A polimorfizmidir (139) bu mutasyon dolaşımdaki Protrombin konsantrasyonunu artırır. 12 haftadan daha düşük olan gebeliklerde, kısmi düşük riski kontrollerle kıyaslandığında protrombin mutasyonu olan kadınlarda 2-8 kat yüksek olarak bildirilmiştir (130, 143).

MTHFR homosisteinin metionine yeniden metile olmasını katalizler, yüksek homosistein seviyeleri MTHFR genindeki pek çok mutasyondan kaynaklanır ve trombozis için risk faktörü olarak tanımlanmıştır (171). C677T mutasyonunun HA olgularındaki etkileri çelişkilidir, HA' u olan hastalar kontrollere göre MTHFR mutasyonları için 2-3 kat daha fazla homozigotturlar (142, 151). Diğer trombofilik faktörler birlikte düşünüldüğünde MTHFR mutasyonunun gebelik kaybı riskini anlamlı dercede artırdığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir (130, 172, 173).

Son yıllarda trombofilik mutasyonlara yenileri eklenmektedir. Bu mutasyonlar arasında FV (G1691A, Y1702C ve H1299R), Faktör II Protrombin G20210A, Faktör XIII V34L, β -fibrinogen-455G/A, PAI-1 4G/5G, HPA 1 a/b (L33P), MTHFR (C677T ve A1298C) (111-115).

Bu mutasyonların koroner tromboz riskini 3-4 kat artırdığı bildirilmiştir (114). Carolyn ve arkadaşlarının bu 10 mutasyonu içeren 150 HA' lu kadın ve 20 kontrol grubundan oluşan çalışmasında homozigot mutasyonların ve toplam gen mutasyonu bulunma sıklığının anlamlı dercede kontrol grubundan yüksek bulunduğu bildirilmiştir (115). Çalışılan 10 gen mutasyonunun üçünden fazlası HA' lu kadınların %68'inde görülürken, kontrollerin ise %21'in de görülmüştür (115). Homozigot mutasyonlarda HA kadınların %59'un da kontrollerin ise %10'un da görülmüş (112-115).

Bu çalışma ve benzer konulu yapılan diğer araştırma sonuçlarına bakıldığında gebelik kaybı riskinin, sipesifik bir mutasyondan çok trombofilik

mutasyonların kombine birikimine bağlı olabileceği düşünölmüştür. Bu nedenle belkide HA'lu kadınlarda daha fazla trombofilik gen mutasyonunun prevalansının araştırılması daha anlamlı olacaktır.

5. SONUÇ

Tekrarlayan gebelik kayıplarıyla ilgili yapılan çalışmalarda nedenler arasında en yüksek payı %55-62 ile koagulasyon protein/platelet kusurları alır. Bu durum erken plasenta dekolmanı, fetal ölüm, fetal gelişme geriliği ve preeklampsi olarak kliniğe yansır. Sağlıklı olmayan maternal fetal dolaşım gebelik kayıplarına neden olur. Hemostaz ve vaskülarizasyon dağılımındaki anormalliklerle ilişkili pek çok neden sayılmaktadır. Bunlar arasında kalıtsal kusurlar ilk sırayı almaktadır. Trombozla sık ilişkilendirilen kalıtsal kusurlar arasında FV Leiden, Protrombin (G20210A) ve MTHFR (C677T) mutasyonlarıdır. Bu nedenden dolayı tekrarlayan gebelik kayıpları olan 110 kadın ve sağlıklı gebelikleri olan 30 kadında bu üç mutasyon çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar şöyle sıralanabilir:

1. FV Leiden mutasyonu HA grubunda %13.6, kontrol grubunda %6.7 sıklıkta tespit edilmiştir. Gruplar arasında mutasyonun bulunma sıklığında istatistiksel anlamlı fark yoktur ($p=0.5$).
2. Protrombin (G20210A) mutasyonu HA grubunda %6.4, kontrol grubunda ise %6.7 sıklıkla tespit edilmiştir. Gruplar arasında mutasyonun bulunma sıklığında istatistiksel anlamlı fark yoktur ($p=1$).
3. MTHFR mutasyonu HA grubunda %55.5, kontrol grubunda %53.3 sıklıkla tespit edilmiştir. Gruplar arasında mutasyonun bulunma sıklığında istatistiksel anlamlı fark yoktur ($p=0.79$).

Bu çalışma ve benzer araştırma sonuçlarına bakıldığında gebelik kaybı riskinin, sipesifik bir mutasyondan çok trombofilik mutasyonların kombine birikimine bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle belkide HA'lu kadınlarda daha fazla trombofilik gen mutasyonunun prevalansının araştırılması daha anlamlı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Rainsbury RA, Viniker DA. (1998) *Practical Guide to Reproductive Medicine*, 337.
2. Roman E. (1984) Fetal loss rates and their relation to pregnancy order. *J Epidemiol Community Health* **38(1)**, 29-35.
3. Warburton, D.(1987) Reproductive loss: how much is preventable? *N Engl J Med.* **316(3)**, 158-60.
4. Wilcox A J., Weinberg C.R, O'Connor J.F. (1988) Incidence of early loss of pregnancy. *N. Engl. J. Med.* **319(4)**, 189-94.
5. Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, et al. (1997) Factor V Leiden is associated with repeated and recurrent unexplained fetal losses. *Thromb Haemost* **77(5)**, 822-4.
6. Clark DA, Lea RG, Podor T, Daya S, Banwatt D, Harley C. (1991) Cytokines determining the success or failure of pregnancy. *Ann NY Acad Sci* **626**, 524-536.
7. Clark DA, Chauat G. (1989) What do we know about spontaneous abortion mechanisms? *Am J Reprod Immunol* **19**, 28-37.
8. Clark DA. (1990) Are there immune abortions? *Res Immunol* **141**, 202-207.
9. Carp HJA, Toder V, Machiach S, Nebel L, Serr M. (1990) Recurrent miscarriage: A review of current concepts, immune mechanisms and results of treatment. *Obstet Gynecol Survey* **45**, 657-669.
10. Carr D. (1972) Cytogenetic aspects of induced and spontaneous abortioris. *Clin Obstet Gynecol.* **15**, 203-219.
11. De Braekeleer M. Dao T.N. (1990) Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum Reprod.* **5(5)**, 519-28.
12. Howard J.A. Carp. *Practical Guide to Reproductive Medicine*, Edited by P.A. Rainsbury and D.A. Viniker 1997 Parthenon Publishing Group, USA.
13. Buttram V.C.J. (1983) Mullerian anomalies and their management. *Fertil Steril.* **40(2)**, 159-63.
14. Shapiro B.S.(1988) Instrumentation in hysteroscopy. *Obstet Gynecol Clin North Am.* **15(1)**, 13-21.

15. Patton P.E.(1994) Anatomic uterine defects. *Clin Obstet Gynecol.*, **37(3)**, 705-21.
16. Jonathan S.B., Eli Y.A., Paula A.H., (Eds) (1998) *Novak Jinekoloji.12. Baskı.*
17. Brent, R.L. and Beckman, D.A. (1994) The contribution of environmental teratogens to embryonic and fetal loss. *Clin Obstet Gynecol.*, **37(3)**, 646-70.
18. Kaufman R.H., Adam E., Binder G.L., Gerthoffer E., (1980) Upper genital tract changes and pregnancy outcome in offspring exposed in utero to diethylstilbestrol. *Am J Obstet Gynecol.* **137(3)** , 299-308.
19. Speroff L., Glass R.H., Kase N.G., (Eds) (1996) *Klinik Jinekolojik Endokrinolojik ve İnfertilite. 5. baskı.*
20. Ateş H.Ö. (2001) Trombozlu hastalarda Protein C geninde mutasyon taraması. T.C. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
21. Guyton AC. (1991) Hemostasis and Blood Coagulation: (8th ed.) Textbook of Medical Physiology. *Philadelphia, An HBJ International Edition, W.D. Saunders Company.*
22. Melvin J.R. (1989) The Body's Response to Vascular Injury: An overview of hemostasis. A detailed examination of hemostasis. Thrombosis: Causes and Treatment. In: Melvin J.R, Walenga J.M., Horowitz R.N. (eds) Introduction to Hemostasis. *USA, Ortho Diagnostic Systems Presents*
23. Terzioğlu M., Yiğit G., Oruç T. (Eds) (1993) Kan Pıhtılaşması ve Kanamanın Durdurulma Mekanizmaları (Koagulasyon ve Hemostaz). *Fizyoloji Ders Kitabı Cilt II, I. Ü. C. T. F. Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.*
24. Ulutin T. (2000) Hemostaz, Koagulasyon Proteinleri veya Faktörleri, Fibrinolizis, Tromboz, In: Ulutin T., Cengiz M., Yüksel A. (Eds) *Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü, Tıbbi Biyoloji Ders Notları, Nobel Tıp Kitabevi.*
25. Turgeon M.L. (1999) Principles of hemostasis and thrombosis, Disorders of hemostasis and thrombosis, (Third edition) In:Mary Louise Turgeon (Ed). *Clinical Hematology. Philadelphia, Lippincott Williams&Wilkins (A Wolters Kluwer Company).*
26. Lane D.A, Mannucci P.M., Saver K.A., et al.(1996) Inherited Thrombophilia: Part 1.. *Thrombosis Haemostasis* **76(5)**, 651-652.

27. Kumar P., Clark M. (1994) Bleeding disorders. In: Kumar P., Clark M. (eds). *Clinical Medicine. A Textbook for medical students and doctors. London ELBS (Educational low-priest Books Scheme)*.
28. Broze G. (1995) Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* **74**, 90-93.
29. Cripe L.D., Moore K.D., Kane W.H. (1992) Structure of the Gene for Human Coagulation Factor V. *Biochemistry* **31**, 3777-3785.
30. Kane W.H., Ichinose A, Hagen F.S., Davie E.W. (1987) Cloning of cDNA's Coding for the Heavy Chain Region and Connecting Region of Human Factor V, A Blood Coagulation Factor with Four Types of Internal Repeats. *Biochemistry* **26**, 6508-6514.
31. www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM Factor V Deficiency Protrombin Deficiency.
32. Zehnder J.L., Hiraki O.O., Jones C.D., Gross N., Grumet F.C. (1999) Familial Coagulation Factor V Deficiency Caused by a Novel 4 Base Pair Insertion in the Factor V Gene, Factor V Standford. *Thrombosis Haemostasis* **82**, 1097--1099.
33. Akar N., Yılmaz E., Akar E., Deda G., Sipahi T. (2000) Factor V (His1299Arg) in young Turkish patients with cerebral infarct. *Hemostasis* **30(3)**, 118-122.
34. Brown K.P. (1999) Screening for the Factor V Leiden Mutation.. In: Perry D.J., Pas i K.J. (eds) *Hemostasis and Thrombosis Protocols. Totowa New Jersey, Humana Press Inc.*
35. Lensen R, Rosendaal F., Vandenbroucke J., Bertina R (2000) Factor V Leiden: the venous thrombotic risk in thrombophilic families. *British Journal of Hematology* **110**, 939-945.
36. Derex L., Phillippeau F., Nighoghossian N., Trouillas P., Berruyer M. (1998) Postpartum cerebral venous thrombosis, congenital protein C deficiency and activated protein C resistance due to heterozygous factor V Leiden mutation. *Journal of Neurology, Neurosurgery, Psychiatry* **65(5)**, 801-802.
37. Gerhardt A, Scharf RE., Beckmann M.W., et al. (2000) Prothrombin and Factor V Mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. *The New England Journal of Medicine* **342(6)**, 374-379.
38. Martinelli I, Bucciarelli P., Margaglione M., Stefano V.D., Castaman G., Mannucci P.M. (2000) The risk of venous thromboembolism in family

- members with mutations in the genes of factor V or prothrombin or both. *British Journal of Haematology* **111**, 1223-1229.
- 39.** Braun A., Müller B., Rosche A.A. (1996) Population study of the G1691A mutation (R50S0, FV Leiden) in the human factor V gene that is associated with resistance to activated protein C. *Human Genetics* **97**, 263-264.
- 40.** Moerloose P., Reber G., Perrier A, Pemeger T., Bounameaux H. (2000) Prevalence of Factor V Leiden and Prothrombin G20210A mutations in unselected patients with venous thromboembolism. *British Journal of Haematology* **110** , 125-129.
- 41.** Zenz W., Bodo Z., Plotho J., et al. (1998) Factor V Leiden and Prothrombin Gene G20210A Variant in Children with Ischemic Stroke. *Thrombosis Haemostasis* **80**, 763-766.
- 42.** Bertina RM., Rosendaal F.R. (1998) Venous Thrombosis- The Interaction of Genes and Environment. *The New England Journal of Medicine* **18;338;25**, 1840-1841.
- 43.** Cushman M., Rosendaal F.R, Psaty B.M., et al. (1998) Factor V Leiden is not a risk factor for arterial vascular disease in the elderly: Results from the cardiovascular study. *Thrombosis Haemostasis* **79**, 912-915.
- 44.** Eskandari M.K., Bontempo F.A., Hassett A.C., Faruki H., Makaroun M.S. (1998) Arterial Thromboembolic events in patients with the Factor V Leiden Mutation. *The American Journal of Surgery* **176**, 122-125.
- 45.** Friedline J.A., Ahmad E. E. , Garcia D., et al. (2001) Combined Factor V Leiden and Prothrombin Genotyping in Patients Presenting with Thromboembolic Episodes. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **125**, 105-111.
- 46.** Handin R.I. (1998) Disorders of the platelet and vessel wall. (14th ed).. In: Fauci AS., Braunwald E., Isselbacher J., Wilson G.D., Martin J.B., Kasper D.L., Hamner S.L., Longo D.L. (eds). *Harrison's Principles of Internal Medicine. Singapore, McGraw Hill Book Co.Inc.*
- 47.** Iliçin G, Onal S., Biberöglü K., Akalın S., Süleymanlar G.(1996) Pıhtılaşma Bozuklukları. Temel İç Hastalıkları. *Ankara. Güneş Kitabevi LTD Şti.*
- 48.** Major D.A, Sane D.C., Herrington D.M., Salem W. (2000) Cardiovascular implications of the factor V Leiden mutation. *American Heart Journal.* **140(2)**, 189-195.

49. Rosen S.B., Sturk A. (1997) Activated Protein C Resistance- A Major Risk Factor for Thrombosis. *Eur J. Clin. Chem. Clin Biochem* **35(7)**,501-516.
50. Simioni P., Prandoni P., Lensing AW.A., et al. (1997) The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with an Arg⁵⁰⁶→Gln mutation in the gene for factor V (Factor V Leiden). *The New England Journal of Medicine*. **336(6)**,399-403.
51. Younis J.S., Ohel G., Brenner B., Haddad S., Lanir N., Ben-Ami N. (2000) The effect of thrombophylaxis on pregnancy outcome in patients with recurrent pregnancy loss associated with factor V Leiden. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* **107**,415-419.
52. Iniesta J.A, Corral J., Pardo J.F., Conojero RG., Vicente V.(1997) Factor V (Arg⁵⁰⁶-+Gln) Mutation is Ischemic Cerebrovascular Disease. *Haemostasis***27**, 1 05-111.
53. Herrmann F.H., Koesling M., Schröder W., et al.(1997) Prevalence of Factor V Leiden Mutation in Various Populations. *Genetic Epidemiology***14**,403-411.
54. Rosing J, Tans G. (1997) Factor V. *Int J Biochem Cell Biol* **29(10)**, 1123-1126.
55. Bertina RM. (1997) Factor V Leiden and other coagulation factor mutations affecting thrombotic risk. *Clin Chem* **43(9)**, 1678-1683.
56. Franco RF, Reitsma PH. (2001) Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet* **109**, 369-384.
57. Esmon C.T. (2001) Anticoagulant Protein Crrhrombomodulin Pathway; Tollefsen D.M. (2001) Antitrombin Deficiency; Greenberg D.L., Devie E.W. (2001) Introduction to Hemostasis and the Vit KDependent Coagulation Factors. (8th ed). In: Scriver C.R., Beaudet AL., Sly W.S., Valle D., Childs B., Kinzler K.W., Vogelstein B. (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. USA, The Mc Graw-Hill Companies Inc.*
58. Kapur RK., Mills L.A, Spitzer S.G., Hultin M.B.(1997) A Protrombin Gene Mutation is Significantly Associated with Venous Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. **17(11)** ,2875-2879.
59. Rosendaal F.R (1999) Venous thrombosis: a multicausal disease. *The Lancet* **353 (3)** ,1167-1173.

60. Sandra J.F.D., Davie W. (1987) Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry* **26**, 6165-6177.
61. Kohlmeier R., Cho C.G., Bux RC., et al. (2000) Prothrombin Gene Mutation Uncommon in Pulmonary Embolism. *Southern Medical Journal* **93**(11), 1073-1077.
62. Sarig G, Younis JS, Hoffman R, Lanir N, Blumenfeld Z, Brenner B. (2002) Thrombophilia is common in women with idiopathic pregnancy loss and is associated with late pregnancy wastage. *Fertil Steril* **77**, 342-7.
63. Couture P., Demers C., Morissette J., et al. (1998) Type I Protein C Deficiency in French Canadians. Evidence of a founder effect and association of specific protein C gene mutations with plasma protein C levels. *Thrombosis Haemostasis* **80**, 551-556.
64. Kluijtmans L.A.J., Heijer M., Reitsma P.H., Heil S.G., Blom H.J., Rosendaal F.R. (1998), Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase and Factor V Leiden in the risk of Deep Vein Thrombosis. *Thrombosis Haemostasis* **79**,254-258.
65. Leeson T.S., Leeson C.R, Paparo A.A. (1998) Specialized Connective Tissue: Blood. Text/Atlas of Histology. *Canada W.B. Saunders International Edition*.
66. Arruda V.R., Bizzacchi J.M., Goncalves M.S., Costa F.F. (1997) Prevalance of the Prothrombin Gene Variant (nt 20210A) in Venous Thrombosis and Arterial Disease. *Thrombosis Haemostasis* **78**, 1430-1433
67. Dahlback B. (2000) Blood Coagulation. *Lancet* **355(9215)**, 1627-1632.
68. Bavikatty N.R, Killeen AA, Akel N, Normolle D., Schmaier A.H. (2000) Association of the Prothrombin G20210A mutation with FactorV Leiden in a Midwestern American Population *American Journal of Clinical Pathology* **114**, 272-275.
69. Dubreuil R.M., Dawson D.A., Münster M. (1999) Development of an internal restriction control in the PCR detection of the protrombin 20210A mutation. *Clin.Lab.Hem* **21**, 281-83.
70. Kujovich J.L., Goodnight S.H.(1998) Factor V Leiden and the Prothrombin Gene Mutation: Two Common Genetic Defects Associated with Thrombosis. *WJM* **168(6)**, 524-525.

71. Stefano V., Martinelli I., Manucci M.P., (1999) The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both Factor V Leiden and The G20210A prothrombin mutation. *The New England Journal of Medicine* **341** (11), 801-806.
72. Zawadski C., Gaveriaux V., Trillot N., et al. (1998) Homozygous G20210A Transition in the Prothrombin Gene Associated with Severe Venous Thrombotic Disease: Two Cases in a French Family. *Thromb. Haemost* **80**, 1027-1028.
73. Girolami A, Simioni P, Scarano L, Carraro G. (1999) Prothrombin and the prothrombin 20210 G to A polymorphism: their relationship with hypercoagulability and thrombosis. *Blood Rev* **13**, 205-210.
74. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R. (1998) Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), Mammalian, Genome, 9, 652-656.
75. www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=607093.
76. Botto L.D., Yang Q. (2000) 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies: A Huge Review. *Am J Epidemiol* **151**(9), 862-77.
77. Daly S.F., Molloy A.M., Mills J.L., et al. (1999) The Influence of 5,10 Methylenetetrahydrofolate Reductase Genotypes On Enzyme Activity In Placental Tissue. *Br J Obstet Gynaecol* **106** , 1214-1218.
78. Homberger G., Linnebank M., Winter C., et al. (2000) Genomic Structure and Transcript Variants of the Human Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene. *Eur J Hum Genet* **8**(9), 725-729.
79. Rozen R. (1998) Methylenetetrahydrofolate Reductase in Vascular Disease. Neural Tube Defects and Colon Cancer, S.A. *Europharma*.
80. Tonetti C., Burtscher A., Borjes 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**(5), 363-367.
81. Rady P.L., Tying S. K., Hundnall S. D., et al. (1999) Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR): The Incidence of Mutations

- C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish Population. *Am J Med Genet* **86(4)**, 380-384.
- 82.** Demuth K., Moatti N., Hanon O., et al. (1998) Opposite Effects of Plasma Homocysteine and the Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Mutation on Carotid Artery Geometry in Asymptomatic Adults. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18(12)**,1838-1843.
- 83.** Friedman G., Goldschmidt N., Friedlander Y., et al. (1999) Common Mutation A1298C in Human Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: Association with Plasma total Homocysteine and Folate Concentrations. *J Nutr* **129(9)**, 1656-1661.
- 84.** Goyette P., Rozen R. (2000) The thermolabile variant 677C-->T can further reduce activity when expressed in cis with severe mutations for human methylenetetrahydrofolate reductase. *Hum Mutat* **16(2)**, 132-8.
- 85.** Lee HA., Choi J.S, Ha KS., Yang D.H, Chang SK., Hong SY. (1999) Influence of 5,10- Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphism on Plasma Homocysteine Concentration in Patients With End-Stage Renal Disease. *Am J Kidney Dis* **34(2)**, 259-263.
- 86.** Schmitz C., Lindpainter K., Verhoef P., Gaziano JM, Buring J. (1996) Genetic Polymorphism of Methylenetetrahydrofolate Reductase and Myocardial Infarction. A case-control study. *Circulation* **94(8)**, 1812-1814.
- 87.** 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(5)**, 1258-1260.
- 88.** Sell S.M., Lagemwa P.R. (1999) Development of a Highly Accurate, Rapid PCR-RFLP Genotyping Assay for the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene. *Genet Test* **3(3)**, 287-289.
- 89.** Verhoef P, Hennekens CH, Malinow MR, Kok FJ, Willett WC, Stampfer MJ. (1994) A Prospective Study of Plasma Homocyst(e)ine and Risk of Ischemic Stroke. *Stroke* **25(10)**, 1924-1930.
- 90.** Letsky E.A., Swiet M., (1994) Maternal hemostasis coagulation problems of pregnancy. In: Loscalzo J, Schafer AI (Eds) *Thrombosis and Hemorrhage*. Blackwell Scientific Publications.

91. Hellgren M. (1996) Hemostasis during pregnancy and puerperium. *Haemostasis* **26(4)**, 224-247.
92. Ralph L., Nachman M. Silverstein R.(1993) Hypercoagulable states. *Ann Intern Med.* **119**, 819-827.
93. Tulppala, M., Bjorses. U.M., Stenman, U.H. (1991) Luteal phase defect in habitual abortion: progesterone in saliva. *Fertil Steril* **56(1)**, 41-4.
94. Hoppensteadt D.A, Jeske W., Fareed J., Bernes E.W. (1995) The role of tissue factor pathway inhibitor in the mediation of the antithrombotic actions of Heparin and low-molecular-weight-heparin. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* **6(1)**, 57-64.
95. Oosting J.D., Derksen H.W.M., Bobbink W.G. (1993) Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein c, or protein s.: An explanation for their pathogenic mechanism. *Blood* **10**, 2618-2625.
96. Kalafatis M., Mann K. (1997) Factor V leiden and thrombophilia. *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology* **17**, 620-627.
97. Faioni E.M., Razzari C, Martinelli I, Mannucci P.M. (1997) Resistance to activated protein c in unselected patients with arterial and venous thrombosis. *American journal of hematology* **55**, 59-64.
98. Clark P., Walker I.D., Greer I. (1999) Acquired activated protein-C resistance in pregnancy and association with increased thrombin generation and fetal weight. *Lancet* **353(9149)**, 292-3.
99. Ogunyemi D., Ku W., Arkel Y. (2002) The association between inherited thrombophilia, antiphospholipid antibodies and lipoprotein a levels with obstetrical complications in pregnancy. *J Thromb Thrombolysis* **14(2)**, 157-62.
100. Rey E., Kahn S.R., David M., Shrier I. (2003) Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet.* **15(361)**, 901-8.
101. Benedetto C., Marozio L., Salton L., Maula V., Chieppa G., Massobrio M. (2002) Factor V Leiden and Factor II G20210A in preeclampsia and HELLP syndrome. *Acta Obstet Gynecol Scand* **81(12)**, 1095-100.

102. Rai R., Shleba A., Cohen H., et al., (2001) Factor V Leiden and acquired activated protein C resistance among 1000 women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* **16(5)**, 961-5.
103. Brenner B., Blumenfeld Z. (1997) Thrombophilia and fetal loss. *Blood Rev* **11(2)**, 72-9.
104. Brenner B. (2000) Inherited thrombophilia and fetal loss. *Curr Opin Hematol* **7(5)**, 290-5.
105. Preston F.E., Rosendaal FR., Walker I.D., et al. (1996) Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet* **5(348)**, 913-6.
106. Kutteh W.H., Park V.M. and Deitcher S.R. (1999) Hypercoagulable state mutation analysis in white patients with early first-trimester recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* **71(6)**, 1048-53.
107. Garner P. (1995) Changes in protein c and protein s levels in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* **172**, 147-150.
108. Tengborn L., Bergqvist D., Matzsch T., Bergqvist A., Hedner U. (1989) Recurrent thromboembolism in pregnancy and puerperium. Is there a need for thromboprophylaxis? *Am J Obstet Gynecol* **160(1)**, 90-4.
109. Rai R, Cohen H., Dave M., Regan L. (1997) Randomised controlled trial of aspirin and aspirin plus heparin in pregnant women with recurrent miscarriage associated with phospholipid antibodies (or antiphospholipid antibodies). *BMJ* **314(7076)**, 253-7.
110. Sartori MT, Wiman B, Vettore S, Dazzi F, Girolami A, Patrassi GM. (1998) 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene promoter and fibrinolytic capacity in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Haemost.* 1998 Dec;80(6):956-60.
111. Behague I, Poirier O, Nicaud V, et al. (1996) Beta fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. The ECTIM Study. Etude Cas-Temoins sur l'Infarctus du Myocarde. *Circulation* **93(3)**, 440-9.
112. Miloszewski K. Losowsky M. (1988) Fibrin stabilisation and factor XIII deficiency. In: L Frands (ed.) *Fibrinogen, Fibrin Stabilisation and Fibrinolysis*. West Sussex Horwood Publishing Limited.

- 113.** Gris JC, Ripart-Neveu S, Maugard C, et al. (1997) Respective evaluation of the prevalence of haemostasis abnormalities in unexplained primary early recurrent miscarriages. The Nimes Obstetricians and Haematologists (NOHA) Study. *Thromb Haemost* **77(6)**, 1096-103.
- 114.** Bojesen SE, Juul K, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. (2003) Platelet glycoprotein IIb/IIIa homozygosity associated with risk of ischemic cardiovascular diseases and myocardial infarction in young men: the Copenhagen City Heart Study. *J Am Coll Cardiol* **42(4)**, 661-667.
- 115.** Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. (2006) Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutations are risk factors for recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol* **55(5)**, 360-8.
- 116.** Nelson D.L, Cox M.M., (Eds) (2000) (Third Ed.) *Lehninger Principles of Biochemistry*. NY, Worth Publishers.
- 117.** (<http://en.wikipedia.org/>).
- 118.** Brigden ML. (1997) The hypercoagulable state. Who, how, and when to test and treat. *Postgrad Med* **101(5)**, 249-52, 254-6, 259-62 passim. Review.
- 119.** Bick RL. (2000) Recurrent miscarriage syndrome and infertility caused by blood coagulation protein or platelet defects. *Hematol Oncol Clin North Am* **14(5)**, 1117-31. Review.
- 120.** Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, Fait G, Lessing JB. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med*. 1999 Jan 7;340(1):9-13. Erratum in: *N Engl J Med* 1999 Jul 29;341(5):384.
- 121.** Schmidt-Sarosi C, Schwartz LB, Lublin J, Kaplan-Grazi D, Sarosi P, Perle MA. (1998) Chromosomal analysis of early fetal losses in relation to transvaginal ultrasonographic detection of fetal heart motion after infertility. *Fertil Steril* **69(2)**, 274-7.
- 122.** Younis JS. (2000) Thrombophilia and recurrent fetal loss-related? *Fertil Steril* **73(3)**, 652-4.
- 123.** Junker R., Koch H.G., Auberger K., Munchow N. (1999) Prothrombin G20210A gene mutation and further prothrombotic risk factors in childhood

- thrombophilia. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* **19**, 2568-2572.
- 124.** Akar N., Akar E., Dalgın G., Sözüöz A., Ömürlü K., Cin Ş. (1997) Frequency of Factor V (1691G~A) Mutation in Turkish Population. *Thrombosis Haemostasis* **78**, 1527-1529.
- 125.** Pauer HU, Voigt-Tschirschwitz T, Hinney B, Burfeind P, Wolf C, Emons G, Neesen J. (2003) Analyses of three common thrombophilic gene mutations in German women with recurrent abortions. *Acta Obstet Gynecol Scand* **82(10)**, 942-7.
- 126.** Carp H, Salomon O, Seidman D, Dardik R, Rosenberg N, Inbal A. (2002) Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* **17(6)**, 1633-7.
- 127.** Tal J, Schliamsler LM, Leibovitz Z, Ohel G, Attias D. (1999) A possible role for activated protein C resistance in patients with first and second trimester pregnancy failure. *Hum Reprod* **14(6)**, 1624-7.
- 128.** Altınışık J., Trombozlu hastalarda FV Leiden (G1691A) ve Protrombin G20210A mutasyonlarının araştırılması. (2001) İstanbul Üni. SBE, Genetik Anabilim Dalı.
- 129.** Pauer HU, Neesen J, Schloesser M, Hinney B, Rauskolb R. (2000) Homozygous factor V Leiden mutation in a woman with multiple adverse pregnancy outcomes. *Arch Gynecol Obstet* **264(3)**, 164-5.
- 130.** Brenner B, Sarig G, Weiner Z, Younis J, Blumenfeld Z, Lanir N. (1999) Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause. *Thromb Haemost* **82(1)**, 6-9.
- 131.** Ridker PM, Miletich JP, Buring JE, et al. (1998) Factor V Leiden mutation as a risk factor for recurrent pregnancy loss. *Ann Intern Med* **128(12 Pt 1)**, 1000-3.
- 132.** Aksoy M, Tek I, Karabulut H, Berker B, Soylemez F. (2005) The role of thrombophilia related to Factor V Leiden and Factor II G20210A mutations in recurrent abortions. *J Pak Med Assoc.* 2005 Mar;55(3):104-8.

133. Kutteh WH, Triplett DA. (2006) Thrombophilias and recurrent pregnancy loss.
Semin Reprod Med. 2006 Feb;24(1):54-66. Review.
134. Guyan N.A Prothrombin G20210A Polymorphism in Thrombophilia.
(2000) *Mayo Clin Proc* **75**, 595-604.
135. Morange P.E., Barthet M.C., Henry M., et al. (1998) A Three-generation Family Presenting Five Cases of Homozygosity for the 20210 G to A Prothrombin Variant. *Thrombosis Haemostasis* **80**, 859-860.
136. Dilley A, Benito C, Hooper WC, et al. (2002) Mutations in the factor V, prothrombin and MTHFR genes are not risk factors for recurrent fetal loss. *J Matern Fetal Neonatal Med* **11(3)**,176-82.
137. Goodman CS, Coulam CB, Jeyendran RS, Acosta VA, Roussev R. (2006) Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? *Am J Reprod Immunol* **56(4)**, 230-6.
138. Jivraj S, Rai R, Underwood J, Regan L. (2006) Genetic thrombophilic mutations among couples with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* **21(5)**, 1161-5.
139. Castoldi E, Simioni P, Kalafatis M, et al. (2000) Combinations of 4 mutations (FV R506Q, FV H1299R, FV Y1702C, PT 20210G/A) affecting the prothrombinase complex in a thrombophilic family. *Blood* **96(4)**, 1443-8.
140. Wramsby ML, Sten-Linder M, Bremme K. (2000) Primary habitual abortions are associated with high frequency of factor V Leiden mutation. *Fertil Steril* **74**, 987-91.
141. Alonso A, Soto I, Urgelles MF, Corte JR, Rodriguez MJ, Pinto CR. (2002) Acquired and inherited thrombophilia in women with unexplained fetal losses. *Am J Obstet Gynecol* **187(5)**, 1337-1342.
142. Nelen WL, Blom HJ, Thomas CM, Steegers EA, Boers GH, Eskes TK. (1998) Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. *J Nutr* **128(8)**,1336-41.
143. Pihusch R, Buchholz T, Lohse P, et al.(2001) Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation

- increases the risk in the first trimester. *Am J Reprod Immunol* **46(2)**, 124-131.
- 144.** Dobson AT, Davis RM, Rosen MP, Shen S, Rinaudo PF, Chan J, Cedars MI. (2007) Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C variants do not affect ongoing pregnancy rates following IVF. *Hum Reprod.* **22(2)**:450-6.
- 145.** Bagley P.J., Jacob S. (1998) A common mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene is Associated with an Accumulation of Formylated tetrahydrofolates in Red Blood Cells. *Medical Sciences* **95**, 13217-13220.
- 146.** Bailey LB, Duhaney RL, Maneval DR, et al. (2002) Vitamin B-12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. *J Nutr* **132(7)**, 1872-8.
- 147.** Kim YI. (2000) Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: a paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutr Rev.* **58(7)**, 205-9.
- 148.** Rosenblatt, D.S. (2001) Methylenetetrahydrofolate Reductase. *Clin. Invest. Med* **24(1)**, 56-59.
- 149.** Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R.(1998) A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* **64(3)**, 169-72.
- 150.** Coppens M, Kaandorp SP, Middeldorp S. (2006) Inherited thrombophilias. *Obstet Gynecol Clin North Am.* **33(3)**:357-74. Review.
- 151.** Blumenfeld Z, Brenner B. (1999) Thrombophilia-associated pregnancy wastage. *Fertil Steril* **72(5)**, 765-74.
- 152.** Nelen WL, van der Molen EF, Blom HJ, Heil SG, Steegers EA, Eskes TK. (1997) Recurrent early pregnancy loss and genetic-related disturbances in folate and homocysteine metabolism. *Br J Hosp Med* **58(10)**, 511-3.

153. Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Eskes TK. (2000) Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta- analysis. *Fertil Steril* **74**, 1196-9.
154. Holmes ZR, Regan L, Chilcott I, Cohen H. (1999) The C677T MTHFR gene mutation is not predictive of risk for recurrent fetal loss. *Br J Haematol* **105**(1), 98-101.
155. Franco RF, Reitsma PH. (2001) Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet* **109**, 369-84.
156. Dahlback B, Zoller B, Hillarp A. Inherited resistance to activated protein C caused by presence of the FV. Q506 allele as a basis of venous thrombosis. *Haemostasis* 1996; 26: 301-14.
157. Finan RR, Tamim H, Ameen G, Sharida HE, Rashid M, Almawi WY. (2002) Prevalence of factor V G1691A (factor V-Leiden) and prothrombin G20210A gene mutations in arecurrent miscarriage population. *Am J Hematol* **71**, 300-305.
158. Souza SS, Ferriani RA, Pontes AG, Zago MA, Franco RF. (1999) Factor V leiden and factor II G202IOA mutations in patients with recurrent abortion. *Hum Reprod* **14**, 2448-50.
159. Foka ZJ, Lambropoulos AF, Saravelos H, et al. (2000) Factor V leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* **15**, 458-62.
160. Pauer HU, Neesen J, Hinney B. (1998) Factor V Leiden and its relevance in patients with recurrent abortions. *Am J Obstet Gynecol* **178**(3), 629.
161. Balasch J, Reverter JC, Fabregues F, et al. (1997) First-trimester repeated abortion is not associated with activated protein C resistance. *Hum Reprod* **12**, 1094-7.
162. Dizon-Townson DS, Kinney S, Branch DW, Ward K. (1997) The factor V Leiden mutation is not a common cause of recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol* **34**(3), 217-23.
163. Dulicek P, Chrobak L, Kalousek I, Pesavova L, Pecka M, Stransky P. (1999) Is factor V Leiden a risk factor for fetal loss? *Acta Med* **42**(3), 93-6.

164. Brenner B, Mandel H, Lanir N, et al. (1997) Activated protein C resistance can be associated with recurrent fetal loss. *Br J Haematol* **97**, 551-4.
165. Martinelli I, Taioli E, Cetin I, et al. (2000) Mutations in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss. *N Engl J Med* **343**, 1015-8.
166. Regan L, Rai R. (2002) Thrombophilia and pregnancy loss. *J Reprod Immunol* **55**, 163-180.
167. Deitcher SR, Park VM, Kutteh WH. (1998) Prothrombin 20210 G A mutation analysis in Caucasian women with early first trimester recurrent pregnancy loss. *Blood* **92(Suppl. 1)**, 118b.
168. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. (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* **90(3)**, 1004-1008.
169. Bare SN, Poka R, Balogh I, Ajzner E. (2000) Factor V Leiden as a risk factor for miscarriage and reduced fertility. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* **40(2)**, 186-190.
170. Brenner B, Vulfsons SL, Lanir N, Nahir M. (1996) Coexistence of familial antiphospholipid syndrome and factor V Leiden: impact on thrombotic diathesis. *Br J Haematol* **94**: 166-167.
171. Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH, et al. (1996) Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* **58(1)**, 35-41.
172. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, et al. (1999) Increased frequency of the genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Eng J Med* **340**, 9-13.
173. Tranquilli AL, Giannubilo SR, Dell'Uomo B, Grandone E. (2004) Adverse pregnancy outcomes are associated with multiple maternal thrombophilic factors. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **117(2)**, 144-147.