

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**TROMBOFİLİ NEDENİYLE TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI
YAŞAYANLARDA GEBELİK ÖNCESİ DÜŞÜK MOLEKÜL
AĞIRLIKLIL HEPARİN KULLANIMININ KLİNİK VE
LABORATUAR VERİLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Yusuf DAL

UZMANLIK TEZİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mehmet Okan ÖZKAYA

Tez Eş Danışmanı

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri
tarafından 4563-TU2-16 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA – 2018

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın oluşturulmasında ve yürütülmesinde her türlü desteği gösteren ve deneyimlerini esirgemeyen, eğitimime büyük katkıda bulunan 1. danışman hocam Prof. Dr. Mehmet Okan ÖZKAYA'ya ve 2. danışman hocam Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'na;

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşan, mesleği öğrenmemizde bizlere destek olan Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Mehmet Okan ÖZKAYA başta olmak üzere değerli hocalarım, Prof. Dr. Gökhan BAYHAN, Prof. Dr. Hilmi Baha ORAL, Prof. Dr. Mekin SEZİK, Prof. Dr. Mehmet GÜNEY, Prof. Dr. Evrim ERDEMOĞLU, Doç. Dr. İlker GÜNYELİ, Dr. Öğr. Üyesi Esra Nur TOLA'ya;

Uzmanlık eğitimim süresince beraber çalıştığımız asistan arkadaşlarıma, tüm Biyofizik A.D çalışanlarına, intern ve stajyer doktorlarımıza, servis ve poliklinik hemşirelerine, doğumhane ve servis personellerimize;

Çalışma süresince verdikleri destekten dolayı Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine ve çalışanlarına,

Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, her konuda destek olan, bu zorlu dönemimde gösterdiği özveri ve anlayışı ile bana güç veren sevgili eşim Dr. Başak Elif DAL'a, hayatın bana verdiği en güzel hediye canım yavrum Çınar Efe'me, beni yetiştiren, sevgi, sabır ile bugünlere gelmemi sağlayan, her türlü kahrımı çeken anneme, babama ve kız kardeşime; eşimin değerli ailesine ithaf ediyorum.

Dr. Yusuf DAL

2018- ISPARTA

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
GRAFİKLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tekrarlayan Gebelik Kayıpları.....	3
2.1.1. Tekrarlayan Gebelik Kayıplarının Etiyolojisi.....	4
2.1.1.1. Epidemiyolojik Faktörler	6
2.1.1.1.1. Anne Yaşı.....	6
2.1.1.1.2. Üreme Öyküsü	6
2.1.1.1.3. Beslenme; Hiperhomosisteinemi, Vitamin B12 ve Folat Eksikliği	7
2.1.1.1.4. Maternal Enfeksiyonlar	8
2.1.1.2. Kromozomal Anomaliler	8
2.1.1.3. Anatomik Nedenler	9
2.1.1.4. Endokrin Faktörler	10
2.1.1.5. İmmünolojik Faktörler	12
2.1.1.5.1. Antifosfolipid Antikorlar	12
2.1.1.5.2. Non-aPL Faktörler	14
2.1.1.5.3. Diğer İmmünolojik Faktörler	14
2.1.1.6. Hematolojik Nedenler	15
2.1.1.6.1. Hemostaz, İnflamasyon ve Koagülasyon Sistemi.....	15
2.1.1.6.2. Gebelik Boyunca Gelişen Koagülasyon Değişiklikleri.....	16
2.1.1.6.3. Trombofili	17
2.1.1.6.3.1. Faktör V Leiden Mutasyonu	18
2.1.1.6.3.2. Protrombin Gen Mutasyonu.....	19
2.1.1.6.3.3. Kombine Heterozigot Mutasyon.....	20
2.1.1.6.3.4. Antitrombin III Eksikliği	20

2.1.1.6.3.5. Protein C ve Protein S Eksikliği	21
2.1.1.6.3.6. Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz Polimorfizmi.....	22
2.1.1.6.3.7. Trombomodulin	23
2.1.1.7. Alloimmun Faktörler.....	23
2.1.1.7.1. NK (Natural Killer) Hücre Sitotoksitesi.....	23
2.1.1.7.2. NK T hücreler	24
2.1.1.7.3. Th1-Th2 Dengesi	24
2.1.1.7.4. Regulator T Hücreler.....	24
2.2. Apoptozis	25
2.3. Oksidatif Stres	27
2.3.1. Serbest Radikaller	27
2.3.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^-).....	28
2.3.1.2. Hidrojen Peroksit	29
2.3.1.3. Hidroksil Radikali	29
2.3.1.2. Serbest Oksijen Radikallerin Biyolojik Etkileri.....	30
2.3.1.2.1. Membran Lipitleri Üzerinde Etkileri	30
2.3.1.2.2. Proteinler Üzerinde Etkileri	31
2.3.1.2.3. Nükleik asitler ve DNA Üzerine Etkileri	31
2.3.1.2.4. Karbonhidratlar Üzerinde Etkileri.....	32
2.4. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali	32
2.4.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi	32
2.4.2. Hücre içi Kalsiyum Sinyalinin Oluşumu	32
2.5. Transient Reseptör Potansiyel (TRP) Kanalları	34
2.5.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin (TRPM) Kanalları	35
2.5.1.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin 2 (TRPM2) Kanalları	36
2.5.1.2. Transiyent Reseptör Potansiyel Vanilloid 1 (TRPV1) Kanalları.....	38
2.6. Tekrarlayan Gebelik Kaybında Tarama	40
2.7. Tekrarlayan Gebelik Kaybında Trombofililerin Tedavisi.....	40
2.7.1. Unfraksiyone Heparin, Düşük Moleküler Ağırlıklı Heparin	41
2.7.2. Diğer Tedaviler	42
2.7.2.1. Aspirin.....	42
2.7.2.1. Folik Asit.....	43

3. MATERYAL VE METOD.....	44
3.1. Hasta-Kontrol Populasyonunun Seçimi	44
3.2. Malzemeler ve Aletler	45
3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	46
3.4. Laboratuvar	48
3.4.1. Trombosit İzolasyonu	48
3.4.2. İntraselüler Kalsiyum İyonu Ölçülmesi	48
3.4.3. Hücre İçi ROT Üretimi Tayini.....	49
3.4.4. Kaspaz 3 ve 9 Enzim Aktiviteleri Tayini.....	49
3.4.5. Apoptozis Testleri.....	50
3.4.6. Mitokondriyal Membran Depolarizasyon Tayini	50
3.4.7. Western Blot Analizleri	51
3.5. Klinik.....	53
3.6. İstatiksel Analiz.....	53
4. BULGULAR.....	54
4.1. Gebelik Öncesi DMAH Tedavisinin TRPM2 Kanalı Aracılı Ca^{+2} Girişi Üzerindeki Etkileri	54
4.2. Gebelik Öncesi DMAH Tedavisinin TRPV1 Kanalı Aracılı Ca^{+2} Girişi Üzerindeki Etkileri	55
4.3. Gebelik Öncesi DMAH Tedavisinin Apoptozis, Hücre Canlılığı, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Aktiviteleri Üzerine Etkisi	57
4.4. Gebelik Öncesi DMAH Tedavisinin PARP1 Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi.....	58
4.5. Gebelik Öncesi DMAH Tedavisinin Hücre içi ROT Üretimi ve Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu (JC-1) Düzeyleri Üzerine Etkisi	59
4.6. Gebelik Öncesi DMAH Tedavisinin Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Ekspresyon Düzeylerine Etkileri	60
4.7. Klinik Veriler	61
4.7.1. Grupların Kendi Aralarında Sosyodemografik Veriler Açısından İncelenmesi	63
4.7.2. DMAH Başlanma Zamanına Göre Düşükle Sonuçlanan Gebeliklerin Karşılaştırılması	63
4.7.3. DMAH Başlanma Zamanına Göre 20 Hafta Üzerine Ulaşan Gebeliklerin Karşılaştırılması	64
4.7.4. DMAH Başlanma Zamanına Göre Canlı Doğumla Sonuçlanan Gebeliklerin Karşılaştırılması	65

4.7.5. DMAH Başlanma Zamanına Göre Gebeliklerin Maternal ve Neonatal Sonuçlarına Göre Karşılaştırılması.....	66
5. TARTIŞMA	67
SONUÇ.....	77
ÖZET.....	78
SUMMARY	79
KAYNAKLAR	80



SİMGELER VE KISALTMALAR

[Ca²⁺]_i	: Hücre içi serbest kalsiyum
µg/ ml	: Mikrogram/mililitre
µM	: Mikrometre
2-APB	: 2-aminoethoxydiphenyl borate
ACA	: Antikardiyolipin Antikorlar
ACA	: Antranilik asit
AFAS	: Antifosfolipid Antikor Sendromu
AKG	: Arka Kök Gangliyonları
ANA	: Anti Nükleer Antikor
APC	: Aktive Protein C
aPL	: Antifosfolipid Antikor
APS	: Antifosfolid Sendromu
ART	: Yardımcı Üreme Teknikleri
ASRM	: Amerikan Üreme Tıbbi Derneği
AT	: Antitrombin
Ca²⁺	: Kalsiyum iyonu
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
CAP	: Kapsaisin
COX	: Siklooksijenaz
DAG	: Diaçilgliserol
DHR	: Dihydrorhodamine
dk	: Dakika
DMAH	: Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin
DOX	: Doksorubisin
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ER	: Endoplazmik Retikulum
ESHRE	: European Society of Human Reproduction and Embryology
FIX	: Faktör 9
FVa	: Aktif Faktör 5
FVIIa	: Aktif Faktör 7

FVIIIa	: Aktif Faktör 8
FX	: Faktör 10
FXa	: Aktif Faktör 10
FXI	: Faktör 11
FXII	: Faktör 12
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksizdaz
GSS	: Gebelik saptandıktan sonra
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HB-EGF	: Heparin- binding epidermal growth factor
HBS	: HEPES-buffered saline
HLA	: Human lökosit antijen
Hyc	: Homosistein
ICSI	: İntrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IP3	: İnositol 1,4,5-trisfosfat
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
JC1	: Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu
KAT	: Katalaz
KCl	: Potasyum klorür
LA	: Lupus Antikoagülan
LH	: Serum Lüteinizan Hormon
MgCl₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
MTHFR	: Metil Tetrahidrofolat Redüktaz
NaCl	: Sodyum klorür
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NAD⁺	: Okside Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NK	: Natural Killer
nm	: Nanometre
O₂	: Oksijen
O₂⁻	: Süperoksit Radikali

°C	: Santigrad derece
PARG	: Poli (ADPR) glikohidrolaz
PARP-1	: Poli (ADPR) polimeraz-1
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PC	: Protein C
PCOS	: Polikistik Over Sendromu
PIP2	: Fosfoinositoldifosfat
PMA	: Phorbol-12-myristate-13-acetate
PRP	: Trombosit bakımından zengin plazma
PS	: Protein S
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Revolution Per Minute
SAM	: S-Adenozil metiyonin
SDS-Page	: Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel
SLE	: Sistemik Lupus Eritematosus
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TBS	: Tris Buffered Saline
TGF	: Transforming Growth Factor
TGK	: Tekrarlayan gebelik kayıpları
TNF	: Tümör nekroz faktör
Treg	: Regulator T hücreler
TRP	: Transient Reseptör Potansiyel
TRPA	: TRP ankyrin
TRPC	: TRP conancial
TRPM	: TRP melastatin
TRPML	: TRP mucolipin
TRPP	: TRP polycystein
TRPV	: TRP vanilloid
Vit	: Vitamin
VTE	: Venöz tromboemboli
µl	: mikrolitre
µmol/L	: Mikromol/litre

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Tekrarlayan gebelik kayıplarının etiyojisi.	5
Tablo 2. Anne yaşına göre sınıflandırılmış düşük oranları.	6
Tablo 3. Spontan düşük olasılıkları.	7
Tablo 4. Abort materyallerinin kromozomal yapısı.	9
Tablo 5. Antifosfolipid sendromunun gebelikteki komplikasyonları	13
Tablo 6. Konjenital ve edinsel trombofili sınıflaması	18
Tablo 7. Trombofili tarama paneli.	40
Tablo 8. Araştırmanın 4 ana gurubunun dağılımı.	62
Tablo 9. Hastaların trombofili sınıflamasına göre dağılımı.	62
Tablo 10. Hastaların önceki gebeliklerinin TGK tipine göre dağılımı.....	62
Tablo 11. Kontrol Grubu ile hasta grubu, tedavi grubu 1 ve tedavi grubu 2 gruplarının sosyodemografik özelliklerine göre karşılaştırılması.....	63
Tablo 12. Gebelik öncesi ve GSS DMAH başlanma zamanına göre düşük ile sonuçlanan gebeliklerin karşılaştırılması.	63
Tablo 13. Gebelik öncesi ve GSS DMAH başlanma zamanına göre 20 hafta üzerine ulaşan gebeliklerin karşılaştırılması.	64
Tablo 14. Gebelik öncesi ve GSS DMAH başlanma zamanına göre canlı doğumla sonuçlanan gebeliklerin karşılaştırılması.	65
Tablo 15. Gebelik öncesi ve GSS DMAH başlanma zamanına göre gebeliklerin maternal ve neonatal sonuçlarına göre karşılaştırılması.	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Koagülasyon kaskadı	16
Şekil 2. Faktör V aktivitesinin düzenlenmesi	19
Şekil 3. Apoptozis mekanizması.....	26
Şekil 4. TRP kanalları ailesi.....	35
Şekil 5. TRPV1 kanal açıcı (Kapsaisin) ve kapatıcısının (Kapsazepin) kimyasal yapıları.....	39
Şekil 6. Trombositlerdeki Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) stimülasyonu ile başlatılan hücre içi serbest Ca ⁺² salınımı üzerine DMAH etkilerinin zamanla değişimi.	54
Şekil 7. Trombositlerdeki kapsaisin (CAP) stimülasyonu ile başlatılan hücre içi serbest Ca ⁺² salınımı üzerine DMAH etkilerinin zamanla değişimi.	56

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Kalsiyum sinyali analizlerinin yapıldığı spektrofloreometre cihazı.	49
Resim 2. Floresans ve spektrofotometrik analizlerin yapıldığı kuyucuk okuyucu (plate reader) cihazı.	51
Resim 3. Western Blot analizi için kullanılan ekipmanlar.	52
Resim 4. Jel görüntüleme cihazı.	52



GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Konrol, hasta ve tedavi grubu 1 gruplarının trombositlerindeki TRPM2 kanallarından kalsiyum iyon geçişi.....	55
Grafik 2. Konrol, hasta ve tedavi grubu 1 gruplarının trombositlerindeki TRPV1 kanallarından kalsiyum iyon geçişi.....	56
Grafik 3. DMAH tedavisinin kontrol, hasta ve tedavi grubu 1 gruplarının trombositlerindeki apopitozis, hücre canlılığı, kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktiviteleri üzerine etkisi.	58
Grafik 4. DMAH tedavisinin kontrol, hasta ve tedavi grubu 1 gruplarının trombositlerindeki PARP1 ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi.....	59
Grafik 5. DMAH tedavisinin kontrol, hasta ve tedavi grubu 1 gruplarının hücre içi ROT ve JC-1 düzeyleri üzerine etkisi.	60
Grafik 6. DMAH tedavisinin kontrol, hasta ve tedavi grubu 1 gruplarının trombositlerindeki kaspaz 3 ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi.....	61
Grafik 7. DMAH tedavisinin kontrol, hasta ve tedavi grubu 1 gruplarının trombositlerindeki kaspaz 9 ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi.....	61

1. GİRİŞ

Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK) 20. gebelik haftasından önce yada 500 gramdan az fetal ağırlıkla birlikte üç veya daha fazla ardışık gebelik kaybı olarak tanımlanır ve üreme çağındaki kadınların %1'inde görülür (1). Çoğu embriyonik veya erken dönem kayıplarıdır. Gebeliğin sık görülen bir komplikasyonudur ve klinik olarak kabul edilen tüm gebeliklerin yaklaşık %15'ini etkilemektedir (2).

TGK olan çiftlerin bir kısmında gebelik kaybının devamlı ve belli bir nedeni bulunmaktadır. Ancak tüm değerlendirmelere rağmen olguların %50'sinde altta yatan neden tespit edilememektedir. Bir kez spontan gebelik kaybı %20, iki kez peş peşe spontan gebelik kaybı %4, üç kez peş peşe spontan gebelik kaybı ise %0.8 oranında gerçekleşmektedir (3).

Tanımda üç veya daha fazla gebelik kaybı olsa da, iki gebelik kaybı sonrası en azından değerlendirmenin dikkate alınması konusunda görüş birliği vardır. Sebebi ise iki düşükten sonra gebelik kaybı riskinin üç düşük sonrası kayıp oranıyla benzer olmasıdır. Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (ASRM), TGK'nın, sonografi veya histopatolojik inceleme ile doğrulanmış, iki veya daha fazla sayıda klinik gebelik kaybı olarak tanımlanmasını önermiştir (4). Ayrıntılı inceleme üç gebelik kaybindan sonra kesin gereklidir ve eşlik eden fertilitite azlığı olan çiftlerde tedaviye ise daha erken başlanmalıdır (5).

Etyolojide düşünülen birçok neden vardır, ancak üç tanesi genel anlamda kabul görmektedir: parenteral kromozom anomalileri, antifosfolipid antikor sendromu (AFAS) ve bazı uterin anomalilerdir. Diğer düşünülen ancak kanıtlanamamış nedenler ise, alloimmünite, endokrinopatiler, çevresel toksinler ve çeşitli enfeksiyonlardır.

Reaktif oksijen türleri (ROT) diğer adıyla serbest radikaller metabolik ve fizyolojik süreçlerde üretilir, sonucunda organizmada zararlı oksidatif reaksiyonlar meydana gelebilir. Oksidan / antioksidan denge, oksidatif taraf lehine kayar. Son yıllarda hücre düzeyinde meydana gelen bu hasarın düşüklere sebep olabileceği düşünülmüş ve bunun için çeşitli araştırmalar yapılmıştır.

Transient Reseptör Potensiyel (TRP) katyon kanalları son 20 yıl içerisinde keşfedilmiş olup, üreme fonksiyonları üzerinde de birçok etkileri vardır (6). Bir kısım TRP kanalları ROT ile aktive olmaktadır. Sitozole ROT aracılı TRP kanal aktivasyonu ile aşırı Ca^{+2} (kalsiyum iyonu) girmesi apoptozis ve DNA tahribi gibi birçok hücre ölümcül süreçlerini başlatmaktadır.

Oksidatif stres plasental apoptozisin direk uyarıcısıdır (7). Oksidatif strese yanıt olarak ortaya çıkan apoptozisin ve trombosit sitozolüne kalsiyum iyonu akışının trofoblast hücrelerinin ölümüne ve koagülasyon defektlerine yol açtığı görülmüştür (8). Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan apoptozisin plasental disfonksiyonuna neden olduğu ve bunun da tekrarlayan düşükklere sebep olabileceği bildirilmiştir (9).

Bu çalışmamızda TGK klinik ve laboratuvar olarak kanıtlanmış, trombofili özgeçmiş olan, iki ve daha fazla sayıda 20. gebelik haftasından önce gebelik kaybı olan kadınlar ele alınmıştır. Trombofili nedeniyle TGK yaşayanlarda TGK oluşumunda;

- 1) Oksidatif stresin etkisi,
- 2) Oksidatif strese yanıt olarak ortaya çıkan apoptozisin ve trombosit sitozolünde Ca^{+2} akışının önemi,
- 3) Tedavide kullanılan düşük molekül ağırlıklı heparinin (DMAH) gebelik öncesi kullanımı ile oksidatif stres, apoptozis ve trombosit sitoplazmasına TRPM2 ile TRPV1 kanalları aracılı kalsiyum akışı üzerindeki etkileri,
- 4) Klinik veriler üzerine etkisinin araştırılması planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tekrarlayan Gebelik Kayıpları

TGK klasik tanımı; en az 3 kere ardışık gerçekleşen 20. gebelik haftasının veya 500 gramın altında fetal ağırlıkla birlikte olan gebelik kayıplarıdır. Ancak tanımında tam bir görüş birliği bulunmamaktadır. İki veya daha fazla sayıda klinik olarak ispat edilmiş intrauterin gebeliğin kaybı (4) veya üç veya daha fazla intrauterin olma zorunluluğu olmayan ard arda meydana gelen gebeliğin kaybı (10) şeklinde farklı tanımlamalar bulunmaktadır.

TGK hikayesinde canlı doğum ile sonuçlanan gebeliklerde bulunabilir ve TGK'lar üç ana grup içinde incelenebilir:

1. Primer TGK: 20. gebelik haftasından önce ard arda üç veya daha fazla sayıda gebelik kaybı olan çiftin hiç canlı doğumunun olmamasıdır.
2. Sekonder TGK: Üç veya daha fazla sayıda ard arda gebelik kaybı olan çiftin bu gebeliklerinden en az bir tanesinin 20. gebelik haftası üzerinde canlı doğum ile sonuçlanmış veya daha az çoğunlukta ölü doğum ve neonatal kayıp ile sonuçlanmış olmasıdır.
3. Tersiyer TGK: Canlı doğumu olan çiftin, bu doğum sonrasında olan en az üç kez peş peşe gebelik kaybı olmasıdır.

Ultrasonografik ve histopatolojik yolla gösterilmiş tüm gebeliklerin yaklaşık %15'inde sporadik gebelik kaybı yaşanmaktadır. Bu kişilerin %5'inden azında ardışık iki gebelik kaybı, %1'inde ise üç veya daha fazla sayıda gebelik kaybı olabileceği öngörülmektedir (11).

Düşüklerin %80'den fazlası gebeliğin ilk 12 haftası içinde gerçekleşmektedir. Bu kayıpların en sık nedenini %50-75 oranı ile fetal kromozomal anomaliler oluşturmaktadır (12). Abort materyallerinin genetik incelemesinde ilk trimester gebelik kayıplarının yaklaşık %50'sinde, ikinci trimester kayıplarının %30'unda, üçüncü trimester kayıplarının %3'ünde kromozomal anomalilerin bulunduğu görülmektedir (13).

2.1.1. Tekrarlayan Gebelik Kayıplarının Etiyolojisi

TGK olgularının %50'sinde geçerli bir etyoloji vardır ve bu grubun tedavisi yapılabilmektedir. TGK değişken komponentler içeren bir durumdur ve TGK'nın varsayılan birçok nedeni vardır. Genel anlamda yaygın biçimde kabul gören nedenler anatomik, immünolojik, genetik, endokrin, enfeksiyöz, trombofilik ve çevresel faktörlerdir. Rodger ve arkadaşları tekrarlayan düşüklerin nedenlerini şu şekilde sınıflandırmışlardır (14):

1. Hemostaz bozukluklarına bağlı hematolojik nedenler: %53
2. Anatomik nedenler: %15
3. Endokrin nedenler: %15
4. Kromozomal anomaliler: %17
5. Enfeksiyöz, immünolojik ve çevresel faktörler: %10

2009 yılında Kwak-Kim ve arkadaşlarının yayınlarında yaptıkları detaylı sınıflandırma daha geniş kapsamlıdır (Tablo 1) (15).

Tablo 1. Tekrarlayan gebelik kayıplarının etiyolojisi (15).

Etiyoloji	Hastalık
Epidemiyolojik	Hasta yaşı Hastanın üreme öyküsü
Beslenme	Hiperhomosisteinemi Folat eksikliği Vitamin B12 eksikliği
Jinekolojik	Servikal yetmezlik Myoma uteri Uterus yapısal bozuklukları (uterin septum, uterus didelphis, bikornuat uterus) In utero DES maruziyeti Primer endometrial bozukluk (Asherman send., endometrial fibrzis)
Enfeksiyon	Ureoplasma urealyticum Mycoplasma hominis Toxoplasmosis Cytomegalovirus Listeria monocytogenes Parvovirus B19
Endokrin	Hipertroidizm Hipotroidizm Diabetes mellitus Hiperglisemi ve insülin rezistansı LH hipersekresyonu Hiperprolaktinemi Polikistik over sendromu
Genetik	Fetus veya düşük materyaline ait kromozomal anomaliler (dengeli translokasyonlar, inversiyon) SYCP3 gen mutasyonu Oosit mitokondri mutasyonu HLA G polimorfizmi Sitokin gen polimorfizmi TNF- α gen polimorfizmi IFN- γ gen polimorfizmi IL-1 β gen polimorfizmi IL-1 reseptör antagonist polimorfizmi IL-6 gen polimorfizmi IL-10 gen polimorfizmi TGF- β gen polimorfizmi
İmmunolojik otoimmün	Antifosfolipid antikor sendromu Otoimmün tiroiditis Romatoid Artrit SLE Sjögren hastalığı Behçet hastalığı Otoimmün trombositopenik purpura Otoimmün hemolitik anemi Miyastenia Gravis Ig M gamopatisi
Alloimmün	Rh uyuşmazlığı ABO uyuşmazlığı
Hematolojik	Trombofili (akkiz ve konjenital) Homozigot orak hücreli anemi

Tekrarlayan kayıplar bazı kadınlarda aynı gebelik haftalarına yakın zamanda gerçekleşmektedir ve gebelik kayıplarının zamanlaması bazı ipuçları verebilir (16). Erken gebelik kayıplarında genellikle genetik faktörler rol alırken, otoimmün veya anatomik nedenler daha çok geç gebelik kayıplarına yol açar (17).

2.1.1.1. Epidemiyolojik Faktörler

2.1.1.1.1. Anne Yaşı

Anne yaşı ve önceki düşük sayısı gerçekleşecek gebelik kayıpları için bağımsız risk faktörleridir (18). İlerleyen anne yaşı ile beraber artan anormal kromozomlu gebelikler ya da azalan uterus ve over fonksiyonları nedeniyle düşük riski artmaktadır. Anne yaşının 40'ın üstünde olmasının düşük için risk faktörü olduğu saptanmıştır (12).

Tanımlanmış gebeliği olan kadınlarda anne yaşı ile gebelik kaybı riskine bakıldığında (19);

Tablo 2. Anne yaşına göre sınıflandırılmış düşük oranları.

Yaş	Toplam gebelik sayısı	Düşük oranı (%)
20-24	350395	9
25-29	414149	11
30-34	235049	15
35-39	93940	25
40-44	25132	51
≥45	1865	75

2.1.1.1.2. Üreme Öyküsü

İlk gebelikte gebelik kaybı riski %11 ile %13 arasındadır (11). Ardışık gebelik kaybindan sonra gebelik kaybı riski daha da artmaktadır. Risk üç ardışık gebelik kaybindan sonra yaklaşık %40'lara ulaşacak şekilde yükselir (20). Daha önceki gebelik kayıpları ile bağlantılı olarak tekrar düşük yapan kadınların yüzdesi Tablo 3'de gösterilmiştir (21).

Gebelik kaybının nedeni düşük riskini etkilemektedir. Örneğin 22:22 traslokasyon taşıyıcılarının gebeliklerinin tamamı olumsuz etkilenirken, 13:14 translokasyon taşıyıcısı kadınlarda ise bu oran %25’ler civarındadır.

Tablo 3. Spontan düşük olasılıkları.

	Daha Önceki Düşüklerin Sayısı			
	0	1	2	3+
Rertospektif çalışmalar Stevenson ve ark. (1959) (%)		16.3	19.2	26.2
Warburton ve Fraser (1964) (%)	12.3	26.2	32.2	30.2
Leridon (1956) (%)	15.2	22.0	35.3	
Poland ve ark. (1977) (%)		19.0	35.0	47.0
Naylor ve Warburton (1978) (%)	11.0	20.3	29.2	37.0
Kohort Çalışmaları Shapiro ve ark. (1970) (%)	10.9	18.0		
Awan (1974) (%)	10.4	22.1	27.4	
Prospektif Çalışmalar Boué ve ark. (1975) (%)		13.8		
Harger ve ark. (1983) (%)			17.4	29.2
Fitzsimmons ve ark. (1983) (%)			31.3	45.7
Regan (1988) (%)	5.6	11.5	29.4	36.4

2.1.1.1.3. Beslenme; Hiperhomosisteinemi, Vitamin B12 ve Folat Eksikliği

Metiyonin metabolizmasında Homosistein (Hyc) ara metabolit olarak oluşur. Normal açlık plazma total Hyc konsantrasyonu 5-15 µmol/L (Mikromol/Litre)’dir. 15µmol/L’den yüksek olmasına hiperhomosisteinemi denir. Besinlerle alınan metiyonin devamlı olarak S-Adenozil metiyonin (SAM) üzerinden Hcy’e dönüşür. Hcy metabolizmasında metiyonin sentaz ve metiltetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimleri rol oynar. MTHFR enziminin fonksiyon bozukluğunda, Vit (vitamin) B12 ve folat eksikliğine yol açacak bu metabolizma bozulmakta ve homosisteinin kanda seviyeleri yükselmektedir. Yüksek Hyc düzeyleri; net olarak açıklanamasa da ROT oluşumu, endotelial toksisite, trombositlerin artmış adezyonu, pıhtılaşma faktörlerindeki değişiklikler ve azalmış adenzin üretimi gibi faktörlere neden olarak

vasküler yatakta hasarlanma yapmaktadır. Bu durum plasentasyon aşamasındaki vasküler direnç ve trombozları açıklamaktadır (22).

2.1.1.1.4. Maternal Enfeksiyonlar

Birçok maternal enfeksiyon (viral, bakteriyel, zoonotik ve fungal) teorik olarak TKG nedeni olabilmektedir. Bakteriyel vajinoz, Mycoplasma ve Chlamydia trachomatis enfeksiyonlarının ise TKG ile ilişkisi araştırılmış fakat net bir ilişki gösterilememiştir (12).

2.1.1.2. Kromozomal Anomaliler

TKG'ların sadece %2-4'ünden sorumlu olsa da tüm derlemeler ve kılavuzlarda genetik sebeplerin değerlendirilmesi ve araştırılması önemli bir basmağı oluşturmaktadır.

Açıklanamayan TKG olan kadınların birinci derece akrabalarında da TKG riskinde artış görülmektedir. Bu durum ortak HLA (human lökosit antijen) türleri, koagülasyon defektleri, immün sistem bozuklukları veya diğer tanımlanamamış faktörlerle ilişkili olabilir (23).

Önceki gebelik kaybı sayısı arttıkça anöploidi riskinde de artış olmaktadır (24). Ancak hangi anormalliklerin nüksetme olasılığını belirleyebilmek için daha ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Sporadik gebelik kayıplarının büyük çoğunluğundan fetusa ait kromozom anormallikleri sorumludur. Bunların %90'nından fazlası sayısal anomalilerdir. Geri kalan kısmında ise yapısal anomaliler ile mozaikim görülmektedir (25).

Gebelik kayıplarının %80'ninden fazlası erken dönem gebelik kayıplarıdır ve vakaların %53'ünde kromozom anomalisi saptanmaktadır. Anöploidiler arasında en sık görüleni trizomilerdir. Trizomiler sıklık sırasına göre trizomi 16, 13, 18 ve 21'dir. Abort materyallerinde saptanan kromozom anomalilerine Tablo 4'te yer verilmiştir.

TKG olan kadınların abort materyalleri incelendiğinde %70-75'inde anembriyonik gebelik ve embriyonik anomali tespit edilmiştir. 233 missed abort

olgusunun incelendiği bir çalışmada 200'ünde anensefali, ensefalosel, spina bifida, sindaktili, polidaktili gibi fetal anomaliler saptanmıştır (25).

Tablo 4. Abort materyallerinin kromozomal yapısı.

Kromozomal yapı	İnsidans (%)
Normal (46 XX, 46 XY)	46
Anormal	54
Otozomal trizomi	31
Monozomi X (45 X)	10
Triploidi	7
Tetraploidi	2
Diğer	4

TGK değerlendirilmesinde herhangi bir dengeli yapısal kromozomal anormalliğin varlığı yönünden çiftlere periferel karyotiplendirme yapılmalıdır. Çiftlerin %2 ile %5'inde dengeli resiprokal translokasyonlar veya Robertsonian translokasyonlar izlenmektedir (10). Bu anomalilerin saptanması; tedavi algoritmasının belirlenmesi ve tedavi giderlerinin azaltılması açısından büyük önem taşır.

2.1.1.3. Anatomik Nedenler

Edinsel ve konjenital uterin anomaliler TGK'nın yaklaşık %10 ile 50'sinden sorumludur (26).

Konjenital uterin anomaliler tüm kadınların %7'sinde görölmektedir ve bu anomaliler TGK olan kadınların %10 ile 15'inde mevcuttur (27). Gebelik kaybı, uterin septumdaki vaskülaritenin azalması, inflamasyonun artması veya steroid hormonlarına duyarlılığın azalması nedeniyle uterus distansiyonunun bozulması veya anormal implantasyon ile ilişkili olabilir (28).

Uterus septum, TGK ile ilişkili en sık görölen konjenital anomalidir ve major uterin anomalilerin %80-90'nını oluşturmaktadır (29). Tedavi edilmeyen septat uterusu olan kadınlarda gebelik kaybı oranı %60'dan fazladır ve fetal sağkalım %6

ile 28 arasındadır (27). Septum ne kadar uzun olursa prognoz o kadar kötü olmaktadır.

Septumun gebelik kaybına neden olduğu mekanizma net bir şekilde açıklanamamıştır ancak septumun vaskülaritesi bozmasına bağlı anormal gelişen implantasyon olası neden olarak düşünülmektedir (30).

Uterin myomlar yerleşim yerlerine ve büyüklüklerine göre gebelik kaybına da neden olabilecek sorunlara yol açabilmektedir. Bu durum myomların endometrial kaviteye torsiyonu sonucu oluşan anormal implanyasyon, anormal vaskülarizasyon, endometrial inflamasyon veya artan sitokin üretimi gibi faktörler ile açıklanabilmektedir (31). Gebelik kaybı ile myomlar arasındaki ilişkiyi net açıklayan yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır.

Endometrial polipler ile TGK arasındaki ilişkiyi gösteren hiçbir veri bulunmamaktadır.

Servikal yetmezlik daha çok tekrarlayan ikinci trimester kayıplarının nedeni olup erken dönem gebelik kayıplarına yol açmaz.

Östrojen ve progesteron endometriumu gebeliğe hazırlayan hormonlardır. Normal endometrial reseptivite embriyonun kabulü, implantasyon, invazyon ve plasentanın gelişimine izin verir. Endometrial reseptivitedeki bu bozukluklar açıklanamayan infertilite ve TGK'ya neden olmaktadır.

Gebelik kaybı olan hastalarda intrauterin sineşi, myomlar ve uterin poliplerin yönetimi tartışmalıdır ve cerrahi tedavinin sonuçları düzelttiğine dair kesin kanıtlar bulunmamaktadır.

2.1.1.4. Endokrin Faktörler

Sağlıklı bir gebelik endokrin faktörlerin kontrolündedir. Endokrin faktörler TGK'ların %15 ila 60'nı oluşturmaktadır.

Pregestasyonel kontrolsüz diyabet maternal, fetal ve yenidoğan döneminde olumsuz etkiler doğurmaktadır. Ayrıca konjenital malformasyon ve spontan abortus riskini de arttırmaktadır (32).

Birçok çalışma gebeliğin erken dönemlerindeki yüksek hemoglobin A1C değerlerini (özellikle %8'in üstünde) düşük ve konjenital malformasyonların artışı ile ilişkilendirmişlerdir (33).

Kontrolsüz diyabeti olan kadınlarda artmış riskin, hiperglisemi, anne ait vasküler hastalık ve muhtemelen immünolojik faktörlere sekonder olduğu düşünülmektedir. İyi kontrol altındaki diyabetik kadınlarda ise gebelik kaybı riski yoktur (34).

Tiroid hormonları gelişen fetusun varlığı için elzemdir. Fetusun 12. gebelik haftasının sonuna kadar tiroid bezleri gelişimi tamamlanmaz. Annede yeterli tiroid hormon düzeyi sağlanamaz ise gebelik kaybı meydana gelir. Gebelik tanısı alan kadında tiroid hormonlarının en kısa zamanda değerlendirilmesi önemlidir.

Bazı çalışmalar, ötiroid olan kişilerde dahil olmak üzere artmış serum tiroid antikor konsantrasyonlarına (tiroid peroksidaz veya tiroglobulin) sahip kadınlarda fetal kayıp oranının arttığını göstermiştir (35). Tiroid otoimmünitesi ayrıca açıklanamayan infertilite ve implantasyon başarısızlığı ile ilişkilendirilmiştir (36).

Kötü kontrollü tiroid hastalığı (hipo veya hipertiroidizm) infertilite ve gebelik kaybıyla ilişkilidir. Fazla tiroid hormonu maternal metabolik işlev bozukluğundan bağımsız olarak düşük yapma riskini artırır (37).

Polikistik over sendromu (PCOS), infertilite ve gebelik kaybı ile ilişkilidir. PCOS'lu kadınlarda gebelik kaybı oranı, genel obstetrik popülasyona göre %20 ila 40 arasında daha yüksek olabilir (38). Bu hastalarda TKG mekanizması bilinmemekle birlikte serum Lüteinizan Hormon (LH) düzeylerinin yükselmesi, yüksek testosteron ve androstenedion konsantrasyonları (endometriyumu olumsuz yönde etkileyebilir) veya insülin direnci ile ilişkili olabilir (39). PCOS'lu kadınlarda görülen seks hormonu anormallikleri, prematür veya gecikmiş ovulasyona, kötü endometrial reseptiviteye ve prostaglandinlerin ve overyan büyüme faktörlerinin sentez ve salınımında bozulmalara neden olabilir (40).

Normal prolaktin düzeyleri gebeliğin erken dönemlerinde önemli bir rol oynayabilir. Yapılan bir çalışmada düşük yapan kadınlarda prolaktin düzeyleri gebeliğin erken dönemlerinde belirgin olarak yüksek bulunmuştur (41).

Progesteron başarılı bir implantasyon ve gebeliğin devamı için gereklidir. Dolayısıyla bozulmuş progesteron üretiminin gebelik başarısını etkilemesi muhtemeldir. Luteal faz yetmezliği korpus luteumun fonksiyonundaki bozukluğu ifade eden yetersiz progesteron salınımı ile giden bir durumdur. Bundan dolayı progesteron eksikliği TGK'lara neden olabilir. Luteal faz yetmezliğinin tanısı ve tedavisine yönelik henüz bir görüş birliği oluşmamıştır. Serum progesteron konsantrasyonları gebelik sonuçlar için prediktif olarak düşünülmezken, erken düşükleri önlemek için eksojen progesteron takviyesinin kullanılmasını destekleyen büyük çalışmalar bulunmamaktadır (42)

2.1.1.5. İmmünolojik Faktörler

Yetman ve arkadaşlarının yaptıkları metaanalizde TGK olan 1000'den fazla kadının %15'inde otoimmün faktörlerin bulunduğunu bildirmişlerdir (43).

Normal bir gebeliğin oluşumundaki her adım gibi gebelik kayıplarında da immünitinin muhtemel bir yeri olduğu ilişkilendirilmiştir. Hem otoimmün hem de alloimmün mekanizmaların gebelik kaybı patofizyolojisinde etken olduğunu bildirmişlerdir. Bir annenin semiallogenik konseptini tolere etmesine izin veren mekanizmalar iyi tanımlanmamış olduğundan üreme başarısızlığında anormal immünolojik faktörlerin rolünü değerlendirmek zordur (44).

2.1.1.5.1. Antifosfolipid Antikorlar

Bazı otoimmün hastalıklar kötü obstetrik sonuçlarla ilişkilendirilmiştir. Ancak antifosfolipid sendromunda (APS) gebelik kaybının varlığı hastalığın tanı ölçütlerinde bir kriterdir. TGK olan hastaların %5 ila 15'inde AFAS vardır (45).

AFAS, antifosfolipid antikorlarının (aPL) varlığında venöz veya arteriyel tromboz ve / veya gebelik kaybıyla karakterize sistemik bir otoimmün bozukluktur. Primer olarak ortaya çıkabileceği gibi sistemik lupus eritematosus (SLE) veya başka bir sistemik otoimmün hastalık ile de ortaya çıkabilir.

AFAS, ilk defa arter ve venlerinde tromboz öyküsü olan, antikardiyolipin antikorları (ACA) pozitif olan SLE'li bir hastada tanımlanmıştır. Bu kadınlarda TGK'da sık olarak görülmektedir.

Antifosfolipid antikorlar (aPL) toplumda belli oranda görülmektedir. TGK etyolojisinde klinik önemi olan üç aPL tipi; lupus antikoagülan (LA), antikardiolipin antikorlar (ACA) ve anti beta-2 glikoprotein I'dir. Obstetrik popülasyonda ACA prevalansı %2.2-9.1, LA prevalansı ise %0.3 olarak bulunmuştur (46). SLE'li hastaların yaklaşık %40'ında aPL mevcuttur ve bu antikorların tromboz oluşumu ve gebelik komplikasyonlarının ortaya çıkmasında etkili olduğu görüşü düşünülmektedir (47).

TGK olan olguların %5 ile 15'inde AFAS vardır. AFAS'lı kadınlar gebeliklerinde preeklampsi ve plasental yetmezlik gelişimi açısından da büyük risk altındadırlar. Yapılan bir çalışmada intrauterin gelişme geriliği olan fetusların annelerinde yaklaşık %25 oranında aPL saptanmıştır (48). Bu gebelikler TGK dışında preeklampsi, plasental yetmezlik ve intrauterin gelişme geriliği açısından da risk altındadırlar. Antifosfolipid sendromunun gebelikteki komplikasyonlarına Tablo 5'te yer verilmiştir.

AFAS'ın en sık görülen ve ciddi komplikasyonu venöz ve arteriyal trombozlardır. Trombozların %65-70'i venöz tromboz şeklindedir. Arteriyal tromboz olarak ise santral sinir sistemi etkilenmektedir (49). AFAS'lı gebelerde venöz tromboemboli genel popülasyondan daha yüksek oranda bulunmuştur.

Tablo 5. Antifosfolipid sendromunun gebelikteki komplikasyonları (50).

Maternal	Fetal
- Tromboz: venöz,arteryel veya kapiller - Erken başlayan preeklampsi/eklampsi - HELLP sendromu	- TGK - İntrauterin Gelişme Geriliği (IUGR) - Preterm doğum - İntrauterin fetal ölüm/ ölü doğum

AFAS'da gebelik kaybına neden olan mekanizma fetoplasental dolaşımın bozulması ve trofoblast gelişiminin yetersiz olmasıdır. aPL prevalansı sağlıklı kadınlarda %5 iken TGK olan kadınlarda bu oran %20 olarak bulunmuştur (51). aPL'ları olan 76 kadını inceleyen bir çalışmada düşüklerin yaklaşık yarısının 10.

gebelik haftasından sonra olduğu görülmüştür. Normal popülasyonda ise bu oran %10 olarak bulunmuştur (51).

AFAS'ın sınıflandırılması ilk olarak Japon araştırmacı Saporro tarafından 1998 yılında yapılmıştır. 2006 yılında bir panelde bu sınıflandırma güncellenmiştir. Tanı klinik kriterlerden bir tanesinin ve kandaki antifosfolipid antikorların pozitifliğinin 12 haftalık aralıklar ile alınan iki örnekte pozitif olması ile konulmaktadır (52):

- Üç kez 10 haftanın altında gebelik kaybı veya
- Bir kez 10 hafta veya üzerinde gebelik kaybı veya
- 37 haftadan önce doğuma neden olan ciddi preeklampsi, IUGR veya dekolman varlığı

2.1.1.5.2. Non-aPL Faktörler

ANA (anti nükleer antikor)'ların TGK öyküsü olan hastalarda yüksek düzeyde saptanması farklı otoimmün nedenlerin de olabileceğini düşündürmektedir (53). TGK olan hastaların yaklaşık %31'inde tiroglobulin antikorları ve tiroid peroksidaz antikorları pozitif saptanmıştır. Anti-tiroglobulin ve anti-peroksidaz antikorları normal gebelik öyküsü olan hastaların ise %10-18'inde pozitif saptanmıştır. Trofoblastik mononükleer hücrelerin endovasküler göçü implantasyon aşamasında görülmüştür ve bu göç antiendotelial hücre antikorları ile inhibe edilip fetal kayıplar ile sonuçlanabilir (54).

2.1.1.5.3. Diğer İmmünolojik Faktörler

Allogeneik faktörler, transplant alıcılarında greft reddi ile benzer bir mekanizma ile tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olabilir. Blastokist gelişimsel açıdan normal ve sağlam ise embriyo tamamen trofoblast hücreleri tarafından korunmaktadır. Bazı gebeliklerde ise blastokist genetik olarak deforme olmuş ve tamamen bozulmamıştır. Sonuç olarak paternal olarak türetilen antijenler maternal bağışıklık sistemine maruz bırakılır ve bu da bir greft reddine yol açar.

TGK olan vakalarda sekonder immün yanıtının erken kayıplara neden olduğu düşünülmektedir. TGK olan kadınlarda embriyolara immünolojik koruma sağlayan esansiyel kompleman proteinlerin uygun şekilde ekspresyonunun olmaması fetal kayıplara neden olabilir (örn Mannoza-bağlayıcı lektin, apoptozu indükleyen TNF süper aile üyeleri, makrofaj önleyici sitokin 1, Th1 / Th2 / Th3 tipi sitokinler ve HLA-DR, HLA-G veya HLA-E) (55).

2.1.1.6. Hematolojik Nedenler

Gebelikte koagülasyona eğilimde artış bulunmaktadır. Antepartum ve postpartum anne ölümlerinin önde gelen nedenlerinden biri tromboembolik olaylardır. Hem gebeliğin oluşturulmasında hem de devamında hemostaz mekanizmaları önemli bir rol oynar. Bazı çalışmalarda yazarlar TGK ve trombotik durumlar arasında bir ilişkinin olduğunu bulmuşlardır. Fetal kaybın oluşmasında düşünülen mekanizmalar; trombolitik sistemin engellenmesi, plasental tromboz, plasental enfarktüs, anormal prostasiklin metabolizması ve direkt sitotoksik etkileri içerir (56).

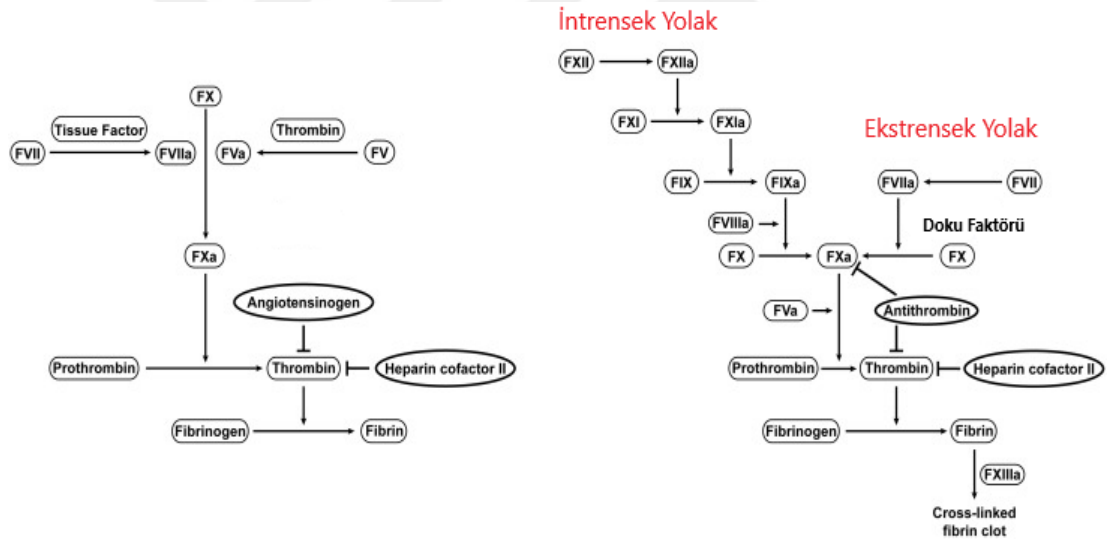
2.1.1.6.1. Hemostaz, İnflamasyon ve Koagülasyon Sistemi

Hemostaz sistemleri kanamanın kontrolünden sorumlu defans mekanizmalarıdır. Damar duvarında meydana gelen hasar ile başlar, sonrasında trombositlerin aktivasyonu, koagülasyon kaskadı, doğal antikoagülan ve fibrinolitik sistemin aktivasyonu ile devam eden süreçtir. Koagülasyon ve inflamasyon sistemleri ortak kısa yollar ile aktive edilmektedir. Hasarlı yüzey ile FXII (Faktör 12)'nin kontakt aktivasyonu ile intrinsek yol başlamaktadır. Bu süreci FXI (Faktör 11) ve FIX (Faktör 9)'un aktivasyonu izlemektedir. Sonunda ekstrinsek yol ile birlikte ortak yolun başlangıcındaki FX (Faktör 10) aktive olmaktadır (Şekil1).

Doku faktörü hasarlanan doku veya damar bölgesinden açığa çıkmaktadır. Doku faktörü-FVIIa (Aktif Faktör 7) kompleksinin etkisi ile FIX aktive olmaktadır. Ortak yolun ilk basamağındaki FX'un aktivasyonu ile pıhtılaşma kaskadı başlatılır.

Hasarlanan damar dokusu sonrası uyarılan trombositler çeşitli sitokinlerin, büyüme faktörlerinin, çeşitli proinflatuar mediatörlerin salınmasına neden olur. İnflamasyon ve koagülasyon sistemlerinin birleşiminde doku faktörü ve trombin aktif görev yapmaktadır. Lökositlerde ve endotel hücrelerinde inflamatuvar sitokinler doku faktörünün ekspresyonunu sağlar. İnflamatuvar süreçlerin başlatılmasında FVIIa yada FXa (Aktif Faktör 10) ile doku faktörünün kompleks oluşturması direk etki meydana getirir (57).

Doğal antikoagülanlar arasında öneme sahip olan üç tanesi; doku faktörü kısa yolu inhibitörü, antitrombin ve Protein C ve S'dir. Trombin endotelial trombomoduline bağlanır, Protein C ve kofaktörü olan Protein S aktive olur, FVa (Aktif Faktör 5) ve FVIIIa (Aktif Faktör 8) inaktive edilerek koagülasyon kaskadı kontrol altına alınır. Bu mekanizmanın ayrıca antiinflamatuvar rolü de bulunmaktadır (57).



Şekil 1. Koagülasyon kaskadı (58).

2.1.1.6.2. Gebelik Boyunca Gelişen Koagülasyon Değişiklikleri

Total Protein S seviyelerinde artan östrojene bağlı düşüş görülürken, C4b seviyelerinde yükselme olmaktadır. Bu durum gebelikteki koagülan faktörlerinde özellikle de faktör II, VII, VIII, IX, X ve von Willebrand faktör seviyeleri yükselişe, Protein S seviyelerinde ise ilk trimesterden itibaren %40-%60'a kadar düşüşe neden olur. Postpartum 3 ay süresince de düşük seviyelerde seyretmektedir. Artan Faktör

V ve azalan Protein S seviyeleri ise aktive olmuş Protein C rezistansına neden olmaktadır (59).

2.1.1.6.3. Trombofili

Trombofili pıhtılaşmaya eğilim durumudur ve batı popülasyonunun en az %15'ini etkilemektedir. Trombofilinin genel anlamda kabul edilmiş bir tanımılaması yoktur. Yıllarca tromboza yatkın hemostaz hastalıklarını tanımlamak için kullanılmıştır. Daha sonraları ise genetik veya akkiz tromboz gelişimine eğilim olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Birçok yayında tekrarlayan gebelik kayıpları olan kadınlarda koagülasyon defektlerinin kontrol gruplarından sık olduğunu bildirmişlerdir. TGK insidansında Faktör V Leiden eksikliği, aktive Protein C rezistansı, protrombin G20210A ve Protein S eksikliği gibi kalıtsal trombofilisi olan kadınlarda artış olduğu görülmüştür ancak diğer yazarlar maternal trombofili ile 10. haftadan önceki gebelik kaybı arasında hiçbir ilişki bulamamıştır (60). Oysa başka bir çalışmada partnerlerin birden fazla genetik trombofilik mutasyonlarının bir sonraki gebelikte gebelik kaybı riskini arttırdığını bildirilmiştir (61).

Trombofilinin neden olduğu gebelik komplikasyonları tekrarlayan gebelik kayıpları, preeklampsi, intrauterin gelişme geriliği ve ablasyo plasenta olarak özetlenebilir (2).

Trombofililer edinsel ve konjenital olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Tablo 6'da akkiz ve konjenital sınıflaması gösterilmiştir.

Tablo 6. Konjenital ve edinsel trombofili sınıflaması.

Konjenital Trombofili	Edinsel Trombofili
Faktör V Leiden mutasyonu Protein S eksikliği Protein C eksikliği Antitrombin eksikliği Disfibrinojenemi Hiperhomosisteinemi Nadir hastalıklar	Malignite Cerrahi (özellikle ortopedi) Travma Gebelik Oral kontraseptif Hormon replasman tedavisi Tamoksifen, Talidomid, Lenalidomid İmmobilizasyon Konjestif yetmezlik Antifosfolipid antikor sendromu Polisitemi vera Esansiyel trombositemi Paroksizmal nokturnal hemoglobinüri İnflamatuvar barsak hastalıkları Nefrotik sendrom

2.1.1.6.3.1. Faktör V Leiden Mutasyonu

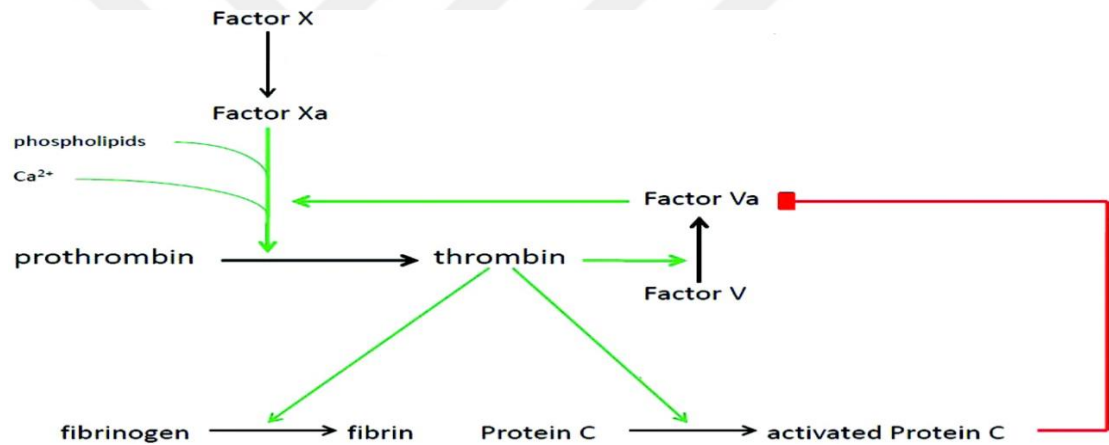
Faktör V plazmada inaktif kofaktör olarak bulunmaktadır ve trombin tarafından aktive edilmektedir. Aktive olan Faktör V, aktive Faktör VIII ile birlikte protrombinin trombine dönüştürülmesinde kofaktör olarak rol oynar (Şekil 2). Leiden mutasyonu; 1691. nükleotid olan Adenin yerine Guanin geçmesi ve bunun Faktör V'in 506. pozisyonundaki Arjininin Glutamin aminoasidi ile yer değiştirmesi sonucunda oluşan nokta mutasyonudur. Aktive Protein C normal pıhtılaşma sürecinde aktive Faktör V ve VIII'i belirli bölgelerden bölme ile inaktif eder. Mutasyon varlığında ise bu faktörün parçalanması inhibe olmaktadır. Sonucunda gelişmiş trombin oluşumuna ve artmış pıhtı oluşumuna neden olmaktadır (59).

Mutasyon otozomal dominant kalıtsal geçişlidir. Mutasyon Afrikalı Amerikalılar, Asyalılar ve Kızıldereliler'de nadirdir. Beyazlar içinde ise sıklığı %3-8 ve 1000 kişide 1 ise homozigottur. Aktive Protein C rezistansı olan olguların %95'inde mutasyon saptanmıştır. Yaşam boyu heterozigot olgularda venöz tromboz riski 3-10 kat, homozigot durumda ise 50-100 kat artar (62). Heterozigot Faktör V Leiden mutasyonu olan hastaların %20-50'sine venöz tromboz tanısı konulmuştur.

En sık konjenital trombofili nedeni Faktör V Leiden heterozigot mutasyonudur. Taşıyıcıların yaklaşık %2'sinde gebelikle ilişkili venöz tromboemboli

gelişmektedir. Venöz tromboemboli en fazla puerperium döneminde meydana gelmektedir. Homozigot mutasyon daha nadir görülmesine rağmen tromboz riskini 34 kat yükseltmektedir (63).

Oral kontraseptif kullarlarda ve gebe heterozigot kadınlarda tromboembolizm için 15 kat artmış risk bulunmaktadır. Faktör V Leiden mutasyonu taşıyıcılığına sahip tekrarlayan gebelik kayıpları olanların kontrol gruplarına göre fetal kayıp ve ölü doğum riski fazladır (64). Heterozigot mutasyonu olan ve edinsel aktive Protein C rezistansı olanlarda fetal kayıp ve abortus için iki kat daha yüksek risk bulunmaktadır. Açıklanamayan ilk trimester TGK olan ve heterozigot mutasyonu bulunan 19 kadının dahil edildiği bir çalışmada; Faktör V normal genotipli TGK olan 100 kadını içeren kontrol grubuna kıyasla canlı doğum oranının önemli ölçüde düşük olduğu bulunmuştur (64).



Şekil 2. Faktör V aktivitesinin düzenlenmesi (65).

2.1.1.6.3.2. Protrombin Gen Mutasyonu

İlk kez 1996 yılında Poort ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Trombofili etyolojisine dahil olan ek bir durum olarak keşfedilmiştir. TGK olan olguların %4-9'unda görülmektedir. Kalıtsal trombofililer arasında ikinci sıklıkta görülen bu mutasyonda; protrombin geninin 20210 nükleotid pozisyonunda Adenin yerine Guanin geçmesiyle bir nokta mutasyonu olmuştur. Geniş serileri kapsayan meta-analiz sonuçlarına göre, tüm TGK'yı, ilk trimester TGK ve geç dönemdeki fetal kayıpları iki-üç kat arttırmaktadır.

ABD’de ilk trimester gebelik kaybı olan 100’den fazla kadını içeren gözlemsel bir çalışmada kontrol gruplarına göre anlamlı olarak daha sık protrombin gen mutasyonu bulunmuştur (66). Üç veya daha fazla TGK olan 87 Orta Doğu’lu kadının dahil olduğu bir çalışmada ise protrombin mutasyonu ile gebelik kayıpları arasında ilişki varlığı net olarak gösterilememiştir (67).

Heterozigot mutasyonu olanlarda venöz tromboemboli insidansı gebelikte %2.3’e puerperiumda ise %1.9’a yükselirken homozigot mutasyonu olanlarda %26’ya ulaşmaktadır (63).

2.1.1.6.3.3. Kombine Heterozigot Mutasyon

Çok nadir görülen bir durumdur. Faktör V Leiden ve Protrombin gen mutasyonunun bir arada bulunmasıdır. Kafkas populasyonunun %0.01’inde görülür.

2.1.1.6.3.4. Antitrombin III Eksikliği

Antitrombin III olarak da bilinen antitrombin doğal antikoagülan özellikleri olup karaciğer ve endotel hücrelerinden sentezlenen doğal bir glikoproteindir. Koagülasyon sisteminin en önemli fizyolojik inhibitörüdür. Ayrıca FX, FIX, FXI, FXII ve FVIIa’ya bağlanmış doku faktörünü ve trombini inhibe eder. Heparin ile beraber inhibitör aktivitesi 5000-40000 kat artar (68).

Antitrombin (AT) eksikliği heterojen bir bozukluk olup iki temel tipi kabul edilmiştir:

1. Tip-I Eksikliği: AT molekülü az miktarda sentezlenmektedir ve işlevde azalma ile karakterizedir. Bu eksiklikler bozulmuş senteze, hatalı sekresyona ve kararsız antitrombine sekonder oluşmaktadır. Tip-I eksikliğe sebep olan 39 mutasyon bulunmaktadır.

2. Tip-II Eksikliği: AT seviyesi normaldir, işlevselliği bozuktur. Varyant AT molekülüdür. Bu eksiklikler proteaz inhibitör aktivitenin anormallikleri ya da heparin bağlanma yerindeki anormalliklerine ya da her ikisine bağlı ikincil olarak gelişirler. Üç alt tipi vardır:

- Tip II RS: AT'nin reaktif site defektidir. 11 mutasyon tanımlanmıştır.
- Tip II HBS: Heparin binding site defektidir. 11 mutasyon tanımlanmıştır.
- Tip II PE (Pleitropic Effect): Multiple fonksiyonel defektir. 9 mutasyonu tanımlanmıştır.

Antitrombin eksikliği tanımlanmış ilk kalıtsal trombofilidir ve trombofililer arasında en trombojenik olanıdır. Otozomal dominant kalıtım gösterir. Gebe olmayan kadınlara göre gebelik venöz tromboemboli riskini 4-5 kat arttırmaktadır (69). Antitrombin eksikliği ölü doğum ve gebelik kaybı için risk artışı ile ilişkilidir (70).

2.1.1.6.3.5. Protein C ve Protein S Eksikliği

Protein C ve Protein S, vitamin K bağımlı karaciğerde sentezlenen proteinlerdir. Protein S megakaryositlerde de sentezlenir. Protein C aktive olduğunda FVa ve FVIIIa inhibe edilir. Protein S'in kofaktör etkisi ile inhibitör etkisi artırılır.

Protein C (PC) eksikliği toplumda %0.2-0.5 oranında görülmektedir. Heterozigot PC eksikliği otozomal dominant şekilde kalıtsaldır. PC geni 2. kromozomdadır (2q13-14) ve karaciğerde vitamin K bağımlı sentezlenmektedir (71). Dolaşımda bulunan PC serin protez ile aktive olduktan sonra aktive Protein C (APC) halini alır. APC'nin primer etkisi FVa ve FVIIIa'nın inaktivasyonudur (72).

Otozomal dominant kalıtsal geçiş gösteren Protein S (PS) eksikliği toplumda yaklaşık %0.03-0.13 oranında görülmektedir. PS geni 3. kromozomdadır (73). PS vitamin K bağımlı bir glikoproteindir ve PC için kofaktör görevi görmektedir. PS varlığında APC, FVa ve FVIIIa inhibe olmaktadır ve trombin oluşumu azalmaktadır. PS eksikliğini 3 tipi bulunmaktadır:

- 1) **Tip I PS eksikliği:** Total ve serbest formlarda PS miktarlarında belirgin azalma bulunur.
- 2) **Tip II PS eksikliği:** Total ve serbest formlar normaldir, fonksiyonu bozuktur.
- 3) **Tip III PS eksikliği:** Total PS seviyesi normaldir, serbest PS miktarı azalmıştır.

Gebelik sırasında östrojen varlığında PS seviyesinde fizyolojik olarak belirgin düşme izlenir, bu sebepten gebelik esnasında PS eksikliği tanısı konulamaz. 1.derece akrabalarda PS seviyeleri bakılarak ailesel eksiklik araştırılabilir (59). PS, PC eksikliği ile faktör Va, VIIIa inaktivasyonu, AT eksikliği ile de trombin ve diğer enzimlerin inaktivasyonu bozulur ve tromboz riski artarak gebelik kaybı riski artmaktadır. PS, PC veya AT eksikliği olanlarda, olmayanlara göre hem erken hem de geç gebelik kaybı riskinde iki kat artış olmaktadır. Geniş serili meta-analizlerde PS eksikliğinde TGK riskinde 15 kat, 22 hafta sonrası fetal kayıp riskinde ise 7 kat artış saptanırken, PC ve AT eksikliği ile fetal kayıp riski arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (74).

2.1.1.6.3.6. Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz Polimorfizmi

Homosistein, aminoasit olan methionin metabolizmasından üretilmektedir (75). Artmış Hyc düzeyleri hem venöz hem de arteriyel tromboz için risk faktörü olduğu gösterilmiştir. TGK olanlarda yüksek kan Hyc birlikteliği gösterilmiştir (76). Son randomize, plasebo-kontrollü çalışmalara göre bu hastalarda; folat, pridoksin ve Vit B12 kullanılarak Hyc seviyeleri normal düzeye geldiğinde venöz tromboemboli tekralamasında (22) ya da ilk atağın ortaya çıkmasında (77) azalma olmadığı sonucuna varılmıştır. Hyc düzeyleri gebelik döneminde %50 oranında azalır ve folat tedavisi nöral tüp defektlerini engellemek için bu dönemde rutin olarak verilir (63).

MTHFR gen spesifik nokta mutasyonu (C677T) sonucu homosisteinin remetilasyonu bozulur. Homozigot mutasyonu genel popülasyonda yaklaşık %10-20 oranında görülmekte olup Hyc düzeylerinde hafif artışa neden olup plasental vaskülopati yaparak fetal olumsuz sonuçlara neden olduğuna inanılmaktadır. Heterozigot mutasyonda Hyc yüksekliği yoktur, arteriyel-venöz tromboz ve gebelik komplikasyonu için risk oluşturmaz. Birkaç çalışmada homozigot mutasyonun TGK'ya neden olduğu belirtilmesine rağmen, meta-analiz sonuçlarına göre tekrarlayan erken ve geç gebelik kaybı ile ilişkisi yoktur (78).

2.1.1.6.3.7. Trombomodulin

Trombomodulin 559 aminoasitten oluşan ve temel olarak büyük damarların endotel hücrelerinde, plasental sinsityotrofoblastlarda sentezlenen glikoprotein reseptörüdür. Sağlam endotelde trombomodulin trombin ile kompleks oluşturur ve bu kompleks PC'nin APC'ye dönüşmesini sağlar.

2.1.1.7. Alloimmün Faktörler

Gebelik boyunca plasenta maternal immün yanıtı engelleyen bir bariyer olarak görev yapar. Gebeliğin ilk dönemlerinde mekanik yapısı ile bu görevi yapar. Gebeliğin ilerleyen dönemlerinde ise trofoblast yüzeyindeki antijenler bu göreve katılır. Maternal immün sistem gebelik boyunca çeşitli alloantikörlerin sentezini stimüle eder, bu antikörler trofoblastları sararak maternal immunitenin sitotoksik cevabından korur. Yapılan çalışmalarda bu alloantikör sentezinde eksikliğinde gebeliklerin fetal kayıp ile sonlanabileceği gösterilmiştir (79).

2.1.1.7.1. NK (Natural Killer) Hücre Sitotoksitesisi

Natural killer (NK) hücreler istilacı trofoblastlara karşı immün savunmada kilit rol oynar. TNF-alfa tarafında NK hücreler aktive edildiğinde trofoblastlarda apoptozu indükleyerek düşüklere yol açabilirler. Yapılan bir araştırmada TGK olan hastalarda periferik kanlarda CD56+ NK hücre sayısı sağlıklı fertilesi olan gebe ve gebe olmayan kadınlara göre daha fazla saptanmıştır.

TGK olanlarda implantasyon alanının immunhistokimyasal incelemesinde; CD57 NK sayısının ve aktive lökositlerin önemli oranda artmış olduğu saptanmıştır. Bu da TGK'daki olası patofizyolojiyi açıklayabilir. TGK olanlarda uterus NK hücreleri trofoblast yüzeyindeki HLA-Cw moleküllerine spesifitesinin eksik olduğu dolayısıyla NK hücre aktivitesinin inhibisyonu bozulmakta ve embriyo yabancı hücre reaksiyonundan korunamamaktadır (80).

2.1.1.7.2. NK T hücreler

Desidualda bulunan TCR alfa-beta lenfosit ailesinin üyesi olan CD3⁺ T hücrelerin bir kısmı NK hücre markırı olan CD56 eksprese etmektedirler. Bu hücrelere NK T hücreler denir.

Bu hücreler NK ve T hücreleri tanıyan CD3⁺/CD56⁺ reseptörleri içerirler ve CD3⁺ insan desidual hücrelerinin %0.48'ini oluştururlar. Normal gebelikte desidual NK T hücrelerin oranı periferik hücreler ile aynıdır. Ancak missed abortus ve TGK'da desidual NK T hücre oranı daha periferik kandan daha düşük saptanmaktadır (81).

2.1.1.7.3. Th1-Th2 Dengesi

Gebelikte maternal immüneyi temel olarak humoral bağışıklık sistemi oluşturur (82).

Feto-maternal yüzeyde bulunan Th2 sitokin cevabı trofoblastlar ve desidual lökositler tarafından yönetilir. Spontan abortuslardan sorumlu 2 temel sitokin mevcuttur; TNF-alfa ve IFN-gama. Bu sitokinler in vitro ortamda trofoblastların apopitozunu indükler. Ek olarak IFN-gama ve TNF-alfa Fas ekspresyonunu uyarır ve trofoblastların Fas aracılı apopitozusa duyarlılığını artırır. Ek olarak IFN-gama ve TNF-alfa Fas ekspresyonunu uyarır ve trofoblastların Fas aracılı apopitozusa duyarlılığını artırır (83).

2.1.1.7.4. Regulator T Hücreler

Regulator T hücreler (Treg) periferik kandaki CD4 ve CD25 eksprese eden CD4⁺ alfa-beta T lenfositlerdir. Gebelik süresince estradiol ve TGF-β'nın etkisi ile CD4⁺ CD25⁻ Treg hücre prekürsörleri; CD4⁺ CD25⁺ hücrelere dönüşür.

TGK öyküsü olanlarda Treg hücrelerin hem folliküler hem de luteal fazla sayılarının postmenapozal dönemde olduğu gibi düşük olduğu saptanmıştır. Azalmış miktara ek olarak TGK olan kadınlarda Treg hücre fonksiyonel aktivitesi bozuk olarak saptanmıştır (84).

2.2. Apoptozis

Her hücre doğar, sonrasında çoğalır, farklılaşır ve en sonunda ölür. Programlı hücre yoğunlaştırma ile karakterize noninflamatuvar hücre ölümüne apoptozis denir. Apoptozis ile programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı eş anlamda kullanılmaktadır (85). Apoptozis aslında fizyolojik bir olaydır. Moleküler mekanizması net olarak bilinmemektedir. Hücrelerin genetik olarak hafızalarındaki intihar programının belirli sinyallerle, patofizyolojik durumlarla ve oksidatif stres gibi olaylarla aktive olması apoptozisi başlatmaktadır (86).

Apoptozisi etkileyen uyarıların bazıları; büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, hücre içi kalsiyum seviyesinin artması, Transforming Growth Factor (TGF- β) ve Fas/FasL sisteminin aktive olması, p53'ün aktive olması, enfeksiyonlar ve glukokortikoidler, tümör nekroz faktör (TNF) gibi sitokinlerdir. Ayrıca apoptozis mekanizması, hücre tipine ve uyarana göre farklılıklar gösterebilmektedir.

Apoptozis morfolojik olarak benzersizdir ve ana morfolojik olay, nükleusun kondensasyonu ve parçalanmasıdır. Apoptoziste kromatin süperkondens duruma gelerek nükleus zarı altında kresentik bir hal oluşturur. Kromatindeki değişikliklerin başlamasının hemen öncesinde sitozolik Ca^{+2} miktarında önemli bir artış olmaktadır. Floresan boyamada DNA boncuklanmalar şeklindedir, nedeni ise DNA'nın Ca^{+2} hassas endonükleaz ile internükleozomal bölgelerden 180-200 baz çiftine ayrılmasıdır (87). İmmün elektroforezde 'ladder patern' olarak nitelendirilen ip merdiven şeklinde bir görünüm vardır (88).

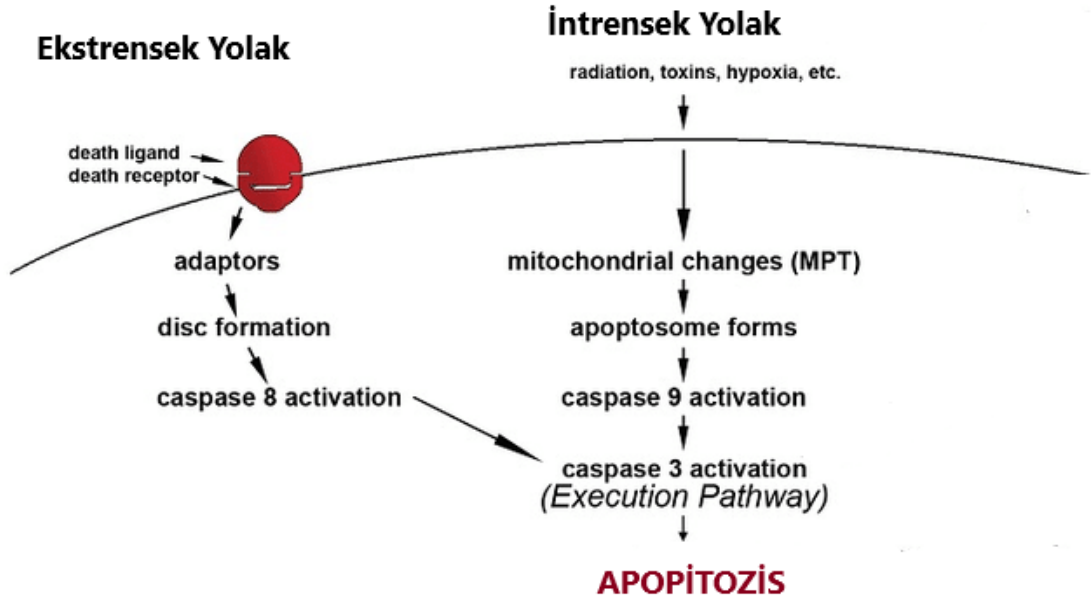
Apoptoziste yaklaşık 300.000 kırılma meydana gelir. Normalde bir hücrede birbirini izleyen 7 kırılmanın tamiri yapılırken, hücre apoptozisteki bu tamiri yapamaz. Apoptoziste hücreler birleşme noktalarından ayrılır ve farklılaşmış yüzey organellerini kaybeder. Hücre bariz şekilde büzülür, hacimlerinin %30'unu kaybeder. Hücresel büzülme Na, K, Cl transport sisteminin durması ve hücre içi ile dışı arasındaki sıvı akışının olmaması sonucu olur (89).

Apoptotik uyarım alan hücrenin çevre ile olan iletişimi kesilir ve mikrovillusları kaybolur. Işık mikroskopunda apoptotik hücreler incelendiğinde, hücrelerin etrafında açık bir halo görülmektedir. Apoptotik hücre membranı intaktır ve üstünde küçük cepcikler oluşur (90). Sonrasında plazma membranında

tomurcuklanmalar başlar ve hücre sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere bölünür (91). Transglutaminaz enzimi zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılımda etkili olmaktadır.

Apoptotik hücreler makrofajlar ve çevre hücreler tarafından tanınır ve fagosite edilir. Apoptotik hücrelerin tanınması ve intakt hücrelerden ayrılması plazma membranında meydana gelen değişikliklerle olur. Hücre zarında iç yüzeyden dışarıya aminofosfolipid transferaz ile fosfatidilserin translokasyonu olur. Fagositik hücrelerin reseptörleri fosfatidilserin ile bağlanır ve fagositozu aktive eder (92).

Trombofili öyküsü olanlarda tekrarlayan gebelik kayıplarını önlemek için anfraksiyone heparin ve düşük molekül ağırlıklı heparin sıkça kullanılmaktadır. Heparinin düşükle sonuçlanan gebelik üzerine etkisi iki hipotezle açıklanır; birinci hipotez anormal koagülasyonun önlenmesi ve plasental iskeminin azaltılması; ikinci hipotez ise hücre modülasyonuna direk etkisi, trofoblast proliferasyonunu düzenlenmesi ve apoptozisi önlemesidir.



Şekil 3. Apoptozis mekanizması (93).

2.3. Oksidatif Stres

2.3.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller; yarı ömürleri kısa, düşük molekül ağırlıklı ve negatif yüklü elektron sayısının, pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmayan moleküllerdir (94). Ayrıca dış yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklaşmamış elektron taşırlar, birçok fizyolojik ve patolojik durumda üretilebilirler. Oldukça kararsız halde olan bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerle reaksiyona girebilir ve son yörünge elektronlarını paylaşabilirler. Atomların dış yörüngelerindeki elektronları sayesinde her tip kimyasal ve biyokimyasal tepkime gerçekleşir. Son yörüngelerindeki paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin reaktivitesini artırır, dolayısıyla serbest radikallerin kimyasal aktifliği yüksektir (95).

Oksijen (O₂) bütün hücelere kolaylıkla giren ve en çok tüketilme özelliğine sahip olan moleküldür. Radikal olmaya çok elverişli olduğundan serbest radikal denince aslında serbest oksijen radikalleri, daha genel anlamda ROT ifade edilmektedir. Organizmada fizyolojik şartlar altında ROT ve serbest radikaller devamlı oluşmaktadır. Serbest radikaller pozitif veya negatif yüklü ya da yüksüz olabilirler (96).

Serbest radikaller, endojen ve ekzojen nedenlere bağlı olarak üretilebilir. Fizyolojik olarak endojen kaynaklı indirgenme-yükseltgenme (redoks) tepkimelerinde; mitokondriyal, endoplazmik ve nükleer elektron iletim sistemlerinde (Sitokrom P-450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi metabolik olaylar sırasında üretilir. Ayrıca eksojen kaynaklı olarak da bu moleküller hücre içerisinde ultraviyole ışınları, x ışınları gibi radyant enerjinin emilimi, hava kirliliği, sigara dumanı, ilaç kullanımı gibi çevresel faktörlerin etkisiyle oluşabilirler (97).

İnsan vücudunda serbest radikaller 3 yolla meydana gelir:

1. Normal molekülden bir elektronun kaybedilmesi veya molekülün heterolitik bölünmesi ile oluşur. Radikal özelliği olmayan bir molekülden elektron kaybı esnasında dış yörüngede paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu

meydana gelir. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan bir tanesinde kalır (97).

2. Kovalent bağ taşıyan molekülün homolitik bölünmesi sonucu oluşur. Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların parçalanmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı atomlar üzerinde bulunur ise, her iki atom üzerinde paylaşılmamış elektron bulunur. Sonuç olarak, reaktivite düzeyi yüksek iki adet serbest radikal oluşur (98).

3. Normal bir moleküle bir elektronun eklenmesi sonucunda oluşurlar. Radikal özelliği olmayan bir moleküle tek elektron eklenmesi ile dış yörüngede paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir. O_2 'in tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksitin ($O_2^{\cdot-}$) oluşumuna neden olur (95).

Radikal özelliği olmayan türler bu tepkimelerden herhangi biri ile radikal hale gelir. Serbest radikaller ile radikal özelliği olmayanların tepkimeleri sonucu, tepkimeye giren moleküller sıra ile serbest radikallere dönüşür ve hasar zincirini ilerleterek yayarlar (96).

Bazı durumlarda, oksidanlardaki artış ve antioksidanlarda azalma önlenemez. Bu süreç hücresel düzeyde hasara sebep olur. Oksidan / antioksidan denge, oksidatif taraf lehine kayar. Oksidatif stres plasental apopitozisin direk uyarıcısıdır, bu sebepten dolayı plasental fonksiyonu korumak için antioksidan tedavi verilmelidir. Son yıllarda hücre düzeyinde meydana gelen bu hasarın gebelik kayıplarına sebep olabileceği düşünülmüş ve bunun için çeşitli araştırmalar yapılmıştır.

2.3.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Aerobik organizmalarda oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile süperoksit radikali oluşur (99).

Mitokondriyal elektron transfer zincirinde redükte nikotinamid adenin dinükleotidin (NADH) okside nikotinamid adenin dinükleotide (NAD⁺) okside olması sonucu süperoksit radikali üretilir. Genel olarak anyon şeklinde olmasına rağmen, ortamın pH sına bağlı olarak proton alarak katyon haline gelebilir. Bu

durumda perhidroksi radikali adını alır. Bir serbest radikal olmakla birlikte, süperoksit kendisi direkt olarak zarar vermez. Önemli olan, H₂O₂ kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit, nötrofillerin bakterisidal aktivitesi, apopitozis, inflamasyon ve vasküler fonksiyonların düzenlenmesi gibi yararlı etkilere sahiptir. Azalmış süperoksit düzeyleri, bakteriyel enfeksiyonlara artmış bir yatkınlığa sebep olabilir. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile artmış süperoksit düzeyleri H₂O₂ ve oksijene dönüştürülerek azaltılır. Böylece hücrel süperoksit düzeyleri kontrol altında tutulur (100) .

2.3.1.2. Hidrojen Peroksit

Oksijenin enzimatik yolla iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik / nonenzimatik dismutasyonu sonucu hidrojen peroksit oluşur (101).

Aslında hidrojen peroksit bir radikal değildir. Üretildiği bölgede kalan süperoksitin tersine membranları geçebilen, hücre içine diffüze olan ve yarı ömrü uzun bir oksidan olarak bilinir. Bu nedenle süperoksitin ulaşamadığı membranla korunan yapılara ulaşabilmektedir. Burada süperoksit ile reaksiyona girerek Haber-Weiss reaksiyonu sonucunda daha reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir . H₂O₂ Fenton reaksiyonu ile de serbest Fe⁺² ile reaksiyona girerse demir okside olurken hidroksil radikali oluşur. Bu formdaki reaktif demirin çok güçlü oksitleyici özelliklere olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Biyolojik sistemlerde oluşan H₂O₂'nin belirtilen potansiyel oksitleyici özelliği nedeniyle derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi, önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri üstlenirler (101).

2.3.1.3. Hidroksil Radikali

Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten hidroksil radikali oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması ile de oluşmaktadır.

Hidroksil radikali, bilinen en reaktif radikal ajandır. Nükleik asitler, aminoasitler, organik asitler, fosfolipidler ve şekerler gibi biyokimyasal maddelerin çoğuyla reaksiyona girebilmektedir (100). DNA ile tepkimeye girmesi sonucu baz modifikasyonları ve delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilir; ileri derecedeki DNA hasarları onarım edilemediğinden hücre ölümüne neden olur. Proteinler üzerinde oluşan oksidasyonlar yapısal değişimine neden olup proteinler proteolitik yıkıma götürülür. Hücre zarı su ihtiva etmediğinden, hidroksil radikalının temel hedefi yağ asitleridir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozmakta ve geçirgenliğini artırıp yine hücre ölümüne neden olabilmektedir (101).

2.3.1.2. Serbest Oksijen Radikallerin Biyolojik Etkileri

Organizmada serbest radikallerin üretim hızı ile bunların yıkım hızı bir temel denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılmaktadır. Oksidatif denge sağlandığı sürece, serbest radikallerden organizma zarar görmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da yıkım hızında bir azalma bu dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres olarak nitelendirilen bu durum, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonucunda doku hasarına yol açmaktadır (102). Hücre düzeyinde meydana gelen bu değişikliklerin plasental disfonksiyon sonucu gelişen plasental iskemi, hipoksi ve buna bağlı toksik oksidan moleküllerin üretim artışı olabileceği savunulmuştur. Bu veriler ışığında oksidasyon artışı ve antioksidanların azalmasını habituel abortuslarla ilişkilendirmişlerdir.

2.3.1.2.1. Membran Lipitleri Üzerinde Etkileri

Biyolojik membranlar ve hücre içi organeller membran fosfolipidlerindeki doymamış yağ asitlerinin varlığı nedeniyle oksidatif strese hassastırlar (95). Serbest radikaller, hücre bileşenleri ile etkileşime girebilmeleri için hücre membranını geçmek zorundadır. Serbest radikallerin etkisi ile hidrojen atomunun yağ asidi zincirinden uzaklaşması, bu yağ asidi zincirinin de radikal özelliği kazanmasına neden olur. Zincir reaksiyonları şeklinde devam eder ve sonucunda malondialdehit, 4-hidroksinoneal, alkoller, etan ve pentan oluşur. Membran bütünlüğünün lipit

peroksidasyonu sonucu bozulması ile membran proteinleri, reseptörleri ve ayrıca bunlara bağlanan enzimler inaktive olurlar.

DNA'nın yapısında yer alan nitrojen bazları ile malondialdehit reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajen, genotoksik ve karsinojen etkiler gösterir. Lipit peroksidasyonu ile oluşan membran hasarı irreversibledır (98).

2.3.1.2.2. Proteinler Üzerinde Etkileri

Serbest radikallerin özellikle duyarlı aminoasitlerle doğrudan etkileşimiyle hücrenin protein yapıları hasara uğramaktadır. Metionin, sistein gibi terminal sülfidril grubu bulunduran aminoasitler ile triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik aminoasitler oksidasyona en fazla uğrayan moleküllerdir. Proteinler serbest radikallerin etkilerine karşı lipitlerden daha az hassastırlar ve etkilenme seviyeleri aminoasit içeriklerine bağlıdır. Oksidasyona sekonder proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında meydana gelen değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir (103). Aminoasitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmentasyonu ve agregasyonu veya çapraz bağlanmaları gibi yapısal değişiklikler meydana gelmektedir. Ayrıca serbest radikaller, protein yapısında olan enzimlerin aktivitelerini değiştirir, membran transport proteinlerini ve reseptör etkileşimlerini bozarlar ve immün sistemi uyarabilecek antijenik değişikliklere de neden olabilirler (104).

2.3.1.2.3. Nükleik asitler ve DNA Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin değişik mekanizmalar ile, DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, zincir kırıkları, DNA-protein çapraz bağlanması gibi lezyonlara neden olarak hasara sebep olduğu bilinmektedir (101). Oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgeler nükleotidin yapısı içinde yer alan pürin ve pirimidin bazlarıdır. Özellikle guanin bazının bu serbest radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte, sitotoksikite ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (103).

2.3.1.2.4. Karbonhidratlar Üzerinde Etkileri

Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler otooksidasyona maruz kalarak, O_2^- ve H_2O_2 radikalleri oluşur. Monosakkaritlerin otooksidasyonu, çeşitli hastalıkların patogenezinde önemli rol üstlenmektedir (98).

2.4. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali

2.4.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi

Hücrelerin fonksiyonları hücrel iyon değişimleri ile düzenlenmektedir. Kalsiyum (Ca^{+2}), hücre içi olaylarda ve hücreler arası etkileşimde önemli roller üstlenmektedir. Canlılarda meydana gelen birçok önemli olayda Ca^{+2} belirleyici bir öneme sahiptir. Vasküler düz kasının kasılması / gevşemesi, hücre çoğalması, hücrel hareket, hormon salınımı, metabolizma, sinir sisteminin fonksiyonu, yumurtanın dölleme sonrasında aktivasyonu, protein döngüsü, gen ekspresyonu, yara iyileşmesi, karaciğer hücrelerinin fizyolojisinin düzenlenmesi, apoptozis gibi birçok fizyolojik olayı kontrol eden bir iyondur (105). Normal sinirsel fonksiyonlarda önemli rol oynar (106). Plastisite ve sinaptik transmisyon gibi önemli sinirsel olayları düzenler (107).

Günümüzde doğrudan bu kanalları doğrudan kapatan bir kanal blokleri mevcut değildir. Ayrıca, mevcut Ca^{+2} kanal blokörleri de bu kanalları bloke edememektedir. Patch-clamp çalışmaları önderliğinde TRPM2 kanallarını doğrudan bloke eden maddelerin araştırılması önem arz etmektedir. Çalışmamızda kullanılacak düşük molekül ağırlıklı heparinin oksidatif stres üzerine etkisini araştıran yayınlar oldukça fazladır. Fakat bunların trombofili nedeniyle tekrarlayan gebelik kaybı yaşayanlarda TRPM2 ve TRPV1 kanalları üzerinde etkisi hakkında literatürde yeterince bilgi bulunmamaktadır.

2.4.2. Hücre içi Kalsiyum Sinyalinin Oluşumu

Endotel kaynaklı mediatörlerin sentezi veya salınımında Ca^{+2} iyonunun önemi kısmen açığa kavuşturulmuştur. Son dönemlerde patch-clamp ve

mikrospektrofluorometrik araştırma metodları ile flüoresan ışığına duyarlı çeşitli boyalar hücre içerisindeki iyonik akımları ve hücre içi serbest iyon düzeylerinin ölçülmesini mümkün kılmıştır (108). $[Ca^{+2}]_i$, hem ekstrasellüler ortama, hem de intrasellüler ortamda Ca^{+2} depolayan yapılara göre çok düşüktür. Bu fark, Ca^{+2} için çok büyük bir sürdürücü kuvvet oluşmasına neden olur. Bu nedenle Ca^{+2} 'un hücre içinde sinyal molekülü olarak görevi yapabilir ve bu özelliğinden dolayı hücre için bir ikincil habercidir (106).

Hem hücre zarı, hem de ER (endoplazmik retikulum) zarından Ca^{+2} geçişi, bu sürdürücü kuvvetin etkisi ile protein yapısındaki kanallardan olur. Bu kanallar, genellikle kapalı durumda olup; voltaj, mekanik uyarı veya ligand bağlanması ile aktive olur ve Ca^{+2} geçirgenliği sağlarlar (109).

Hücre dışından sitoplazmaya Ca^{+2} geçişi sağlayan kanal tipleri şunlardır:

1) Pasif kanallar: Kalsiyumun sızarak hücreye girdiği kanallardır. Bu kanalların aktivasyon mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Hücre içi Ca^{+2} depoları, Ca^{+2} sinyali sonucu ya da daha farklı şekillerde boşaldığında, bu kanallar hücre dışından sitoplazmaya Ca^{+2} girişine sebep olurlar.

2) Aktif kanallar: Bunların değişik tipleri vardır;

A-Voltaj Bağımlı Ca^{+2} kanalları: Membran depolarizasyonu sonucu aktive olurlar. Bu aktivasyon sonucu kanallar Ca^{+2} 'a geçirgen hale gelir. Bu sayede hücre zarındaki elektriksel hadiseler, hücre içindeki fizyolojik olaylarla ilişkilendirir (110).

B- Ligand Bağımlı Ca^{+2} kanalları: Hücre dışından gelen ligandların bağlanması ile aktive olurlar ve Ca^{+2} 'a geçirgen hale gelirler. Bu kanallar aynı zamanda birer reseptör görevi görürler. Nikotinik asetilkolin reseptörleri bu kanallara örnek verilebilir (111).

C- Store Operated Channels (SOC Kapıları): Bu kanallar ikinciler haberciler ile [örneğin inositol trifosfat (IP3)] ile hücre içerisi serbest kalsiyum düzeylerinin arttığında açılan kanallardır.

D- TRP Kanalları: Voltaj bağımsız kanallardır. Kalsiyum, sodyum ve potasyuma geçirgen katyon kanallarıdır. Bu kanallar hakkında detaylı bilgi aşağıda verilmiştir.

2.5. Transient Reseptör Potansiyel (TRP) Kanalları

TRP kanalları drosophila türü sirke sineklerinin gözlerinde bulunan fotoreseptörlerde ilk defa 1998 yılında keşfedilmiştir. Mutasyona uğramış bu kanalların sürekli bir ışığa karşı geçici gerilim oluşturmasıyla karakterize olduğu ve buna bağlı görsel defekt olduğu bulunmuştur (112). TRP kanalları, memelilerden omurgasızlara kadar canlıların dokularındaki proteinlerin çeşitli bir grubunu oluşturmaktadır (113).

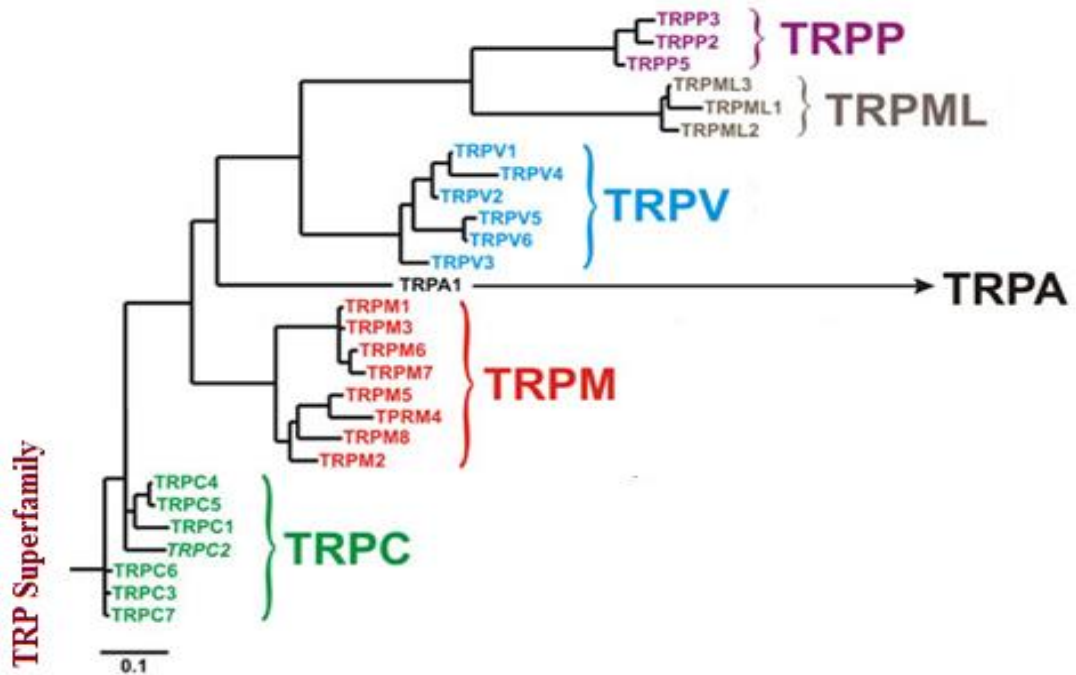
TRP kanalları voltaj bağımsız olan, kalsiyum, sodyum ve potasyuma geçirgen olan katyon kanallarıdır (114).

TRP katyon kanalları üst ailesi voltaja duyarlı Ca^{+2} 'a geçirgen katyon kanallarının geniş bir bölümünü içine almaktadır. Devam etmekte olan genetik araştırmalar sonucunda günümüzde memelilere ait toplam 28 çeşit TRP kanalları memelilerde 6 alt aileye gruplandırılmıştır. Bunlar; TRP conancial (TRPC) 7 alt aileden, TRP vanilloid (TRPV) 6 alt aileden, TRP melastatin (TRPM) 8 alt aileden, TRP polycystein (TRPP) 3 alt aileden, TRP mucolipin (TRPML) 3 alt aileden ve TRP ankyrin (TRPA) 1 alt aileden oluşmaktadır (Şekil 3). Günümüzde TRP kanallarını nelerin aktive ve bloke ettikleri net olarak bilinmemektedir (115). Ancak, birçok hastalığın etyopatogenezinde bu kanalların aktivasyonu ve inaktivasyonu ile alakalı olduğundan bu kanallara olan ilgi artmaktadır.

TRP kanalları dokunma, duyma, tat alma, görme, termal hassasiyet gibi duyuların algılanmasında bir öneme sahiptir (116). Genel olarak N terminal, transmembran bölgesi ve C terminal olmak üzere 3 ana kısımdan oluşur (117). Tekrarlayan ankrin ve coiled-coil olarak adlandırılan yapılar N terminalinde iken, TRP homoloji ve enzimatik Nudiks boks segmentleri C terminalinde bulunmaktadır. C terminalinde enzimatik bir bölge bulunması ve aynı zamanda kanal görevi görmesi nedeniyle 'zincir enzim' olarak da adlandırılmaktadır. İyonların bir taraftan diğer tarafa geçişi, transmembran bölgesindeki 5. ve 6. segmentler arasındadır. Kanal gözeneginin 5. ve 6. segmentleri arasındaki bir iletken iyon etrafında homo yada heterotetromerik düzenlemelerle TRP kanalları voltaj kapılı K^{+} kanallarına benzer basit bir yapıya sahiptir (112). Bu benzerlik sadece tek değerliğe sahip katyonlar için geçerli değil, Ca^{+2} ve Mg^{+2} içinde geçerlidir.

Ayrıca TRPM2 ve TRPC kanallarının Nudiks alanları ADPR pirofosfataz enzim aktivasyonuna sahiptir ve ADP-ribozu, riboz 5- fosfat ve adenozin monosfosfata böler ve kanal açılır. ADPR pirofosfataz aktivasyonu TRPV kanallarında bulunmamaktadır. Çok yönlü protein kinaz A ve protein kinaz C varsayılan fosforilasyon alan fonksiyonları belirtilmiştir. Birkaç TRP kanallarında da fosfotidilinositide 3 kinaz SH2- tanıma alanları keşfedilmiştir (118).

TRP kanalları ya doğrudan plazma zarlarındaki Ca^{+2} kanalları gibi davranmakta ya da Ca^{+2} kanallarının modülasyonu için sürükleyici güç olan zar potansiyelini değiştiren sitozolik serbest Ca^{+2} kanallarında değişime yardımcı olmaktadır (119). Tüm işlevsel TRP kanalları (TRPM4 ve TRPM5 dışında) Ca^{+2} için geçirgendirler. TRPV5 ve TRPV6 ise Ca^{+2} 'a çok geçirgendir. TRPM6 ve TRPM7 Mg^{+2} 'a çok geçirgen, TRPV1,TRPML1 ve TRPP3 kanalları da H^{+} iyonlarına çok geçirgendirler (120).



Şekil 4. TRP kanalları ailesi (121).

2.5.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin (TRPM) Kanalları

TRPM alt ailesinin 8 üyesi mevcuttur ve bunlar 4 grup içerisinde yer alırlar. Bunlar; TRPM2/TRPM8, TRPM1/TRPM3, TRPM4/TRPM5 ve TRPM6/TRPM7'dir

(115). İlk keşfedilen TRPM1 kanallarıdır ve ilk kez melanoma hücrelerinde bulunmuşlardır (120). Bundan dolayı melanoma sözcüğünün baş harfi olan 'M' ile ifade edilirler. TRPM1 kanallarının yüksek oranda metastatik potansiyele sahip olan melanoma hücrelerindeki ekspresyonunun, nonmetastatik hücrelerdekine göre daha düşük olduğu bulunmuştur (122). Bununla beraber normal özellikteki dokularda da bulunduğu tespit edilmiştir. TRPM kanalları 6 segmentten oluşan bir transmembran bölgesine, N ve C terminal bölgelerine bulundurlar (114).

TRPM alt ailesinin özellikle oksidatif stresle aktive olan TRPM2 kanallarının hücre farklılaşması ve canlılığın devam ettirilmesi gibi önemli işlevlerin yerine getirilmesinde görev aldıkları bilinmektedir (123).

Hem TRPM6 hem de TRPM7 fonksiyonel C terminali serin/treonin kinaz ihtiva ederken, TRPM2 ADPR pirofosfataz faaliyeti gösteren fonksiyonel NUDT9 homoloji alanı bulundurur. Ca^{+2} geçirgenliği farklılık göstermektedir. TRPM1 kanalı hariç tüm TRPM katyon kanalları bu güne kadar karakterize edilmemişlerdir. TRPM4 ve TRPM5 ısıya duyarlı Ca^{+2} aktif kanallarıdır (120). TRPM2; ADPR, H_2O_2 ve sıcaklıkla aktive olurlar. TRPM3 kanallarının fonksiyonu TRPM6 ve TRPM7 kanalları gibi hücre içi Mg^{+2} seviyesi ile ilgilidir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada düşük sıcaklıkla ve mentol ile aktive edilen TRPM8 kanallarının hem tekrar normal vücut sıcaklığına döndüğünde hem de antranilik asit uygulandığında, önemli miktarda kanalların inaktive olduğu bildirilmiştir (117).

2.5.1.1. Transient Reseptör Potansiyel Melastatin 2 (TRPM2) Kanalları

TRPM2, kalsiyuma geçirgen nonselektif katyon kanallarıdır (124). TRPM2 geni ilk kez 1998'de klonlanmıştır (125). Bu kanallar daha önceleri TRPC7 ve LTRPC2 olarak daha sonra yapılan filogenetik sınıflandırma sonucunda günümüzde de yaygın kullanılan TRPM2 olarak adlandırılmıştır (116). TRPM2 kanalları başta beyin ve kemik iliği olmak üzere böbrek, bağırsak, karaciğer, akciğer, testis, prostat, pankreas, iskelet kası, lökositler ve arka kök gangliyonları (AKG) gibi birçok doku ve hücrede bulunmuştur (126).

TRPM2 kanallarının 4 alt tipi mevcuttur ve kanalların moleküler yapısı diğer kanallar gibi 6 segmentten meydana gelip, katyon girişlerine 5. ve 6. segmentler

arasında gözlenmektedir. Bu kanallar sodyum ve potasyum iyonlarına geçirgen olup kalsiyumun geçişinde de çok önemli rol oynarlar (127). TRPM2'nin transmembran bölgesinin yanında intraselüler N ve C terminal uçları vardır. TRPM2 katyon kanallarının C terminalindeki Nudiks alanında (NUDT9) bulunan ADPR pirofosfataz enzimiyle, ADPR, riboz-5 fosfat ve AMP ye bölünüp TRPM2 kanallarının açılmasına neden olur (124). Yani anahtarı kanalın içerisindedir. TRPM2 kanallarının oksidatif stres sonucunda da aktive olabileceği gösterilmiştir (128, 129). Bu oksidatif stres ve ADPR ile aktivasyonu kesinleşmiş olmasına rağmen bunların birlikte mi yoksa ayrı ayrı mı kanalı aktive ettikleri günümüzde hala netleşmemiştir. Bazı araştırmacılar kanalların hem ADPR ve oksidatif stresle ayrı ayrı aktive olduklarını bildirmelerine rağmen (124), diğer bazı araştırmacılar oksidatif stres ürünlerinin ADPR düzeyini artırdığını ve sonucunda ADPR kanalı açtığını yani oksidatif stresin kanal aktivasyonunda dolaylı etkisinin olduğunu savunmuşlardır (130).

ADPR üretimi, G proteine bağlı reseptörlere ligand kanal aktivasyonu ile başlatılır. Reseptör aktivasyonu aynı zamanda intrasellüler Ca^{+2} yoğunluğunun yükselmesi, IP3 tarafından hücre içi organellerden kalsiyumun serbest bırakılmasına neden olur. ADPR polimerlerinin uyarılması sonrası poli (ADPR) polimeraz-1 (PARP-1)'e ve sonrasında poly (ADPR) glikohidrolaz (PARG) tarafından ADPR'ye hidroliz edilir. Bu olay hücreyi apoptozise gidinceye kadar uyarabilir.

Metabolizma ürünü olan H_2O_2 hücre içerisine girerek TRPM kanalını aktive etmesiyle hücre içerisine Ca^{+2} un girişinin artırdığına inanılmaktadır (131). Sitozolde kalsiyum iyonunun artışı mitokondride depolarizasyon ve porların açılmasını sağlar. Bir kısım araştırmacılara göre ise H_2O_2 hücre içi organellerde ADP-riboz sentezini artırmakta ve kanalın açılmasını sağlamaktadır (130). Ayrıca, hücre kültürlerinde TRPM2 kanallarının H_2O_2 ile aktive olduğu gözlenmiştir (132). Fakat, karışık sonuçlara sahip çalışmalar da mevcuttur (133). Kanalların patch-clamp ile alınan tekli kanal kayıtlarında ikinci haberciler olmadan da aktive olabildiği gözlemlendi (128).

Hücre içi Ca^{+2} iyonu artışı hücre ölümleride dahil birçok patofizyolojik olayların başlatıcısıdır (134). Sinir hücrelerinin elektriksel olarak aşırı uyarılması “aşırı uyarılma toksisitesi” adı verilen, hücreyi ölüme götüren bir süreci başlatabilir.

Günümüzde TRPM2 kanalları, kullanılan Ca^{+2} kanal inhibitörleri ile bloke olmamaktadır (135).

Yapılan çalışmalarda, TRPM2 kanal aktivasyonunda 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) ve antranilik asidin önemli rollerinin olabileceği düşünülmektedir (136). TRPM8 kanal blokörü olan 2-APB'nin inositol 1,4,5-trifosfaz reseptör antagonisti olduğu ve kanal etkinliğini düzenlemesini bu şekilde gösterdiği bildirilmiştir (137). Oksidatif hasar oluşturulmuş transfekte CHO hücrelerine kalsiyum girişinin kontrolünde 2-APB'nin önemli bir etkisi olduğu savunulmaktadır (117). Antranilik asidin ise etkisini fosfolipaz A2'yi inhibe ederek gerçekleştirdiği varsayılmaktadır (138).

2.5.1.2. Transiyent Reseptör Potansiyel Vanilloid 1 (TRPV1) Kanalları

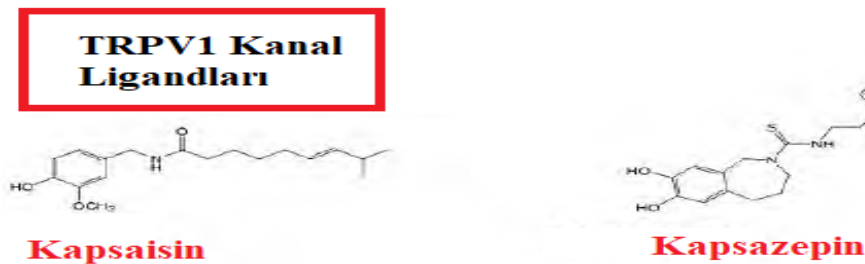
TRP vanilloid (TRPV) kanalları kendi arasında 6 alt gruba bölünmekle beraber, özellikle daha çok TRPV1 kanalları üzerinde çalışmalar yapılmıştır. TRPV1 kanalları memelilerin fizyolojik, patolojik ve hastalık durumlarında görev almaktadır. TRPV1 kanalları zararlı birçok etkiden sorumlu olabilirler. TRPV1'in tekrarlanan aktivasyonu ile ölümcül hücre yaralanmaları, oksidatif stress ve sitozoldeki serbest kalsiyumun yükselişi olabilir.

Bu kanalların; yüksek sıcaklık (>42 °C), asidik pH ve kırmızı acı biberde bulunan kapsaisin maddesi ile aktive olduğu ispatlanmıştır (112). Kapsaisin ile oksidatif stress ürünleri arasındaki etkileşimle kapsaisinin etkisinin azalmasına bağlı olarak, oksidatif stress ürünlerinin daha fazla üretildiği hücresel ortamlarda, kapsaisinle uyarılan TRPV1 kanal akımları, oksidatif ürünlerin az bulunduğu ortamlara oranla daha az izlenmiştir (139). Bununla beraber, hücre içerisinden ve dışından gelen etkenlerle da aktive olmaktadır. Bu uyarılar arasında inflamasyonu uyarıcı faktörler (örneğin interlökinler) ve kimyasal uyarıcılar bulunmaktadır (140).

Son yapılan çalışmalarda, TRPV1 kanallarının yapısında ve aktive olmasında tiyol ve sülfidril gruplarının önemi vurgulanmıştır (141). Oksidatif stres ürünleri kinaz enzimleri ve hücre zarı proton yapılarında değişikliklere neden olmaktadır. Bu nedenle, uzun süre oksidatif strese maruz kalındığında tiyol ve sülfidril gruplarının bağlarındaki değişimlerden dolayı, TRPV1 kanallarının duyarlılığının azaldığı, fakat sistein içeren maddeleri inkübe edilen HEK-293 hücre serilerinin TRPV1 kanallarının açılma-kapanma hassasiyetinin düzeldiği saptanmıştır (142).

Bu kanalların protein kinaz A ve protein kinaz C gibi ikinci haberciler ile aktifleşebildiği ispatlanmıştır (143). Protein kinaz C'yi ikincil haberci sistemi olmadan aktive edebilen bazı maddeler mevcuttur. Bu maddelerden en fazla bilinen forbo esterlerden phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) maddesidir. Yapılan çalışmalar sonucunda PMA'nın protein kinaz C yoluyla TRPV1 katyon kanallarının açılmasına yardımcı olduğu görülmüştür (144, 145).

Bu kanalların önemi, günümüzde bilinen voltaja duyarlı Ca^{+2} kanal blokerlerinin hiçbiri bu kanalları inhibe edememektedir. Bu kanallar bozulacak olursa hücre içi Ca^{+2} miktarı patolojik düzeylerde seyredip hücrenin ölümüne yol açabilmektedir. Konuya bu açıdan bakılacak olursa, bu kanallar üzerine yapılan çalışmalar artmaktadır. Çünkü bunların düzenlenmesi veya patolojik durumdan fizyolojik duruma döndürülmesi, artan oksidatif stres ürünleri sonucu plasental apoptozis ve plasental disfonksiyonun düzelmesinde büyük katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışma, DMAH'in TRPM2 ve TRPV1 üzerine etkisi ve bu yolla hücre içerisine Ca^{+2} girişi üzerine odaklanılacaktır.



Şekil 5. TRPV1 kanal açıcı (Kapsaisin) ve kapatıcısının (Kapsazepin) kimyasal yapıları.

2.6. Tekrarlayan Gebelik Kaybında Tarama

TGK hikayesi olanlarda tarama kriterleri, risk faktörleri ile belirlenir.

Tromboembolik atak öyküsü olanlarda tarama yapılmalıdır. Bu hastalarda trombofili saptanır ise antikoagülan tedavi planlanmalıdır. Tromboembolik atak öyküsü olmayıp sadece aile öyküsü olanlarda tarama konusu hala tartışmalıdır. Ancak birinci derece akrabalarında antitrombin III, protrombin gen mutasyonu, FV Leiden homozigot mutasyonu var ise bu kişi yüksek riskli kabul edilip tarama yapılmalıdır (146).

Trombofili tanısal test yapma endikasyonları (146) ;

- Erken gelişen preeklampsi
- TGK (2 veya daha fazla 10. gebelik haftasından önce gebelik kaybı)
- Açıklanamayan 10. gebelik haftasından sonra fetal ölüm
- İntrauterin gelişme geriliği
- Dekolman plasenta

Tarama paneli olarak istenecek tetkikler tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7. Trombofili tarama paneli.

Trombofili Paneli
<ul style="list-style-type: none">• Fv Leiden mutasyonu• Lupus antikoagülan• Protrombin G20210A ACA IgG ve IgM• Protein C aktivitesi Anti-B2 glikoprotein IgG ve IgM• Protein S aktivitesi ANA, anti-DNA• AT aktivitesi• Açlık homosistein düzeyi

2.7. Tekrarlayan Gebelik Kaybında Trombofililerin Tedavisi

TGK’da tedavi etyolojiye yönelik olmalıdır. TGK ile bazı kalıtsal ve edinsel hiperkoagülabilité durumları arasındaki ilişki (Faktör V Leiden, protrombin G20210A mutasyonu, hiperhomosisteinemi, anti fosfolipit antikorları) net olarak görünüyor olmakla beraber diğerleri ile TGK arasındaki ilişkisinin açığa

kavuşturulması gerekmektedir (147). Çeşitli araştırmalar antikoagülan kullanımının hem fetal ve hem de maternal sonuçları iyileştirebileceğini göstermektedir.

2.7.1. Unfraksiyone Heparin, Düşük Moleküler Ağırlıklı Heparin

Klinik çalışmalarda erken dönem gebelik kaybındaki temel patolojinin plasental trombozlar olduğu dolayısıyla antikoagülan kullanımının gebelikte başarı şansını arttırabileceği düşünülmektedir. Heparin fetomaternal ara yüzde işlev gören özelliklere sahiptir. Heparin antifosfolipid antikolarına bağlanabilir ve Th-1 sitokin interferon gamma hareketini antagonize edebilir, böylelikle erken gebelikte trofoblast ve maternal vasküler endoteli koruyucu etki yapar.

Heparin, antikoagülan aktivite, farmakokinetik özellikleri ve moleküler ağırlığı ile heterojen bir yapı gösterir. Çeşitli pozisyonlarda sülfat kökleri içeren idorinük asit ve D-glukozaminden oluşmuştur. Molekül ağırlığı ortalama olarak verilmektedir (3000-30.000 Da; ortalama 15.000 Da). Heparinin antikoagülan etkisi için antitrombine ihtiyaç vardır. AT ile bağlanmaktadır ve antitrombin yoluyla Faktör Xa'yı inaktive eder. Heparin-AT kompleksi trombin ile birlikte FXIa, FXa ve FIXa'yı da inaktive etmektedir.

DMAH'ler anfraksiyone heparinin depolimerizasyonu ile elde edilirler. Ortalama molekül ağırlıkları 5000 Da'dır. DMAH faktör Xa'yı inaktive eder ve plazma proteinlerine daha az bağlandığı için daha düşük dozda daha belirgin etki gösterirler. DMAH'lerin trombin üzerine etkisi azdır.

DMAH'lerin gebelik kaybını önleyici mekanizmaları;

1. DMAH direkt aPL'ların trofoblastlara bağlanmasını önleyerek normal trofoblast invazyonunu sağlamaktadır (148).
2. Heparin kompleman aktivasyonunu azaltmaktadır (148, 149)
3. IL-1 seviyesinde ve IL-6 üretiminde artış sağlamaktadır (150).
4. Desidual E-kadherin ekspresyonunda azalma, selektin aracılı hücre adezyonunun modülasyonu, heparin bağlayıcı EGF benzeri büyüme faktörüne bağlanma, insülin benzeri büyüme faktörü 1 seviyesinde artış ile trofoblast invazyonunda artış yapmaktadır (150).

5. Sinsisyotrofoblastik anti-apoptotik faktör Bcl-2 seviyesinde artış yapmaktadır (150).
6. Trofoblast invazyonundan sorumlu spesifik proteazların aktivitesinde artış yapmaktadır (151).
7. aPL'ların trofoblastlar üzerindeki kompleman aracılı aktivasyonunun inhibisyonuna neden olmaktadır (151).

Heparin ve aspirinin trofoblast biyolojisi üzerine direk etki ile trofoblast apoptozisinde modülasyona yol açtığı, bunun da TGK olgularında klinik yararını açıklayan mekanizmalardan biri olduğuna çeşitli çalışmalarda yer verilmiştir. Düşük molekül ağırlıklı heparinler trofoblast proliferasyonu, invazyonu ve diferansiyasyonunu düzenleyerek sitoprotektif etki sağlar. Heparin- binding epidermal growth factor (HB-EGF) trofoblast fonksiyonu üzerine düşük molekül ağırlıklı heparin etkisi için önemli bir faktördür. DMAH, desidual HB-EGF ekspresyonunu indükler ve apoptosise uğrayan desidual hücrelerin sağ kalımını artırır.

Hem DMAH hem de anfraksiyone heparin plasentadan geçmez, süte geçiş göstermez ve teratojen etkileri saptanmamıştır, fetal hemorajiye yol açmazlar.

DMAH'lerden yapılan çalışmalar dalteparin, enoxaparin, nadroparin gibi moleküller ile yapılmıştır. Tinzaparin ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır ve tinzaparinin gebelikteki kullanımı ile ilişkili osteoporotik fraktür olgusu bildirilmiştir (76).

2.7.2. Diğer Tedaviler

2.7.2.1. Aspirin

Aspirin siklooksijenaz enzimidaki serin kalıntılarını irreversible olarak hidroksilleyerek siklooksijenaz (COX) enzimini seçici ve geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. Aspirin vazokonstriksiyonu ve trombosit agregasyonunu engellemektedir ve etkisi geri dönüşümsüzdür. Salisilat plasentadan kolayca fetusa geçer ve fetal prostasiklin ve tromboksan aktivitesini bozar.

2.7.2.1. Folik Asit

Tromboz öyküsü olmayan Hyc düzeyleri yükselmiş olan hastalara gebelik öncesi vitamin B6, B12 ve folik asit ile uygun takviye yapılmalıdır. Bu yaklaşımı kanıtlayan hiçbir randomize kontrollü çalışma yoktur, ancak bu tedavinin toksisitesi önemsizdir ve folik asitin nöral tüp defektleri azaltmada önemi gösterilmiştir. Profilaktik heparin homozigot MTHFR mutasyonu olanlarda, ya da vitamin desteğine yanıt vermeyen olumsuz gebelik sonuçları olan ve tromboemboli öyküsü olan hastalarda düşünülmelidir (56).



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hasta-Kontrol Populasyonunun Seçimi

Çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (18.03.2015 tarihli toplantınının 68 sayılı kararı). Ayrıca, çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje no 4563-TU2-16; onay tarihi; 01.02.2016).

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı ve Biyofizik Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya alınan hastalar Süleyman Demirel Üniversitesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilim Dalı'na başvuran gönüllü hastalardan seçildi.

Araştırmaya alınan TGK tanısı olup aynı zamanda trombofilili ancak henüz ilaç almamış olan 10 hasta, TGK tanısı olup aynı zamanda trombofilisi olan ve gebelik öncesi DMAH kullanmış (12 hafta boyunca) 10 hasta, TGK tanısı olup trombofilili ve gebelik saptandıktan sonra (GSS) DMAH kullanmış 16 hasta ve hiçbir ek hastalığı olmayan 10 kişilik kontrol grubundan oluşturuldu. Hastalar gebelik, diyabet, sistemik inflamatuvar hastalık gibi oksidatif stresle ilgili değerleri etkileyebilecek problemi olmayan hastalardan seçildi. Hastalara çalışmamız anlatılmış, onam formları alınmıştır.

Hastaların bilgilerine; yatış ve takip dosyalarındaki bilgiler ve ayrıca telefon görüşmeleri ile ulaşılmıştır. Hastaların tamamında TGK nedeni araştırılmak üzere jinekolojik ve obstetrik değerlendirme yapılmıştır. Trombofilinin taraması için, çiftlerin her birinden periferik kanda kromozom analizi, Protein C, Protein S, antitrombin III, AFAS ve SLE için otoimmün tarama paneli, FV Leiden, protrombin, MTHFR gen mutasyon tahlilleri istenilmiş, önceden tahlil sonuçları olanlarda bu tetkikler tekrarlanmamıştır. Gebeliklerinde başvuran hastalarda, dış merkezlerde gebelikten önce uterin anomali açısından transvajinal ultrasonografi ve histerosalpingografi ile değerlendirilmiş olanlar araştırma grubumuza alınırken, uterin anomali taranmamış hastalar araştırmadan dışlanmıştır.

Tüm olguların kan alımı benzer şartlarda ve aynı kişiler tarafından gerçekleştirildi. Kanlar uygun antikoagulan eklenmiş enjektörlerle alınıp kısa süre içinde çalışmak üzere laboratuvara ulaştırıldı. Daha sonra kanlar trombosit izolasyonu bölümünde anlatıldığı şekilde santrifüj edilerek hücreler ve serum izole edildi.

Hastalardan alınan venöz kan örneklerinden trombositler izole edildi. Toplam trombosit sayıları Casy TT cihazı ile hücreler Casy TT solusyonuna alınarak sayıldı. Trombositlerin elde edilme (izolasyon) miktarına bağlı her biri 10^6 hücre olacak şekilde kısımlara ayrıldı. Trombosit aktivasyonundaki erken etkileşimlerin belirlenmesi açısından önemli olan $\Delta[Ca^{+2}]_i$ değişiminin kinetik olarak izlenmesini saptamak için; kalan trombositlerin FLMP ile aktive edilerek, izole edilip, carry eclipse fluorescence spectrophotometer cihazı ile hücre içi serbet kalsiyum $[Ca^{+2}]_i$ düzey değişimleri belirlendi.

Gruplar;

1. Kontrol Grubu (n=10): Hiçbir ek hastalığı olmayan grup.
2. Hasta Grubu (n=10): TKG öyküsü olan trombofilisi olup gebelik öncesi DMAH kullanmamış olan hastalar.
3. Tedavi Grubu 1 (n=10): TKG öyküsü olan trombofilisi olup gebelik öncesi DMAH kullanmış olan (en az 12 hafta boyunca) hastalar.
4. Tedavi Grubu 2 (n=16): TKG tanısı olup trombofilili ve gebelik saptandıktan sonra DMAH kullanmış hastalar olmak üzere 4 ayrı grupta incelendi.

Tedavi Grubu 1’de DMAH tedavisine gebelik süresince de devam edilmiştir ve sonunda Tedavi Grubu 1 ve Tedavi Grubu 2 gebeliğin maternal ve neonatal sonuçları açısından da incelendi.

3.2. Malzemeler ve Aletler

- Şarjlı pipet: Witeg (Almanya)
- Şarjlı pipet uçları: LP Italiana 5 ml, 10 ml hacimlerde (İtalya)

- Floresan spektrofotometre: Cary Eclipse, Varian, (Avustralya)
- Şeffaf küvet: Sarstedt (45mm) Cuvvette (Almanya)
- Plate reader: Infinite 200 Pro, Tecan (Avusturya)
- Hücre sayım cihazı: Casy TT, Roche, (Almanya)
- Jel görüntüleme cihazı: Syngene G:Box, XRQ (İngiltere)
- Soğutmalı santrifüj: Kubota 2800 (Japonya)
- Derin dondurucu (-80°C): Wisd Persnal Digital (Kore)
- Hassas terazi: Scaltec SPB 32 (İsviçre)
- Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)
- pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)
- Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
- CO₂ inkübatör: Heal Force HF90, Smart Cell (Japonya)
- Çalkalamalı su banyosu: Termal Laboratuvar Aletleri (Türkiye)
- Çalkalama cihazı: Biosan Orbital shaker PSU 10i (Türkiye)
- Falkon tüpleri: ISOLAB, 15 ml ve 50 ml hacimlerde (Almanya)
- Steril 96'lık plakalar: Greiner Bio-One (Almanya)
- Buz yapma makinesi: ITV IQ P5C (ABD)
- Manyetik ısıtıcılı karıştırıcı: Variomag Monoterm (Almanya)
- Distile ve ultradistile su cihazı: ELGA Purelab option DU25 (ABD)

3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640), Sigma Aldrich (ABD)
- Fetal Bovine Serum (FBS), Life Technologies (ABD)
- Penicillin/Streptomycin, Biochrom (Almanya)

- Phosphate Buffered Saline (10X, PBS), Biochrom (Almanya)
- Trypsin-EDTA (%0,25), Sigma Aldrich (ABD)
- Dimethyl sulphoxide (DMSO), Sigma Aldrich (ABD)
- Anthranilic acid (ACA), Sigma Aldrich (ABD)
- Cumene hydroperoxide, Sigma Aldrich (ABD)
- Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), Merck (Almanya)
- Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), Sigma Aldrich (ABD)
- HEPES, Sigma Aldrich (ABD)
- Sodium chloride (NaCl), Merck (Almanya)
- Potassium chloride (KCl), Merck (Almanya)
- Calcium chloride (CaCl₂), Merck (Almanya)
- L-glutamic acid, Merck (Almanya)
- Hydrochloric acid (HCl), Merck (Almanya)
- Potassium hydroxide (KOH), Merck (Almanya)
- Fura-2 AM, Invitrogen (ABD)
- APOPercentage Apoptosis Kit, Biocolor (Kuzey İrlanda)
- Dihydrorhodamine 123 (DHR 123), Molecular Probes (ABD)
- JC-1 Dye, Santa Cruz Biotechnology (ABD)
- Kaspaz 3 substrat (AC-DEVD-AMC), Bachem, (İsviçre)
- Kaspaz 9 (AC-LEHD-AMC) substrat, Bachem, (İsviçre)
- Capsaisin, Santa Cruz Biotechnology (ABD)
- Anthranilic Acid (ACA), Sigma Aldrich (ABD)
- Capsazepine - Santacruz (ABD)

3.4. Laboratuvar

3.4.1. Trombosit İzolasyonu

Trombositlerin elde edilmesi ortak çalışmakta olduğumuz Extramadura Üniversitesinde Prof. Pariente'nin çalışmalarında belirttiği yönteme göre yapıldı (Lopez et al. 2008). Bu metot başlıca şu şekilde uygulanmıştır; Hasta ve sağlıklı bireylerden kan asit/sitrat antikoagulanı içeren tüplere alındı. Bu antikoagülanlı tüplerin içerisinde şu kimyasallar yer almıştır (mM olarak): 85 sodyum sitrat, 78 sitrik asit ve 111 D-glikoz. Trombosit bakımından zengin plazma (PRP) bu antikoagülanlı kanın 700 g de 5 dakika santrifüj edilmesi ile elde edildi. Bu PRP lere aspirin (100 µM) ve apyrase (40 µg/ ml) ilave edildikten sonra, trombosit hücreleri 350 g de 20 dakika santrifüj edilerek elde edildi. Elde edilen hücreler HEPES-buffered saline (HBS) de sulandırıldı. Bu HBS'nin pH ve elektrolit içeriği kan ile aynı olması sağlandı. Bu amaçla pH 7.45 ayarlandı. Ayrıca, mM olarak: 145 NaCl, 10 HEPES, 10 D-glikoz, 5 KCl, 1 MgSO₄, %0.1 sığır albümini (BSA) ve 40 µg ml apyrase içerdi. En son trombosit miktarı hücre sayıcı (Casy Cell Counter TT) da sayılarak analizler için kısımlara ayrıldı.

3.4.2. İntraselüler Kalsiyum İyonu Ölçülmesi

Hücre içi kalsiyum miktarının ölçümü için trombosit hücreleri oda ısısında 45 dakika boyunca 4µM fura-2 AM flüoresan boyası ile boyandı (152). Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücre manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu 2×10^6 olacak şekilde Na⁺-HEPES [(mM cinsinden) NaCl, 140; KCl, 4,7; CaCl₂, 1,2; MgCl₂, 1,1; glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7.4)] solusyonu içerisinde florasan spektrofotometrede (Varian Cary Eclipse, Australia) haznesine yerleştirildi. Fura-2 AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, 505 nm emisyon dalga boylarında flüoresan ışık ile uyarıldı ve yaklaşık yedi dakika boyunca kayıt alındı. Hücre içi serbest Ca⁺² iyon düzeyi ([Ca⁺²]_i) değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları ile kaydedildi (153) ve bulgular Grynkiewicz ve arkadaşlarının metoduna göre hesaplandı (108).



Resim 1. Kalsiyum sinyali analizlerinin yapıldığı spektrofluorometre cihazı.

3.4.3. Hücre İçi ROT Üretimi Tayini

İzole edilen hücreler 150 μ l 1xPBS ile sulandırıldı. Sonrasında her bir ependorfta 50 μ l olacak şekilde hücreler 3'e bölündü. Daha sonra üzerlerine 950 μ l RPMI konuldu. Pipetaj yaptıktan sonra üzerine 1 μ l Dihydrorhodamine (DHR) 123 ROT boyasından konuldu ve güzelce pipetaj yapıldı. Ependorflar 30 dk süreyle inkübatöre konuldu. Süre bitimini takiben 4x100 G devirde 5 dakika santrifüj edildi. Sonrasında oluşan süpernatant dökülerek üzerlerine 300 μ l 1xPBS koyup güzelce pipetaj yapıldıktan sonra plate kuyucuklarına (Infinite 200 Pro, Avusturya) her bir kuyucuğa 100 μ l olacak şekilde hücreler bölündü. Plate readerda floresanlar 498 nm emisyon ve 522 nm eksitasyon (uyarım) dalga boylarında okunmuştur ve aradaki fark değer olarak belirlenmiştir. Değerler, kontrole kıyasla misli artış olarak verildi.

3.4.4. Kaspaz 3 ve 9 Enzim Aktiviteleri Tayini

Kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponlarının hazırlanması için 2.5 ml kaspaz 3 ve kaspaz 9 un buffer ham solüsyonlarından 15 ml'lik falkon tüplerine konuldu. Her 2 tampona da 2,5 μ l NP-40 (+23°C) kimyasalından ilave edildi, sonrasında vortekste karıştırıp floresan kaspaz DTT boyasından kaspaz 3 ve kaspaz 9 bufferlarının üzerine 10 μ l ve 2.5 μ l konulup güzelce vortekste karıştırıldı. İzole edilen trombositler 150 μ l 1xPBS solüsyonuyla sulandırıldıktan sonra her bir plate kuyucuğuna 15 μ l olacak şekilde 10 kuyucuğa eşit bir şekilde konuldu. Üzerine de öncesinde hazırlanmış

olduğumuz kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponlarından 50 µl konuldu ve sonrasında açığa çıkan enzimler (Infinite 200 Pro, Avusturya) cihazında 360 nm uyarılma ve 460 nm emilme dalga boylarında okunarak kaspaz 3 ve 9 aktiviteleri değerlendirildi. (AC-DEVD-AMC Kaspaz 3 ve AC-LEHD-AMC Kaspaz 9 için). Elde edilen veriler kontrole kıyasla misli artış olarak değerlendirildi.

3.4.5. Apoptozis Testleri

İzole edilen trombositler 150 µl 1xPBS ile sulandırıldı. Sonra her bir ependorfta 50 µl olacak şekilde hücreler 3'e bölündü. Daha sonra üzerlerine 950 µl 1XPBS konuldu. Pipetaj yaptıktan sonra üzerine 3-5 µl apoptozis boyasından (Apopcentage dye 10 ml) ilave edildi ve 30 dk süreyle çalkalama cihazına konuldu. Çalkalama sonrası 3500 rpm de 5 dk santrifüj ettik ve üstte oluşan süpernatant (üstte oluşan hücresiz sıvı kısım) döküldü. Üzerine tekrar 1xPBS eklendi ve 200µl Apopcentage Release'den ilave edildi. Pipetaj yaptıktan sonra süpernatant alındı ve plate kuyucuklarımıza yerleştirerek 550 nm de Infinite 200 Pro (Avusturya) kuyucuk okuyucu cihazında okundu. Elde edilen veriler kontrole kıyasla misli artış olarak değerlendirildi.

3.4.6. Mitokondriyal Membran Depolarizasyon Tayini

Hücre içerisine Ca^{+2} iyon akışı, mitokondride depolarizasyon artışı yoluyla ROT üretimini artırmakta, artan hücre içi ROT miktarı, gerek hücre içi organale kapılarını açarak ve gerekse katyon kanallarına zarar vererek sitozolde Ca^{+2} miktarını artırmaktadır. Mitokondriye daha fazla Ca^{+2} girişi depolarizasyonu artırmakta ya hücre çalışması bozulmakta veya hücre apoptozise gitmektedir. Bu nedenle, mitokondriyal zar depolarizasyonu tayininin yapılması bu halkadaki zinciri tamamlayarak moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlamıştır.

Analizin yapılışı: Hücreler 1 µM JC-1 ile 37 °C de 15 dakika inkübe edildi. JC-1 boyası mitokondride depolarizasyon artışına paralel girişi artmaktadır. JC-1 inkübasyon sonrası kırmızıdan yeşile doğru floresan artışı mitokondriyal depolarizasyonu göstermekte ve bu durum plate reader tarafından değişik dalga boylarında hemen peşi sıra cihaz tarafından otomatik olarak belirlenebilmektedir.

Yeşil dalga boyları eksitasyon 485 ve emisyon 535 dalga boylarında belirlendi. Kırmızı dalga boyu değişimleri ise 540 nM (Eksitasyon) ile 590 nM (Emisyon) de belirlendi. Elde edilen veriler kontrole kıyasla misli artış olarak değerlendirildi.



Resim 2. Floresans ve spektrofotometrik analizlerin yapıldığı kuyucuk okuyucu (plate reader) cihazı.

3.4.7. Western Blot Analizleri

Tüm Western Blot analizleri standart protokol izlenerek gerçekleştirildi. Her gruba ait flasklar rutin olarak kaldırılıp santrifüjden sonra süpernatant atıldı. Hücreler lizis tamponu içerisinde çözdürüldü. 12000 rpm’de 15 dk boyunca santrifüj edilen trombosit hücrelerinin üzerinden süpernatant uzaklaştırıldı. Total protein miktarı Bradford yöntemine göre belirlendi. Immunoblottlama için %6 ile %13 arasında değişen konsantrasyonlarda Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel (SDS-Page) hazırlandı ve jellere eşdeğer protein (her örnekten $\pm 30 \mu\text{g}$) yüklemesi yapıldı. Elektroforez işlemi ardından jeller nitroselüloz membranlara transfer edildi. Oda sıcaklığında 1 saat boyunca %5 yağsız süt tozu (Pınar, Türkiye) ve %1 Tween 20 içeren Tris Buffered Saline (TBS) ile bekletildi ve 3 defa 5 dk süreyle TBST buffer ile yıkandı. Daha sonra membran primer; Caspase 9/p35/p10 Polyclonal Antibody (Proteintech, ABD); Caspase 3, p17-specific Polyclonal Antibody (Proteintech,

ABD); Beta Actin Polyclonal Antibody (Abcam Biochemicals, İngiltere); PARP1 Polyclonal Antibody Proteintech, ABD)) ve sekonder antikor (Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab, İngiltere) ile inkübe edildi. İşlem sonunda β -actin, PARP1, aktif (bölünmüş) kaspaz 3, aktif (bölünmüş) kaspaz 9 ve TRPM2 ve TRPV1 kanal proteinlerine ait ekspresyon çalışmalarında elde edilen bantlar, hassas jel görüntüleme cihazı (Syngene G:Box, İngiltere) kullanılarak görüntüledi.



Resim 3. Western Blot analizi için kullanılan ekipmanlar.



Resim 4. Jel görüntüleme cihazı.

3.5. Klinik

Çalışmaya dahil olan hastaların tamamında TGK nedeni araştırılmak üzere jinekolojik ve obstetrik değerlendirme yapılmıştır. Hastalar gebelik istemi ile başvuran kadınlardan oluşmaktaydı. Hastalar transvajinal ultrasonografi ve histerosalpingografi ile uterin anomali açısından araştırılmıştır. Uterin anomalisi olan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Endokrin patolojilerin araştırılması açısından tiroid fonksiyon testleri, prolaktin istenmiştir. Anormal sonuca sahip olan hastalar çalışma dışı bırakılmıştır. Trombofilinin araştırılabilmesi için, çiftlerin her birinden periferik kanda kromozom analizi, Protein C, Protein S, antitrombin III, AFAS ve SLE için otoimmün tarama paneli, FV Leiden, protrombin, MTHFR gen mutasyon tahlilleri istenmiştir. Çalışmaya daha öncesinde en az 2 tane 20. haftanın altında gebelik kaybı olan kadınlar dahil edilmiştir.

3.6. İstatiksel Analiz

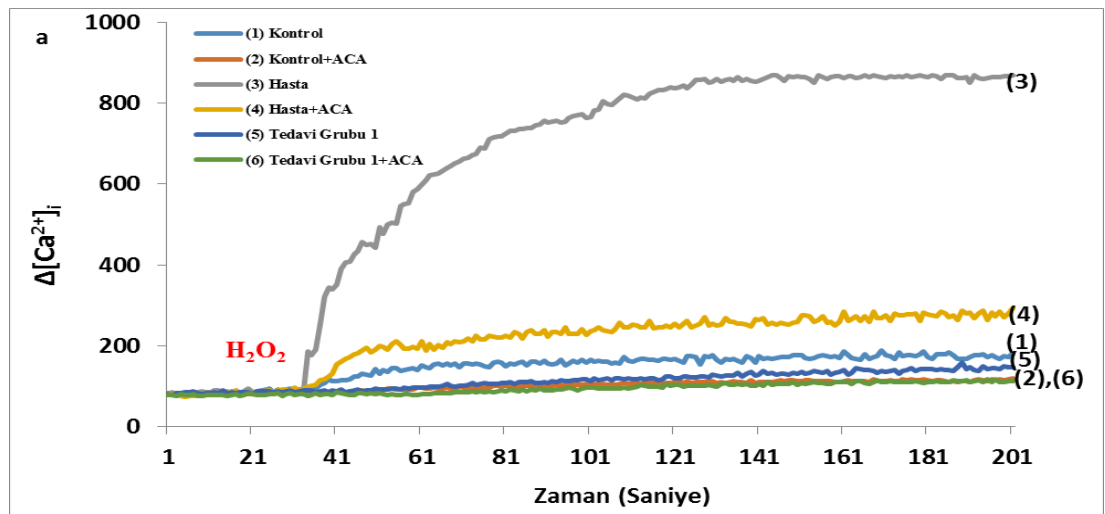
Bütün veriler ortalama \pm standart sapma [mean \pm standard deviation (SD)] olarak verildi. Trombosit hücrelerinde çalışılan bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS for Windows 17.0 paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Gruplar arası fark olup olmadığı Mann-Whitney U, ANOVA, Chi-square testleri istatistiksel analizi ile değerlendirildi. Tüm istatistikî karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ den küçük olanlar anlamlı olarak kabul edildi.

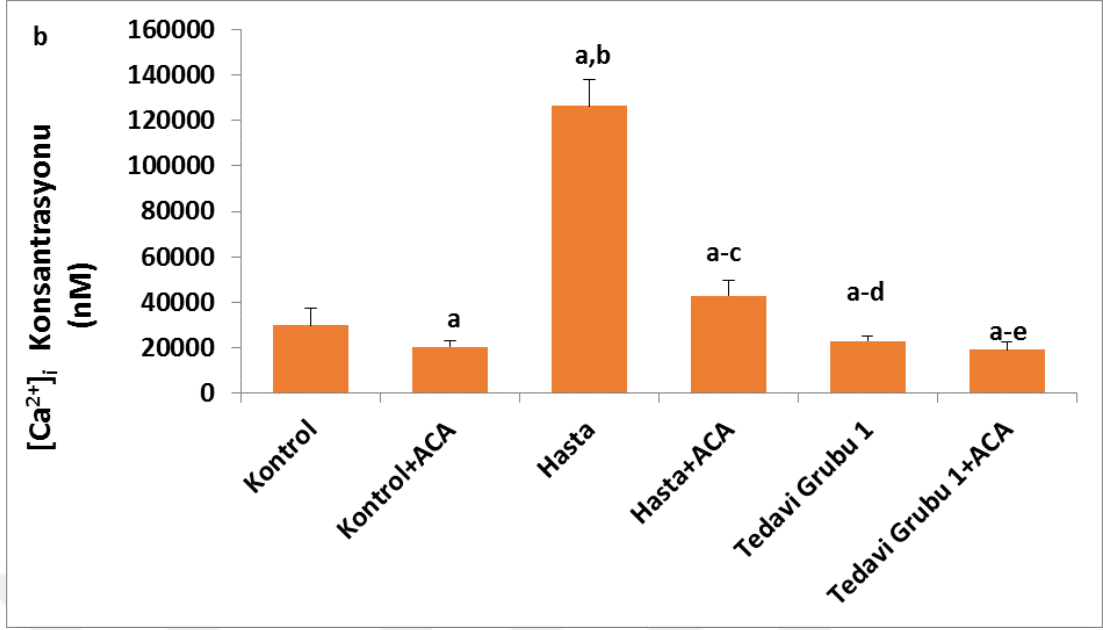
4. BULGULAR

4.1. Gebelik Öncesi DMAH Tedavisinin TRPM2 Kanalı Aracılı Ca^{+2} Girişi Üzerindeki Etkileri

Çalışmamızda gebelik öncesi DMAH tedavisinin Kontrol Grubu, Kontrol+ACA Grubu, Hasta Grubu, Hasta+ACA Grubu, Tedavi Grubu 1 ve Tedavi Grubu 1+ACA gruplarının trombositlerindeki TRPM2 kanallarından Ca^{+2} geçişi üzerine etkisinin sonuçları Grafik 1’de gösterilmektedir. Kontrol+ACA, Tedavi Grubu 1 ve Tedavi Grubu 1+ACA grubunun trombositlerdeki TRPM2 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişinin Kontrol Grubu’na kıyasla azaldığı görülmektedir ($p<0.001$). Hasta Grubu ve Hasta+ACA Gruplarında ise trombositlerdeki TRPM2 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişinin Kontrol Grubu’na kıyasla arttığı görülmektedir ($p<0.001$). Trombositlerdeki TRPM2 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişi Hasta Grubu’nda Kontrol+ACA Grubu’na kıyasla istatistiksel olarak arttığı görülmüştür ($p<0.001$). Hasta Grubu’na kıyasla, Hasta+ACA Grubu’nda ise trombositlerdeki TRPM2 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişi azaldığı görülmüştür ($p<0.001$). Gebelik öncesi DMAH kullanan Tedavi Grubu 1’de TRPM2 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişi Hasta+ACA Grubu’na kıyasla azaldığı görülmüştür ($p<0.001$). Yine Tedavi Grubu 1+ACA Grubu’nda trombositlerdeki TRPM2 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişi Tedavi Grubu 1’den az olduğu görülmüştür ($p<0.001$).



Şekil 6. Trombositlerdeki Hidrojen Peroksit (H_2O_2) stimülasyonu ile başlatılan hücre içi serbest Ca^{+2} salınımı üzerine DMAH etkilerinin zamanla değişimi.



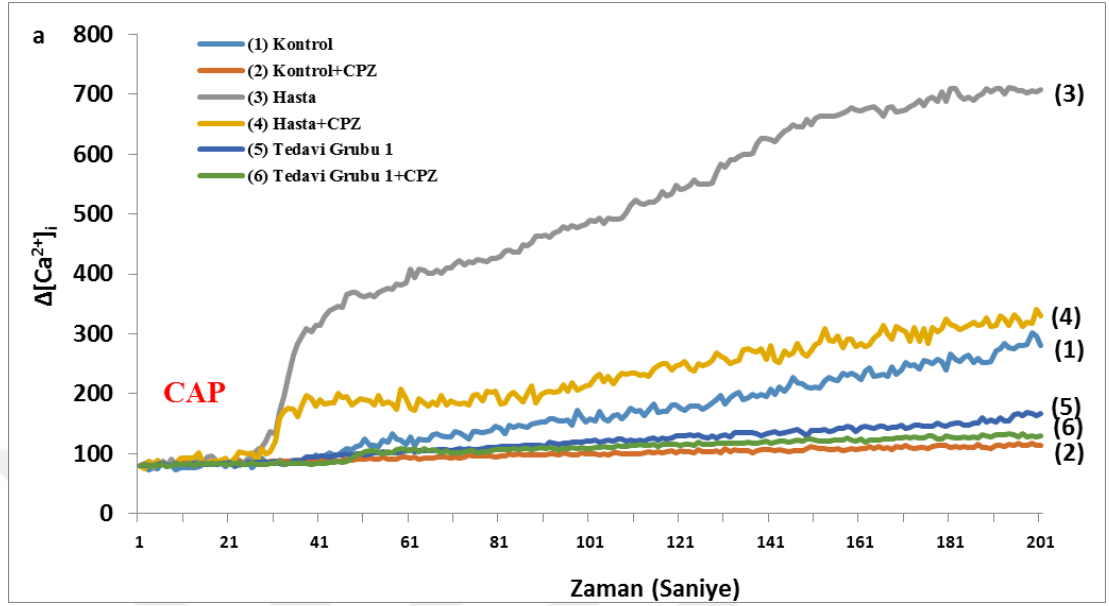
Grafik 1. Kontrol, hasta ve tedavi grubu 1 gruplarının trombositlerindeki TRPM2 kanallarından kalsiyum iyon geçişi.

^ap<0.001 Kontrol Grubu'na kıyasla. ^bp<0.001 Kontrol+ACA Grubu'na kıyasla. ^cp<0.001 Hasta Grubu'na kıyasla. ^dp<0.001 Hasta+ACA Grubu'na kıyasla. ^ep<0.001 Tedavi Grubu 1'e kıyasla

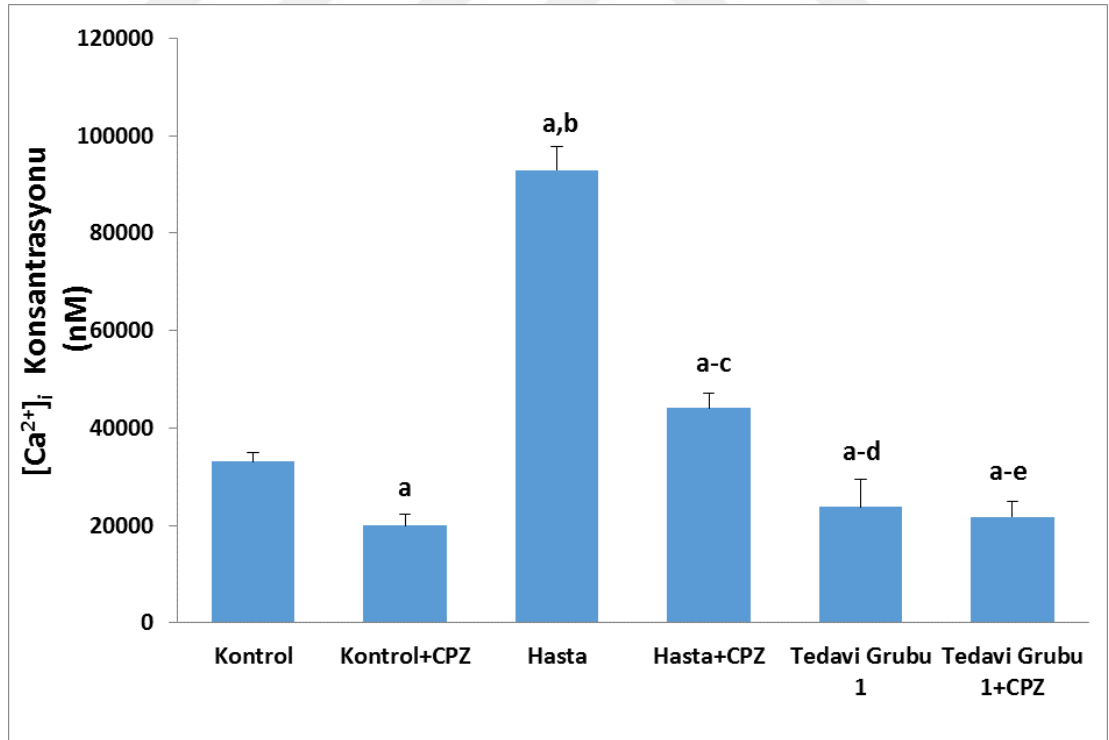
4.2. Gebelik Öncesi DMAH Tedavisinin TRPV1 Kanalı Aracılı Ca⁺² Girişi Üzerindeki Etkileri

Çalışmamızda gebelik öncesi DMAH tedavisinin Kontrol Grubu, Kontrol+CPZ Grubu, Hasta Grubu, Hasta+CPZ Grubu, Tedavi Grubu 1 ve Tedavi Grubu 1+CPZ gruplarının trombositlerindeki TRPV1 kanallarından kalsiyum iyon geçişi üzerine etkisinin sonuçları Grafik 2'de gösterilmektedir. Kontrol+CPZ Grubu, Tedavi Grubu 1 ve Tedavi Grubu 1+CPZ gruplarında trombositlerindeki TRPV1 kanallarından kalsiyum iyon geçişi Kontrol Grubu'na kıyasla azaldığı görülmektedir (p<0.001). Hasta Grubu ve Hasta+CPZ gruplarında ise trombositlerdeki TRPV1 kanallarından Ca⁺² iyon geçişinin Kontrol Grubu'na kıyasla arttığı görülmektedir (p<0.001). Trombositlerdeki TRPV1 kanallarından Ca⁺² iyon geçişi Hasta grubunda Kontrol+CPZ Grubu'na kıyasla istatistiksel olarak arttığı görülmüştür (p<0.001). Hasta+CPZ Grubu'nda ise trombositlerdeki TRPV1 kanallarından Ca⁺² iyon geçişi Hasta Grubu'na kıyasla azaldığı görülmüştür (p<0.001). Gebelik öncesi DMAH kullanan Tedavi Grubu 1'de TRPV1 kanallarından Ca⁺² iyon geçişi Hasta+CPZ Grubu'na kıyasla azaldığı görülmüştür (p<0.001). Yine Tedavi Grubu 1+CPZ

Grubu'nda trombositlerdeki TRPV1 kanallarından Ca^{+2} iyon geçişi Tedavi Grubu 1'den az olduğu görülmüştür ($p < 0.001$).



Şekil 7. Trombositlerdeki kapsaisin (CAP) stimülasyonu ile başlatılan hre içi serbest Ca^{+2} salınımı zerine DMAH etkilerinin zamanla değişimi.



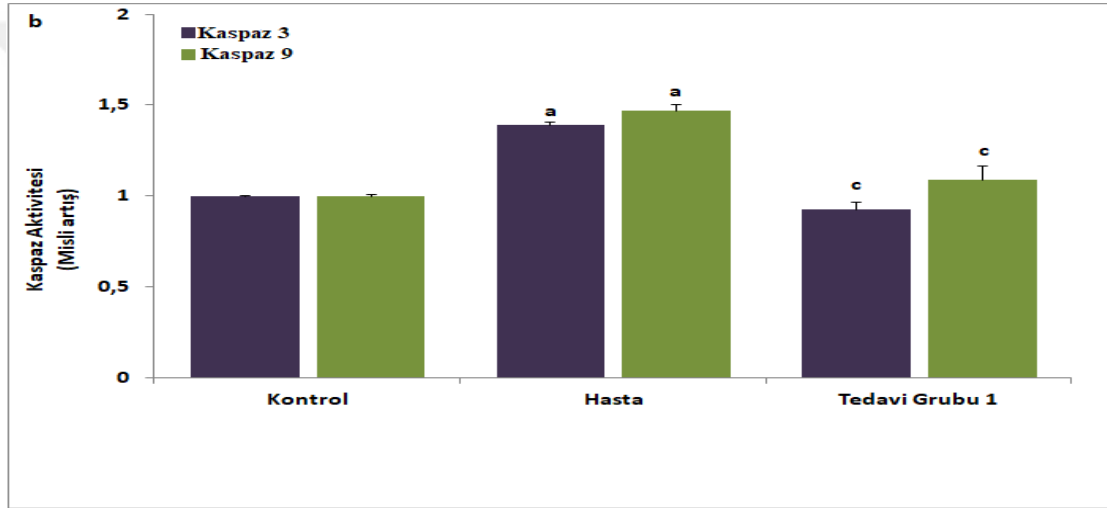
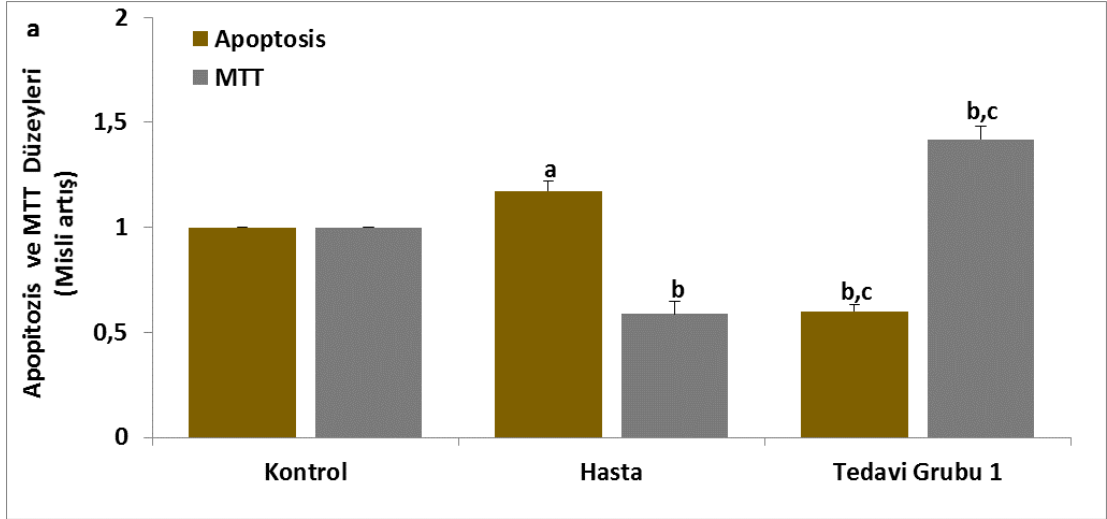
Grafik 2. Konrol, hasta ve tedavi grubu 1 gruplarının trombositlerindeki TRPV1 kanallarından kalsiyum iyon geçişi.

^a $p < 0.001$ Konrol Grubu'na kıyasla. ^b $p < 0.001$ Konrol+CPZ Grubu'na kıyasla. ^c $p < 0.001$ Hasta Grubu'na kıyasla. ^d $p < 0.001$ Hasta+CPZ Grubu'na kıyasla. ^e $p < 0.001$ Tedavi grubu 1'e kıyasla.

4.3. Gebelik Öncesi DMAH Tedavisinin Apoptozis, Hücre Canlılığı, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Aktiviteleri Üzerine Etkisi

Çalışmamızda Kontrol, Hasta ve Tedavi Grubu 1 gruplarının trombositlerindeki apoptozis, hücre canlılığı, kaspaz 3 ve kaspaz 9 düzeyleri Grafik 3'te tanımlanmıştır. Hasta Grubu'nda Kontrol Grubu'na kıyasla apoptozis artış gösterirken ($p<0.05$) hücre canlılığının (MTT) azaldığı izlenmektedir ($p<0.001$). Yine Tedavi Grubu 1'de Kontrol Grubu'na kıyasla apoptozisin azaldığı hücre canlılığında artışın olduğu izlenmektedir ($p<0.001$). Gebelik öncesi DMAH kullanan Tedavi Grubu 1'de Hasta Grubu'na kıyasla apoptozisin azaldığı hücre canlılığının arttığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmaktadır ($p<0.001$).

Kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitelerine bakıldığında ise Hasta Grubu Kontrol Grubu ile kıyaslandığında Hasta Grubu'nda kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktiviteleri artmıştır ($p<0.05$). Tedavi verilen grupta ise kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktiviteleri Hasta Grubu'na kıyasla Tedavi Grubu 1'de anlamlı olarak azaldığı izlenmektedir.



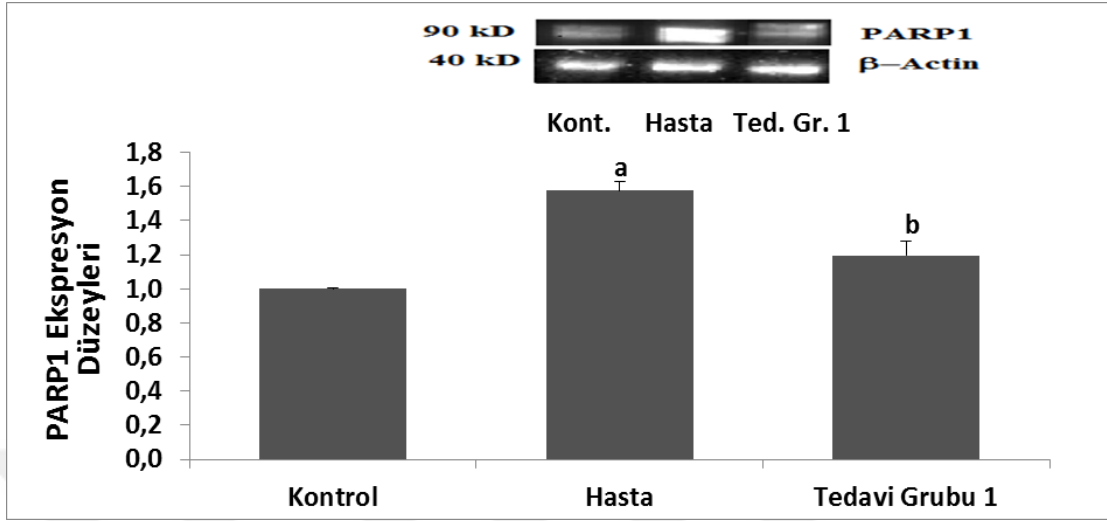
Grafik 3. DMAH tedavisinin kontrol, hasta ve tedavi grubu 1 gruplarının trombositlerindeki apoptozis, hücre canlılığı, kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktiviteleri üzerine etkisi.

^ap<0.05 ve ^bp<0.001 Kontrol Grubu'na kıyasla. ^cp<0.001 Hasta Grubu'na kıyasla.

4.4. Gebelik Öncesi DMAH Tedavisinin PARP1 Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

Çalışmamızda Kontrol, Hasta ve Tedavi Grubu 1 gruplarının trombositlerindeki PARP1 ekspresyon düzeyleri Grafik 4'te tanımlanmıştır. Kontrol Grubu'na kıyasla Hasta Grubu'nda PARP1 ekspresyon düzeyleri artmıştır (p<0.001). Gebelik öncesi DMAH tedavisi alan Tedavi grubu 1'de ise Hasta Grubu ile

karşılaştırıldığında PARP1 ekspresyon düzeylerinde azalma olduğu izlenmektedir (p<0.001).

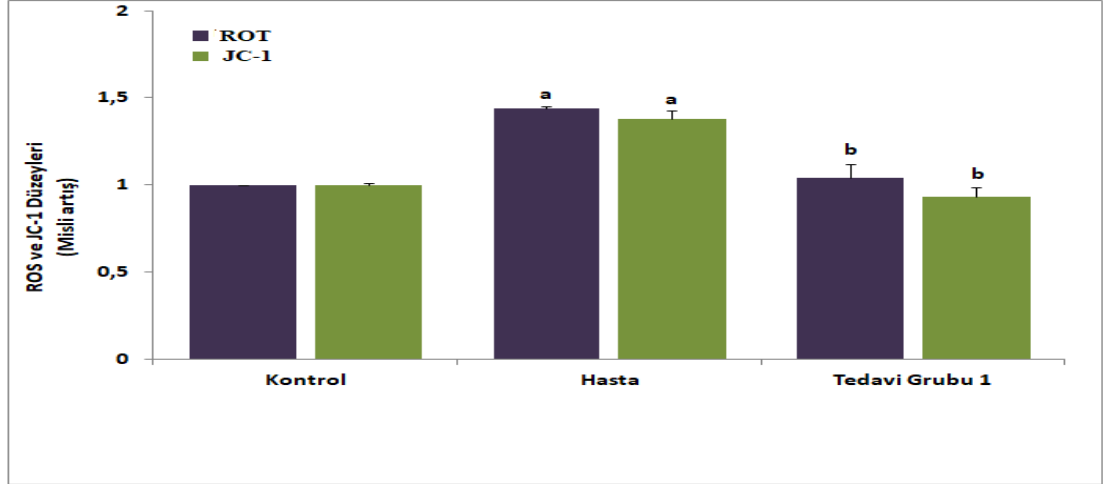


Grafik 4. DMAH tedavisinin kontrol, hasta ve tedavi grubu 1 gruplarının trombositlerindeki PARP1 ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi.

^ap<0.001 Kontrol Grubu'na kıyasla. ^bp<0.001 Hasta Grubu'na kıyasla.

4.5. Gebelik Öncesi DMAH Tedavisinin Hücre İçi ROT Üretimi ve Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu (JC-1) Düzeyleri Üzerine Etkisi

Çalışmamızda Kontrol, Hasta ve Tedavi Grubu 1 gruplarının trombositlerindeki hücre içi ROT üretimi üzerindeki etkisi Grafik 5'te tanımlanmıştır. Kontrol Grubu'na kıyasla Hasta Grubu'nda ROT ve JC-1 düzeyleri artmıştır (p<0.001). Gebelik öncesi DMAH tedavisi alan Tedavi grubu 1'de ise Hasta Grubu ile karşılaştırıldığında hücre içi ROT ve JC-1 düzeylerinde azalma olduğu izlenmektedir (p<0.001).

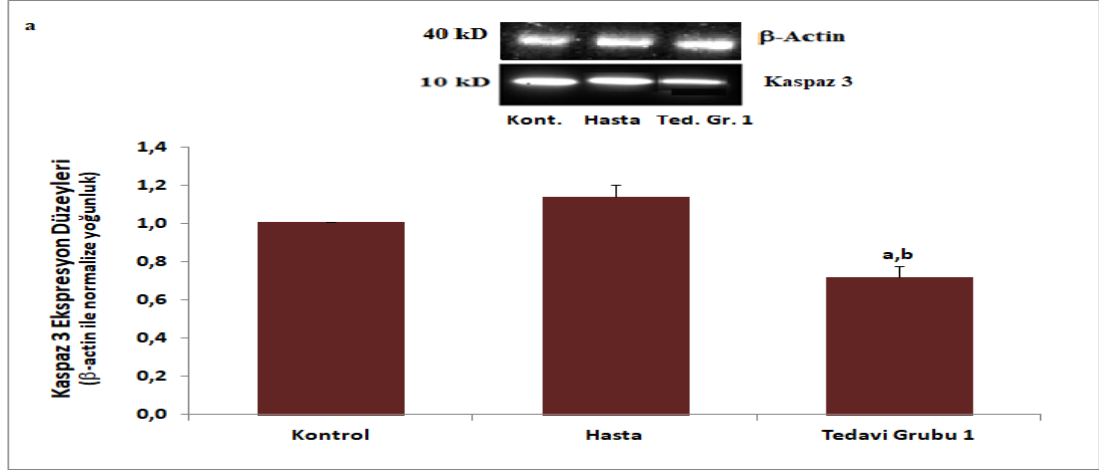


Grafik 5. DMAH tedavisinin kontrol, hasta ve tedavi grubu 1 gruplarının hücre içi ROT ve JC-1 düzeyleri üzerine etkisi.

^ap<0.001 Kontrol Grubu'na kıyasla. ^bp<0.001 Hasta Grubu'na kıyasla.

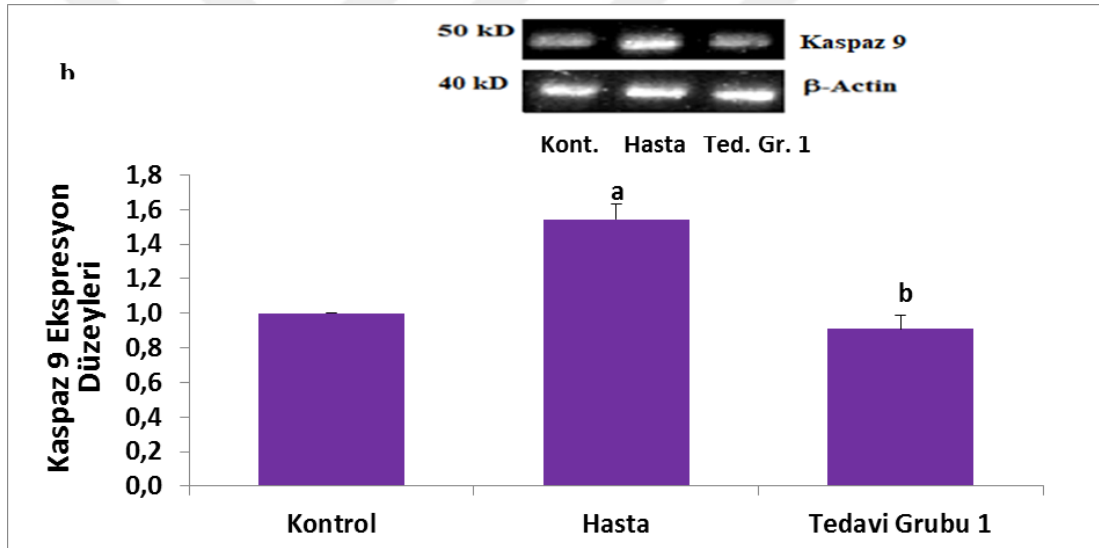
4.6. Gebelik Öncesi DMAH Tedavisinin Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Ekspresyon Düzeylerine Etkileri

Çalışmamızda Kontrol, Hasta ve Tedavi Grubu 1 gruplarının trombositlerindeki kaspaz 3 ve kaspaz 9 ekspresyon düzeyleri Grafik 5 ve 6'da tanımlanmıştır. Sonuçlar β -actin ile normalize edilmiştir. Kaspaz 3 ekspresyon düzeyi Hasta ve Kontrol grupları ile kıyaslandığında gebelik öncesi DMAH tedavisi alan Tedavi Grubu 1'de azalmış olduğu izlenmektedir ($p<0,001$). Kaspaz 9 ekspresyon düzeyi ise Hasta Grubu'nda Kontrol Grubu'na kıyasla yüksek bulunmuştur. Gebelik öncesi DMAH tedavisi alan Tedavi Grubu 1'de ise Hasta Grubu'na göre azalmış olduğu izlenmektedir ($p<0,001$).



Grafik 6. DMAH tedavisinin kontrol, hasta ve tedavi grubu 1 gruplarının trombositlerindeki kaspaz 3 ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi.

^ap<0.001 Kontrol Grubu'na kıyasla. ^bp<0.001 Hasta Grubu'na kıyasla.



Grafik 7. DMAH tedavisinin kontrol, hasta ve tedavi grubu 1 gruplarının trombositlerindeki kaspaz 9 ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi

^ap<0.001 Kontrol Grubu'na kıyasla. ^bp<0.001 Hasta Grubu'na kıyasla.

4.7. Klinik Veriler

Çalışmamıza dahil olan hastaların tamamında (Hasta Grubu, Tedavi Grubu 1 ve Tedavi Grubu 2) TKG nedeni trombofili idi. Trombofilisi olan Hasta Grubu'na dahil olanlar gebelik öncesi DMAH kullanmamış olan, Tedavi Grubu 1'e dahil olanlar gebelik öncesi DMAH başlanmış olan, Tedavi Grubu 2'e dahil olanlar GSS

DMAH başlanmış olan hastalardan oluşmaktaydı. Kontrol Grubu'na dahil olanlar sağlıklı grubu oluşturmaktadır.

Çalışma grupları 4 ana gruba ayrıldı ve araştırma gruplarının dağılımı Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Araştırmanın 4 ana gurubunun dağılımı.

Gruplar	Sayı	Yüzde
Kontrol Grubu	10	21,8
Hasta Grubu	10	21,8
Tedavi Grubu 1	10	21,8
Tedavi Grubu 2	16	34,6
TOPLAM	46	100,0

Hastaların trombofili sınıflamasına göre dağılımı Tablo 9'da verilmiştir

Tablo 9. Hastaların trombofili sınıflamasına göre dağılımı.

	Konjenital trombofili	Edinsel trombofili
Hasta Grubu (n=10) (Sayı - Yüzde)	7 - (%70)	3 - (%30)
Tedavi Grubu 1 (n=10) (Sayı - Yüzde)	9 - (%90)	1 - (%10)
Tedavi Grubu 2 (n=16) (Sayı - Yüzde)	11 - (%68.8)	5 - (%31.2)

Tablo 10'da araştıma grubumuza katılan hastalar TGK tipine göre sınıflandırılmıştır.

Tablo 10. Hastaların önceki gebeliklerinin TGK tipine göre dağılımı.

TGK Tipi	Hasta Grubu (n=10)	Tedavi Grubu 1 (n=10)	Tedavi Grubu 2 (n=16)
Primer (Sayı - Yüzde)	6 - (%60)	7 - (%70)	10 - (%62.5)
Sekonder (Sayı - Yüzde)	4 - (%40)	3 - (%30)	6 - (%37.5)
TOPLAM	10 - (%100)	10 - (%100)	16 - (%100)

4.7.1. Grupların Kendi Aralarında Sosyodemografik Veriler Açısından İncelenmesi

Tablo 11. Kontrol Grubu ile hasta grubu, tedavi grubu 1 ve tedavi grubu 2 gruplarının sosyodemografik özelliklerine göre karşılaştırılması.

Özellikler	Kontrol (n=10)	Hasta (n=10)	Ted. Gr. 1 (n=10)	Ted. Gr. 2 (n=16)	Anlamlılık Testi
Yaş (yıl) (Ortalama±S.sapma)	28.90 ± 4.43	28.20 ± 5.55	27.60 ± 7.08	29.81 ± 3.10	p = 0.712
Gravida (Ortalama±S.sapma)	0.90 ± 0.99	3.10 ± 0.87	3.10 ± 1.19	4.00 ± 1.03	p = 0.002
Parite (Ortalama±S.sapma)	0.80 ± 0,78	0.30 ± 0.48	0.40 ± 0.69	1.00 ± 0.89	p = 0.088
Düşük Sayısı (Ortalama±S.sapma)	0.10 ± 0.31	2.80 ± 0.78	2.70 ± 1.05	3.31 ± 0.70	p = 0.001

Tablo 11’de görüldüğü gibi grupların sosyodemografik değişkenlere göre karşılaştırılması yapıldığında, yaş ve parite açısından aralarında istatistiksel fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Gruplar benzer özelliklere sahip hastalardan oluşmaktadır. Ancak gravida ve düşük sayıları incelendiğinde gruplar arasında anlamlı istatistiksel fark saptanmıştır ($p<0.05$). Çünkü Kontrol Grubu’na dahil olanlarda TGK öyküsü bulunmamaktadır.

4.7.2. DMAH Başlanma Zamanına Göre Düşükle Sonuçlanan Gebeliklerin Karşılaştırılması

Tablo 12. Gebelik öncesi ve GSS DMAH başlanma zamanına göre düşük ile sonuçlanan gebeliklerin karşılaştırılması.

	Düşük		TOPLAM	Anlamlılık Testi
	Var	Yok		
Tedavi Grubu 1 (n=10) (Sayı - Yüzde)	2 (%20)	8 (%80)	10 (%100)	p = 0.016
Tedavi Grubu 2 (n=16) (Sayı - Yüzde)	11 (%68.8)	5 (%31.3)	16 (%100)	
TOPLAM	13 (%50)	13 (%50)	26 (%100)	

Çalışmamızda Tedavi Grubu 1'e dahil olan hastalar, TGK öyküsü olan trombofilili ve en az 12 hafta boyunca gebelik öncesi DMAH kullanmış olanlardır. Bu grupta 2 (%20) olgu düşük ile sonuçlanmıştır. Tedavi Grubu 2'e dahil olan hastalar ise TGK öyküsü olan aynı zamanda trombofilisi olan ve GSS DMAH başlanmış olanlardır. Bu grupta ise 11 (%68.8) olgu düşük ile sonuçlanmıştır. Gruplar düşük sonuçlarına göre karşılaştırıldığında gebelik öncesi DMAH başlama ile gebelik kayıpları 2.5 kat azalmaktadır (Odds Ratio: 2.560) ve gruplar arasında düşükler açısından anlamlı istatistiksel fark bulunmaktadır ($p = 0.016$).

4.7.3. DMAH Başlanma Zamanına Göre 20 Hafta Üzerine Ulaşan Gebeliklerin Karşılaştırılması

Tablo 13. Gebelik öncesi ve GSS DMAH başlanma zamanına göre 20 hafta üzerine ulaşan gebeliklerin karşılaştırılması.

	20 Hafta Üzerinde Gebeliğe Ulaşma		TOPLAM	ANLAMLILIK TESTİ
	Var	Yok		
Tedavi Grubu 1 (n=10) (Sayı - Yüzde)	8 (%80)	2 (%20)	10 (%100)	p = 0.016
Tedavi Grubu 2 (n=16) (Sayı - Yüzde)	5 (%31.3)	11 (%68.8)	16 (%100)	
TOPLAM	13 (%50)	13 (%50)	26 (%100)	

Gruplar 20 hafta üzerine ulaşan gebelik sonuçlarına göre karşılaştırıldığında DMAH gebelik öncesi başlanıldığında 20 hafta üzeri gebeliğe ulaşma 2.5 kat artmaktadır (Odds Ratio: 2.560) ve gruplar arasında 20 hafta üzerine ulaşan gebelik sonuçları açısından anlamlı istatistiksel fark bulunmaktadır ($p = 0.016$).

4.7.4. DMAH Başlanma Zamanına Göre Canlı Doğumla Sonuçlanan Gebeliklerin Karşılaştırılması

Tablo 14. Gebelik öncesi ve GSS DMAH başlanma zamanına göre canlı doğumla sonuçlanan gebeliklerin karşılaştırılması.

	Canlı Doğum		TOPLAM	ANLAMLIILIK TESTİ
	Var	Yok		
Tedavi Grubu 1 (n=10) (Sayı - Yüzde)	7 (%70)	3 (%30)	10 (%100)	p = 0.054
Tedavi Grubu 2 (n=16) (Sayı - Yüzde)	5 (%31.3)	11 (%68.8)	16 (%100)	
TOPLAM	12 (%46.2)	14 (%53.8)	26 (%100)	

Gruplar canlı doğum ile sonuçlanan gebelik sonuçlarına göre karşılaştırıldığında DMAH gebelik öncesi başlanıldığında canlı doğum oranı 2.24 kat artmaktadır (Odds Ratio: 2.240) ancak gruplar arasında canlı doğum açısından anlamlı istatistiksel fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).

4.7.5. DMAH Başlanma Zamanına Göre Gebeliklerin Maternal ve Neonatal Sonuçlarına Göre Karşılaştırılması

Tablo 15. Gebelik öncesi ve GSS DMAH başlanma zamanına göre gebeliklerin maternal ve neonatal sonuçlarına göre karşılaştırılması.

Değişkenler		Gruplar		Anlamlılık Testi
		Tedavi Grubu 1 (n=10)	Tedavi Grubu 2 (n=16)	
Oligohidroamnios (Sayı - Yüzde)	Var	2 - (%25)	1 - (%20)	p = 0.835
	Yok	6 - (%75)	4 - (%80)	
İntrauterin Gelişme Geriliği (Sayı - Yüzde)	Var	1 - (%12.5)	-	p = 0.411
	Yok	7 - (%87.5)	5 - (%100)	
Erken Membran Ruptürü (Sayı - Yüzde)	Var	1 - (%12.5)	-	p = 0.302
	Yok	7 - (%87.5)	8 - (%100)	
Akut Fetal Distres (Sayı - Yüzde)	Var	-	1 - (%12.5)	p = 0.302
	Yok	8 - (%100)	7 - (%87.5)	
Erken Doğum Tehdidi (Sayı - Yüzde)	Var	1 - (%12.5)	-	p = 0.411
	Yok	7 - (%87.5)	5 - (%100)	
Gestasyonel Diabet (Sayı - Yüzde)	Var	2 - (%25)	1 - (%20)	p = 0.835
	Yok	6 - (%75)	4 - (%80)	
Gestasyonel Hipertansiyon (Sayı - Yüzde)	Var	-	1 - (%20)	p = 0.188
	Yok	8 - (%100)	4 - (%80)	
Düşük Tehdidi (Sayı - Yüzde)	Var	2 - (%20)	3 - (%18.8)	p = 0.937
	Yok	8 - (%80)	13 - (%81.3)	
Doğum Haftası (Ortalama±S.sapma)		36.37 ± 5.06	37.80 ± 1.30	p = 0.556

Gruplar DMAH başlanma zamanına göre devam eden gebeliklerin, gebeliğin maternal ve neonatal sonuçlarına göre karşılaştırıldığında gruplar arasında gebeliğin seyri ve sonuçları üzerine anlamlı istatistiksel fark bulunmamaktadır (p>0.05).

5. TARTIŞMA

TGK, klinikte gebeliğin sık görülen bir komplikasyonu olup tüm gebeliklerin yaklaşık %15'ini etkilemektedir. Çiftlerin bir kısmında gebelik kaybının belli bir nedeni bulunmasına rağmen olguların yaklaşık yarısında altta yatan neden tespit edilememektedir (154).

Klasik tanımında TGK, gebeliğin 20. haftasından önce yada 500 gramın altında fetal ağırlıkla birlikte üç veya daha fazla ardışık gebelik kaybı olarak tanımlanır. Ancak gebelik kaybı fetusun yaşayabilirliğine ulaşmadan önce bir gebeliğin kendiliğinden ölümü olarak tanımlanır. Bu nedenle TGK, bazı otörlerce 24 haftalık gebeliğe kadar olan tüm gebelik kayıplarını içerir (10). Kimyasal gebelik kayıpları, molar ve ektopik gebelikler tanıma dahil edilmemektedir.

Plasental apopitozis oksidatif stres sonucu doğrudan meydana gelmektedir. Oksidatif strese yanıt olarak ortaya çıkan apopitozisin ve sitozole ROT aracılı TRP kanal aktivasyonu ile aşırı Ca^{+2} girmesi trofoblast hücrelerinin ölümüne ve koagülasyon defektlerine neden olduğu görülmüştür. Son yıllarda hücre düzeyinde meydana gelen bu hasarın habituel abortuslara sebep olabileceği düşünülmüş ve bunun için çeşitli araştırmalar yapılmıştır.

Heparinin trofoblast apopitozisinde modülasyona neden olduğu, TGK olgularında gebelik öncesi DMAH kullanılması ile oksidatif stresin ve oksidatif stres ile aktive olan TRP kanal aktivasyonunun önlenmesi gebelik kayıplarını önleyecek mekanizmalardan biri olduğu bizim çalışmamızın sonuçları arasındadır.

TGK, 20. gebelik haftasından önce olan üç veya daha fazla gebelik kaybı olmasıdır. Ancak yeni yayınlarda iki veya daha fazla gebelik kaybı kabul görmektedir. ASRM 2013 yılında yayınladığı kılavuzda, tekrarlayan gebelik kaybını iki veya daha fazla olumsuz gebelikle sonuçlanan infertiliteden ayrı bir hastalık olarak belirtmiştir (4). European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) de 2017 yılında yayınladığı kılavuzda TGK tanısının iki veya daha fazla gebeliğin kaybindan sonra düşünülebileceğini belirtmiştir. Bu durum iki veya üç düşükten sonra gebelik kayıp oranlarının benzer olmasıdır. Bizde çalışmamıza iki veya daha fazla gebelik kaybı olan hastaları dahil ettik.

Apoptozis, insan plasentası dahil olmak üzere birçok üreme dokusunda normal bir olaydır. TGK olan olgularda gebelik öncesi DMAH kullanımının apoptozis, kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitesi üzerine etkisini araştıran literatürde yeterli çalışma bulunmamaktadır. 2003 yılında Choi ve arkadaşları apoptozisin TGK ile ilişkili olup olmadığını araştırmışlardır. 12 apoptozise bağlı genin anormal şekilde koryonik villuslarda eksprese olduğunu ortaya koymuşlardır. Apoptozis ile ilişkili genlerin aşırı ekspresyonunun TGK ile ilişkili olması muhtemeldir sonucuna varmışlardır (155). Normal gebelik seyri esnasında trofoblast hücre apoptozunun regülasyonunu değerlendirilen bir çalışmada da artmış trofoblast apoptozunu intrauterin gelişme geriliği, preeklampsi ve TGK gibi gebelik komplikasyonları ile ilişkili bulmuşlardır (156).

Kaspaz 3 aktivitesindeki artış apoptozisin bir göstergesidir. Preeklampsi benzeri semptomları olan sıçanların plasentalarında DMAH'ın anti-apoptotik etkisini araştıran bir çalışmada DMAH verilen grupta daha düşük kaspaz 3 ve Bax aktivitesi daha yüksek Bcl-2 aktivitesi bulunmuştur. Anlamli derecede daha az plasental apoptozis indeksi gösterilmiştir (157). Yine yapılan bir çalışmada Faktör V Leiden mutasyonu olan farelerin plasental dokusunda kaspaz 3 aktivitesinin arttığı DMAH tedavisi sonrasında ise aktivitesinin azaldığı bulunmuştur. Profilaktik DMAH kullanımının trombofili tanısı konulmuş olanlarda anti-apoptotik etkilerinden dolayı olumlu sonuçları olabileceği vurgulanmıştır (158).

2017 yılında Bolnick ve arkadaşlarının çalışmasında oksidatif strese maruz kalmış sitotrofoblast hücrelerinde kaspaz 3 düzeyleri yüksek olarak bulunmuştur. DMAH ile tedavi sonrasında ise kaspaz 3 düzeyinin azaldığını anti-apoptotik Bcl-2'nin arttığını saptamışlardır. DMAH'ın trofoblastlar üzerindeki anti-apoptotik etkileri gösterilmiştir (159). Shaker ve arkadaşlarının 2018 yılında yayınlanan çalışmasında Doksorubisinin (DOX) indüklediği kardiyomyopatiye DMAH tedavisinin apoptozis parametreleri üzerine etkisinde kaspaz 3 aktivitesinin kontrol grubunda düşük olduğu, DOX ile aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir. Tedaviye enoxparin eklenmesi ile kaspaz 3 düzeyinin azaldığı saptanmıştır. Enoksaparin tedavisi ile apoptozisin baskılandığı gözlemlenmiştir (160).

Bizim çalışmamızda trombofili nedeniyle TGK olanlarda gebelik öncesi DMAH tedavisinin apopitozis, kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitesi üzerine olan etkisi araştırıldı. Trombofili tanısı olan ve TGK öyküsü olan Hasta Grubu'nda apopitozis, kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitesinde artış olduğunu gözlemledik. Tedavi verilen grupta ise tedavi sonrasında apopitozis, kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitesinde azalma olduğunu saptadık. Sonuçlar literatürde belirtildiği gibi DMAH'ın etkisi ile benzer bulundu. Klinik bulgularla da karşılaştırıldığında, gebelik öncesi DMAH tedavisinin profilaktik başlanması apopitozisi önleyerek olumlu gebelik sonuçları elde etmeye yarar sağlayabilir.

Kortikal hücrelerde glutamat kaynaklı apopitozise karşı DMAH'ın koruyucu etkisini araştıran bir çalışmada tedavi edilen kortikal hücrelerin yaşayabilirlikleri MTT analizi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda hücrelerin yaşayabilirlikleri, 24 saat boyunca 100 umol/l glutamat ile inkübasyon yoluyla azaltılmıştır, bu da hücrelerin aşırı glutamat ile zarar görebileceğini göstermektedir. Glutamat inkübasyonundan önce DMAH verilen grupta ise hücre canlılığı artmıştır. Sonucunda azalan yaşayabilirlik, glutamat inkübasyonundan önce 1 mg/l DMAH ile tedavi ile önlenebileceği sonucuna varılmıştır (161).

DMAH'ın hücre canlılığı üzerine olum etkisi bizim çalışmamızda saptanmıştır. Hasta Grubu'nda hücre canlılığının Kontrol Grubu'na kıyasla anlamlı şekilde azalmış olarak saptadık. Gebelik öncesi DMAH tedavisi alan grupta ise tedavi sonrası hücre canlılığı Hasta Grubu'na kıyasla anlamlı şekilde artmıştır. Bu sonucu da DMAH'ın olumlu etkisi olarak yorumladık.

Serbest radikal üretimi ve antioksidan savunmaları arasında kritik bir denge vardır. Oksidatif stres, serbest radikallerin üretimi ile antioksidan sistemin bunları detoksifiye etme yeteneği arasındaki dengesizlikten kaynaklanır. Oksidan/antioksidan dengesinin oksidasyon yönünde bozulmasının yani oksidatif stresin, TGK patogenezinde de önemli rolü olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur. Oksidatif stres gebeliğin erken döneminde ortaya çıkabilir ve postpartum dönemde devam edebilir; bu hasar, tekrarlayan gebelik kaybı, preeklampsi ve erken membran rüptürü de dahil olmak üzere, gebelikle ilişkili bozuklukların patofizyolojisinde rol oynamaktadır (162).

1996-2005 yılları arasında Gupta ve arkadaşlarının yaptıkları literatür taramasında buldukları sonuçlara göre; yüksek oksijen metabolizmasına sahip plasenta gibi birçok organda canlılığın devamı için biyokimyasal tepkimeler sonucunda hücre zarı, DNA ve hücre organellerine zararlı oksidan denenen maddeler ortaya çıkmaktadır, bu zararlı maddelerin etkilerinin önlenmesini sağlayan antioksidanlarla ile oksidanların arasındaki denge oksidan lehine kayarsa artmış oksidatif stres oluşur ve bu durum hücrelerde ve DNA da hasarlanmaya neden olur. Oksidatif strese bağlı plasental hasarlanmanın TKG, mol hidatiform, preeklampsi özellikle de sebebi bilinmeyen TKG gibi hastalıkların etiolojisinde sorumlu olabileceği yorumu yapılmıştır (9). 2013 yılında Yiyenoğulları ve arkadaşlarının oksidatif stres ve gebelik komplikasyonları üzerine olan prospektif çalışmasında ise 30 TKG'lı ve 30 sağlıklı gebe çalışmaya dahil olmuştur. TKG olan hastalarda total oksidatif stres düzeyinin ve oksidatif stres indeksinin arttığı ve total antioksidan kapasitenin ise azaldığını saptamışlardır (163).

Çalışmamızda oksidatif stres TKG ilişkisi ve DMAH tedavisinin oksidatif stres üzerine etkisi araştırmanın primer sonuçlarındandır. Trombofilisi olan Hasta Grubu'nda ROT ürünleri ve JC-1 seviyesinin Kontrol Grubu'ndan daha fazla olduğu izlenmiştir. Gebelik öncesi DMAH tedavisi alan grupta ise ROT ürünleri ve JC-1 seviyesi azalmıştır. Oksidatif stresin olumsuz gebelik sonuçlarına neden olduğu literatürde çeşitli çalışmalarda açıklanmıştır. Ancak gebelik öncesi DMAH tedavisinin apoptozisin indüklediği oksidatif strese etkisi ile ilgili literatürde çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda gebelik öncesi DMAH kullanımı ile oksidatif stresin önlenerek gebelik kayıplarının önlenebileceğini sonucuna ulaştık.

TRPM2 ve TRPV1'in artan aktivasyonu mitokondriyal permeabilitenin artmasına ve zarlar arasında Ca^{+2} içeriğini bozan aşırı $[Ca^{+2}]_i$ yoğunluğuna yol açmaktadır. Mitokondrideki işlev bozukluğu üç duruma yol açmaktadır; birincisi endojen mitokondriyal ROT oluşumu, ikincisi kaspaz oluşumu ile apoptozis, üçüncüsü ise PARP1 aktivasyonu ile DNA hasarıdır (164). Çalışmamızda Hasta Grubu'nda PARP aktivitesi Kontrol Grubu'na kıyasla artmıştır. Gebelik öncesi DMAH kullanmış olan grupta ise bu aktivite anlamlı olarak azalmıştır.

Ca⁺² iyonu; sinir hücrelerindeki iletim mekanizmasında, ROT üretiminde ve apoptoziste önemli rol oynamaktadır (115). Ca⁺² iyonunun TRPV1 ve TRPM2 kanallarından da hücre içine geçtiği bilinmektedir. TRPV1 ve TRPM2 kanalları oksidatif stresle de aktive olmaktadır (165). 2000 yılından sonraki yapılan çalışmalarda hem ADPR'nin hem de oksidatif stresin birbirlerinden bağımsız olarak TRPM2 kanalını açabildiği belirtilmiştir.

Kalsiyum sinyalinin gen ekspresyonu, hücrel büyüme ve farklılaşma, ROT oluşumu ve apoptozis dahil olmak üzere çeşitli hücrel fonksiyonları kontrol ettiği gösterilmiştir. Nöronlarda DMAH'ın [Ca⁺²]_i üzerinde modülasyonunu gösteren bir çalışmada DMAH'ın Ca⁺² salınımını baskılayarak [Ca⁺²]_i azaltabildiğini göstermişlerdir (166).

TRP kanallarının çeşitli hastalıklarda olan etkisi literatürde yeni yeni gündeme gelmektedir. Ancak TKG ile olan ilgisi ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda TRP kanallarından kalsiyum iyon geçişinin Hasta Grubu'nda yüksek olduğunu saptadık. DMAH tedavisi alan grupta ise tedavi sonrası bu iyon geçişinin azaldığını bulduk. DMAH tedavisi ile bu kanalların aktivasyonu azalmıştır. Bu aktivasyonun baskılanması ile TRPM2 ve TRPV1 kanalları aracılı Ca⁺² girişi ve apoptozis azalmıştır. DMAH kullanılması ile oksidatif stresin ve oksidatif stres ile aktive olan TRP kanal aktivasyonunun önlenmesi tedavi açısından ümit vericidir.

Çalışmaya dahil olan hastaların tamamının trombofili tanısı vardı. Hastalar trombofili sınıflamasına göre konjenital ve edinsel olarak ikiye ayrılmıştır. Hasta Grubu'nda 7 (%70) hasta, Tedavi Grubu 1'de 9 (%90) hasta ve Tedavi Grubu 2'de 11 (%68.8) hasta konjenital trombofili özgeçmişine sahipti. Hasta Grubu'nda 3 (%30) hasta, Tedavi Grubu 1'de 1 (%10) hasta ve Tedavi Grubu 2'de 5 (%31.2) hasta da ise edinsel trombofili öyküsü mevcuttu. Gruplar konjenital ve edinsel trombofili açısından benzer oranlara sahiptir. Konjenital ve edinsel trombofililer kötü gebelik sonuçları ile ilişkilidirler. Konjenital trombofili prevalansı hasta seçimine ve etnik kökene göre değişmektedir. Örneğin Kafkas populasyonlarında bu oran %10 ile 40 arasında değişebilmektedir. Venöz tromboembolili (VTE) bireylerin % 50'sinde alta yatan bir trombofili tanımlanabilir, bunların % 35'i kalıtsal bir forma sahiptir

(167). Bizim çalışmamızda ise konjenital trombofil oranı yaklaşık %70 ile %90 arasında idi. AFAS edinsel trombofilinin en önemli nedenidir. Genel toplumdaki prevalansı yaklaşık %2'dir (168). Prevalans çalışmalarında ise TGK olan kadınların % 5-51'inde ACA pozitifliği ve %2-20'sinde LA pozitifliği gösterilmiştir (169). Edinsel trombofil oranı bizim çalışmamızda %10 ile %30 arasındadır. Konjenital ve edinsel trombofil oranlarının çalışmamızda genel toplum prevalansından farklı olmasının sebebi çalışmaya dahil edilen hasta sayısının azlığından olabilir.

TGK'lar 3 ana grupta incelenmektedir. Canlı doğum öyküsünün olup olmamasına göre hastalar primer, sekonder ve tersiyer TGK olarak üç alt tipe ayrılmaktadır. Çalışmamızda tersiyer TGK öyküsü bulunan hasta bulunmamaktadır. Primer TGK'sı olan hasta sayısı, Hasta Grubu'nda 6 (%60), Tedavi Grubu 1'de 7 (%70) ve Tedavi Grubu 2'de 10 (%62.5) idi. Sekonder TGK öyküsü olanlar ise hasta Grubu'nda 4 (%40), Tedavi Grubu 1'de 3 (%30) ve Tedavi Grubu 2'de 6 (%37.5) hastadır. Çalışmamızda primer ve sekonder TGK oranları gruplar arasında benzer dağılım göstermektedir. Carp ve arkadaşlarının 2002 yılında 108 TGK öyküsü olan kadında yaptıkları bir çalışmada trombofilisi olan 22 kadının 14'ünün (%64) primer TGK ve 8'inin (%36) sekonder veya tersiyer TGK öyküsünün olduğunu belirtmişlerdir (170). Çalışmamız TGK alt tiplerine göre bu çalışma ile benzer oranlara sahiptir.

Yaş ve önceki gebeliklerdeki düşük sayısı bir sonraki gebelikte düşük olasılığını arttıran birbirinde bağımsız faktörlerdir. Öncesinde gebelik kaybı olanlar, daha önce doğum yapmış olanlara göre daha yüksek düşük yapma riskine sahiptir. Diğer önemli bir faktör olan anne yaşı arttıkça genetik olarak normal olan veya olmayan gebelik kayıpları artmaktadır (171). 2009 yılında Papinger tarafından yapılan bu iki faktörü birarada inceleyen bir çalışmada peş peşe üç gebelik kaybı sonrasında, sonraki gebelikte başarılı gebelik oranları 45 yaşındaki kadınlarda %54, 20 yaşındaki kadınlarda %90 olarak bulunmuştur. Peş peşe 2 gebelik kaybı olan 30 yaşındaki kadınlarda sonraki gebelikte başarı şansı %84 iken, aynı yaş grubundaki peş peşe 5 açıklanamayan düşüğü olan hastalarda %71'e düşmektedir (172). Gruplardaki hasta sayısının az olmasından dolayı bu iki faktör çalışmamızda değerlendirilememiştir.

Gebelikte trombofili ile istenmeyen gebelik sonuçları arasında güçlü kanıtlar mevcuttur. Bu sorunlar hem erken gebelik (tekrarlayan düşükler) hem de geç gebelik [(plasental vasküler aracılı problemleri (fetal kayıp, preeklampsi, plasental abruption ve intra-uterin büyüme kısıtlaması)] dönemlerini içerir (173).

Trombofili, normal plasental vasküler fonksiyonu olumsuz yönde etkileyerek obstetrik komplikasyonlara maruz kalma riskini artırabilir. Olumsuz gebelik sonuçları ile kalıtsal trombofililer arasındaki ilişkiyi değerlendiren bir çalışmada gebelik planlayan ve olumsuz gebelik sonuçları öyküsü olan kadınlarda trombofili testlerinin yapılması gerektiği tezi savunulmuştur (174).

TGK olan kadınlarda trombofili prevalansını tahmin etmek ve antitrombotik tedavinin etkisini değerlendirmek amacıyla 490 gebenin dahil olduğu bir çalışmada canlı doğum oranı, belirli bir trombofilinin bulunup bulunmadığına bakılmaksızın enoksaparin alan kadın grubunda daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgu ≥ 4 düşüğü olan kadınlarda daha belirgin olarak bulunmuştur. Sonucunda çalışma grubunda trombofili prevalansı genel popülasyona göre daha yüksek bulunmuş. Ayrıca enoksaparin ile tedavi, trombofili kanıtı olan özellikle ≥ 4 düşük olanlarda canlı doğum oranını arttırabileceği belirtilmiştir (175).

TGK olan hastalarda kalıtsal trombofili insidansını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada 211 hasta değerlendirilmiştir. Kalıtsal trombofili açısından heterozigot veya homozigot olup olmadığına bağlı olarak çalışma sonucunda trombofili ile TGK arasında doğrudan bir ilişki olduğu gösterilmiştir (176).

Antitrombotiklerin etkisi anti-FXa veya anti-Faktör IIa şeklindedir. Heparin anti-FXa ve anti-Faktör IIa etkisi gösterirken, DMAH'ler daha çok anti-FXa etkilidirler. DMAH'lerin bu etkisi hem heparin kadar etkili hem de heparinden daha güvenilirdir. Faktör Xa, inhibisyon için iyi bir hedef moleküldür. DMAH tedavisinin TGK üzerine etkilerini araştıran birçok çalışma yapılmıştır.

2016 yılında Sokol V. ve arkadaşlarının yayınlanan çalışmasında kalıtsal tombofilisi olan 70 hastanın 57'sine DMAH verilmiştir. 13 kadına herhangi bir tedavi verilmemiştir. Gebelikte DMAH ile tedavi edilen kalıtsal trombofili kadınlarda perinatal sonuçların, DMAH ile tedavi edilmeyen kadınlara göre anlamlı olarak daha iyi olduğu bulunmuştur (177). Yine yapılan bir çalışmada kalıtsal

trombofilisi olan ve TGK öyküsü olan 150 kadına DMAH tedavisi verilmiş, açıklanamayan TGK'sı olan 98 kadına ise herhangi bir tedavi verilmemiştir. Tedavi verilen grupta anlamlı olarak düşük sayısının daha az olduğu ve doğum oranlarının daha yüksek olduğu bulunmuştur (178). TGK ve Protein S eksikliği olan DMAH tedavisi verilen 51 kadının dahil olduğu bir çalışmada da başarılı doğum oranı %94 olarak bulunmuştur (179).

Tekrarlayan plasental aracılı gebelik komplikasyonlarını önlemek için DMAH kullanımı ile ilgili bir meta-analizde önceden plasenta aracılı gebelik komplikasyonu olan toplam 848 gebe kadından oluşan altı randomize kontrolü çalışma belirlenmiştir. Çalışmanın primer sonuçları preeklampsi, gestasyonel küçük yaşta yenidoğan doğumu, plasental abruption veya 20 haftanın altı gebelik kaybıdır. Sonucunda DMAH'ın tekrarlayan, özellikle şiddetli plasenta aracılı gebelik komplikasyonları için umut verici bir tedavi olabileceği belirtilmiştir (180). 2016 yılında yayınlanan bir metaanalizde ise sekiz çalışmadan 963 uygun hasta analiz edilmiş. Rastgele 480 hastaya DMAH tedavisi başlanılmış. 483 hastaya tedavi verilmemiş. Primer sonucunda, DMAH, tekrarlayan plasenta aracılı gebelik komplikasyonları riskini önemli ölçüde azaltmamıştır (181).

Trombofili ve kötü obstetrik öyküsü olan 204 hastanın dahil olduğu bir çalışmada antikoagülan tedavinin gebelik sonuçları üzerine etkisi araştırılmıştır. Antikoagülan tedavi almayan hastalarda kötü obstetrik sonuçlar daha sık görülmüş. DMAH ve aspirin ile antikoagülan tedavinin trombofili ve daha önceki kötü obstetrik sonuçları olan gebe kadınlarda daha iyi obstetrik sonuçlar sağlayabileceği belirtilmiştir (182).

2015 yılında yapılan ardışık en az 2 düşüğü olan ve açıklanamayan TGK öyküsü olan 449 kadının dahil olduğu bir çalışmada ise DMAH kullanımının açıklanamayan TGK'sı olan kadınlarda devam eden gebeliğin seyrini veya canlı doğum oranlarını değiştirmediği saptanmıştır (183).

Çalışmamızda trombofili nedeniyle TGK öyküsü olup gebelik öncesi DMAH tedavisi alan grupta düşük ile sonuçlanan gebelik oranlarının azalmış olduğunu canlı doğum ile sonuçlanmış gebelik oranların artmış olduğunu bulduk. GSS DMAH tedavisi alan grupta ise gebelik kaybı oranı nispeten daha fazla idi.

Literatürde DMAH tedavisinin başlama zamanı hakkında yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bununla ilgili 2018 yılında yapılan bir çalışmada iki veya daha fazla IVF / ICSI (İn Vitro Fertilizasyon / İntrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu) siklusuna sahip subfertil hastalarda DMAH uygulamasının etkileri araştırılmış. 230 kadına GnRH-antagonist protokolü uygulanmış ve hastalar DMAH kullanımına göre iki gruba ayrılmış. Klinik gebelik ve düşük yapma çalışmanın primer sonuçlarıdır. Gruplar arasında klinik gebelik, düşük ve canlı doğum açısından anlamlı fark saptanılmamış, iki veya daha fazla başarısız IVF / ICSI siklusuna sahip hastalarda standart DMAH ilavesini destekleyen kanıt bulunmamıştır (184). Bir çalışma da ise iki veya daha fazla başarısız ART öyküsü olan 150 kadın oosit toplama işleminden hemen sonra aynı gün DMAH başlanan ve başlanmayan kontrol grubu olmak üzere iki grupta incelenmiştir. Çalışma açıklanamayan TGK olup ART siklusuna dahil edilen, 38 yaş altında, herhangi bir metabolik veya hormonal koagülasyon bozukluğu olmayan, normal karyotipe ve anatomiye sahip kadın hastalarda yapılmıştır. Gebeliğin 12. haftasına kadar DMAH tedavisine devam edilmiş. Sonucunda istatistiksel anlamlılık olmamasına rağmen, DMAH ile canlı doğum oranlarında gözlemlenen nispi artış % 30 oranında saptanmıştır (185).

Bizim çalışmamızda da DMAH başlama zamanının gebelik sonuçlarına olumlu etkisi olduğu görülmüştür. Tedavi Grubu 1 ve Tedavi Grubu 2 grupları DMAH başlanma zamanına göre değerlendirildiğinde; düşük ve 20 hafta üzerine ulaşan gebelik oranları ile DMAH başlanma zamanı arasındaki ilişki incelendi. Tedavi Grubu 1’de düşük %20, 20 hafta üzerine ulaşan gebelik %80 oranında; Tedavi Grubu 2’de düşük %68.8, 20 hafta üzerine ulaşan gebelik %31.2 oranında olduğu görüldü. Bu sonuç gebelikten önce DMAH başlanan hastalarda GSS DMAH başlanan hastalara göre gebeliklerinin düşük ile sonuçlanma oranının istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha az olduğunu gösterdi ($p=0.016$). Bu sonuç DMAH’ın TRP kanalları aracılığıyla oksidatif stresin indüklediği apoptozisi önleyerek implantasyonu kolaylaştırması ile açıklanabilir.

DMAH başlanma zamanının canlı doğum ile sonuçlanan gebelik sonuçlarına etkisi değerlendirildiğinde Tedavi Grubu 1’de canlı doğum %70, Tedavi Grubu 2’de canlı doğum %31.3 oranında görüldü. Gebelikten önce DMAH başlanan hastalarda canlı doğum oranı daha yüksek bulunmuştur. Ancak aralarında anlamlı istatistiksel

fark bulunmamıştır ($p=0.054$). Ancak sonucunda istatistiksel anlamlılık olmamasına rağmen, gebelik öncesi DMAH kullanımı ile canlı doğum oranları GSS kullanılmasına göre yaklaşık 2 kat daha fazla saptanmıştır (OR: 2.24).

TGK öyküsü olan hastalarda DMAH'ın gebeliğin seyri ve sonuçları üzerine önemli oranda başarılı sonuçlar elde edildiğini gösteren bir çok çalışma olmasına rağmen başlama zamanına göre literatürde yeterli veri bulunmamaktadır. Çalışmamızda DMAH başlanma zamanına göre gebelikler maternal ve neonatal sonuçlara göre karşılaştırılmıştır. Oligohidroamnios, intrauterin gelişme geriliği, erken membran rüptürü, akut fetal distres, erken doğum tehdidi, gestasyonel diyabet, gestasyonel hipertansiyon, düşük tehdidi, doğum haftası primer sonuçlardır. Gruplar arasında devam eden gebeliklerin maternal ve neonatal sonuçları üzerine anlamlı istatistiksel fark saptanılmamıştır.

Trombofili durumu gebelikte obstetrik komplikasyonların insidansını arttırmaktadır. 2014 yılında yapılan bir çalışmada çalışmaya dahil edilen hastaların %37.5'inde bir veya daha fazla obstetrik komplikasyona rastlanılmıştır. Çalışmada gebelikte trombofili tedavisi için antikoagülasyon tedavisinin sıkı bir şekilde uygulanmasının, gebelik sonucunun iyileşmesi ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (186). Trombofili varlığı, ciddi preeklampsi formlarına sahip hastalarda maternal laboratuvar parametrelerinin ve perinatal sonuçların kötüleşmesine yol açmaktadır (187). Berks ve arkadaşlarının 2015 yılında 844 tekil gebeliği içeren çalışmasında, şiddetli preeklampsiyi Protein S eksikliği ile, intrauterin gelişme geriliğini ve erken başlangıçlı preeklampsiyi ise aPL'ları ile ilişkili bulmuşlardır. Erken başlangıçlı preeklampsiyi, özellikle intrauterin gelişme geriliği ile komplike ise aPL'ları ile ilişkili olduğunu vurgulamışlardır (188).

Çalışmamızda gebelik öncesi DMAH başlanan grupta gestasyonel hipertansiyon ve preeklampsi olgusuna rastlanılmamıştır. GSS DMAH kullanan grupta ise 1 olguda gestasyonel hipertansiyon gelişmiştir. Diğer obstetrik komplikasyonlar açısından da gruplarda anlamlı yüksek oran bulunmamıştır. Gruplar DMAH başlanma zamanına göre maternal ve neonatal sonuçlara göre karşılaştırıldığında da gruplar arasında gebeliğin seyri ve sonuçları arasında anlamlı bir fark saptanılmamıştır.

SONUÇ

Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler ilk kez, trombofili nedeniyle TKG'nın trombositlerde TRPM2 ve TRPV1 kanalları aracılığıyla mitokondriyal ROT ürünleri ve apoptozisi arttırarak ortaya çıkabileceğini öne sürmüştür. Ancak, DMAH tedavisi ile trombofilinin oksidan ve apoptotik etkilerinin trombositlerdeki TRPM2 ve TRPV1'in bloke edilmesiyle tersine döndüğü görülmüştür. Böylelikle, DMAH'ın gebelik öncesi kullanımı ile trombofili kaynaklı trombositlerdeki oksidatif stres ve apoptozisi tedavi etmek için yeni ve etkili bir yaklaşım olduğu kanısındayız.



ÖZET

Trombofili Nedeniyle Tekrarlayan Gebelik Kaybı Yaşayanlarda Gebelik Öncesi Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin Kullanımının Klinik ve Laboratuvar Verileri Üzerine Etkileri

Tekrarlayan gebelik kaybı; ardışık iki ya da daha fazla gebeliğin 20. haftasından önce yada 500 gramın altında fetal ağırlıkla birlikte gebelik kaybı olarak tanımlanır. Fertil çiftlerin yaklaşık %1'inde görülür. Hemostaz bozukluklarına bağlı hematolojik nedenler, anatomik nedenler, endokrin nedenler, kromozomal anomaliler, enfeksiyöz, immünolojik ve çevresel faktörler başlıca etyolojik nedenlerdir.

Trombofili pıhtılaşmaya eğilim durumudur. Batı popülasyonunun en az %15'ini etkilemektedir. Trombofili gebeliğin seyrini olumsuz yönde etkilemektedir. Abtus, tekrarlayan gebelik kaybı, gestasyonel hipertansiyon, preeklamsi, ablasyo plasenta, IUGR, oligohidroamnios, intrauterin ex fetus, erken doğum gibi sonuçlara neden olmaktadır.

TRP katyon kanalları son 20 yıl içerisinde keşfedilmiştir. Bu kanalların birçok hastalığın patogeneğinde rolü olduğu düşünülmektedir. Bir kısım TRP kanalları reaktif oksijen ürünleri ile aktive olmaktadır. Sitozole ROT aracılı TRP kanal aktivasyonu ile aşırı Ca^{+2} (kalsiyum iyonu) girmesi apoptozis ve DNA tahribi gibi birçok hücre ölümcül süreçlerini başlatmaktadır. DMAH'ın anti-apoptotik etkisi bilinmektedir. Ancak TRP kanalları üzerine etkisi tam olarak bilinmemektedir.

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı ve Biyofizik Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya alınan hastalar Süleyman Demirel Üniversitesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilim Dalına başvuran gönüllü hastalardan seçildi. Araştırmaya alınan TGK tanısı olup aynı zamanda trombofilili ancak henüz ilaç almamış olan 10 hasta, TGK tanısı olup aynı zamanda trombofilisi olan ve gebelik öncesi DMAH kullanmış (12 hafta boyunca) 10 hasta, TGK tanısı olup trombofilili ve gebelik saptandıktan sonra (GSS) DMAH kullanmış 16 hasta ve hiçbir ek hastalığı olmayan 10 kişilik kontrol grubundan oluşturuldu.

Gruplar sosyodemografik veriler açısından homojendi. Kontrol, Hasta ve gebelikten önce DMAH kullanmış olan hastaların trombositlerinde TRPM2 ve TRPV1 kanal aktivasyonu, apoptozis, hücre canlılığı, kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktiviteleri, PARP1 aktivitesi, hücre içi ROT üretimi, mitokondriyal membran depolarizasyonu (JC-1) düzeyleri incelenmiştir. DMAH başlanma zamanına göre gruplar gebeliğin seyri ve sonuçları açısından incelenmiştir. DMAH'ın başlanma zamanına göre düşük ve 20 hafta üzerine ulaşan gebelik oranları arasında istatistiksel olarak anlamları sonuçlara ulaşıldı. Gebelikten önce DMAH başlandığında gebeliğin düşük ile sonlanma oranlarının belirgin olarak azaldığını saptadık.

Anahtar Kelimeler: Tekrarlayan gebelik kaybı, trombofili, düşük molekül ağırlıklı heparin, gebelik öncesi, Ca^{+2} sinyali, TRP kanalları, apoptozis, oksidatif stres

SUMMARY

The Effects of Low Molecular Weight Heparin Used to Before Pregnancy on Clinical and Laboratory Data in Patients with Recurrent Pregnancy Loss Due to Thrombophilia

Recurrent pregnancy loss is defined as pregnancy loss together with fetal weight below 500 grams before 20th week of two or more consecutive pregnancies. Approximately %1 of the fertile pairs are affected. Haematological causes due to hemostatic disorders, anatomical, endocrine, chromosomal anomalies, infectious, immunologic and environmental factors are major etiological causes.

Thrombophilia is a tendency to clot. It affects at least %15 of Western populations. Thrombophilia affects the course of pregnancy negatively. It results in abortion, recurrent pregnancy loss, gestational hypertension, preeclampsia, ablative placenta, IUGR, oligohydroamnios, intrauterine ex fetus, premature birth.

TRP cation channels have been discovered in the past 20 years. These channels are thought to play a role in the pathogenesis of many diseases. Some TRP channels are activated by reactive oxygen species. Excessive Ca^{+2} (calcium ion) entry through cytosolic ROT-mediated TRP channel activation initiates many cell lethal processes such as apoptosis and DNA damage. The anti-apoptotic effect of LMWH is known. However, the effect on TRP channels is not fully known.

This study was carried out at Süleyman Demirel University, Department of Obstetrics and Gynecology and Biophysics Departments Research Laboratories. The included patients were selected from voluntary patients who applied to Süleyman Demirel University, Department of Obstetrics and Gynecology. 10 patients who were diagnosed with RPL and who had thrombophilia but had not received any medication at the same time, 10 patients who had RPL and who also had thrombophilia and received pre-pregnancy LMWH (during 12 weeks), 16 patients who were diagnosed as RPL and had thrombophilia and received LMWH after pregnancy has been detected, and control group of 10 persons with no additional disease were included in the study.

Groups were homogeneous in terms of sociodemographic data. TRPM2 and TRPV1 channel activation, apoptosis, cell viability, caspase 3 and caspase 9 activities, PARP1 activity, intracellular ROT production, mitochondrial membrane depolarization (JC-1) levels were examined in platelets of control group, patient group and patients who had used LMWH before pregnancy. Groups were examined according to the time of onset of LMWH in terms of gestation and outcome. Statistically significant results were obtained according to the time of onset of LMWH between abortion and pregnancy rates reaching over 20 weeks. We found that the prevalence of abortion and abortion decreased markedly when LMWH was initiated before pregnancy.

Keywords: Recurrent pregnancy loss, thrombophilia, low molecular weight heparin, before pregnancy, Ca^{+2} signalling, TRP channels, apoptosis, oxidative stress.

KAYNAKLAR

1. Krog M, Kolte A, Husby K, Egerup P, Larsen E, Christiansen O, et al. Recurrent pregnancy loss. *Ugeskrift for laeger*. 2017;179(17).
2. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Reviews in obstetrics and gynecology*. 2009;2(2):76.
3. Pabinger I. Thrombophilia and its impact on pregnancy, *Hamostaseologie* 2008; 28 (3): 130-4. Published with permission from Schattauer GmbH. *Thrombosis research*. 2009;123:S16-S21.
4. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertility and sterility*. 2013;99(1):63.
5. Jaslow CR, Carney JL, Kutteh WH. Diagnostic factors identified in 1020 women with two versus three or more recurrent pregnancy losses. *Fertility and sterility*. 2010;93(4):1234-43.
6. Götz V, Qiao S, Beck A, Boehm U. Transient receptor potential (TRP) channel function in the reproductive axis. *Cell calcium*. 2017.
7. Chappell LC, Seed PT, Kelly FJ, Briley A, Hunt BJ, Charnock-Jones DS, et al. Vitamin C and E supplementation in women at risk of preeclampsia is associated with changes in indices of oxidative stress and placental function. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2002;187(3):777-84.
8. Danihel Ľ, Gomolčák P, Korbel M, Pružinec J, Vojtaššák J, Janík P, et al. Expression of proliferation and apoptotic markers in human placenta during pregnancy. *Acta histochemica*. 2002;104(4):335-8.
9. Gupta S, Agarwal A, Banerjee J, Alvarez JG. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. *Obstetrical & gynecological survey*. 2007;62(5):335-47.
10. No, Green-top Guideline. The investigation and treatment of couples with recurrent first-trimester and second-trimester miscarriage. April 2011. 2011.
11. Stirrat GM. Recurrent miscarriage I: definition and epidemiology. *The Lancet*. 1990;336(8716):673-5.
12. James DK, Steer PJ, Weiner CP, Gonik B. *High Risk Pregnancy E-Book: Management Options-Expert Consult: Elsevier Health Sciences*; 2010.
13. Hassold T, Chiu D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Human genetics*. 1985;70(1):11-7.
14. Ray JG, Kearon C, Yi Q, Sheridan P, Lonn E. Homocysteine-Lowering Therapy and Risk for Venous Thromboembolism A Randomized Trial Homocysteine-Lowering Therapy and Risk for Venous Thromboembolism. *Annals of internal medicine*. 2007;146(11):761-7.

15. Kwak-Kim J, Yang KM, Gilman-Sachs A. Recurrent pregnancy loss: a disease of inflammation and coagulation. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2009;35(4):609-22.
16. Heuser C, Dalton J, Macpherson C, Branch DW, Porter TF, Silver RM. Idiopathic recurrent pregnancy loss recurs at similar gestational ages. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2010;203(4):343. e1-. e5.
17. Schust D, Hill J. Recurrent pregnancy loss. *Novak's Gynecology*. 2002;1(3):371-81.
18. Andersen A-MN, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *Bmj*. 2000;320(7251):1708-12.
19. Knudsen UB, Hansen V, Juul S, Secher NJ. Prognosis of a new pregnancy following previous spontaneous abortions. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 1991;39(1):31-6.
20. Speroff L, Fritz MA. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*: Lippincott Williams & wilkins; 2005.
21. Allan H. Decherney LN, T.Murphy Goodwin, Neri Laufer. . *Current Diagnosis and Treatment'Serisi*. 10. Baskı Syf:263.
22. Den Heijer M, Willems HP, Blom HJ, Gerrits WB, Cattaneo M, Eichinger S, et al. Homocysteine lowering by B vitamins and the secondary prevention of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Blood*. 2007;109(1):139-44.
23. Christiansen OB, Mathiesen O, Lauritsen JG, Grunnet N. Idiopathic recurrent spontaneous abortion: evidence of a familial predisposition. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*. 1990;69(7-8):597-601.
24. Bianco K, Caughey AB, Shaffer BL, Davis R, Norton ME. History of miscarriage and increased incidence of fetal aneuploidy in subsequent pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*. 2006;107(5):1098-102.
25. Philipp T, Philipp K, Reiner A, Beer F, Kalousek D. Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies. *Human reproduction*. 2003;18(8):1724-32.
26. Propst AM, Hill III JA, editors. *Anatomic factors associated with recurrent pregnancy loss*. *Seminars in reproductive medicine*; 2000.
27. Harger JH, Archer DF, Marchese SG, Muracca-clemens M, Garver KL. Etiology of recurrent pregnancy losses and outcome of subsequent pregnancies. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 1984;39(6):394-5.
28. Wold ASD, Pham N, Arici A, editors. *Anatomic factors in recurrent pregnancy loss*. *Seminars in reproductive medicine*; 2006.
29. Proctor JA, Haney AF. Recurrent first trimester pregnancy loss is associated with uterine septum but not with bicornuate uterus. *Fertility and sterility*. 2003;80(5):1212-5.

30. Homer HA, Li T-C, Cooke ID. The septate uterus: a review of management and reproductive outcome. *Fertility and sterility*. 2000;73(1):1-14.
31. Simpson JL. Causes of fetal wastage. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2007;50(1):10-30.
32. Damti A, Riskin-Mashiah S. Preconception care and counseling for women with diabetes and those at risk for diabetes. *Harefuah*. 2009;148(7):447-51, 75.
33. Greene MF, Hare JW, Cloherty JP, Benacerraf BR, Soeldner JS. First-trimester hemoglobin A1 and risk for major malformation and spontaneous abortion in diabetic pregnancy. *Teratology*. 1989;39(3):225-31.
34. Mills JL, Simpson JL, Driscoll SG, Jovanovic-Peterson L, Van Allen M, Aarons JH, et al. Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin-dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. *New England Journal of Medicine*. 1988;319(25):1617-23.
35. Stagnaro-Green A, Glinioer D. Thyroid autoimmunity and the risk of miscarriage. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;18(2):167-81.
36. Bellver J, Soares SR, Álvarez C, Muñoz E, Ramírez A, Rubio C, et al. The role of thrombophilia and thyroid autoimmunity in unexplained infertility, implantation failure and recurrent spontaneous abortion. *Human Reproduction*. 2007;23(2):278-84.
37. Anselmo J, Cao D, Karrison T, Weiss RE, Refetoff S. Fetal loss associated with excess thyroid hormone exposure. *Jama*. 2004;292(6):691-5.
38. Rai R, Backos M, Rushworth F, Regan L. Polycystic ovaries and recurrent miscarriage—a reappraisal. *Human Reproduction*. 2000;15(3):612-5.
39. Okon MA, Laird SM, Tuckerman EM, Li T-C. Serum androgen levels in women who have recurrent miscarriages and their correlation with markers of endometrial function. *Fertility and sterility*. 1998;69(4):682-90.
40. Bonney RC, Franks S. 2 The endocrinology of implantation and early pregnancy. *Bailliere's clinical endocrinology and metabolism*. 1990;4(2):207-31.
41. Hirahara F, Andoh N, Sawai K, Hirabuki T, Uemura T, Minaguchi H. Hyperprolactinemic recurrent miscarriage and results of randomized bromocriptine treatment trials. *Fertility and sterility*. 1998;70(2):246-52.
42. Goldstein P, Berrier J, Rosen S, Sacks HS, Chalmers TC. A meta-analysis of randomized control trials of progestational agents in pregnancy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 1989;96(3):265-74.
43. Yetman DL, Kutteh WH. Antiphospholipid antibody panels and recurrent pregnancy loss: prevalence of anticardiolipin antibodies compared with other antiphospholipid antibodies. *Fertility and sterility*. 1996;66(4):540-6.
44. Kallen CB, Arici A. Immune testing in fertility practice: truth or deception? Current opinion in obstetrics and gynecology. 2003;15(3):225-31.

45. Reindollar RH. Contemporary issues for spontaneous abortion: Does recurrent abortion exist? *Obstetrics and gynecology clinics of North America*. 2000;27(3):541-54.
46. Lim W, Crowther MA, Eikelboom JW. Management of antiphospholipid antibody syndrome: a systematic review. *Jama*. 2006;295(9):1050-7.
47. Mok CC, Tang SSK, To CH, Petri M. Incidence and risk factors of thromboembolism in systemic lupus erythematosus: a comparison of three ethnic groups. *Arthritis & Rheumatology*. 2005;52(9):2774-82.
48. Clark EA, Silver RM, Branch DW. Do antiphospholipid antibodies cause preeclampsia and HELLP syndrome? *Current rheumatology reports*. 2007;9(3):219-25.
49. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis & Rheumatology*. 2002;46(4):1019-27.
50. Kadanalı S. Tekrarlayan gebelik kayıpları. *Nobel Tıp Kitapevleri*. 2012:96.
51. Oshiro BT, Silver RM, Scott JR, Yu H, Branch DW. Antiphospholipid antibodies and fetal death. *Obstetrics & Gynecology*. 1996;87(4):489-93.
52. Myakis S, Lockshin M, Atsumi T. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost*. 2006;4:295-306.
53. Oliver-Miñarro D, Sanchez-Ramón S, Rodriguez-Mahou M, Álvarez S, Fernández-Cruz E. Isolated type 5 antimitochondrial autoantibodies are associated with a history of thrombocytopenia and fetal loss. *Fertility and sterility*. 2007;87(4):976. e17-. e18.
54. Stricker R, Echenard M, Eberhart R, Chevailler M, Perez V, Quinn F, et al. Evaluation of maternal thyroid function during pregnancy: the importance of using gestational age-specific reference intervals. *European Journal of Endocrinology*. 2007;157(4):509-14.
55. Christiansen OB, Nielsen HS, Lund M, Steffensen R, Varming K. Mannose-binding lectin-2 genotypes and recurrent late pregnancy losses. *Human Reproduction*. 2008;24(2):291-9.
56. Kutteh WH, Triplett DA, editors. *Thrombophilias and recurrent pregnancy loss. Seminars in reproductive medicine*; 2006.
57. Verhamme P, Hoylaerts MF. Hemostasis and inflammation: two of a kind? *Thrombosis journal*. 2009;7(1):15.
58. Wang Y, Köster K, Lummer M, Ragg H. Origin of serpin-mediated regulation of coagulation and blood pressure. *PloS one*. 2014;9(5):e97879.
59. Fogerty AE, Connors JM. Management of inherited thrombophilia in pregnancy. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 2009;16(6):464-9.

60. Roqué H, Paidas MJ, Funai EF, Kuczynski E, Lockwood CJ. Maternal thrombophilias are not associated with early pregnancy loss. *Thrombosis and haemostasis*. 2004;92(02):290-5.
61. Jivraj S, Rai R, Underwood J, Regan L. Genetic thrombophilic mutations among couples with recurrent miscarriage. *Human reproduction*. 2006;21(5):1161-5.
62. Juul K, Tybjærg-Hansen A, Schnohr P, Nordestgaard BG. Factor V Leiden and the risk for venous thromboembolism in the adult Danish population. *Annals of internal medicine*. 2004;140(5):330-7.
63. Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, Clark P, Lowe G, et al. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *British journal of haematology*. 2006;132(2):171-96.
64. Rai R, Backos M, Elgaddal S, Shlebak A, Regan L. Factor V Leiden and recurrent miscarriage—prospective outcome of untreated pregnancies. *Human reproduction*. 2002;17(2):442-5.
65. Hamedani AG, Cole JW, Mitchell BD, Kittner SJ. Meta-analysis of factor V Leiden and ischemic stroke in young adults: the importance of case ascertainment. *Stroke*. 2010;41(8):1599-603.
66. Pihusch R, Hiller E, Buchholz T, Rogenhofer N, Hasbargen U, Thaler CJ, et al. Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2001;46(2):124-31.
67. Mahjoub T, Mtiraoui N, Tamim H, Hizem S, Finan RR, Nsiri B, et al. Association between adverse pregnancy outcomes and maternal factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A genotypes in women with a history of recurrent idiopathic miscarriages. *American journal of hematology*. 2005;80(1):12-9.
68. Walker ID, Greaves M, Preston F. Investigation and management of heritable thrombophilia. *British journal of haematology*. 2001;114(3):512-28.
69. Sabadell J, Casellas M, Alijotas-Reig J, Arellano-Rodrigo E, Cabero L. Inherited antithrombin deficiency and pregnancy: maternal and fetal outcomes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2010;149(1):47-51.
70. Preston F, Rosendaal F, Walker I, Briet E, Berntorp E, Conard J, et al. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *The Lancet*. 1996;348(9032):913-6.
71. Foster DC, Yoshitake S, Davie EW. The nucleotide sequence of the gene for human protein C. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985;82(14):4673-7.
72. Clouse LH, Comp PC. The regulation of hemostasis: the protein C system. *New England Journal of Medicine*. 1986;314(20):1298-304.

73. Ploos vAJ, Van der Zanden A, Bakker E, Reitsma P, Bertina R. Two genes homologous with human protein S cDNA are located on chromosome 3. *Thrombosis and haemostasis*. 1987;58(4):982-7.
74. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette J-C, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis rheum*. 1999;42(7):1309-11.
75. Lockwood CJ. Inherited thrombophilias in pregnant patients: detection and treatment paradigm 1, 2. *Obstetrics & Gynecology*. 2002;99(2):333-41.
76. Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, Den Heijer M, Thomas CM, Eskes TK. Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. *Obstetrics & Gynecology*. 2000;95(4):519-24.
77. Ray JG, Kearon C, Yi Q, Sheridan P, Lonn E. Homocysteine-lowering therapy and risk for venous thromboembolism: a randomized trial. *Annals of internal medicine*. 2007;146(11):761-7.
78. Molen Evd, Verbruggen B, Novakova I, Eskes T, Monnens L, Blom H. Hyperhomocysteinemia and other thrombotic risk factors in women with placental vasculopathy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2000;107(6):785-91.
79. Pandey MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2005;272(2):95-108.
80. Varla-Leftherioti M, Spyropoulou-Vlachou M, Keramitsoglou T, Papadimitropoulos M, Tsekoura C, Graphou O, et al. Lack of the appropriate natural killer cell inhibitory receptors in women with spontaneous abortion. *Human immunology*. 2005;66(1):65-71.
81. van den Heuvel M, Peralta C, Hatta K, Han V, Clark D. Decline in number of elevated blood CD3 (+) CD56 (+) NKT cells in response to intravenous immunoglobulin treatment correlates with successful pregnancy (vol 58, pg 447, 2007). *American Journal of Reproductive Immunology*. 2007;58(6):547-.
82. Emmer PM, Steegers EA, Kerstens HM, Bulten J, Nelen WL, Boer K, et al. Altered phenotype of HLA-G expressing trophoblast and decidual natural killer cells in pathological pregnancies. *Human Reproduction*. 2002;17(4):1072-80.
83. Chaouat G, Menu E, Clark D, Dy M, Minkowski M, Wegmann T. Control of fetal survival in CBA \times DBA/2 mice by lymphokine therapy. *Journal of reproduction and fertility*. 1990;89(2):447-58.
84. Arruvito L, Sanz M, Banham AH, Fainboim L. Expansion of CD4⁺ CD25⁺ and FOXP3⁺ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *The Journal of Immunology*. 2007;178(4):2572-8.
85. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology*. 1995;146(1):3.

86. Nazıroğlu M, Yüksel M, Köse SA, Özkaya MO. Recent reports of Wi-Fi and mobile phone-induced radiation on oxidative stress and reproductive signaling pathways in females and males. *The Journal of membrane biology*. 2013;246(12):869-75.
87. Narula J, Kharbanda S, Khaw B-A. Apoptosis and the heart. *Chest*. 1997;112(5):1358-62.
88. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology*. 1992;119(3):493-501.
89. Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma V-M, Syrjänen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *European Journal of Cancer*. 1994;30(14):2068-73.
90. Searle J. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu*. 1982;17(2):229-59.
91. Wyllie A. What is apoptosis? *Histopathology*. 1986;10(9):995-8.
92. JJ C. Apoptosis. To be or not to be. *Postgraduate Syllabus (AAAA- I)* 1998;1:1:19.
93. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
94. Halliwell B. Free radicals and metal ions in health and disease. *Proceedings of the Nutrition Society*. 1987;46(1):13-26.
95. Knight JA. Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 2000;30(2):145-58.
96. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2007;18(9):567-79.
97. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(1):44-84.
98. Gutteridge J, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;899(1):136-47.
99. Vladimirov YA, Proskurnina E. Free radicals and cell chemiluminescence. *Biochemistry (Moscow)*. 2009;74(13):1545-66.
100. Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. 2005.
101. Kılınc K, Kılınc A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe. Medical Journal*. 2002;33:110-8.
102. Altan N DA, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006;31(2);(51):6.

103. Akkoç H. Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Dicle Tıp Dergisi*. 2008;35(3)(211):5.
104. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *Apmis*. 2007;115(2):81-103.
105. Eraç Y, Selli Ç, Tosun M. Kalsiyumun çok yönlü işlevselliğinde TRPC iyon kanallarının rolü. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*. 2009;28(2):161-83.
106. DeLorenzo RJ, Sun DA, Deshpande LS. Erratum to “Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy” [*Pharmacol. Ther.* 105 (3)(2005) 229–266]. *Pharmacology & therapeutics*. 2006;111(1):288-325.
107. Wojda U, Salinska E, Kuznicki J. Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB life*. 2008;60(9):575-90.
108. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*. 1985;260(6):3440-50.
109. Alberts B JA, Lewis J. *Molecular Biology of the Cell: Fourth Edition*. Garland Publishing Inc 2002;1:852-62.
110. Catterall W, Perez-Reyes E, Snutch T, Striessnig J. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels, international union of pharmacology. XLVIII. *Pharmacol Rev*. 2005;57:411-25.
111. McKay BE, Placzek AN, Dani JA. Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical pharmacology*. 2007;74(8):1120-33.
112. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 2003;426(6966):517.
113. Miller B. The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death. *The Journal of membrane biology*. 2006;209(1):31-41.
114. Mobasheri A, Barrett-Jolley R. *Transient receptor potential channels: emerging roles in health and disease*. WB Saunders; 2011.
115. Nazıroğlu M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochemical research*. 2007;32(11):1990-2001.
116. Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Science Signaling*. 2005;2005(272).
117. Nazıroğlu M, Özgül C, Çelik Ö, Çiğ B, Sözbir E. Aminoethoxydiphenyl borate and flufenamic acid inhibit Ca²⁺ influx through TRPM2 channels in rat dorsal root ganglion neurons activated by ADP-ribose and rotenone. *The Journal of membrane biology*. 2011;241(2):69-75.
118. Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H. TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacology & therapeutics*. 2008;118(3):337-51.

119. Özgül C, Nazıroğlu M. TRPM2 channel protective properties of N-acetylcysteine on cytosolic glutathione depletion dependent oxidative stress and Ca²⁺ influx in rat dorsal root ganglion. *Physiology & behavior*. 2012;106(2):122-8.
120. Nilius B, Owsianik G. Transient receptor potential channelopathies. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 2010;460(2):437-50.
121. Nilius B, Voets T, Peters J. TRP channels in disease. *Sci STKE*. 2005;2005(295).
122. Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G. TRP channels in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2007;1772(8):937-46.
123. Fonfria E, Murdock PR, Cusdin FS, Benham CD, Kelsell RE, McNulty S. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 2006;26(3):159-78.
124. Nazıroğlu M. TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: where are we now? *Neurochemical research*. 2011;36(3):355-66.
125. Nagamine K, Kudoh J, Minoshima S, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, et al. Molecular cloning of a novel putative Ca²⁺ channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics*. 1998;54(1):124-31.
126. Hecquet CM, Malik AB. Role of H₂O₂-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. *Thrombosis and haemostasis*. 2009;102(04):619-25.
127. Nishida M, Hara Y, Inoue R, Mori Y. TRP channels: formation of signal complex and regulation of cellular functions. *Nihon yakurigaku zasshi Folia pharmacologica Japonica*. 2003;121(4):223-32.
128. Nazıroğlu M, Lückhoff A. A calcium influx pathway regulated separately by oxidative stress and ADP-Ribose in TRPM2 channels: single channel events. *Neurochemical research*. 2008;33(7):1256-62.
129. Nazıroğlu M, Lückhoff A. Effects of antioxidants on calcium influx through TRPM2 channels in transfected cells activated by hydrogen peroxide. *Journal of the neurological sciences*. 2008;270(1):152-8.
130. Perraud A-L, Takanishi CL, Shen B, Kang S, Smith MK, Schmitz C, et al. Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(7):6138-48.
131. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, et al. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Molecular cell*. 2002;9(1):163-73.
132. Ishii M, Shimizu S, Hara Y, Hagiwara T, Miyazaki A, Mori Y, et al. Intracellular-produced hydroxyl radical mediates H₂O₂-induced Ca²⁺ influx and cell death in rat β -cell line RIN-5F. *Cell calcium*. 2006;39(6):487-94.

133. Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Molecular cell*. 2005;18(1):61-9.
134. Pantaler E, Lückhoff A. Inhibitors of TRP channels reveal stimulus-dependent differential activation of Ca²⁺ influx pathways in human neutrophil granulocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2009;380(6):497.
135. Yamamoto S, Wajima T, Hara Y, Nishida M, Mori Y. Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2007;1772(8):958-67.
136. Togashi K, Inada H, Tominaga M. Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *British journal of pharmacology*. 2008;153(6):1324-30.
137. Tóth B, Csanády L. Identification of direct and indirect effectors of the transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(39):30091-102.
138. Bari MR, Akbar S, Eweida M, Kühn FJ, Gustafsson AJ, Lückhoff A, et al. H₂O₂-induced Ca²⁺ influx and its inhibition by N-(p-aminocinnamoyl) anthranilic acid in the β -cells: involvement of TRPM2 channels. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(9b):3260-7.
139. Susankova K, Tousova K, Vyklicky L, Teisinger J, Vlachova V. Reducing and oxidizing agents sensitize heat-activated vanilloid receptor (TRPV1) current. *Molecular pharmacology*. 2006;70(1):383-94.
140. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389(6653):816.
141. Nazıroğlu M, Dikici DM, Dursun Ş. Role of oxidative stress and Ca²⁺ signaling on molecular pathways of neuropathic pain in diabetes: focus on TRP channels. *Neurochemical research*. 2012;37(10):2065-75.
142. Chuang H-h, Lin S. Oxidative challenges sensitize the capsaicin receptor by covalent cysteine modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(47):20097-102.
143. Nazıroğlu M, Özgül C. Vitamin E modulates oxidative stress and protein kinase C activator (PMA)-induced TRPM2 channel gate in dorsal root ganglion of rats. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2013;45(6):541-9.
144. Nazıroğlu M. Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca²⁺ signaling and TRP cation channel activation in nervous system. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 2012;32(3):134-41.
145. Nazıroğlu M, Cığ B, Özgül C. Neuroprotection induced by N-acetylcysteine against cytosolic glutathione depletion-induced Ca²⁺ influx in dorsal root ganglion neurons of mice: role of TRPV1 channels. *Neuroscience*. 2013;242:151-60.

146. Jordaan D-J, Schoon MG, Badenhorst PN. Thrombophilia screening in pregnancy. *Obstetrical & gynecological survey*. 2005;60(6):394-404.
147. Todorova M, Baleva M. Some recent insights into the prothrombogenic mechanisms of antiphospholipid antibodies. *Current medicinal chemistry*. 2007;14(7):811-26.
148. Girardi G. Guilty as charged: all available evidence implicates complement's role in fetal demise. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2008;59(3):183-92.
149. Shamonki JM, Salmon JE, Hyjek E, Baergen RN. Excessive complement activation is associated with placental injury in patients with antiphospholipid antibodies. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2007;196(2):167.e1-. e5.
150. Erden O, Imir A, Guvenal T, Muslehiddinoglu A, Arici S, Cetin M, et al. Investigation of the effects of heparin and low molecular weight heparin on E-cadherin and laminin expression in rat pregnancy by immunohistochemistry. *Human reproduction*. 2006;21(11):3014-8.
151. Salmon JE, Girardi G. Antiphospholipid antibodies and pregnancy loss: a disorder of inflammation. *Journal of reproductive immunology*. 2008;77(1):51-6.
152. Bejarano I, Terrón M, Paredes S, Barriga C, Rodríguez A, Pariente J. Hydrogen peroxide increases the phagocytic function of human neutrophils by calcium mobilisation. *Molecular and cellular biochemistry*. 2007;296(1-2):77-84.
153. Uğuz AC, Nazıroğlu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, et al. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and-9 activities. *Journal of Membrane Biology*. 2009;232(1-3):15.
154. Shahine L, Lathi R. Recurrent pregnancy loss: evaluation and treatment. *Obstetrics and Gynecology Clinics*. 2015;42(1):117-34.
155. Choi HK, Choi BC, Lee SH, Kim JW, Cha KY, Baek KH. Expression of angiogenesis-and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy loss patients. *Molecular reproduction and development*. 2003;66(1):24-31.
156. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Mor G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocrine reviews*. 2005;26(7):877-97.
157. Zhang Y, Zhong M, Liu F. Low molecular weight heparin inhibits cell apoptosis in the placenta of rats with preeclampsia-like symptoms. *Nan fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University*. 2012;32(6):862-6.
158. Luley L, Schumacher A, Mulla MJ, Franke D, Löttge M, Fill Malfertheiner S, et al. Low molecular weight heparin modulates maternal immune response in pregnant women and mice with thrombophilia. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2015;73(5):417-27.

159. Bolnick AD, Bolnick JM, Kohan-Ghadr H-R, Kilburn BA, Pasalodos OJ, Singhal PK, et al. Enhancement of trophoblast differentiation and survival by low molecular weight heparin requires heparin-binding EGF-like growth factor. *Human Reproduction*. 2017;32(6):1218-29.
160. Shaker RA, Abboud SH, Assad HC, Hadi N. Enoxaparin attenuates doxorubicin induced cardiotoxicity in rats via interfering with oxidative stress, inflammation and apoptosis. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 2018;19(1):3.
161. Yu T-G, Zhang Q-Z, Zhang Z-G, Wang W-W, Ji S-L, Du G-H. Protective effect of ultra low molecular weight heparin on glutamate-induced apoptosis in cortical cells. *Yonsei medical journal*. 2008;49(3):486-95.
162. Marseglia L, D'Angelo G, Manti S, Arrigo T, Barberi I, Reiter RJ, et al. Oxidative stress-mediated aging during the fetal and perinatal periods. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014;2014.
163. Yiyenoğlu ÖB, Uğur MG, Özcan HÇ, Can G, Öztürk E, Balat Ö, et al. Assessment of oxidative stress markers in recurrent pregnancy loss: a prospective study. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2014;289(6):1337-40.
164. Pecze L, Jósvay K, Blum W, Petrovics G, Vizler C, Oláh Z, et al. Activation of endogenous TRPV1 fails to induce overstimulation-based cytotoxicity in breast and prostate cancer cells but not in pain-sensing neurons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2016;1863(8):2054-64.
165. Nazıroğlu M. Activation of TRPM2 and TRPV1 channels in dorsal root ganglion by nadph oxidase and protein kinase c molecular pathways: a patch clamp study. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2017;61(3):425-35.
166. Hao L, Zhang Q, Yu T, Yu L, Cheng Y. Modulation of ultra-low-molecular-weight heparin on [Ca²⁺] i in nervous cells. *Brain research bulletin*. 2011;86(5-6):355-9.
167. Phillippe HM, Hornsby LB, Treadway S, Armstrong EM, Bellone JM. Inherited thrombophilia. *Journal of pharmacy practice*. 2014;27(3):227-33.
168. Stevens SM, Woller SC, Bauer KA, Kasthuri R, Cushman M, Streiff M, et al. Guidance for the evaluation and treatment of hereditary and acquired thrombophilia. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2016;41(1):154-64.
169. Vinatier D, Dufour P, Cosson M, Houpeau J. Antiphospholipid syndrome and recurrent miscarriages. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 2001;96(1):37-50.
170. Carp H, Salomon O, Seidman D, Dardik R, Rosenberg N, Inbal A. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Human Reproduction*. 2002;17(6):1633-7.
171. Garrisi JG, Colls P, Ferry KM, Zheng X, Garrisi MG, Munné S. Effect of infertility, maternal age, and number of previous miscarriages on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertility and sterility*. 2009;92(1):288-95.

172. Pabinger I. Thrombophilia and its impact on pregnancy. *Thrombosis research*. 2009;123:S16-S21.
173. Simcox LE, Ormesher L, Tower C, Greer IA. Thrombophilia and pregnancy complications. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(12):28418-28.
174. Dłuski D, Mierzyński R, Poniedziałek-Czajkowska E, Leszczyńska-Gorzela B. Adverse pregnancy outcomes and inherited thrombophilia. *Journal of perinatal medicine*. 2017.
175. Nahas R, Saliba W, Elias A, Elias M. The prevalence of thrombophilia in women with recurrent fetal loss and outcome of anticoagulation therapy for the prevention of miscarriages. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2018;24(1):122-8.
176. Coriu L, Ungureanu R, Talmaci R, Uscatescu V, Cirstoiu M, Coriu D, et al. Hereditary thrombophilia and thrombotic events in pregnancy: Single-center experience. *Journal of medicine and life*. 2014;7(4):567.
177. Sokol V, Ivanišević M, Herman M, Đelmiš J. The role of low molecular weight heparin in women with hereditary thrombophilia for good perinatal outcome. *Acta clinica Croatica*. 2016;55(2):309-15.
178. Karadağ C, Yoldemir T, Karadağ S, İnan C, Dolgun Z, Aslanova L. Obstetric outcomes of recurrent pregnancy loss patients diagnosed with inherited thrombophilia. *Irish Journal of Medical Science (1971-)*. 2017;186(3):707-13.
179. Shen M-C, Wu W-J, Cheng P-J, Ma G-C, Li W-C, Liou J-D, et al. Low-molecular-weight-heparin can benefit women with recurrent pregnancy loss and sole protein S deficiency: a historical control cohort study from Taiwan. *Thrombosis journal*. 2016;14(1):44.
180. Rodger MA, Carrier M, Le Gal G, Martinelli I, Perna A, Rey É, et al. Meta-analysis of low-molecular-weight heparin to prevent recurrent placenta-mediated pregnancy complications. *Blood*. 2014;123(6):822-8.
181. Rodger MA, Gris J-C, De Vries JI, Martinelli I, Rey É, Schleussner E, et al. Low-molecular-weight heparin and recurrent placenta-mediated pregnancy complications: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *The Lancet*. 2016;388(10060):2629-41.
182. Zhang T, Ye X, Zhu T, Xiao X, Liu Y, Wei X, et al. Antithrombotic treatment for recurrent miscarriage: Bayesian network meta-analysis and systematic review. *Medicine*. 2015;94(45).
183. Schleussner E, Kamin G, Seliger G, Rogenhofer N, Ebner S, Toth B, et al. Low-molecular-weight heparin for women with unexplained recurrent pregnancy loss: a multicenter trial with a minimization randomization scheme. *Annals of internal medicine*. 2015;162(9):601-9.
184. Siristatidis C, Dafopoulos K, Salamalekis G, Galazios G, Christoforidis N, Moustakarias T, et al. Administration of low-molecular-weight heparin in patients with two or more unsuccessful IVF/ICSI cycles: a multicenter cohort study. *Gynecological Endocrinology*. 2018:1-5.

185. Urman B, Ata B, Yakin K, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, et al. Luteal phase empirical low molecular weight heparin administration in patients with failed ICSI embryo transfer cycles: a randomized open-labeled pilot trial. *Human reproduction*. 2009;24(7):1640-7.
186. Khalafallah AA, Ibraheem A-RO, Teo QY, AlBarzan A-M, Parameswaran R, Hooper E, et al. Review of management and outcomes in women with thrombophilia risk during pregnancy at a single institution. *ISRN obstetrics and gynecology*. 2014;2014.
187. Baptista FS, Bortolotto MRdFL, Bianchini FRM, Krebs VLJ, Zugaib M, Francisco RPV. Can thrombophilia worsen maternal and perinatal outcomes in cases of severe preeclampsia? *Pregnancy Hypertension*. 2018.
188. Berks D, Duvekot JJ, Basalan H, De MP, Steegers EA, Visser W. Associations between phenotypes of preeclampsia and thrombophilia. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 2015;194:199-205.

