

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Spontan Abortuslarda Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması

Dr. Özgür KIRBIYIK

Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Haluk AKIN

Mart 2010

İzmir

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Spontan Abortuslarda Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması

Dr. Özgür KIRBIYIK

Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Haluk AKIN

Mart 2010

İzmir

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütölmüs olan

“Spontan Abortuslarda Vasköler Endotelyal Büyöme Faktörü Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması” başlıklı, Dr Özgür KIRBIYIK’a ait bu çalışma aşğıdaki jüri tarafından Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:19 /03/2010

Prof. Dr. Ferda ÖZKINAY

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Jüri Başkanı

Yrd. Doç. Dr. Haluk AKIN
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Üye

Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ONAY
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Üye

ÖNSÖZ

Uzmanlık tezimde, üreme çağındaki kadınların en önemli sorunlarından biri olan spontan abortuslarla Vasküler Endotelial Growth Faktör genine ait 2 polimorfizmin ilişkisini araştırdım.

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamda bilgilerini, tecrübelerini, maddi, manevi yardım ve hoşgörülerini esirgemeyen tez danışmanım, Yard. Doç. Dr. Haluk AKIN'a,

Sağladığı olanaklar ile uzmanlık eğitimimi başarıyla sürdürmemi sağlayan değerli hocam, Prof.Dr. Cihangir ÖZKINAY'a,

Eğitimim süresince sağladıkları her türlü katkıları için hocalarım; Prof. Dr. Ferda ÖZKINAY, Doç. Dr. Özgür Çoğulu, ve Yard. Doç. Dr. Hüseyin ONAY'a,

İstatistiksel analizler ve yorumlanması konusunda desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Cumhur GÜNDÜZ'e

Tez çalışmama verdiği desteğin yanısıra çocuğumun doğumunu gerçekleştiren Prof. Dr. Sermet Sağol'a

İhtisas sürem boyunca birlikte çalıştığım doktor arkadaşlarım Uzm. Dr. Tufan Çankaya, Uzm. Dr. Emin Karaca, Uzm. Dr. Asude Alpman Durmaz, Uzm. Dr. Burak Durmaz, Uzm. Dr. Filiz Hazan, Uzm. Dr. Erhan Pariltay, Dr. Ali Vahabi, Dr. Ayça Aykut, Dr. Mehmet Akgül, Dr. Esra Ataman, Dr. Esra Arslan, Dr. Taha Reşid Özdemir, Dr. Merve Saka'ya

Bu süre boyunca birlikte çalıştığım tüm biyolog, teknisyen, hemşire ve sekreter arkadaşlara,

Bu zorlu süreçte desteğini her zaman hissettiğim sevgili eşim Eylem'e ve en stresli anlarıma tanıklık etmekle kalmayıp bir gülücüğü ile herşeyi unutturan oğlum Umut Ekim'e

Beni her zaman destekleyen annem, babam ve kardeşlerime

TEŞEKKÜR EDERİM.

Dr. Özgür KIRBIYIK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLO İNDEKSİ	viii
ŞEKİL İNDEKSİ.....	xi
KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Abortus.....	2
2.1.1 Oluş zamanlarına göre abortuslar	2
2.1.1.1 Subklinik abortus:.....	2
2.1.1.2 Erken abortus:.....	2
2.1.1.3 Geç abortus:.....	2
2.1.2 Oluş şekillerine göre abortuslar	2
2.1.2.1 Spontan Abortus:	2
2.1.2.2 Provoke Abortus:.....	3
2.1.2.2.1 Medikal (Terapotik) Abortus:.....	3
2.1.2.2.2 İstemli Abortus:	3
2.1.3 Klinik seyrine göre abortuslar	3
2.1.3.1 Abortus imminens (Düşük tehdidi):	3
2.1.3.2 Abortus incipiens (Önlenemeyen düşük):.....	4
2.1.3.3 Missed abortuslar:.....	4
2.1.3.4 Habituel abortuslar:	4
2.1.3.5 Septik abortuslar:	4
2.2 Abortus Tanısı.....	4

2.3	Spontan Abortus	5
2.3.1	Spontan Abortuslarda Epidemiyoloji.....	6
2.3.2	Spontan Abortuslarda Etiyoloji	7
2.3.2.1	Fetal Faktörler:	7
2.3.2.1.1	Genetik Bozukluklar	7
2.3.2.1.1.1	Parental kromozom anomalileri	11
2.3.2.1.1.2	Submikroskopik kayıp ve kazançlar	12
2.3.2.1.1.3	Tek Gen Hastalıkları.....	13
2.3.2.1.1.4	.X inaktivasyonu	13
2.3.2.1.1.5	.HLA Genotipi	14
2.3.2.1.1.6	.Sınırlı Plasental Mozaizm	15
2.3.2.1.1.7	Diğer fetal sebepler	15
2.3.2.2	Maternal Faktörler:	15
2.3.2.2.1	Enfeksiyonlar:	15
2.3.2.2.2	Endokrin Anormallikler	16
2.3.2.2.3	İmmünolojik Faktörler:.....	17
2.3.2.2.3.1	Otoimmün Bozukluklar:	17
2.3.2.2.3.2	Alloimmün Bozukluklar	17
2.3.2.2.4	Anatomik nedenler	18
2.3.2.2.4.1	Konjenital Uterin Malformasyonlar.....	18
2.3.2.2.4.2	Leiomyomlar	18
2.3.2.2.4.3	Uterin Adezyonlar	19
2.3.2.2.4.4	Servikal yetmezlik.....	19
2.3.2.3	Çevresel Faktörler	19
2.3.2.4	Kalıtsal Trombofililer	19
2.3.2.4.1	Faktör V Leiden Mutasyonu	20

2.3.2.4.2	Protrombin G20210A Gen Mutasyonu	20
2.3.2.4.3	Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Gen Mutasyonu	20
2.3.2.4.4	Diğer Kalıtsal Trombofililer	21
2.4	Spontan Abortuslarda Genetik Yaklaşım	21
2.5	Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF).....	22
2.5.1	VEGF Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi.....	25
2.5.2	VEGF Ve Gebelik	26
2.5.2.1	Overde VEGF.....	27
2.5.2.2	Menstrüel Siklusta VEGF	28
2.5.2.3	Embriyo implantasyonunda VEGF	28
2.5.2.4	Embriyogenezde VEGF.....	28
2.5.2.5	Plasental Gelişimde VEGF.....	29
2.5.2.6	VEGF ve Gebelik Kaybı	30
2.5.2.7	VEGF -2578 C/A ve 936 C/T polimorfizmleri.....	32
2.5.2.7.1	VEGF -2578 C/A polimorfizmi	32
2.5.2.7.2	VEGF 936 C/T polimorfizmi	33
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	34
3.1	Örneklerin Seçimi.....	34
3.2	Örneklerin Toplanması.....	35
3.3	Kandan DNA İzolasyonu	35
3.3.1	Abortus materyalinden DNA İzolasyonu	37
3.4	DNA Amplifikasyonu	37
3.4.1	Gerekli Alet Ve Kimyasallar Listesi	37
3.4.2	Primerlerin Sulandırılması	38
3.4.3	Reaksiyon Karışımı	38
3.4.4	İzlenen PCR Programı.....	39

3.5	Agaroz jel elektroforezi.....	39
3.6	DNA'nın Enzimatik Kesim İşlemi.....	41
3.6.1	Gerekli Alet ve Kimyasallar Listesi.....	41
3.6.2	VEGF -2578 C>A Polimorfizmi İçin Enzim Kesimi.....	43
3.6.3	VEGF 936 C>T Polimorfizmi İçin Enzim Kesimi	43
3.7	İstatistiksel Analiz.....	43
4.	BULGULAR	44
5.	TARTIŞMA.....	72
6.	SONUÇLAR.....	80
7.	KAYNAKLAR	81
8.	ÖZET	96
9.	ABSTRACT.....	97

TABLO İNDEKSİ

Tablo 2.1: Sporadik ve tekrarlayan gebelik kayıplarında etiyoloji [33].	8
Tablo 2.2: Anormal karyotipli spontan abortuslarda kromozom bozukluklarının sıklığı [45].	11
Tablo 2.3: Spontan abortus ve canlı doğanlarda 10.000 gebelik için beklenen kromozom kuruluşları [45].	12
Tablo 2.4: Gebelik kaybına yol açabilecek tek gen hastalıkları ve ilişkili genler [33].	14
Tablo 2.5: Kalıtsal Trombofililer ve Venöz tromboemboli [99].	21
Tablo 2.5: -2578 C/A polimorfizminin genotip dağılımı ve allel frekansları[149]	32
Tablo 2.6: 936 C/T polimorfizminin genotip dağılımı ve allel frekansları [153].	33
Tablo.4.1: Abortus ve kontrol grubunda cinsiyet dağılımı.	44
Tablo 4.2: Abortus olgularının anne yaşı dağılımı	44
Tablo 4.3: Abortus olgularının annelerinin gebelik öyküsü dağılımı	45
Tablo 4.4: Abortus olgularının annelerinin abortus öyküsü ve dağılımı	45
Tablo 4.5: Gebeliğin oluş şekli	47
Tablo 4.6: Abortus ve kontrol grubunda akrabalık dağılımı	47
Tablo 4.7: Abortus grubunda düşük sayısı ile anne yaşının karşılaştırılması	48
Tablo 4.8: Abortus grubunda düşük sayısı ile anne yaşı arasındaki ilişki	49
Tablo 4.9: Abortus grubunda cinsiyetle tekrarlayan gebelik kaybı	49
Tablo 4.10: Abortus grubunda düşükle sonuçlanan gebeliğin kaçınıcı gebelik olduğu ile akrabalık durumu arasındaki ilişki	51
Tablo 4.11: Abortus grubunda akrabalık durumuna göre düşük sayısının karşılaştırılması	52
Tablo 4.12: -2578 C>A polimorfizminin genotip ve allel frekansının abortus ve kontrol grubunda karşılaştırılması.	53
Tablo 4.13: -2578 C/A polimorfizmi için risk alleli taşıyan ve taşımayanların abortus ve kontrol grubunda karşılaştırılması	54

Tablo 4.14: 936 C>T polimorfizminin genotip ve allel frekansının abortus ve kontrol grubunda karşılaştırılması.	55
Tablo 4.15: 936 C/T polimorfizmi için risk alleli taşıyan ve taşımayanların abortus ve kontrol grubunda karşılaştırılması	56
Tablo 4.16: Abortus ve kontrol grubunda VEGF geni -2578C/A ve 936C/T polimorfizmlerinin birleşik genotip analizi değerlendirmesi.	56
Tablo. 4.17: Abortus ve kontrol grubunda VEGF geni -2578C/A ve 936C/T polimorfizmlerinin birleşik allel analizi değerlendirmesi.	57
Tablo 4.18: VEGF geni -2578C/A polimorfizmi genotip dağılımının düşük sayısı ile karşılaştırılması.	58
Tablo4.19: VEGF geni 936C/T polimorfizmi genotip dağılımının düşük sayısı ile karşılaştırılması.	58
Tablo 4.20: -2578 C/A polimorfizmi allel dağılımının düşük sayısına göre değerlendirilmesi	59
Tablo 4.21: 936 C/T polimorfizmi allel dağılımının düşük sayısına göre değerlendirilmesi	59
Tablo 4.22: -2578 C/A polimorfizmi genotiplerinin düşük haftasına göre değerlendirilmesi	60
Tablo 4.23: 936 C/T polimorfizmi genotiplerinin düşük haftasına göre değerlendirilmesi	61
Tablo: 4.24: -2578 C/A polimorfizmi allel dağılımının abortus grubunda gebelik haftasına göre değerlendirilmesi	61
Tablo 4.25: 936 C/T polimorfizmi allel dağılımının abortus grubunda gebelik haftasına göre değerlendirilmesi	62
Tablo 4.26: -2578 C/A polimorfizmi genotiplerinin akrabalık durumuna göre değerlendirilmesi.	62
Tablo 4.27: 936 C/T polimorfizmi genotiplerinin akrabalık durumuna göre değerlendirilmesi.	63

Tablo 4.28: -2578 C/A polimorfizmi allel dağılımının abortus grubunda akrabalık durumuna göre değerlendirilmesi	63
Tablo 4.29: 936 C/T polimorfizmi allel dağılımının abortus grubunda akrabalık durumuna göre değerlendirilmesi	64
Tablo 4.30: -2578 C/A polimorfizmi genotiplerinin abortus grubunda yardımcı üreme teknikleri uygulaması arasındaki ilişki.....	64
Tablo 4.31: 936 C/T polimorfizmi genotiplerinin abortus grubunda yardımcı üreme teknikleri uygulaması arasındaki ilişki.....	65
Tablo 4.32: -2578 C/A polimorfizmi allel dağılımının abortus grubunda yardımcı üreme tekniği uygulanmasına göre değerlendirilmesi	65
Tablo 4.33: 936C/T polimorfizmi allel dağılımının abortus grubunda yardımcı üreme tekniği uygulanmasına göre değerlendirilmesi.....	66
Tablo 4.34: -2578 C/A polimorfizmi allel dağılımının anne yaşına göre değerlendirilmesi	66
Tablo 4.35: 936 C/T polimorfizmi allel dağılımının anne yaşına göre değerlendirilmesi	67
Tablo 4.36: -2578 C/A polimorfizmi için genotip dağılımının abortus grubunda düşük sayısı ve anne yaşı ile birlikte değerlendirilmesi.....	68
Tablo 4.37: 936 C/T polimorfizmi için genotip dağılımının abortus grubunda düşük sayısı ve anne yaşı ile birlikte değerlendirilmesi.....	69
Tablo 4.38: -2578 C/A polimorfizminin anne yaşı ve düşük sayısı ile birlikte değerlendirilmesi	70
Tablo 4.39: 936 C/T polimorfizminin anne yaşı ve düşük sayısı ile birlikte değerlendirilmesi	71

ŞEKİL İNDEKSİ

Şekil 2.1: Yaşa göre düşükler ve fertilitate potansiyeli (Harlap ve ark. 1989) [25].....	5
Şekil 2.2: VEGF geninin 6. kromozom üzerindeki lokalizasyonu.	24
Şekil 2.3: VEGF formları ve başlıca fonksiyonları [107].....	25
Şekil 2.4: Fetoplasental alanda eksprese olan vazodilatatör genler [107]	27
Şekil 2.5: VEGF genotipleri ile periferik kan mononükleer hücrelerde VEGF üretimi arasındaki ilişki [148].	32
Şekil 2.6: Serum VEGF seviyesi ile 936 C/T polimorfizmi arasındaki ilişki[152].	33
Şekil 3.1: 2007-2010 yılları arasında karyotip analizi yapılan tüm abortus materyallerinin dağılımı.	34
Şekil 3.2: Trizomi saptanan olguların dağılımı	35
Şekil 3.3: VEGF geni 936 C/T (rs3025039) ve 2578C/A (rs699947) PCR ürünü.....	41
Şekil 3.4: VEGF geni 2578C/A (rs699947) polimorfizminin Bgl II enzimi ile kesim...	42
Şekil. 3.5: VEGF geni 936 C/T (rs3025039) polimorfizmi HinI II enzimi ile kesim	42
Şekil 4.1: Abortusun meydana geldiği gebelik haftası	46
Şekil 4.2: Abortus grubunun ailesindeki düşük sayıları.....	46
Şekil 4.3: Abortus grubunda cinsiyet tekarlayan gebelik kaybı ilişkisi.....	49

KISALTMALAR

AAS: Antifosfolipid Antikor Sendromu

CGH: Comperative Genomik Hibridizasyon

F-VL: Faktör V Leiden

FGF: Fibroblast Growth Factor

FISH :Fluorescent In Situ Hybridisation

HRE: Hipoksi Response Element

IUFGG:İntrauterin Fetal Gelişme Gerilikleri

LH: Luteinizan Hormon

NK: Natural Killer

OHSS: Ovaryen Hiperstimülasyon Sendromu

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

PGT: Preimplantasyon Genetik Tanı

QF-PCR : Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction

SLE: Sistemik Lupus Eritematozis

TBE: Tris-Borate-EDTA

TGK: Tekrarlayan Gebelik Kaybı

TSH: Tiroid Stimülan Hormon

UTR: Untranslated Region

VEGF: Vasküler Endotelyal Growth Faktör

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımlamasına göre abortus, son adet kanamasının ilk gününden başlayarak 20. gebelik haftasından önce ya da fetal ağırlığın 500gr'ın altında olduğu durumlarda gebeliğin sonlanması olarak tanımlanır. Gebelik kayıpları sık karşılaşılan jinekolojik problemlerdir. Gebelik tanısı konulduktan sonra gebeliklerin yaklaşık %15'i abortus ile sonuçlanır [1]. Embriyoların bir kısmının biyokimyasal gebelik evresini geçip klinik gebelik aşamasına ulaşmadan kaybedilmesi nedeni ile spontan abortusların gerçek insidansını saptayabilmek neredeyse olanaksızdır. Tüm konsepsiyonların yaklaşık %70'inin canlılık kazanmadığı ve %50 kadarının ilk menstrüel kanama öncesi kaybedildiği tahmin edilmektedir [2]. Evrimsel süreçte doğal seleksiyonun gereği olarak spontan abortuslar, canlı doğarlarda kromozomal anomalilerin görülme sıklığını azaltarak insan neslinin korunmasında rol oynarlar [3].

Anjiogenik büyüme faktörleri, anjiogenezi indüklediğinden insan embriyosunun implantasyonu ve fetal gelişim için önemli bir role sahiptir [4]. Birçok anjiogenik faktör olmasına rağmen Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF) anahtar role sahiptir [5]. VEGF'nin embriyonel anjiogenez açısından ne denli önemli olduğu Carmeliet ve arkadaşları tarafından VEGF ve/veya VEGF reseptör geninde allel kaybı bulunan fare embriyolarında, anormal damar gelişimi ve abortus geliştiğinin tanımlandığı çalışma ile ortaya konmuştur [6].

Evans ve ark. yaptıkları çalışmada maternal serum VEGF konsantrasyonunun erken 1. trimester gebeliklerde arttığını göstermişlerdir [7]. Bu sonuç VEGF'nin embriyonun gelişim aşamalarındaki önemini ortaya koyması açısından önemlidir. Daha sonra implantasyon sırasında anjiogenezi indükleyen VEGF'nin, fetal-maternal arayüzde desidual natural killer (NK) hücrelerinde ve invaze olan blastokist ve trofoblast hücrelerinde üretildiği gösterilmiştir [8, 9].

Bu çalışmada embriyonel anjiogenezde önemli role sahip VEGF geninde sık görülen iki polimorfizmin abortus materyali ve kontrol grubunda karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Abortus

Dünya Sağlık Örgütü abortusu, son adet kanamasının ilk gününden başlayarak gebeliğin 20. haftasına kadar olan dönemde veya fetal ağırlık 500 gramdan daha düşük iken gebeliğin herhangi bir sebeple sonlanması olarak tanımlamıştır. Abortuslar oluş zamanları, oluş şekilleri ve klinik seyrine göre sınıflandırılabilirler.

2.1.1 Oluş zamanlarına göre abortuslar

2.1.1.1 Subklinik abortus:

Fekundasyonu takip eden günlerde, henüz gebelik tanısı konulmadan meydana gelen abortuslardır [10]. Sonuçta normal zamanında veya birkaç gün gecikme sonrası menstruasyon ile gebelik sonlanır.

2.1.1.2 Erken abortus:

Birinci trimesterde, yani 12. hafta sonuna kadar oluşan abortuslardır. Tespit edilebilen düşüklerin %80 kadarı bu dönemde meydana gelir ve en az %50'si kromozomal anomali sonucu ortaya çıkar [11].

2.1.1.3 Geç abortus:

13-20 haftalar arasında oluşan abortuslardır.

2.1.2 Oluş şekillerine göre abortuslar

2.1.2.1 Spontan Abortus:

Gebeliğin 20. haftadan önce herhangi bir müdahale olmaksızın sonlanmasıdır ve anne yaşı arttıkça görülme sıklığı artar. Bu oran 20-24 yaş grubundaki annelerde yaklaşık %8 iken 40 yaşından sonra ise %26'ya yükselir [12]. Spontan abortus

görülme sıklığı önceki obstetrik öykü ile de ilişkilidir. Önceki gebeliği başarılı olan ve anormal obstetrik öyküsü bulunmayan anne adaylarında abortus oranı %4-6 dolaylarındadır. Ancak önceki gebeliği spontan abortusla sonlanan anne adaylarında ise bu oran %19-24 olarak saptanmıştır. İki kez spontan abortus sonrası bu oran %24, üç kayıptan sonra %30, 4 ve daha fazla kayıp var ise %50'lere kadar çıkmaktadır [13-15].

2.1.2.2 Provoke Abortus:

2.1.2.2.1 Medikal (Terapotik) Abortus:

Fetal kromozom anomalisi, ciddi anormal USG bulguları, gebeliğin devamının hayati tehlike oluşturduğu ağır maternal hastalıklar, teratojen ilaç kullanımı, TORCH enfeksiyonu gibi sebeplerle gebeliğin sonlandırılmasıdır.

2.1.2.2.2 İstemli Abortus:

Anne veya fetus için herhangi bir medikal risk yok iken gebeliğin sonlandırılmasıdır. Ülkemizde 10. gebelik haftasına kadar gebeliğin ebeveynlerin isteği ile sonlandırılması 2827 sayılı “ Nüfus planlamasına dair kanun” ile yasal güvence altına alınmıştır. Yine aynı kanun ile medikal ve elektif abortus şartları belirlenmiştir [16]. Kişinin kendisi veya bir başkasının uygun olmayan şartlarda gebeliği sonlandırması kriminal abortus, bu işlem sırasında genital organlarda enfeksiyon oluşması sonucu düşüğün gerçekleşmesine septik abortus adı verilir [17].

2.1.3 Klinik seyrine göre abortuslar

Klinik seyrine göre abortuslar 5 grupta incelenir.

2.1.3.1 Abortus imminens (Düşük tehdidi):

20. gebelik haftasından önce vajinal kanama olması şeklinde tanımlanır. Gebelerin yaklaşık %25'inde ilk aylarda spot tarzında vajinal kanama görülebilir. Birinci trimester şiddetli vajinal kanamalarında düşük riski belirgin olarak artar [18].

2.1.3.2 Abortus incipiens (Önlenemeyen düşük):

Servikal dilatasyona ek olarak gros membran rüptürü ile kendini gösterir. Abortus hemen hemen kaçınılmazdır.

2.1.3.3 Missed abortuslar:

Spontan abortusların büyük kısmını oluştururlar. Düzensiz gebelik kesesi ve düzensiz embriyonun bir hafta arayla yapılan USG izleminde birkaç haftadır gelişmediğinin görülmesi olarak tanımlanır. İn-utero ölü fetus mevcuttur ve dışarı atılamamıştır. Etiyolojisinde kromozomal anomaliler, hormonal düzensizlikler, polikistik over sendromu, immünolojik bozukluklar ve uterus anomalileri suçlanmıştır [19].

2.1.3.4 Habituel abortuslar:

Klinik olarak fark edilmiş 3 veya daha fazla gebelik kaybı olmasıdır. Üreme çağındaki kadınların yaklaşık %1–2'sinde ortaya çıkar [20]. Etiyolojide %12–16 anatomik anomaliler, %17–20 endokrinolojik problemler, %0.5–5 enfeksiyonlar ve %20–50 immünolojik faktörler tekrarlayan gebelik kaybı (TGK) ile ilişkili bulunmuştur[21]. Vakaların yaklaşık yarısında etiyoloji aydınlatılamaz.

2.1.3.5 Septik abortuslar:

Genellikle güvensiz, uygun olmayan koşullarda kontamine bir cisimle düşük yaptırma girişimi sonucunda ortaya çıkan yaygın enfeksiyon tablosu ile karakterizedir [17].

2.2 Abortus Tanısı

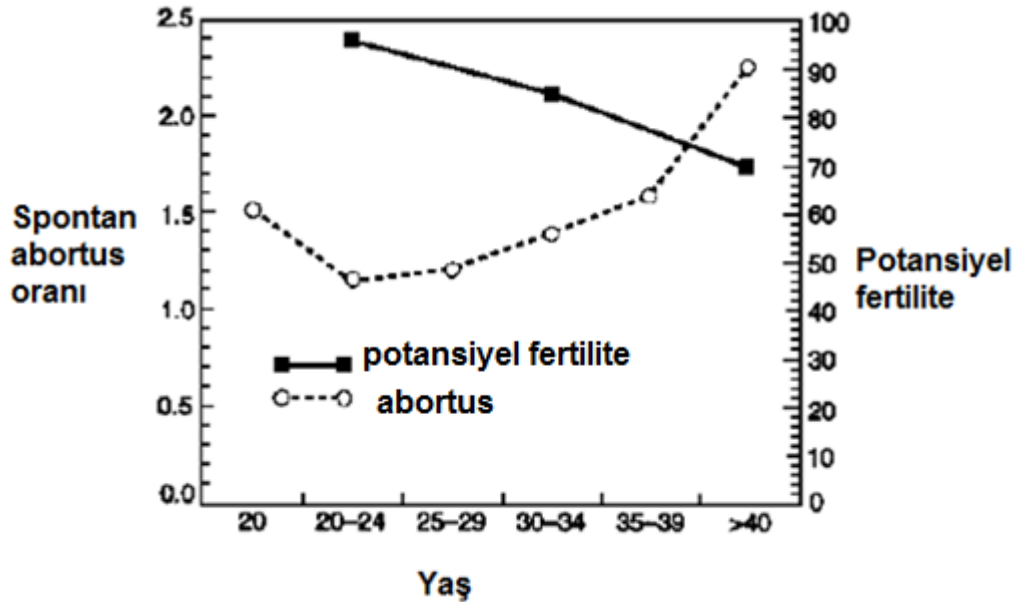
Son adet tarihi, adet düzeni, kanama olup olmaması, varsa miktarı, parça düşürme olup olmaması sorgulanmalıdır. Pelvik muayene ile kanamanın yeri, miktarı, servikal dilatasyonun kontrolü ve abort materyalinin kavite dışına atılıp atılmadığı anlaşılır. Tuşe muayenesiyle de servikal açıklık, uterus büyüklüğü, kıvamı ve hassasiyet varlığı araştırılır [21]. Ultrasonografi, basit ve ucuz bir tanı aracıdır ve erken gebelik kayıplarının tanısı ve ayırıcı tanısında oldukça değerlidir. Erken gebelikte yapılan USG fetal tehlikeyi veya gerçekleşmek üzere olan fetal kaybı

gösteren bulguları ortaya çıkarabilir. USG ile gebelik tanısı en erken 4 hafta 3 günlük iken ortaya çıkan gestasyonel sac'ın görüntülenmesi ile konabilir [22]. Gebelik tanısı için otörler kanda β hCG düzeyi ile birlikte değerlendirilmesini önermektedir [23]. Erken dönem yapılan USG ile fetal kayıp tahmin edilebilir. Daha önce tespit edilen kardiyak aktivitenin kaybı %100 fetal kayıp anlamına gelir. Fetal gelişme geriliği, amniyotik sıvıda azalma, kese çapı ile CRL (Crown-rump length) farkı, intra uterin ve subkoryonik hematoma da fetal kayıp ile ilgili bulgulardır [24].

2.3 Spontan Abortus

Spontan abortus, gebeliğin 20. gebelik haftasından önce herhangi bir müdahale olmaksızın sonlanmasıdır ve son yıllarda daha çok kadının ilk gebelik yaşı için 30 ve 40'lı yaşlarını tercih etmesi nedeniyle önemi gün geçtikçe artan bir kavramdır. Elbette maternal yaşın artışı ve stres, çevre kirliliği ve sigara kullanımı gibi diğer faktörlerin de etkisiyle düşük riski artmaktadır [25]. 30-35 yaşında fertilité potansiyeli azalırken spontan abortus riski artmaktadır (Şekil 1).

Şekil 2.1: Yaşa göre düşükler ve fertilité potansiyeli (Harlap ve ark. 1989) [25]



Spontan abortus oranının artması ve fertilité potansiyelinin azalması ve teknolojinin gelişmesi ile günümüzde spontan abortus tanısı ve klinik yönetiminde

kullanılan araçlarla ilişkili olarak araştırmalar, son yıllarda embriyo korunması ve implantasyon oranının artırılmasına odaklanmıştır [25].

Günümüzde bile spontan tekrarlayan düşükler için genellikle en az 3 kez düşük gerçekleşmesi şartı aranmaktadır [26]. Oysa anne olma yaşının ertelenmesi, fertilitte potansiyelinin azalması ve bu konudaki sosyal alışkanlıklar bu tanımın gözden geçirilmesi ihtiyacını doğurmuştur. Çünkü 3 kez düşük gerçekleşmesini beklemek, klinik araştırmalar ve olası tedavi seçeneklerinin başarıyla uygulanabilmesi için geç kalınmasına neden olabilecektir. Ayrıca, tek veya tekrarlayan düşükler arasında etiyopatogenezin farklı olduğuna dair ikna edici bir kanıt bulunmamaktadır [25].

2.3.1 Spontan Abortuslarda Epidemiyoloji

İnsanda üremenin verimliliği halen devam eden bir tartışma konusudur. Yeterli koitus sonrası konsepsiyon oranı siklus başına en fazla %66 kadardır. İnfertilite riski olmayan 200 çiftte yapılan bir çalışmada fertilitte oranı siklus başına ortalama %27,8 bulunmuştur. Bu gebeliklerin yaklaşık yarısı (%46) düşükle sonuçlanmıştır [27]. İnfertilite insidansı yaklaşık %10-15'tir [28]. Oluşan gebeliklerin yaklaşık %70'i tamamlanamadan düşükle sonuçlanır ve bu düşüklerin %50-60 kadarı gebeliğin ilk ayında meydana gelir [29]. Genel popülasyonla karşılaştırıldığında açıklanmamış sekonder infertiliteye sahip çiftlerde spontan abortus frekansı 3 kat daha yüksek saptanmıştır [30]. 40 yaşın üzerindeki annelerde de spontan abortus oranı 2-3 kat artmıştır ve ek olarak kromozomal anomali riski de artmıştır [31].

Tekrarlayan gebelik kaybı görölme sıklığı %0,5-1 arasındadır [32]. Spontan abortus riski, önceki gebelik kaybı sayısı ile ilişkili olarak artış gösterir. Buna göre ilk gebelikte risk %10 iken, tek düşük öyküsü olanda %24, 2 düşük olanda %26 ve 3 düşük görölenlerde %32'dir [29].

2.3.2 Spontan Abortuslarda Etiyoloji

2.3.2.1 Fetal Faktörler:

2.3.2.1.1 Genetik Bozukluklar

Sporadik gebelik kaybı üreme çağındaki kadınların belki de en yaygın problemidir. Son menstrüel periyoddan 5 haftaya kadar preembriyonik gebelik, 6-9 hafta embriyonik dönem ve 10 haftadan sonra fetal dönem olarak adlandırılır. 6 haftadan önceki kayıplar anembriyonik veya blighted ovum olarak adlandırılır. Gebelik kayıplarının büyük kısmı sporadiktir fakat bazı ailelerde tekrarlayan gebelik kaybı görülebilmektedir. TGG, 1'den fazla yaşayan çocuk yok iken 3 veya daha fazla gebelik kaybı olarak tanımlanır [33]. Sporadik ve tekrarlayan gebelik kayıplarının etiyolojisi tablo 1 de özetlenmiştir.

Amerikan Ulusal Kronik Hastalıkları Engelleme Merkezi'nin verilerine göre 2006 yılında abortusların %88,4'ü gebeliğin ilk 12 haftası içinde meydana gelmiştir. % 62,1 kadarı ilk 8 haftada, %17,1'i 9-10 haftalarda ve %9,3'ü ise 11 ve 12. haftalarda meydana gelmiştir. Bu oran bu haftalardan sonra hızla düşer [34]. Erken spontan abortusların yaklaşık yüzde 50 ile 60'ında fetusta bir kromozom anomalisi mevcuttur. Klinik olarak fark edilmiş gebeliklerin yaklaşık olarak %15-20 kadarının spontan abortus ile sonlandığını düşünecek olursak gebeliklerde %7.5-12 arası kromozom anomalisi görülme riski bulunmaktadır. Oysa yeni doğan taramalarında kromozom anomalisi %0,845 olarak tespit edilmiştir [35].

Tablo 2.1: Sporadik ve tekrarlayan gebelik kayıplarında etioloji [33].

Morfolojik anormallikler / yapısal doğum defektleri	
Genetik anormallikler	Kromozomal anormallikler Tek gen hastalıkları Parental dengeli translokasyon Trombofili X'e bağlı kalıtılan hastalıklar Sınırlı plasental mozaizm
Endokrin sebepler	Diabetes mellitus Tiroid bozuklukları Luteal faz defekti Polikistik over sendromu
Çevresel ajanlar	Alkol Sigara ve tütün ürünleri İlaçlar ve kimyasallar
İmmünolojik	Antifosfolipid antikor sendromu Maternal otoimmün faktörler
Uterin anatomik anormallikler	Konjenital uterin malformasyonlar Sineşiler Myomlar Servikal anormallikler
İnfeksiyonlar	Viral Bakteriyel Spiroketler Mikoplazma

En sık rastlanan kromozomal bozukluklar trizomilerdir (%60). Bunu monozomi X (%20) ve poliploidiler (%20) takip eder. Trizomiler gamatogenez esnasında genellikle 1. mayozda ayrılamama nedeniyle meydana gelir. Parental karyotip normal ise tekrar riski minimaldir. Trizomilerin yaklaşık %20-30'u trizomi 16'dır. Malformasyon saptanan embriyoların yaklaşık 2/3'ü ve fetusun yaklaşık 1/3'ünde kromozom anomalisi saptanır [36]. Anormal karyotipli spontan abortuslarda kromozom bozukluklarının sıklığı tablo 2.2'de gösterilmiştir. Genel spontan abortus hızı (%15) ve hem abortuslarda hem de canlı doğumlarda spesifik kromozom defektlerinin genel görülme sıklığı bilindiğinden belli bir karyotipteki tüm gebeliklerin spontan abortusla kaybedilen kısmını tahmin etmek mümkündür (tablo 3.3). Yapılan bir çalışmaya göre 750 spontan abortus vakasının %68'i 12. gebelik haftasından önce meydana gelir ve kromozom anomalisi insidansı %50,1 saptanmıştır. Bu çalışmada da en sık görülen kromozom anomalisi trizomilerdir (%62). Bunu triploidi (%12,4), monozomi X (%10,5), tetraploidi (%9,2) ve diğer yapısal kromozom anomalileri (%4,7) izler. Trizomiler arasında en sık görüleni trizomi 16 (%21,8), 22 (%17,9) ve 21 (%10) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca trizomi sıklığı anne yaşı artışı ile korelasyon gösterirken, poliploidi ve monozomi X görülme sıklığı ileri anne yaşında azalmıştır [37]. Abortuslarda birinci kromozom hariç tüm otozomal kromozomların trizomileri tanımlanmıştır. Trizomi 16, en sık görülmesine rağmen yaşarla bağdaşmaz ve hiç bir yenidoğanda görülmemiştir. Monozomi X, sık görülmesine rağmen Monozomi Y tanımlanmamıştır. Otozomal monozomiler ise son derece nadirdir ve yaşarla bağdaşmaz. Yapılan moleküler incelemelere göre trizomilerin yaklaşık %90'ında sebep maternal mayoz hatasıdır [38]. Paternal mayoz hatasının en sık görüldüğü kromozom kuruluşu XXY'dir (%50). Diğer trizomilerde paternal mayoz hatası %10'dan daha düşüktür. Bununla birlikte monozomi X vakalarında genellikle eksik kromozom paternal kökenli olandır [39]. Poliploidilerde yapılan moleküler çalışmalar olayın maternal mayoz kusuru sonucu olmadığını, sıklıkla dispermi veya polar cismin atılamaması olduğunu ortaya koymuştur [40].

Anne yaşının önceki gebelikte düşük öyküsünden daha yüksek risk teşkil ettiği belirtilmiştir [41]. Anne yaşı ilerledikçe trizomiler başta olmak üzere kromozom anomalisi riski artmaktadır. Önceki gebelikte trizomi saptanması genel olarak tekrar

riskini artırmakla birlikte özellikle 30 yaşın altındaki kadınlarda kendi yaş grubuna göre trizomi görülme sıklığı 8 kat artmış olarak saptanmıştır [42]. Yapılan bir araştırmada 40 kadından 21 tanesinde ilk gebelik kaybında kromozom anomalisi saptanmamış ve bu kadınların tamamında sonraki gebelik kaybında da herhangi bir kromozom anomalisi rapor edilmemiş. İlk gebelikte kromozom anomalisi saptanan 19 kadının ise 9 tanesinde (%47) sonraki gebelik kaybında da kromozom anomalisi rapor edilmiştir [43]. Tekrarlayan gebelik kaybında kromozom anomalisi daha az sıklıktadır ve yaklaşık 1/3 oranında gerçekleşir [33]. Tekrarlayan düşükleri olan çiftlerde yapılan araştırmalar sonucu ebeveynlerde %4-5 oranında dengeli kromozom anomalisi saptanmıştır [44]. Bu gibi hallerde kromozom anomalisinin kalıtılması söz konusu olur ve günümüzde preimplantasyon genetik tanı (PGT) sayesinde bu çiftler eskiye göre yüksek oranda sağlıklı çocuk sahibi olabilmektedir.

Abortus materyalinde yapılan karyotip analizi spontan abortusların en sık sebebi olan kromozom anomalilerini saptamak açısından oldukça değerlidir. Karyotip analizi sonucunda dengesiz translokasyon saptandığında ebeveynlerde dengeli kromozomal translokasyon olup olmadığı araştırılmalıdır. Karyotip normal saptanırsa spontan abortusa neden olabilecek diğer nedenler araştırılmalıdır. Bununla birlikte karyotipin normal saptanması genetik nedenleri tamamıyla dışlayamaz. Ayrıca karyotipin normal bir dişi (46, XX) saptanması halinde doku kültüründeki maternal hücrelerin kontaminasyonu akla getirilmelidir. Abortus materyallerinde hücre kültür başarısızlığı %50'ye kadar çıkabilmektedir ve bu da kromozom anomalisini beklediğimizden daha düşük bulmamıza neden olabilir. Kültür başarısızlığında moleküler bir yöntem olan CGH (Comperative Genomik Hibridizasyon) ile kromozomlarda kopya sayısı değişiklikleri gösterilebilir. Bu teknikte canlı hücreye gereksinim yoktur ve normal karyotip ile elde edilebilecek birçok bilgiye bu teknikle de ulaşılabilir [33].

Tablo 2.2: Anormal karyotipli spontan abortuslarda kromozom bozukluklarının sıklığı [45].

Tip	Anormal karyotiplerin yaklaşık oranı
Anöploidi	
Otozomal trizomi	0.52
Otozomal monozomi	<0.01
45, X	0.19
Triploidi	0.16
Tetraploidi	0.06
Diğer	0.07

2.3.2.1.1 Parental kromozom anomalileri

TGK'da %3-5 oranında dengeli kromozom yeniden düzenlenmesi görülebilir. Dengeli kromozom yeniden düzenlenmelerinin yaklaşık yarısı resiprokal ve %24 kadarı Robertsonian ve %12 si de cinsiyet kromozom mozaiklikleri saptanmıştır. Geriye kalanlar inversiyonlar ve diğer sporadik yeniden düzenlenmeler olarak saptanmıştır [46]. Fenotipik olarak normal olan bu bireylerde mayoz sırasında kromozomların ayrılması ile ilgili olarak kromozomal kopya sayısı anormallikleri ortaya çıkabilir. CGH tekniği ebeveynlerdeki bu gibi dengeli kromozomal translokasyonları tespit etmek için uygun bir teknik değildir. Bu yüzden tekrarlayan gebelik kaybı olan çiftlerde ebeveyn karyotiplerinin çalışılması gereklidir.

Ayrıca sperm anöploidileri de bu gibi TGK olan çiftlerde konseptusta problem yaratabilmektedir. Carrell ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada TGK meydana gelen çiftlerde paternal sperm 13, 18, 21 ve cinsiyet kromozom anöploidilerinin fertil kontrol grubuna göre daha yüksek oranda olduğunu tespit etmişler ve sperm anöploidilerinin konseptusa direkt etki edebileceğini ortaya koymuştur [47].

2.3.2.1.1.2 Submikroskopik kayıp ve kazançlar

Normal karyotip saptanan gebelik kayıplarının anlamlı bir grubunda sorun submikroskopik kayıp veya kazançlar olabilir. Array tabanlı CGH çalışmaları ile sitogenetik olarak normal saptanan fakat nörogelişimsel anormallikler, konjenital malformasyonlar ve dismorfik bulguların olduğu bir grup vakada kromozomal submikroskopik delesyonlar gösterilmiştir. Normal karyotipli bir grup sebebi açıklanamayan mental retardasyonlu olguda yaklaşık %7 oranında subtelomerik bölge delesyonları gösterilmiştir [48]. Ancak genetik materyaldeki küçük kayıp ya da kazançların klinik etkisini yorumlamak her zaman mümkün olmamaktadır. Bu kromozomal mikro kayıp ya da kazançlar bazen fenotipe etki etmeyen polimorfizmler de olabilmektedir. Yeni keşfedilen bir kayıp ya da kazancın değerlendirilmesi için ebeveynlerin kontrol edilmesi ve fenotipik olarak normal bireylerde görülen polimorfizm veritabanları ile karşılaştırılması gerekmektedir. Bugün için ebeveynlerde bulunmayan ve veritabanlarında tanımlanmamış mikrodelesyonların anlamlı olacağı kabul edilmektedir [33].

Tablo 2.3: Spontan abortus ve canlı doğarlarda 10.000 gebelik için beklenen kromozom kuruluşları [45].

Spontan Abortuslar				
Sonuç	Gebelik	Sayı	Yüzde	Canlı Doğum
Normal kromozomlar	9200	750	8	8450
Anormal kromozomlar	800	750	94	50
Triploid/tetraploid	170	170	100	-
45, X	140	139	99	1
Trizomi 16	112	112	100	-
Trizomi 18	20	19	95	1
Trizomi 21	45	35	78	10
Trizomi diğer	209	208	99.5	1
Seks kromozom trizomileri	19	4	21	15
Dengesiz yeniden düzenlenmeler	27	23	85	4
Dengeli yeniden düzenlenmeler	19	3	16	16
Diğer	39	37	95	2
Toplam	10000	1500	15	8500

2.3.2.1.1.3 Tek Gen Hastalıkları

Hemoglobinopatiler, metabolik hastalıklar ve trombofililer gibi bir grup tek gen hastalıklarının ölü doğum ile ilişkili olduğu bilinmektedir [49]. Bu hastalıkların bazıları özellikle 2. ve 3. trimesterdeki fetal ölüme katkıda bulunur. Ayrıca ebeveynler arasındaki akrabalık da otozomal resesif kalıtılan bir hastalık için birlikte taşıyıcı olma riskinin artmasından dolayı anlamlı olabilir. Örneğin alfa talasemi tek gen hastalığı grubundan bir hemoglobinopatidir ve gebelik kaybına neden olabilir. Ebeveynlerden her ikisi de bir allelde komplet gen delesyonu nedeniyle null allele sahipse fetusta 4 alfa globin geni de delesyonlu olacağından Hemoglobin Bart, hidrops fetalis ile özellikle 2. ve 3. trimesterde fetal kayba neden olabilir. Özellikle Güneydoğu Asyalılarda cis konfigürasyonlu null allel sahibi bireyler yüksek sıklıkta bulunmaktadır ve bu durumdan etkilenmiş gebeliklerle sık karşılaşılmaktadır. Bu durum bazı Akdeniz kökenlilerde de risk oluşturmaktadır. Bu yüzden güneydoğu Asyalı ve Akdeniz kökenlilerde fetal kayıp öyküsü varlığında hemoglobin elektroforezi ve gerekirse moleküler yöntemlerle mutasyonun tanımlanması ve ailelere prenatal tanı için genetik danışma verilmelidir [33]. Bazı aminoasit metabolizma hastalıkları, peroksizomal hastalıklar ve depo hastalıkları da gebelik kaybına neden olabilir [49]. Gebelik kaybına yol açabilecek tek gen hastalıkları tablo 4'de özetlenmiştir. Eğer tekrarlayan erkek fetus kaybı meydana gelirse erkeklerde fetal seyreden X'e bağlı genetik hastalıklar akla gelmelidir. Bu hastalıklar genellikle 3. trimester gebelik kayıplarına neden olur [33].

2.3.2.1.1.4. X inaktivasyonu

X inaktivasyonu normalde kadınların büyük bir kısmında her hücrede rastgele olarak meydana gelir ve böylece her iki X kromozomu da yaklaşık olarak eşit oranda aktive ve inaktivedir. Ancak bazı kadınlarda rastgele gerçekleşmesi gereken inaktivasyon orantısız olarak kromozomlardan biri lehine bozulur ve hemizigot mutasyonlar gebelik kaybına neden olabilir. Literatürde rastgele olmayan X inaktivasyonunun gebelik kaybı ile ilişkili olduğunu iddia eden yayınlar olmasına rağmen bazı yayınlarda da ilişkili olmadığı rapor edilmiştir [50, 51].

2.3.2.1.1.5.HLA Genotipi

HLA-G sitotrofoblastların yüzeyinde bulunan ve klasik olmayan bir klas 1 proteindir. Gebeliğin gelişmesi sırasında immun sistemden koruyucu bir etkiye sahiptir. HLA-G eksikliğinin ve bazı polimorfizmlerinin düşük sayısını arttırdığını gösteren yayınlar olmasına rağmen bu konu hakkında daha çok çalışmaya gereksinim vardır [52].

Tablo 2.4: Gebelik kaybına yol açabilecek tek gen hastalıkları ve ilişkili genler [33].

Genetik Bozukluk	Spesifik Genler
Hemoglobinopati	Alfa globin
Alfa Talasemi	
Enzim eksiklikleri	
Glutarik Asidüri Tip 2	ETFA, ETFB ve ETFDH
Smith Lemli Opitz	DHCR7
Peroksizomal Bozukluk	
Zellweger Sendromu	PEX (peroksin)
Depo Hastalıkları	
Gaucher Hastalığı	GBA (Glukoserebrosidaz)
Sialidozis	NEU1 (Nöramidaz)
Trombofililer	
Aktive Protein C Rezistansı (Faktör V Leiden)	Faktör V
Faktör II (PT G20210A)	Protrombin
Protein C ve S eksikliği	
Antitrombin III eksikliği	
X'e bağlı dominant Bozukluklar	
Rett Sendromu	MECP2, CDKL5
İncontinentia Pigmenti	NEMO
HLA-G	HLA
Servikal Yetmezlik	COL1A1, TGF-β

2.3.2.1.1.6.Sınırlı Plasental Mozaisizm

Sınırlı plasental mozaisizm mitotik veya mayotik ayrılma sırasında meydana gelen hatalar sonrası ortaya çıkabilir. Sınırlı plasental mozaisizm vakalarının %20 kadarında gebelik kaybı veya intrauterin gelişme geriliği olabilmektedir. 16. kromozomun parsiyel trizomisinin mozaik olduğu durumda yüksek oranda gebelik kaybı rapor edilmiştir. Plasentadaki anöploid hücre oranı ne kadar yüksekse, ilerleyen haftalardaki anöploid hücreler ne kadar persiste olursa ve uniparental dizomiye neden olur ise gebelik kaybı ihtimali o kadar artar [33].

2.3.2.1.1.7 Diğer fetal sebepler

Spontan abortuslarda diğer fetal faktörler, konjenital organ anomalileri, bazı enfeksiyonlar, radyasyon ve bazı kimyasallara maruziyet sonucu ortaya çıkan teratojenite, eritroblastosis fetalis, umbilikal kord anomalileri sonucu fetusa giden kan akımının bozulması, anormal plasental yerleşim ve çoğul gebelik sayılabilir [53].

2.3.2.2 Maternal Faktörler:

2.3.2.2.1 Enfeksiyonlar:

Spontan abortus etiolojisinde enfeksiyonların önemi tartışmalıdır. Düşüklerde spesifik enfeksiyöz ajanların risk faktörü olarak ileri sürüldüğü çalışmalar olmasına rağmen bakteriyel veya viral enfeksiyonların tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olduğu konusunda kesin kanıtlar yoktur. Transplasental enfeksiyonlar, variola, vaccinia, sitomegalovirüs, parvovirüs ve rubella gibi viral veya brusella, M. hominis ve U.urealyticum gibi bakteriyel ajanlarla oluşabilir. Klamidya ve toxoplazma da transplasental enfeksiyona neden olabilir [1]. Bu konuda çok sayıda yayın bulunmamakla birlikte daha önce yapılan bir çalışmada tekrarlayan gebelik kayıpları bulunan kadınlarda U.urealyticum kontrole göre daha yüksek sıklıkta bulunmuştur [54]. Daha yakın zamanda yapılan başka bir çalışma ise bu bulguyu desteklememektedir. PCR temelli bu çalışmada 54 abortus materyali çeşitli enfeksiyöz ajanlar açısından araştırılmış ve sadece 1 olguda klamidya DNA'sı ve 4 olguda HPV DNA'sına rastlanmıştır [55]. Bir başka kohort çalışmasında enfeksiyöz

ajanların etkisi klinik olarak araştırılmış ve spontan abortus ile anlamlı bir ilişki saptanmamıştır [56]. Yine klamidya ile gebelik kaybı arasındaki ilişkiyi araştıran serolojik çalışmalarda da anlamlı bir artış görülmemiştir [57, 58]. Enfeksiyöz ajanların, gebelik kaybına doğrudan fetusu ve plasentayı infekte ederek, villus enfeksiyonu ve doku hasarı meydana getirerek yol açtığı düşünülmektedir. Enfektif ajanlara karşı oluşan immun yanıt gebelik kaybı ile ilişkili olabileceği gibi, fetusun otoimmun olarak reddini önleyen mekanizma patojen mikro organizmanın engellenmeden çoğalmasına yol açıyor olabilir [21].

2.3.2.2.2 Endokrin Anormallikler

Gebelik kaybı riskine predispozisyon yaratan endokrin faktörler arasında tiroid fonksiyon bozuklukları, diabetes mellitus, polikistik over sendromu ve luteal faz defektleri sayılabilir. Tiroid fonksiyon bozukluğu olan kadınlarda klinik tabloya sıklıkla ovulatuvar disfonksiyon ve luteal faz defekti gibi üreme anormalliklerine yol açan bozukluklar eşlik eder [59]. Gebeliğin erken döneminde tiroid hormon ihtiyacı artmaktadır ve klinik olarak hipertiroidi görülebilir. Bu durumun düşük riski yaratmadığı gösterilmiştir [59]. Antitiroid antikör varlığının tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkili olduğuna dair yayınlar olmasına karşın bunun sorgulandığı yayınların da bulunması nedeniyle bu durum tartışmalıdır [60-62]. Bir çalışmada, tedavi edildikten sonra tiroid fonksiyon testleri normal saptanan hipotiroidi hastalarında gebelik kaybı insidansı çok düşük bulunmuş fakat tedavi edilmemiş subklinik hastalığı olan ve belirgin hipotiroidi saptanan ve yüksek tiroid stimulan hormonu (TSH) bulunanlarda belirgin olarak artmış risk bulunmuştur [60].

Gebe kalmadan önce kan şekeri regülasyonu iyi olan diyabetik kadınların gebelik kaybı yaşama ihtimali nondiyabetik kadınlardan fazla değildir. Fakat ilk trimesterde artmış kan glukoz ve glikolize hemoglobin seviyeleri olan diyabetik kadınlar, spontan düşüklükler için önemli ölçüde artmış risk altındadır [63]. İnsüline bağımlı diyabeti olan ve regülasyonu iyi olmayan kadınlarda spontan abortus riski ve major konjenital malformasyonların görülme sıklığı artmıştır [64].

Ovulasyon ile gebeliğin 7-9. haftalarına kadar geçen sürede gebeliğin devamı korpus luteumdan progesteron salınmasına bağlıdır. Progesteron üretiminde veya kullanımında meydana gelebilecek bir defekt gebeliğin onuncu haftasından önce

oluşan gebelik kayıplarına sebebiyet verebilir. Luteal faz yetmezliği özellikle endometriyumun implantasyona yeterince hazırlanamaması ve buna bağlı olarak implantasyonun başarısızlığı ile gebelik kayıplarına yol açar. Birçok çalışmada artmış Luteinizan Hormon (LH) seviyeleri ile tekrarlayan gebelik kayıpları arasında ilişki saptanmıştır. Bu ilişki LH'nin kendisinin yan etkilerine ya da Polikistik over sendromlu kadınlarda LH'nin indüklediği hiperandrojenizme bağlı olabilir [65-68].

2.3.2.2.3 İmmünolojik Faktörler:

Otoimmün ve alloimmün olmak üzere ikiye ayrılır.

2.3.2.2.3.1 Otoimmün Bozukluklar:

Kişinin kendi dokularına karşı oluşan immün yanıtıdır. Sistemik lupus eritamatozus (SLE) ve Antifosfolipit antikor sendromu (AAS) gebelik kayıplarıyla ilişkili olan otoimmün hastalıklardır. SLE'de görülen gebelik kayıpları antifosfolipit antikorlarla ilişkili bulunmuştur [69]. AAS tekrarlayan venöz ve arteriyel tromboemboli ve yine tekrarlayan gebelik kayıpları ile karakterize, otoimmün bir hastalıktır[70]. Klinik ve laboratuvar tanı kriterleri mevcuttur. Tanı için klinik ve laboratuvar tanı kriterlerinden en az birer tanesinin bulunması gerekir. Klinik olarak arteriyel, venöz veya küçük damar trombozu ve/veya 10 haftadan küçük en az 3, 10 haftadan büyük en az 1 veya plasental yetmezlik, eklampsi, preeklampsi nedenleriyle 34 haftadan erken en az 1 gebelik kaybından herhangi birine ek olarak lupus antikoagülanı, antikardiyolipin antikor (IgG veya IgM) ve anti β 2 glikoprotein-1 antikorlarından (IgG veya IgM) en az birinin tespiti tanı için yeterlidir [70]. Laboratuvar bulgularının 6 hafta arayla 2 kez gösterilmesi gerekir [71].

2.3.2.2.3.2 Alloimmün Bozukluklar

Maternal yanıtın fetal ya da plasental antijenlere karşı oluşmasıdır. Anne ve babanın paylaştığı HLA antijenlerinin fetal allografta karşı oluşan maternal immün yanıtı bozarak gebelik kayıplarına yol açtığı düşünülmektedir [72]. Bu teorinin sonucu olarak tekrarlayan gebelik kaybı görülen kadınların partnerlerinin lenfositleri ile immünize edilmeleri tedavi olarak denenmiş ancak etkinliği ile ilgili farklı sonuçlar alınmıştır [73, 74].

2.3.2.2.4 Anatomik nedenler

Konjenital uterin malformasyonlar, leiomyomlar, uterin adezyonlar ve servikal yetmezlik gebelik kaybına yol açabilecek anatomik sebeplerdir.

2.3.2.2.4.1 Konjenital Uterin Malformasyonlar

Spontan abortuslarda konjenital uterin malformasyon sıklığı %2 ve tekrarlayan gebelik kaybı olgularında bu oran %6-7'lere kadar artmış olarak rapor edilmiştir [75]. Konjenital uterin malformasyonlar, 1988 yılında American Fertility Society (AFS) tarafından 1988 yılında sınıflandırılmıştır [76]. Buna göre;

- Klas I: Uterin agenezi ve/veya hipoplazi: Vajinal, servikal, fundal, tubal veya kombine olabilir.
- Klas II: Unicorn Uterus: Kommünikan, nonkommünikan, kavite olmayan ve boynuz olmayan şeklinde olabilir.
- Klas III: Uterin Didelfis: Müller kanallarının tam birleşmemesidir. İki serviks ve 2 uterus bulunur.
- Klas IV: Bicornuat Uterus: Komplet veya parsiyel olabilir.
- Klas V: Septat Uterus: Komplet veya parsiyel olabilir.
- Klas VI: Arcuat Uterus: Yay şeklinde eğri uterus.
- Klas VII: DES (diethylstilbestrol) ile ilişkili malformasyon: Intrauterin dönemde DES'e maruz kalan kadınlarda en sık görülen malformasyon hipoplazidir.

En sık görülen (%80-90) ve gebelik kaybına en çok yol açan (44,3) malformasyon septat uterustur [77].

2.3.2.2.4.2 Leiomyomlar

Myomların lokalizasyonu, büyüklüğüne göre daha önemlidir ve en sık abortusa neden olan submüköz myomlardır [78]. Subseröz ve intramural myomlar 5-7 cm'den küçükse abortusa yol açmamaktadır. Komplikasyon gelişmezse cerrahi müdahale endike değildir [79].

2.3.2.2.4.3 Uterin Adezyonlar

Uterin adezyon gelişmesi için endometriumun zedelenmesi gerekir ve en sık sebep (%90) küretaj sonrası meydana gelen endometriyal hasardır. Uterus hacminin azalması, plasental yetmezliğe yol açabilecek endometriyal fibrozis ve inflamasyon nedeniyle abortuslara sebep olurlar [80].

2.3.2.2.4.4 Servikal yetmezlik

Servikal yetmezlik, 2. trimesterde tekrarlayan ve ağrısız servikal dilatasyonu takiben oluşmuş geç 2.trimester yada erken 3. trimester gebelik kayıpları olarak tarif edilebilir Tanıda en önemlisi tekrarlayan 2. trimester gebelik kayıp öyküsüdür. Gold standart görüntüleme yöntemi transvajinal USG'dir. Ayrıca luteal fazda 8 nolu Hegar bujisinin direnç olmaksızın servikal kanaldan geçmesi ile de tanı konulabilir. Tedavi için transvajinal veya abdominal yolla serklaj uygulanmalıdır [81].

2.3.2.3 Çevresel Faktörler

Sigara, alkol, aşırı kahve tüketimi, deterjanlar, ağır metaller, içme suyu katkı maddeleri, elektromanyetik radyasyon, X ışını maruziyeti gibi birçok çevresel faktörün gebelik kayıplarına neden olabilirler. Sigara kullanan kadınlarda düşük riskinin 1,2 ile 2 kat arasında arttığı gösterilmiştir [82, 83]. Gebeliğin ilk 8 haftasında alkol kullanımı, spontan abortus ve fetal anomali riski yaratabilir [84]. Alkol kullanım sıklığı arttıkça spontan abortus riski de 2-3 kat artar [85]. Gebelik kaybı ile ilişkisi kesinleşmiş çevresel faktörler kurşun, civa gibi ağır metaller, organik çözücüler ve iyonize radyasyondur [86].

2.3.2.4 Kalıtsal Trombofililer

Kalıtsal trombofili nedeniyle gebelerde plasental vasküler zedelenme, infarktüs ve fibrinoid nekroz nedeniyle ablatio plasenta, yineleyen gebelik kayıpları, intrauterin fetal ölümler, intrauterin fetal gelişme gerilikleri (IUFGG) ve preeklampsi görülmektedir [87]. Kupferminc ve ark. bir çalışmada kalıtsal trombofili sıklığını preeklampside %64.7, gebelik kaybında %50, IUFGG'de %61.4 ve ablatio plasentada %70 bildirmişlerdir [88]. Gebelikte kalıtsal olarak ortaya çıkan en sık

kalıtsal trombofili nedenleri Faktör-VLeiden (F-VL) protrombin G20210A ve metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) gen mutasyonlarıdır [87].

2.3.2.4.1 Faktör V Leiden Mutasyonu

Kalıtsal trombofililerin en sık görülenidir. Faktör-V'i kodlayan genin 1691.nükleotidinde guaninle adeninin yer değiştirmesi sonrasında faktör-V' in yapısındaki 506.pozisyonundaki arginin yerine glutamin geçmektedir. Protein C normalde trombin-trombomodülin kompleksi ve protein S ile aktive olur ve faktör V ve faktör VIII'i inaktive eder. Mutasyon varlığında bu inaktivasyon 10 kat azalarak, tromboz riskinin arttığı gözlenir [89]. F-VL mutasyonu olan hastalarda tromboz relatif riski homozigotlarda 80 kat, heterozigotlarda 7-10 kat, oral kontraseptif kullananlarda 35-50 kat, heterozigot gebelerde 4-16 kat, hormon replasman tedavisi alanlarda 13-16 kat artmıştır [90, 91].

2.3.2.4.2 Protrombin G20210A Gen Mutasyonu

İkinci en sık kalıtsal trombofilidir. Protrombin geni 3' ucunda 20210. pozisyonda Guanin yerine Adenin nükleotidi gelmesi ile oluşur [92]. Protrombin G20210A gen mutasyonu olanlarda tromboz için relatif risk 2-6 kat artmıştır. Eğer oral kontraseptif kullanımı mevcut ise risk 16 kat, gebelikte ise 10-15 kat artmaktadır [93, 94].

2.3.2.4.3 Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Gen Mutasyonu

Metilentetrahidrofolat redüktaz, homosisteinin remetilasyonu ve metionine dönüşümünü sağlar. Bu genin 677. pozisyonunda sitozin yerine timin (C677T) nükleotidinin geçmesi ile oluşur. Bu mutasyon sonucunda hiperhomosisteinemi ortaya çıkabilir [95]. Hiperhomosisteinemi, endotelial zedelenme, intima kalınlaşması, düz kas hipertrofisi, düşük dansiteli lipoprotein oksidasyonu, lipoprotein (a) artışı ve DNA hipometilasyonuna yol açması gibi sebeplerle trombofiliye neden olabilir [96]. Hiperhomosisteinemi ablasyo plasentada %26, intrauterin fetal ölümden %11, in utero fetal gelişme geriliğinde %38, yineleyen gebelik kayıplarında %18 oranlarında saptanmasına karşın yapılan araştırmalarda MTHFR gen mutasyonunun

tek başına risk faktörü olmadığı belirtilmiştir. Ancak bu mutasyona Vitamin B12 veya Folik asit eksikliğinin eşlik etmesi halinde riskin arttığı gösterilmiştir [97, 98].

2.3.2.4.4 Diğer Kalıtsal Trombofililer

Ayrıca antitrombin eksikliği, Protein C ve S eksiklikleri de diğer kalıtsal trombofililerden olup ve tromboz ile ilişkileri tablo 2.5’de özetlenmiştir.

Tablo 2.5: Kalıtsal Trombofililer ve Venöz tromboemboli [99].

Trombofil Faktörleri	Prevalans	Venöz Tromboemboli Riski
Faktör V Leiden	% 2-15	Homozigot: 34,40 kat
		Heterozigot: 8,32 kat
Prothrombin G20210A	% 4-9	Homozigot: 26,36 kat
		Heterozigot: 6,80 kat
MTHFR C677T Homozigotluğu	% 11	0.74
Protein C	% 0,2-0,3	4.76
Protein S	% 0,1-2,1	2.19
Antitrombin Eksikliği	% 0,02	4.76

2.4 Spontan Abortuslarda Genetik Yaklaşım

Öncelikle iyi bir anamnez alınmalı ve risk faktörlerini ortaya koymak için aile ağacı çizilerek pedigrî analizi yapılmalıdır. Genetik danışmanlıkta çiftlerin birlikte değerlendirilmesi gereklidir. Aile ağacında başka bir risk faktörü saptanmamışsa kromozomal anormalliklerin spontan abortusun en sık sebebi olması nedeniyle fetal dokudan karyotip analizi yapılması önerilir. Karyotip analizi sonucunda spontan

abortusların yaklaşık yarısına tanı konulmaktadır. Burada akılda tutulması gereken şeylerden biri fetal karyotipleme sırasında hücrelerin viabilitesinin düşük olabileceği ve kültür başarısızlığı ihtimalidir. Farklı serilerde değişik oranlar bildirilmekle birlikte bu oran fetal ölüm ile materyalin alındığı zaman arasındaki süreye, laboratuvara taşınma koşullarına bağlı olarak ortalama %10- 40 arasında değişir [100]. Kültür başarısızlığı olasılığına karşı Rapid FISH (Fluorescent In Situ Hybridisation), çeşitli İnterfaz FISH teknikleri ve QF-PCR (Quantitative fluorescent polymerase chain reaction) uygulamaları ile anöploidi taramaları gerçekleştirilebilir. Bu dönemde ortaya çıkabilecek bir diğer sorun da maternal hücre kontaminasyonudur. FISH tekniği maternal hücre kontaminasyonu açısından kısıtlılıkları olan bir teknik olmasına rağmen QF-PCR analizi gibi mikrosatellit belirteçlerle fetal ve maternal DNA karşılaştırılarak örneğin fetal olup olmadığı anlaşılabilir.

Fetal karyotipin normal olarak saptandığı olgularda mikrodelesyon sendromları, kalıtsal trombofililer ve fetal ölüme yol açabilecek tek gen hastalıkları açısından dikkatli olmak gerekmektedir. Kalıtsal trombofililer ve tek gen hastalıkları için dizi analizi, strip testler, real time PCR gibi çeşitli moleküler yöntemler ile tanısal yaklaşım getirilebilir. Yapılabiliyorsa fetal otopsi ve plasentanın değerlendirilmesi ile tek gen hastalıkları, mikrodelesyon sendromları gibi sebepler için kanıtlar elde edilebilir [33].

Teknolojinin gelişmesi ile uygulamaya giren ve tüm genomun değerlendirilmesine olanak sağlayan yüksek rezolüsyonlu tekniklerle kopya sayısı tekrarları, kriptik delesyon ve duplikasyonlar araştırılabilir [33]. Ancak ülkemiz için bu yöntemler henüz oldukça pahalı ve ulaşılması kolay olmayan uygulamalardır. Ayrıca bu çalışmalardan elde edilen sonuçların yorumlanması da oldukça zordur. Elde edilen bulguların değerlendirilebilmesi için gerekli veritabanlarının oluşturulabilmesi için henüz zamana ihtiyaç vardır. Ayrıca fetal örneklerden elde edilen bilgilerin ebeveynlerde de araştırılması gerekmektedir.

Tüm bu çalışmalara rağmen etyopatogenezin aydınlatılamadığı durumlar genetik danışmanlığı en zor konulardan biridir.

2.5 Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF)

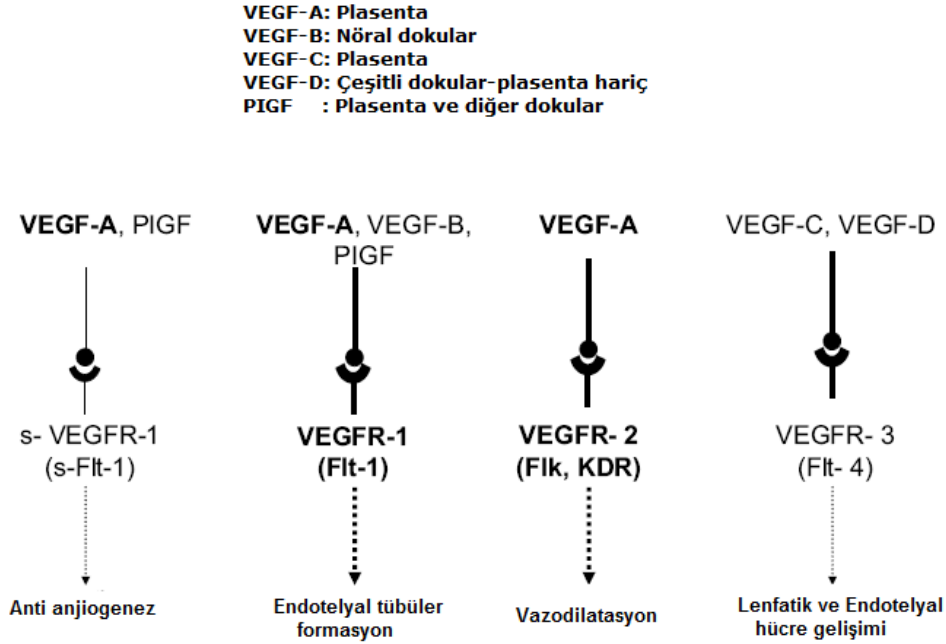
Fibroblast growth factor (FGF) ve platelet-derived growth factor (PDGF) gibi büyüme faktörleri birçok farklı hücre tipi üzerine etkili mitojenler olmalarına karşın VEGF sadece endotelial hücreler üzerinde mitojen aktiviteye sahiptir. VEGF geni, 6. kromozomun kısa kolunda (6p12) lokalize 8 ekzonlu bir gendir [101]. VEGF, homodimerik bir glikoprotein yapıda olup moleküler ağırlığı 45000 daltondur. Belki de insan tümör anjiogenezinin major regülatörüdür. 1994 yılında fare deneyleri sonucunda VEGF ekspresyonunun hipoksi ile arttığı gösterilmiştir [102].

Şekil 2.2: VEGF geninin 6. kromozom üzerindeki lokalizasyonu.



VEGF ailesi, VEGF-A,-B,-C,-D,-E ve plasenta büyüme faktöründen oluşur. VEGF, insanlarda, 121, 145, 165, 189 ve 206 aminoasitli, glikozile homodimerik glikoprotein olarak en az 8 farklı splicing varyantı bulunur [103]. VEGF'nin endotelial hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının uyarılması yanısıra , vasküler geçirgenliği artırmak, endotel üzerine etki ederek vazodilatasyonu yürütmek gibi görevleri bulunmaktadır (Şekil). Bu özellikleri sayesinde fizyolojik ve patolojik anjiogenezin major regülatörüdür [104]. VEGF'nin FLT1 ve KDR/FLK1 adı verilen 2 adet endotelial reseptörü mevcuttur (VEGFR-1 ve VEGFR-2). Bu reseptörler yüksek affiniteli transmembran tirozin kinaz reseptörleridir [105]. VEGF yapımı, TGF-beta, PDGF, GF1 gibi birçok büyüme faktörü ve sitokinler ile düzenlenir [103, 104]. Ayrıca VEGF, Nitrik Oksit Sentetaz 3 (NOS3)'ün endotelial hücrelerindeki ekspresyonunu ve Nitrik Oksit (NO)'nun yapımını artırır [106].

Şekil 2.3: VEGF formları ve başlıca fonksiyonları [107]



2.5.1 VEGF Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi

VEGF, vasküler hücre endoteline spesifik mitojen etki gösteren ve endotel hücre farklılaşması ve mevcut damarlardan yeni kapillerlerin gelişmesi için gerekli bir büyüme faktörüdür. Anjiyogenik aktivite gösteren çeşitli büyüme faktörleri olsa da VEGF anjiyogenezin ana düzenleyicisidir.

İn situ hibridizasyon yöntemi ile yapılan çalışmalarda VEGF mRNA'sının tümörlerin nekrotik bölgelerine komşu alanlarda arttığı gösterilmiştir. Hipoksi; VEGF geninin ekspresyonunda hem in vivo hem de in vitro ortamda ana düzenleyici rol oynar ve VEGF gen transkripsiyonunu indükler. VEGF geninde promotor bölgede 28 baz çiftlik hipoksi yanıt elementi (HRE) bölgesi bulunmaktadır ve bu bölgenin silindiği transgenik farelerde Amyotropik Lateral Skleroz (ALS) benzeri klinik tablo rapor edilmiştir [108]. Hipoksik koşullarda endotel hücresinde, hipoksi ile indüklenebilen faktör-1 (HIF-1alfa/beta), VEGF geninin 3' kısmındaki enhancer bölgesine bağlanır ve promotor bölgedeki HRE, VEGF transkripsiyonunu aktive eder. Bununla birlikte

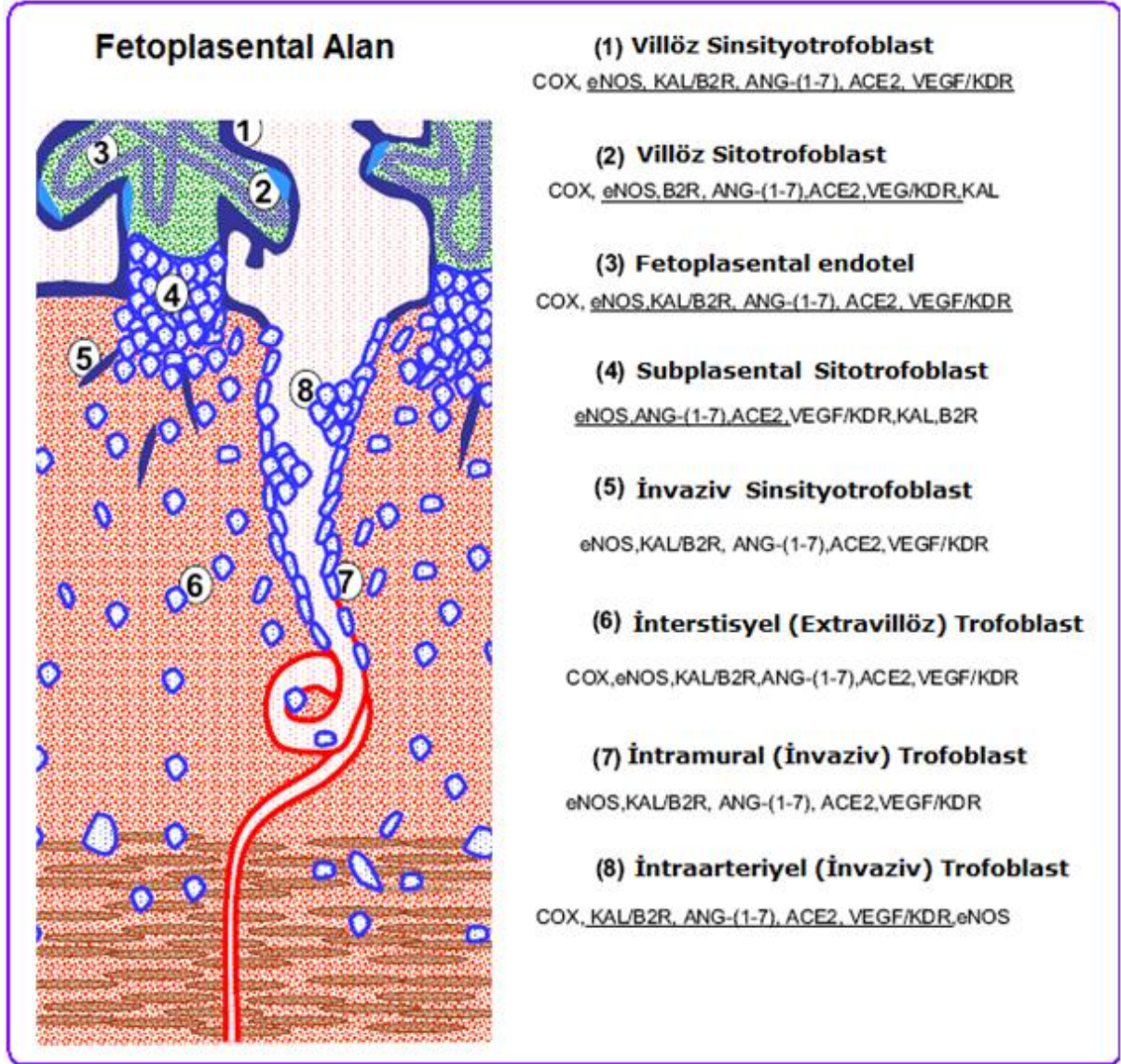
hipoksik koşullarda VEGF'nin dñzenlenmesinde transkripsiyon aktivasyonuna ek olarak mRNA'da stabilite artışı meydana gelir.

Hipoksi haricinde VEGF ekspresyonunda etkili birçok molekñl tanımlanmıştır. IL-1 gibi inflamatuvar sitokinler, IGF, TSH ve ACTH gibi birçok hormon ve epidermal büyüme faktörü, TGF-beta veya keratinosit büyüme faktörü gibi büyüme faktörleri de VEGF mRNA ekspresyonunu dñzenleyici olabilir [109, 110].

2.5.2 VEGF Ve Gebelik

Neovaskñlarizasyon dişi reproduktif sistemindeki tüm organların normal fonksiyonlarını gösterebilmesi için gereklidir. Birçok araştırmacı VEGF'nin uterus ve overde eksprese olarak ovulasyon, embriyo implantasyonu ve plasental gelişim için gerekli olduğunu göstermiştir. Ek olarak ovaryan hiperstimñlasyon sendromu, preeklampsi ve endometriozis ile de ilişkilendirilmiştir [111]. Fetoplasental neovaskñlarizasyon için vaskñler permeabilite artışına ihtiyaç vardır. VEGF, bu süreçte KDR/FLK1(VEGFR-2) reseptörü ile Nitrik Oksit aracılı vazodilatatör ajan olarak rol oynar. Şekil 2.4'de fetoplasental alan ve bu alanda eksprese olan vazodilatatör genler gösterilmiştir. Şekilde mavi ve yeşil renkli alanlar fetal dokuları, kırmızı ve kahverengi alanlar maternal dokuları sembolize etmektedir [107].

Şekil 2.4: Fetoplasental alanda eksprese olan vazodilatör genler [107]



2.5.2.1 Overde VEGF

VEGF'nin overde eksprese olduğu ve gelişim, seçilim, maturasyon, ovulasyon korpus luteumun korunmasında görev aldığı 2000'li yılların başında ortaya konmuştur [112, 113]. Overde anjiyogenez, erken folikül gelişimi sırasında teka hücre diferansiyasyonundan önce başlar ve tüm folikülogenez ve ovulasyon süresince devam eder. Çalışmalar VEGF'nin ovulasyonu otokrin etki ile regüle ettiğini

göstermiştir [114]. Luteal formasyon ve gelişimi de anjiyogenez ile ilişkilidir. VEGF ve reseptörleri, luteal ve endotel hücrelerde eksprese olarak anjiyogenezi ve vasküler permeabiliteyi otokrin olarak düzenler [115].

2.5.2.2 Menstrüel Siklusta VEGF

VEGF'nin insan ve diğer memelilerde, menstrüel siklusta endometriumda anjiyogenez ve vasküler permeabiliteyi artırarak çok önemli rol oynadığına dair çok sayıda veri bulunmaktadır. Permeabilite artışı ile ince kondanse endometrium, kalınlaşır ve sekretuar bir yapıya dönüşür. VEGF ekspresyonu menstrüel siklusun geç proliferatif ve luteal fazında artar. Proliferatif fazda KDR reseptörü, Flt1 reseptörünün 2 katı kadarken mid sekretuar fazda azalır ve Flt1 reseptörü en yüksek düzeyine ulaşır [116].

2.5.2.3 Embriyo implantasyonunda VEGF

Embriyo implantasyonu için implantasyon bölgesindeki permeabilite artışı çok önemlidir. Çalışmalar VEGF'nin endometrial damarların permeabilitesini ve anjiyogenezini regüle ettiğini göstermiştir [117]. Farelerde gebeliğin 4. gününde Flt1 mRNA'sının eksprese olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Flt1 ve Flk1'in mesometriumda birlikte eksprese olduğu, ancak kan damarı bulunmayan implantasyon bölgelerinde eksprese olmadıkları rapor edilmiştir [118]. VEGF'nin endometrial stromal desidualizasyonla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Memelilerde stromal hücreler implante olmuş embriyoyu çevreler. Endometrial epitelin proliferasyonu ve diferansiyasyonu için VEGF'nin gerekli olduğu gösterilmiştir [111]. VEGF'nin trofoblast hücre infiltrasyonu ve invazyonunda da rol oynadığı ve fetomaternal sinyal iletiminde fonksiyon gösterdiği bilinmektedir [119].

2.5.2.4 Embriyogenezde VEGF

Embriyogenez embriyonun maternal dokulara infiltre olmasının hemen ertesinde başlar ve bu süreçte gerekli olan anjiyogenez, VEGF ve reseptörleri tarafından kontrol edilir. İnsan genomunun embriyonun 4 hücreli evresinde aktive olduğu ve VEGF'nin de 8 hücreli iken aktive olduğu tespit edilmiştir [120]. Yani insanda en erken aktive olan genlerden biri VEGF'dir. Fare deneylerinde VEGF'nin

heterozigot kaybının anormal embriyo gelişimine neden olduğu ve homozigot kayıp halinde gebeliğin 11 ve 12. günlerinde fetal ölüm gerçekleştiği gösterilmiştir [6]. Yine farelerde kardiyovasküler sistemin normal gelişiminin VEGF dozajı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. VEGF konsantrasyonunun azalması geri dönüşümsüz hasarla sonuçlanmıştır [121]. Flk1 reseptörünün homozigot rekombinasyonuna sahip farelerin gebeliğin 8,5 ve 9,5. günlerinde kan damarı gelişim kusuruna ve çok düşük hematopoeze bağlı öldüğü, Flt1 reseptöründeki homozigot kayıplarda da aynı günlerde fetal ölüm görüldüğü ancak ölüm sebebinin endotel hücrelerinin aşırı gelişmesi ve dizorganizasyonu olduğu tespit edilmiştir [122, 123].

2.5.2.5 Plasental Gelişimde VEGF

İnsan plasentasında VEGF ekspresyonunun fetal ve maternal kaynaklı olarak villöz trofoblastlar ve makrofajlarda lokalize olduğu gösterilmiştir [124]. Gebeliğin 6. haftasında maksimum seviyedeysen gebelik boyunca azalarak eksprese olmaya devam eder. Gebeliğin erken döneminde anjiyogenez ve villöz kan damarlarının gelişiminde rol oynarken ilerleyen haftalarda damar sağlamlığı ve permeabilitenin devam etmesini sağlar. VEGF, KDR reseptörü aracılığıyla endotel hücre proliferasyonu ve kendisinin flt1 reseptörüne bağlanmasını sağlar. İnsan trofoblast hücrelerinde KDR ekspresyonunun saptanması, gestasyonel süreçte VEGF'nin otokrin etki ile etkili olduğunu göstermektedir [125].

VEGF, Kadın reproduktif sisteminde Ovaryan Hiperstümlasyon Sendromu (OHSS), preeklampsi ve endometriozis ile de ilişkilendirilmiştir [126-128]. Papazoglou ve ark. 2004 yılında yaptığı bir çalışmada preeklampsi ile fonksiyonel, sık görülen VEGF polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştırmış ve promotör bölgede bulunan -2578 C/A polimorfizmi ile preeklampsi arasında ilişki saptanmamıştır. Ancak 3' UTR bölgesindeki 936C/T polimorfizminin preeklampsinin ağırlığı ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca T alleli taşıyanlarda serum VEGF düzeyini CC genotipine göre anlamlı olacak şekilde düşük saptanmıştır [129]. Kore'de yapılan bir başka araştırmada da aynı polimorfizmin preeklampsi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [130].

2.5.2.6 VEGF ve Gebelik Kaybı

İmmun boyama metodları ile midsekretuar faz ve erken gebelikte insan endometriumunda VEGF saptanmış. Araştırmacılar immünohistokimyasal yöntemle tekrarlayan gebelik kaybı olanlarda ve normal gebeliklerde 7-11. gebelik haftalarında VEGF ekspresyonunu araştırmışlar ve TGK grubunda sito ve sinsityotrofoblastlarda VEGF ekspresyonuna rastlamazken normal kontrol grubunda zayıf VEGF ekspresyonunun olduğunu göstermişlerdir. Aynı araştırmada VEGF reseptör düzeyleri de normal kontrol grubunda pozitif saptanırken TGK grubunda oldukça zayıf olarak saptanmıştır. Plasental villüs ve desidual stromal ve endotel hücrelerde VEGF ekspresyonu açısından TGK ve kontrol grubunda bir fark saptanmamışken VEGF reseptör düzeyleri bu hücrelerde TGK grubunda kontrole göre azalmış olarak saptanmıştır [131]. Bu bulgular VEGF düzeylerinin tekrarlayan gebelik kaybına yol açabileceği hipotezini desteklemektedir. 1994 yılında Kanadalı araştırmacılar immünohistokimyasal yöntemler ile sito ve sinsityotrofoblast hücrelerinde VEGF varlığını araştırmışlar ve VEGF'nin ilk trimesterde sadece sitotrofoblastlarda, gebeliğin geri kalanında ise sinsityotrofoblastlarda da var olduğunu göstermişlerdir. VEGF'nin özellikle ilk ve ikinci trimesterde yüksek düzeyde olması nedeniyle villöz vasküler ağın oluşumunda trofoblastların aktif rol oynuyor olabileceğini iddia etmişlerdir [8].

Erken gebelikte VEGF'nin merkezi bir rol oynadığı daha önceki hayvan deneylerinde gösterilmiştir [132]. Ayrıca başarılı embriyo implantasyonu için VEGF'nin vasküler permeabilite artışı ve endotel hücre proliferasyonu fonksiyonları gereklidir [133, 134]. Koryonik villüs vaskülarizasyonu ve embriyonik gelişim arasında yakın ilişki olduğu gösterilmiştir [120, 135]. İnsan blastokistlerinde VEGF tarafından kodlanan mRNA gösterilmesi, implante olan embriyonun implantasyon bölgesinde vaskülarizasyonun acilen başlatıldığını göstermektedir [8, 136]. Daha sonraki haftalarda İnsan plasentasının zengin bir VEGF kaynağı olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [5, 137, 138]. Bu araştırmalar ışığında VEGF mutasyonları ve/veya polimorfizmlerinin gebelik kaybı riskini arttıracığı söylenebilir.

VEGF sistemi iki agonist (KDR ve FLT1) ve bir antagonist (sFLT) reseptörü içerir [139]. Ek olarak VEGF ligand reseptör etkileşimi ile sitotrofoblastların diferansiyasyonu, invazyonu ve hayatta kalmasını destekler [140]. Ayrıca VEGF'nin

matür damar endotelinde apoptozisi inhibe ettiği gösterilmiştir [141, 142]. Bu özellikleri nedeniyle VEGF genindeki polimorfizmler gibi ekspresyonun azalabileceği durumlar, hem trofoblastik etkilerinin azalması hem de endotel apoptozisinin artması ile plasenta dekolmanı ve spontan abortuslara sebep olabilir.

Nitekim VEGF'nin -1154G>A polimorfizmi ile tekrarlayan gebelik kaybı arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için yapılan bir araştırmada 2 veya daha fazla gebelik kaybı bulunan 152 kadın ve 65 kontrolde bu polimorfizm araştırılmış ve TGK olan olguların %16'sında ve kontrol grubunun %6'sında homozigot olarak saptanmış ve bu polimorfizmin TGK ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Böylece bu polimorfizmi homozigot olarak taşıyanlarda TGK'ya yakınlık varlığından sözedilebilir [143]. Kore'li kadınlarda, sık görülen bazı VEGF polimorfizmleri (-2578C>A, -1154G>A, -634G>C, 936C>T) ve tekrarlayan spontan abortus arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada hem -1154G>A polimorfizmi hem de CAGT haplotipinin sınırdan anlamlı bulunduğu gösterilmiştir [144].

Yine Kore'de 2003 yılında yapılan bir ekspresyon çalışmasında 6 adet tekrarlayan gebelik kaybı olgusunun ve 6 adet elektif terminasyon olgusunun koryonik villüs örneğinde VEGF ekspresyonunun 6. ve 8. gebelik haftalarında araştırılması sonucunda VEGF ekspresyonunun TGK örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir. Bu araştırma gebelik esnasında yetersiz anjiogenezin fetusun anormal gelişimine veya düşmesine yol açabileceğini göstermiştir [145].

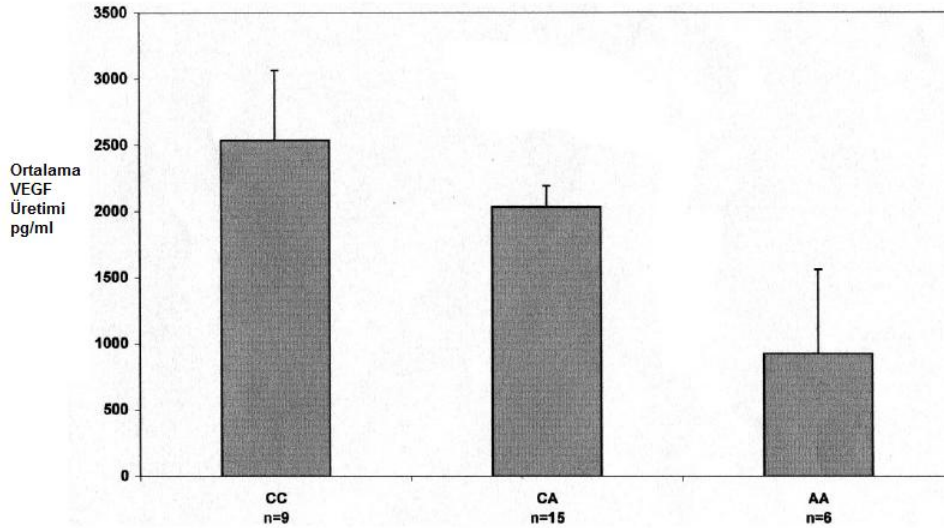
Tüm bu bilgilerin ışığında amacımız sitogenetik olarak normal olduğu değerlendirilen spontan abortus olgularında etiyopatogenezden sorumlu olabileceğini düşündüğümüz ve literatürde maternal DNA çalışmalarında gebelik kayıpları ile ilişkisi tanımlanmış, fonksiyonel olarak VEGF düzeyini ve ekspresyonunu değiştirme potansiyeli olan -2578 C/A ve 936 C/T polimorfizmlerinin spontan abortusla ilişkisini araştırmak ve abortusların etiyopatogenezi ile ilgili yeni yaklaşımlar geliştirmeye çalışmaktır.

2.5.2.7 VEGF -2578 C/A ve 936 C/T polimorfizmleri

2.5.2.7.1 VEGF -2578 C/A polimorfizmi

Bu polimorfizm genin promotor bölgesinde yer alan bir polimorfizmdir [146]. Steffensen ve arkadaşları tarafından bu polimorfizmin plazma VEGF seviyesi üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir[147]. VEGF genotipleri ile periferik kan mononükleer hücrelerde VEGF üretimi arasındaki ilişki şekil 2.5'de gösterilmiştir.

Şekil 2.5: VEGF genotipleri ile periferik kan mononükleer hücrelerde VEGF üretimi arasındaki ilişki [148].



Farklı popülasyonlarda -2578 C/A polimorfizminin genotip dağılımı ve allel frekansları tabloda gösterilmiştir.

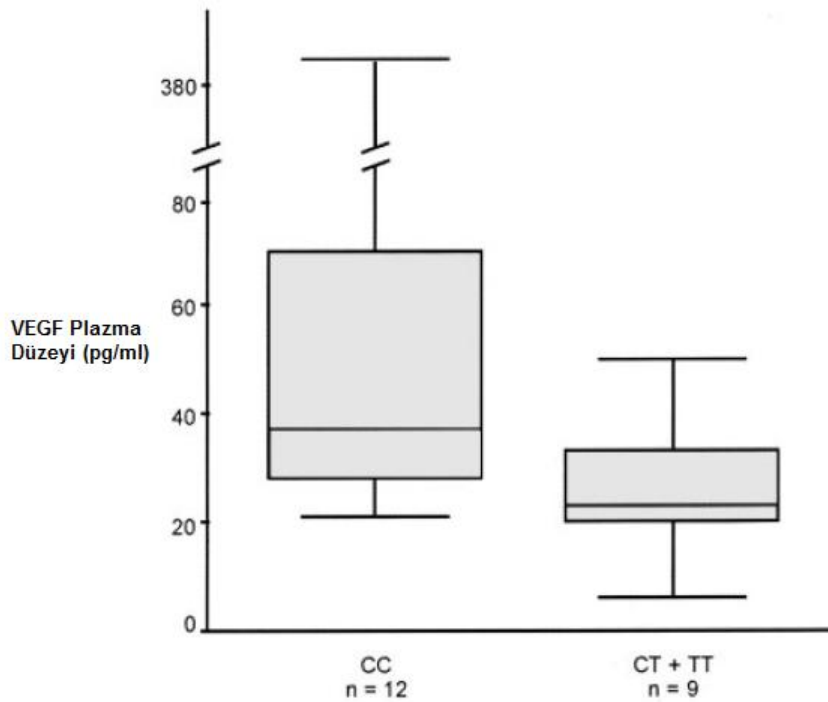
Tablo 2.5: -2578 C/A polimorfizminin genotip dağılımı ve allel frekansları[149]

	A/A	A/C	C/C	HW	A alleli	C alleli
Avrupa	0.167	0.483	0.350	1.000	0.408	0.592
Asya Çin	0.067	0.422	0.511	0.752	0.278	0.722
Asya Japon	0.091	0.455	0.455	1.000	0.318	0.682
Afrika		0.233	0.767	0.317	0.117	0.883

2.5.2.7.2 VEGF 936 C/T polimorfizmi

VEGF geninde 3'UTR bölgesinde bulunur [150]. Renner ve arkadaşları VEGF plazma konsantrasyonu ile VEGF polimorfizmlerini araştırdıkları bir çalışmada 936 C/T polimorfizminin plazma VEGF seviyesini etkileyerek fonksiyonel bir polimorfizm olduğunu rapor etmişler [151]. Serum VEGF seviyesi ile bu polimorfizm arasındaki ilişki şekilde gösterilmiştir.

Şekil 2.6: Serum VEGF seviyesi ile 936 C/T polimorfizmi arasındaki ilişki[152].



Farklı popülasyonlarda 936 C/T polimorfizminin genotip dağılımı ve allel frekansları tabloda gösterilmiştir.

Tablo 2.6: 936 C/T polimorfizminin genotip dağılımı ve allel frekansları [153].

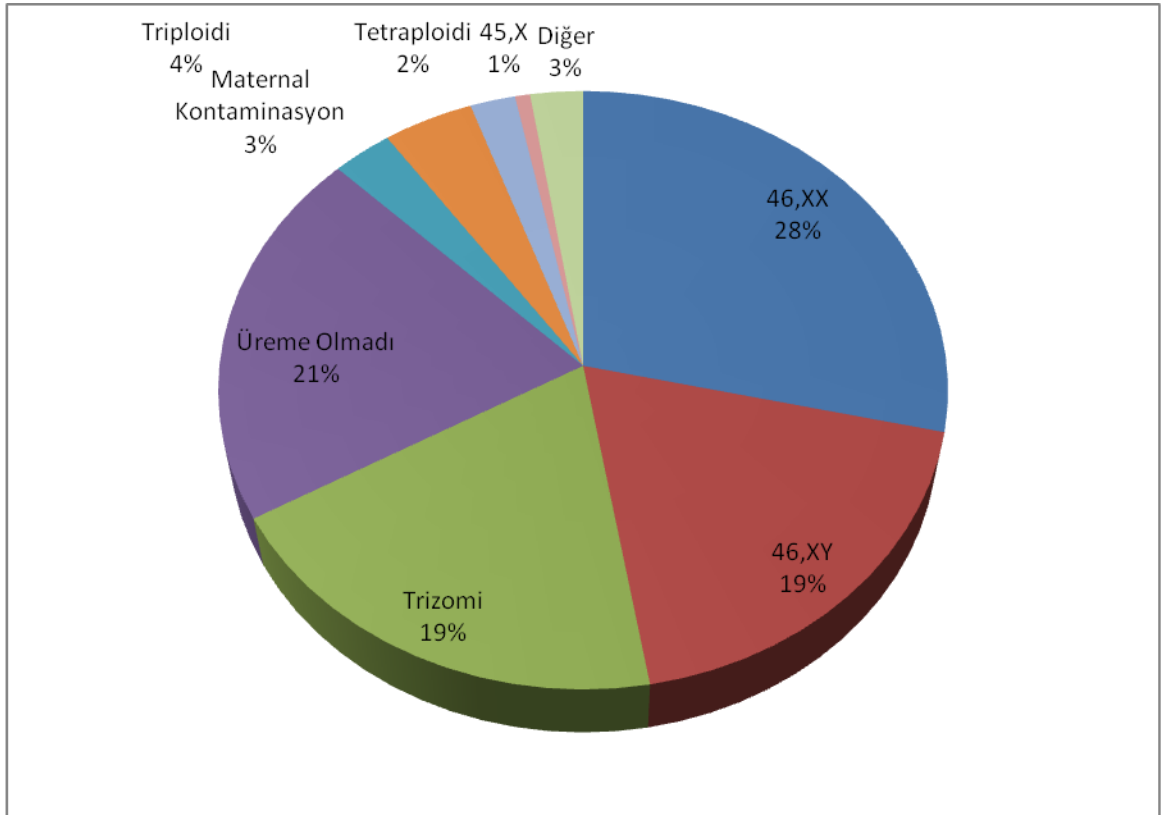
	C/C	C/T	T/T	HW	C alleli	T alleli
Avrupa	0.661	0.305	0.034	1.000	0.814	0.186
Asya Çin	0.711	0.222	0.067	0.150	0.822	0.178
Asya Japon	0.659	0.318	0.023	0.655	0.818	0.182
Afrika	0.864	0.136		0.584	0.932	0.068

3. GEREÇ ve YÖNTEM

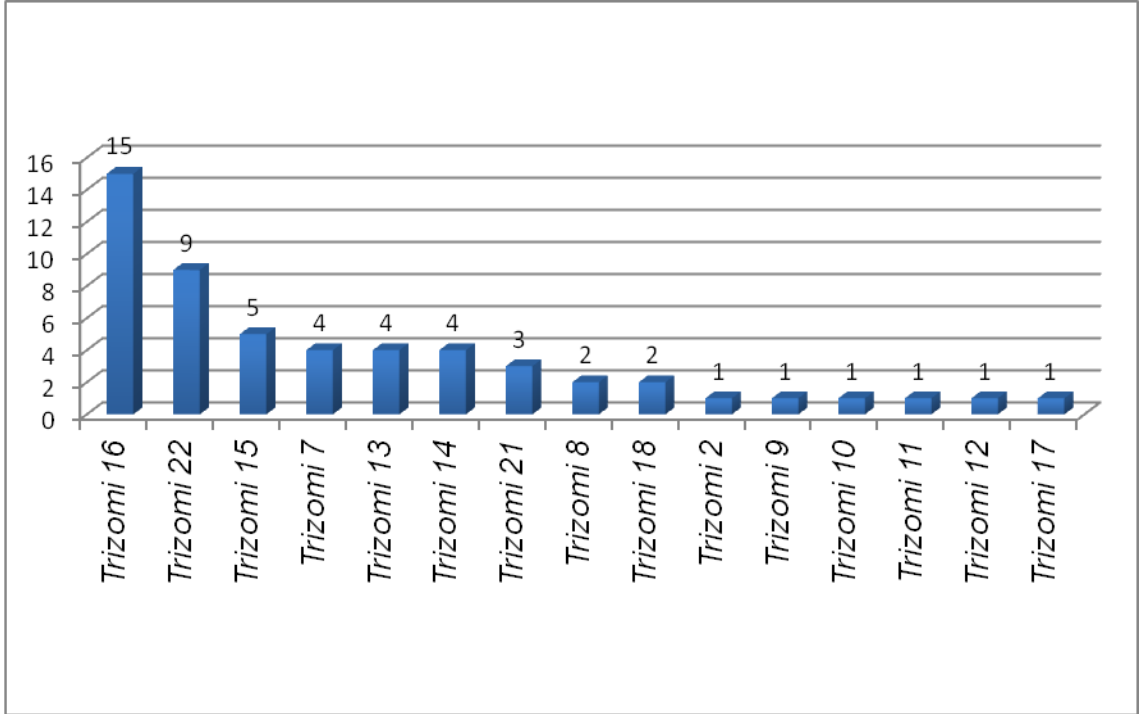
3.1 Örneklerin Seçimi

Örnekler Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 2007-2010 yılları arasında aynı dönemde EÜTF Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nden gelen 277 abortus materyali içinden herhangi bir kromozomal anomali saptanmayan 81 adet (27 erkek/ 54 kız) abortus materyali seçilerek çalışmaya dahil edildi. Abortus materyallerinin karyotip analizi dağılımı şekil 3.1 ve 3.2'de gösterilmiştir. Kontrol grubu ise popülasyonu temsil etmesi için sağlıklı 50 kadın ve 50 erkek olarak seçilmiştir.

Şekil 3.1: 2007-2010 yılları arasında karyotip analizi yapılan tüm abortus materyallerinin dağılımı.



Şekil 3.2: Trizomi saptanan olguların dağılımı



3.2 Örneklerin Toplanması

Çalışma başladıktan sonra gelen abortus örneklerinden ayrılan örnekler DNA izolasyonu yapılması amacıyla 1.5 cc'lik eppendorf tüplerine alındı. Eski abortus örneklerinin DNA izolasyonu için ise EÜTF Tıbbi Genetik AD arşivindeki metanol asetik asit süspansiyonları kullanıldı. Tüm abortus materyalinin DNA izolasyonu High Pure PCR Template Preparation Kit'i (Roche) kullanılarak yapıldı. Kontrol grubundan 2 cc periferik kan örneği EDTA'lı tüplere alındı ve Invisorb spin blood kit (INVITEK) ile DNA izolasyonu yapıldı.

3.3 Kandan DNA İzolasyonu

Gerekli alet ve kimyasal listesi:

- Magna Pure LC Robotik DNA İzolasyon Cihazı (Roche Diagnostik)
- Örnek Kartuşları
- Reagent Kartuşları

- Eppendorf tüpleri
- Proteinaz K
- Lysis/Binding Buffer
- Wash buffer I
- Wash bufferr II
- Elution buffer
- Magnetic Glass Particles (MGPs) Süspansiyonu
- Otomatik pipetler (1-10 mikrolitre, 10-100 mikrolitre ve 100-1000 mikrolitre)
- Steril sarı ve beyaz pipet uçları
- Saklama Kartuşu
- Eppendorf tüp taşıyıcıları
- Vorteks (Heidolph Reaks Top)
- Santirfüj (Sigma 1-15)
- Steril eldiven

DNA izolasyonları Magna Pre LC Robotik DNA İzolasyon Cihazı yardımıyla aşağıda belirtilen protokole uygun olarak toplanan EDTA'lı kanlardan gerçekleştirilmiştir. Finalde her örneğe ait 100 mikrolitre DNA elde edilmiştir.

1. 200 µl kan Örnek kartuşu içine aktarılır.
2. 300 µl Lysis/Binding Buffer eklenir.
3. Bu çözelti Magna Pure LC Robotik DNA İzolasyon Cihazındaki örnek kartuşu bölgesine yerleştirilir.
4. Kaç adet DNA izolasyonu yapılacağına bağlı olarak diğer süspansiyonlardan ne kadar ekleneceği system tarafından belirlenir ve tavsiye edilen miktarda Magnetic Glass Particles (MGPs) Süspansiyonu, Proteinaz K, Elution Buffer, Wash Buffer 1 ve Wash Buffer 2 solüsyonları programda gösterildiği gibi uygun reagent kartuşlarına yüklenerek uygun yerlere yerleştirilir.
5. Örnekler ve kullanılan diğer kimyasallar yerleştirildikten sonra sistemin kullanacağı steril pipet uçları programda belirtilen yerine yerleştirilir.
6. Maksimum 32 adet Dna izolasyonu aynı anda yapılabilmektedir.

7. Program çalıştırılır. Tüm işlemler cihaz tarafından otomatik olarak gerçekleştirilir.
8. Elde edilen DNA'lar DNA saklama kutularına konulur ve -20° C ' de saklanır.

3.3.1 Abortus materyalinden DNA İzolasyonu

Yeni gelen abortus örneklerinden 25-50 mg doku parçası 1,5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine 200 µl Tissue Lysis Buffer ve 40 µl proteinaz K eklendi ve 55°C sıcaklıkta örneğin tamamı sindirilene kadar, minimum 1 saat bekletildi. 200 µl binding buffer eklendi ve 10 dakika 70 °C'de inkübe edildi. Metanol asetik asit fiksatif süspansiyonundaki materyal ise 13000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı uzaklaştırılarak 2 kez 200 µl PBS solüsyonu ile yıkandı. Her örneğe 200 µl binding buffer ve 40 µl proteinaz K eklendi ve bu karışım 70°C de 10 dakika inkübe edildi. Bu aşamadan sonra yeni ve eski örnekler için aynı basamaklar uygulandı. Önce 100 µl isopropanol eklendi ve pipetaj ile karıştırıldı. Örnekler önceden hazırlanan filtreli tek kullanımlık tüplere aktarıldı ve 8000 g devir ile 1 dakika santrifüj edildi. Filtreler alınarak yeni tüplere aktarıldı. 500 µl inhibitor removal buffer eklendi ve 8000 g devir ile santrifüj edildi. Filtreler alınarak yeni tüplere aktarıldı. 500 µl wash buffer eklenerek 8000 g de santrifüj edildi(bu işlem 2 kez tekrar edildi). Daha sonra filtreler yeni tüplere aktarılarak wash buffer içeriğinde bulunan etanolün uzaklaştırılması için maksimum devirde 1 dakika santrifüj edildi. Filtreler kapaklı mikrosantrifüj tüplerine alınarak üzerlerine önceden ısıtılmış 200 µl elution buffer eklendi ve 8000 g devirde 1 dakika santrifüj edildi ve filtreler atıldı.

3.4 DNA Amplifikasyonu

3.4.1 Gerekli Alet Ve Kimyasallar Listesi

- Termal cycler (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700)
- Otomatik pipetler (1-10 mikrolitre ve 10-100 mikrolitre)
- Steril sarı ve beyaz pipet uçları
- 0.5'lik ve 1.5'lik eppendorf tüpleri (Axygen)
- Eppendorf tüp taşıyıcıları
- 0.2'lik PCR tüpleri (Axygen)
- Steril kavanozlar

- Steril eldivenler
- Buz kalıbı
- Deiyonize su
- Taq DNA polimeraz (Fermentas# EP402 Lot 4835)
- MgCl₂ (Fermentas# Lot 4835)
- 10X PCR Buffer (Fermentas# Lot 4835)
- dNTP karışımı
- 10 mikrolitre dATP
- 10 mikrolitre dTTP
- 10 mikrolitre dGTP
- 10 mikrolitre dCTP
- 60 mikrolitre distile su
- Primerler:

3.4.2 Primerlerin Sulandırılması

Liyofilize durumdaki primerlere kullanma talimatında belirtilen miktarda su eklenerek ve 100 pikomol/mikrolitre'lik stok çözeltiler hazırlandı. PCR işleminde kullanılmak üzere stoktan 10 pikomol/mikrolitre'lik konsantrasyonlu 100 mikrolitrelik sulandırılmış primerler hazırlandı.

VEGFA geni 2578C/A (rs699947) polimorfizmi için

F: GGATGGGGCTGACTAGGTAAGC

R: GTTGGAGGAAAAGGGGGCT primerleri kullanıldı.

VEGFA geni 936C/T (rs3025039) polimorfizmi için

F: AAGGAAGAGGAGACTCTGCGC

R: CTGTAGACACACCCACCCACATA primerleri kullanıldı.

3.4.3 Reaksiyon Karışımı

Her bir örnek için hazırlanan total PCR reaksiyon karışımı 25 mikrolitredir. H₂O, 10X buffer, MgCl₂ (25mM), dNTP, primerler ve Taq Polimerazdan oluşan karışım her bir reaksiyon tüpüne dağıtıldı ve en son DNA örnekleri eklendi.

VEGFA geni rs699947 ve rs3025039 polimorfizmleri için PCR Mix Hazırlanışı

- H₂O: 11,2 mikrolitre
- 10X buffer: 2.5 mikrolitre
- MgCl₂ (25mM): 2.5 mikrolitre
- dNTP: 1 mikrolitre
- primerler: 1,25 mikrolitre
- Taq Polimeraz: 0.3 mikrolitre
- DNA: 100 nanogram

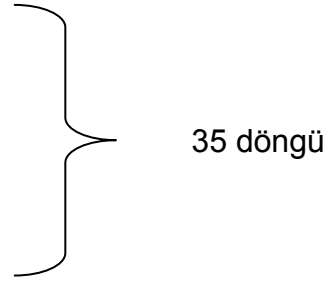
3.4.4 İzlenen PCR Programı

Denatürasyon 94 °c 5 dakika 1 döngü

Denatürasyon 94 °c 45 saniye

Bağlanma 60 °c 30 saniye

Uzama 72 °c 45 saniye



Final Uzama 72 °c 7 dakika 1 döngü

Her 2 polimorfizm için aynı koşullarda amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon ürünleri PCR programı bittikten sonra +4 °c' de saklandı.

3.5 Agaroz jel elektroforezi

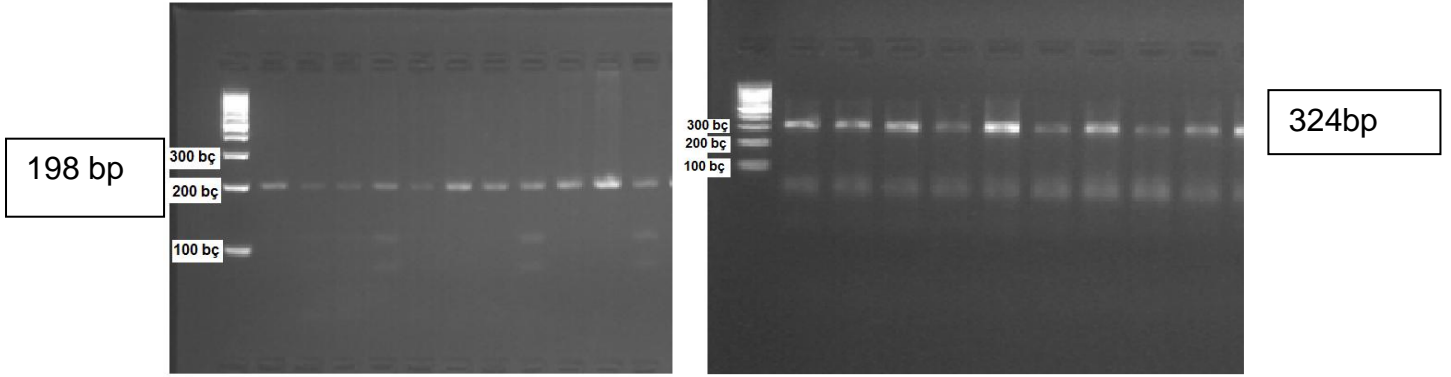
Gerekli alet ve kimyasal listesi:

- Yatay elektroforez
- Güç kaynağı
- Mikrodalga fırın
- Erler mayer
- Mezürler (50 ml, 100 ml, 500 ml)
- Pipetler (2ml, 1,5 ml, 10 ml)

- Pens ve çeşitli boyutlarda cam şişeler
- Agaroz (Sigma, A5093 Lot 51K01131)
- Etidyum bromür (Sigma)
- Orange G (Biological Industries Lot 204804)
- DNA markır (Fermentas, O'Range Ruler 100bp DNA Ladder)
- Deiyonize su
- Görüntüleme cihazı
- Hassas tartı
- pH metre

VEGFA geni için araştırdığımız bölgelerin PCR ürünüde amplifiye olup olmadığının kontrolü için, %2'lik agaroz jelde PCR ürünleri yürütüldü. Elektroforez tabağının içine, PCR koyabileceğimiz kuyucukların oluşması için taraklar yerleştirildi. 100 ml'lik erler içine, 2 gr agaroz ve 100 ml 0.5X TBE konulup mikrodalga fırında ısıtılarak eritildi. Berrak görünüm sağlanınca, 16 mikrolitre etidyum bromür eklenip karıştırıldı ve hazırlanan tabağa döküldü. Jel donması için beklendi. Jel donduktan sonra örnekler jele yüklenirken; bir parça parafilm üzerine 5 mikrolitre orange G ve 5 mikrolitre PCR ürünü karıştırılıp, jeldeki kuyucuklara yüklendi. Elde edilen PCR ürünlerinin doğru amplifiye olup olmadığı kontrol etmek için, her jele markör yüklendi. 120 volt akımda yürüdüktan sonra jel görüntüleme sistemi ile incelendi. PCR ürünlerinin jel görüntülemesi şekilde gösterilmiştir.

Şekil 3.3: VEGF geni 936 C/T (rs3025039) ve 2578C/A (rs699947) PCR ürünü



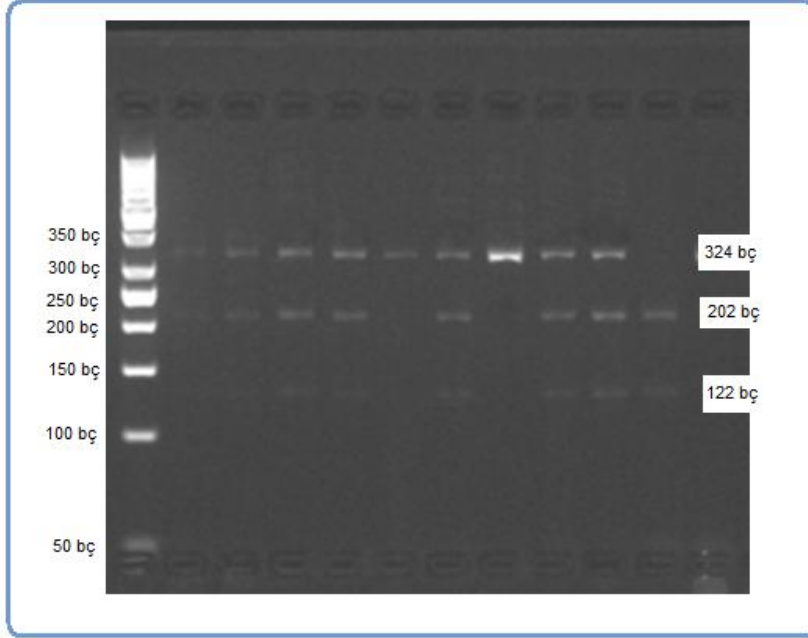
3.6 DNA'nın Enzimatik Kesim İşlemi

3.6.1 Gerekli Alet ve Kimyasallar Listesi

- Etüv
- Bgl II enzimi (Roche) ve buffer
- Hin1 II enzimi (Fermentas) ve buffer
- Distile su

PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinden amplifikasyonun oluşum kontrolü yapıldıktan sonra enzimatik kesim işlemi yapıldı. **VEGF geni** 2578C/A (rs699947) polimorfizmi için çoğaltılan bölge PCR ürünü 324 bç (baz çifti)'dir. Bgl II enzimi ile PCR ürünü spesifik bölgeden kesildiğinde 202 bç ve 122 bç uzunluğunda PCR ürünü elde edilir. **VEGF geni** 936 C/T (rs3025039) polimorfizmi için çoğaltılan bölge PCR ürünü 198 bç (baz çifti)'dir. Hin1 II enzimi ile PCR ürünü spesifik bölgeden kesildiğinde 112 bç ve 86 bç uzunluğunda PCR ürünü elde edilir. Bu polimorfizmler için agaroz jel elektroforezinde elde edilen görüntülere ait örnekler şekilde 3.4'de gösterilmiştir.

Şekil 3.4: VEGF geni 2578C/A (rs699947) polimorfizminin Bgl II enzimi ile kesim



Şekil. 3.5: VEGF geni 936 C/T (rs3025039) polimorfizmi HinI II enzimi ile kesim



3.6.2 VEGF -2578 C>A Polimorfizmi İçin Enzim Kesimi

Kesim Koşulları:

Bgl II enzim kesimi:

PCR ürünü	10	µl
Buffer	2,5	µl
Enzim	1 (10 U)	µl
H2O	11,5	µl

37 °C'de 12-16 saat inkübasyon uygulandı.

3.6.3 VEGF 936 C>T Polimorfizmi İçin Enzim Kesimi

Kesim Koşulları:

HinI II enzim kesimi:

PCR ürünü	10	µl
Buffer	2.5	µl
Enzim	1(5 U)	µl
H2O	11,5	µl

37 °C'de 12-16 saat inkübasyon uygulandı.

Restriksiyona uğramış PCR ürünlerinde amplifikasyonun olup olmadığının kontrolü % 2'lik agaroz jelde yapıldı. Kesim ürününden 8 µl ile 8µl orange G (yükleme tamponu) parafilm üzerinde karıştırıldı ve jeldeki kuyucuklara yüklendi. marköre göre PCR ürünlerinin enzimle inkübasyon sonrası kesim olup olmadığı görüntülendi. Tüm örneklerin genotiplemesi kesilme olup olmamasına göre yapıldı.

3.7 İstatistiksel Analiz

VEGF geni 2578C/A (rs699947) ve **VEGF geni 936 C/T** (rs3025039) polimorfik allel ve genotip frekansı spontan abortus ve kontrol gruplarında SPSS 15 (SPSS Inc.,Chicago, IL, USA) istatistik programında chi-kare testlerinin yardımıyla karşılaştırılmıştır ve <0. 05 olan p değerleri (iki yönlü) istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir. Hardy Weinberg eşitliğini, birleşik genotip analizi Helix Tree version 5.0.9 yardımıyla yapılmıştır.

4. BULGULAR

VEGF geni 2578C/A (rs699947) ve VEGF geni 936 C/T (rs3025039) polimorfizmleri genotiplerinin allel frekansları Hardy Weinberg eşitliğini sağlamaktaydı. VEGF geni 2578C/A (rs699947) polimorfizmi için kontrol grubunda p değeri: 0,889337, VEGF geni 936 C/T (rs3025039) polimorfizmi için kontrol grubunda p değeri : 0,179599 bulundu.

Çalışmaya katılan hasta ve kontrol tüm gönüllülerde kadın olgu sayısı 104 (%57,46), erkek olgu sayısı 77 (%42,54) idi. Abortus grubunda 54 kadın (%66,67) ve 27 (%33,33) erkek, kontrol grubunda 50 (%50) kadın ve 50 (%50) erkek bulunmaktaydı (tablo 4.1).

Tablo.4.1: Abortus ve kontrol grubunda cinsiyet dağılımı.

	Cinsiyet					
	Kadın		Erkek		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Abortus Grubu (n:81)	54	66,73	27	33,3	81	44,8
Kontrol Grubu (n:100)	50	50	50	50	100	55,2
Toplam	104	57,5	77	42,5	181	100

Kontrol grubunun yaş ortalaması 28,2 (1-65) idi. Spontan abortus nedeniyle araştırmaya dahil ettiğimiz olguların anne yaşları ortalaması 30,62 (20-44) idi (tablo 2).

Tablo 4.2: Abortus olgularının anne yaşı dağılımı

	Yaş
En Düşük	20
En Yüksek	44
Ortalama	30,62
SD	5,219

Araştırmaya dahil olan abortus olgularının endikasyonlarının %90,12'si (73/81) missed abortuslu olgular oluşturmaktaydı.

Abortus olgularının annelerinin ortalama gebelik sayısı 2,16 (1-8) ve ortalama düşük sayısı 1,80 (1-8) olarak saptandı. Abortus olgularının annelerinin gebelik ve abortus öyküsü ve dağılımı tablo 4.4'de sunulmuştur.

Tablo 4.3: Abortus olgularının annelerinin gebelik öyküsü dağılımı

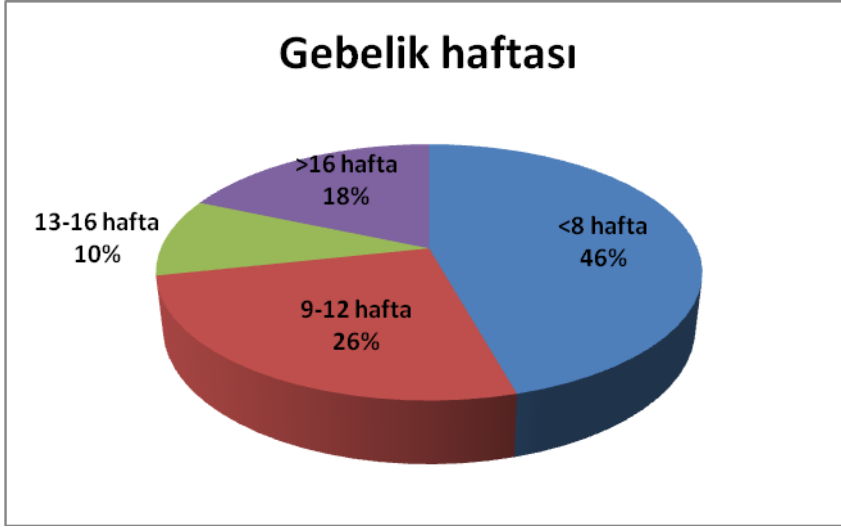
Gebelik Sayısı	n	%
1	29	35.80
2	28	34.57
3	17	20.99
4	3	3.70
5	1	1.23
6	1	1.23
8	2	2.47
Toplam	81	100.00

Tablo 4.4: Abortus olgularının annelerinin abortus öyküsü ve dağılımı

Düşük Sayısı	n	%
1	43	53,09
2	24	29,63
3	9	11,11
4	1	1,23
5	2	2,47
6	1	1,23
8	1	1,23
Toplam	81	100

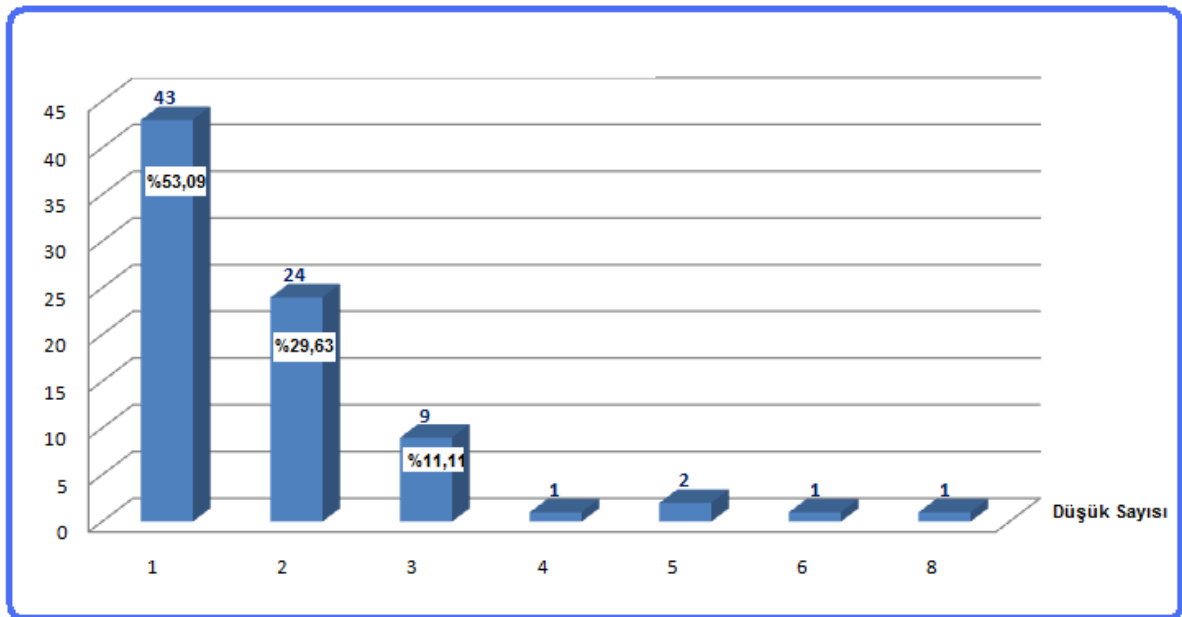
Abortus olgularının ortalama gebelik haftası 10,96 olarak saptandı. Dağılımı şekil 4.1 de sunulmuştur.

Şekil 4.1: Abortusun meydana geldiği gebelik haftası



Meydana gelen abortusların %53,09'u (43/81) o çifte ait ilk düşük olarak, %29,63'ü (24/81) ikinci düşük ve %11,11'i (9/81) ise üçüncü düşük olarak meydana gelmiştir. Abortus grubunun anne ve babalarının sahip olduğu düşük sayıları şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Şekil 4.2: Abortus grubunun ailesindeki düşük sayıları



Meydana gelen abortusların %16,05'i (13/81) yardımcı üreme teknikleri (YÜT) ile meydana gelmiş ve %83,95'i (68/81) ise spontan gebelikti (tablo 4.5).

Tablo 4.5: Gebeliğin oluş şekli

	n	%
Yardımcı Üreme Tekniği	13	16.05%
Spontan Gebelik	68	83.95%
Toplam	81	100.00%

Kontrol grubunda 15 (%15) kişinin anne babası arasında akraba evliliği bulunurken abortus grubunda 13 (%16,04) kişinin anne babası arasında akraba evliliği bulunmaktaydı (tablo 4.6)

Tablo 4.6: Abortus ve kontrol grubunda akrabalık dağılımı

	Abortus Grubu (n=81)		Kontrol Grubu (n=100)		P
	n	%	n	%	
Akrabalık	13	16,04	15	15	0.845

Abortus grubundaki düşük sayıları anne yaşı ile karşılaştırıldığında düşüklerin büyük bir çoğunluğu 35 yaş altı anne adaylarının ilk düşüğü olarak bulundu (n=36 (%54,55)) (Tablo 4.7).

Tablo 4.7: Abortus grubunda düşük sayısı ile anne yaşının karşılaştırılması

Düşük Sayısı	<35		>34		Toplam		P
	n	%	n	%	n	%	
1	36	54,55	7	46.67	43	53.09	0,055
2	18	27,27	6	40.00	24	29.63	
3	9	13,64	0	0.00	9	11.11	
4	1	1,52	0	0.00	1	1.23	
5	0	0,00	2	13.33	2	2.47	
6	1	1,52	0	0.00	1	1.23	
8	1	1,52	0	0.00	1	1.23	
Toplam	66	100	15	100	81	100	

Düşük sayıları gruplandırıldığında 54 olgu (%66,67) 35 yaş altı 3'den daha az düşüğe sahip olarak bulundu. Ayrıca 35 yaş üstü olgular değerlendirildiğinde olguların 13'ü (%86,67) 3'den daha az düşüğe sahip olarak bulundu. Bu iki grup birbiriyle karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,654$) (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: Abortus grubunda düşük sayısı ile anne yaşı arasındaki ilişki

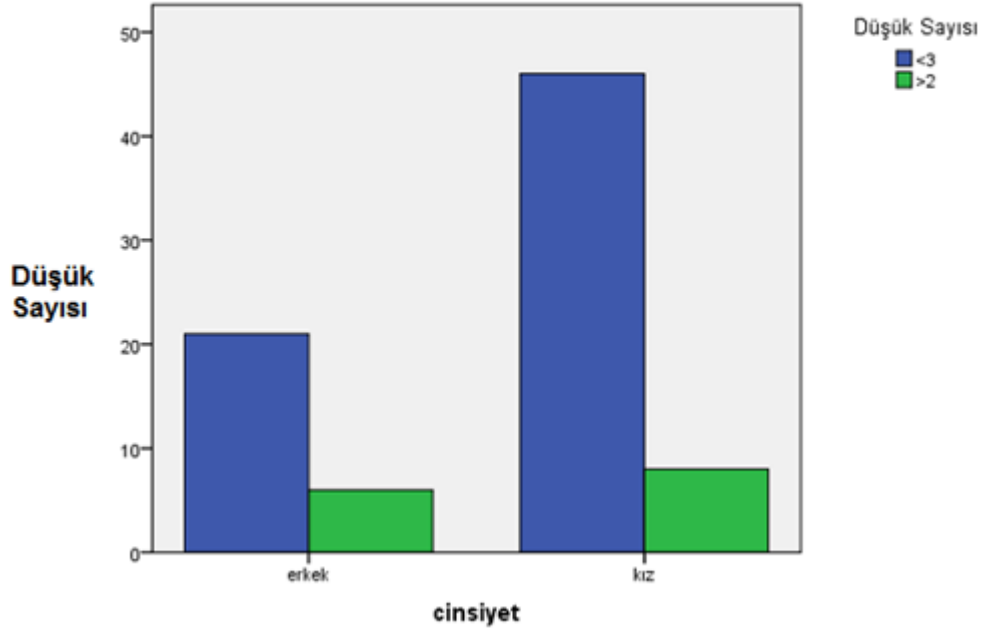
Düşük Sayısı	Yaş Grubu				Toplam		p
	<35		>34		n	%	
	n	%	n	%			
<3	54	81.82	13	86.67	67	82.72	0,654
>2	12	18.18	2	13.33	14	17.28	
Toplam	66	100	15	100	81	100	

Abortus grubundaki cinsiyetleri incelediğimizde 27/81 (%33,33) olgunun erkek ve 54/81 (%66,67) olgunun kız olduğu saptandı. Abortus grubundaki cinsiyetler ile düşük sayısını karşılaştırdığımızda istatistiki olarak fark saptanmamakla birlikte tekrarlayan gebeliklerde erkek cinsiyet lehine bir artış izlendi (p:0,406). (Tablo 4.9) (Şekil 4.3)

Tablo 4.9: Abortus grubunda cinsiyetle tekrarlayan gebelik kaybı

Cinsiyet	Düşük Sayısı				Toplam		p
	<3		>2		n	%	
	n	%	n	%			
Erkek	21	77,77	6	22,23	27	33,33	0,406
Kız	46	85,18	8	14,82	54	66,67	
Toplam	67	100	14	100	81	100	

Şekil 4.3: Abortus grubunda cinsiyet tekrarlayan gebelik kaybı ilişkisi



Eşler arasında akarabalık bulunan olguların 5'inde (%45,45) düşük ikinci gebelikte ortaya çıkmıştır. Ancak eşler arasında akrabalık bulunmayan olguların 41'inde (%58,57) düşük ilk gebelikte ortaya çıkmaktaydı. Akrabalık ile kaçınıcı gebelikte düşük olduğunun karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ($p=0,137$) (Tablo 4.10).

Tablo 4.10: Abortus grubunda düşükle sonuçlanan gebeliğin kaçınıcı gebelik olduğu ile akrabalık durumu arasındaki ilişki

Kaçınıcı Düşük	Akrabalık				Toplam		p
	VAR		YOK				
	n	%	n	%	n	%	
1	2	18.18	41	58.57	43	53.09	0,137
2	5	45.45	19	27.14	24	29.63	
3	3	27.27	6	8.57	9	11.11	
4	0	0	1	1.43	1	1.23	
5	1	9.09	1	1.43	2	2.47	
6	0	0	1	1.43	1	1.23	
8	0	0	1	1.43	1	1.23	
Toplam	11	100	70	100	81	100	

Düşük sayıları ile akrabalık ilişkisi değerlendirildiğinde eşler arasında akrabalık olan grup ile akrabalık olmayan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmamaktaydı ($p=0,072$) (Tablo 4.11).

Tablo 4.11: Abortus grubunda akrabalık durumuna göre düşük sayısının karşılaştırılması

Düşük Sayısı	Akrabalık				Toplam		p
	VAR		YOK				
	n	%	n	%	n	%	
<3	7	63.64	60	85.71	67	82.72	0,072
>2	4	36.36	10	14.29	14	17.28	
Toplam	11	100	70	100	81	100	

Abortus ve kontrol grubu arasında, VEGF geni -2578 C>A polimorfizmi genotip dağılımları karşılaştırması yapıldığında anlamlı fark saptanmadı (p:0,696) (p:0,744).

Abortus ve kontrol grubu arasında, VEGF geni -2578 C>A polimorfizmi için allel dağılımı değerlendirmesinde abortus grubunda C allel sıklığı 100/162 (%61,7), A allel sıklığı 62/162 (%38,3), kontrol grubunda C allel sıklığı 127/200 (%63,5), A allel sıklığı 73/200 (%36,5) bulundu. Her iki allel için de abortus ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p:0,744/ OR: 1,079)(Tablo 4.12).

Tablo 4.12: -2578 C>A polimorfizminin genotip ve allel frekansının abortus ve kontrol grubunda karşılaştırılması.

2578 C/A Genotipi		Grup		Toplam	OR	95,0% C.I.		p
		Kontrol	Abortus			Lower	Upper	
CC	n	40	30	70	1,00			
	%	40,0	37,0	38,7				
CA	n	47	40	87	1,135	0,602	2,139	0,696
	%	47,0	49,4	48,1				
AA	n	13	11	24	1,128	0,444	2,865	0,800
	%	13,0	13,6	13,3				
Toplam	n	100	81	181				
	%	100,0	100,0	100,0				
2578 C-A Allelleri								
C	n	127	100	227	1,079	0,703	1,655	0,744
	%	63,5	61,7	62,7				
A	n	73	62	135				
	%	36,5	38,3	37,3				
Toplam	n	200	162	362				
	%	100,0	100,0	100,0				

Abortus ve kontrol grubunda VEGF geni -2578 C/A polimorfizmi için risk alleli olan A allelini taşıyanların oranı kontrol grubunda 60/100 (%60), abortus grubunda 51/81 (%62,96) olarak saptandı. Abortus ve kontrol grubunun risk alleli açısından karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,684$). (Tablo 4.13).

Tablo 4.13: -2578 C/A polimorfizmi için risk alleli taşıyan ve taşımayanların abortus ve kontrol grubunda karşılaştırılması

-2578C/A	Kontrol		Abortus		Toplam		P
	n	%	n	%	n	%	
CC	40	40.00	30	37.04	70	38.67	0,684
CA+AA	60	60.00	51	62.96	111	61.33	
Toplam	100	100	81	100	181	100	

Abortus ve kontrol grubu arasında, VEGF geni 936 C>T polimorfizmi genotip dağılımları ve allel frekansları karşılaştırması yapıldığında abortus grubunda hem heterozigot genotip hem de mutant alleli taşıyanların frekansı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti ((p: 0,006) (p: 0.010) (tablo 4.13)

Abortus ve kontrol grubu arasında, VEGF geni 936 C>T polimorfizmi için allel dağılımı değerlendirmesinde abortus grubunda C allel sıklığı 140/162 (%86,4), T allel sıklığı 22/162 (%13,6), kontrol grubunda C allel sıklığı 189/200 (%94,5), T allel sıklığı 11/200 (%5,5) bulundu. Bu polimorfizm için abortus grubunda mutant alleli taşıyanlar kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksekti (p:0,010/ OR: 2,7)(Tablo 4.14).

Tablo 4.14: 936 C>T polimorfizminin genotip ve allel frekansının abortus ve kontrol grubunda karşılaştırılması.

936 C/T Genotipi		GRUP		Toplam	OR	95,0% C.I.		p
		KONTROL	ABORTUS			Lower	Upper	
CC	n	90	60	150	1,00			0,021
	%	90,0	71,4	82,9				
CT	n	9	20	29	3,333	1,422	7,813	0,006
	%	9,0	24,7	16,0				
TT	n	1	1	2	1,500	0,092	24,446	0,776
	%	1,0	1,2	1,1				
Toplam		n	100	81	181			
		%	100,0	100,0	100,0			
936 C/T Allelleri								
C	n	189	140	329	2,700	1,268	5,751	0,010
	%	94,5	86,4	90,9				
T	n	11	22	33				
	%	5,5	13,6	9,1				
Toplam		n	200	162	362			
		%	100,0	100,0	100,0			

Abortus ve kontrol grubunda VEGF geni 936 C/T polimorfizmi için risk alleli olan T allelini taşıyanların oranı kontrol grubunda 10/100 (%10), abortus grubunda 21/81 (%25,93) olarak saptandı. Abortus ve kontrol grubunun risk alleli açısından karşılaştırılması sonucunda aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p:0,005). Risk alleli olan T allelini taşıyanlarda risk artışının yaklaşık 3,1 kat olduğu tespit edildi. (Tablo 4.15).

Tablo 4.15: 936 C/T polimorfizmi için risk alleli taşıyan ve taşımayanların abortus ve kontrol grubunda karşılaştırılması

936C/T	Kontrol		Abortus		Toplam		P	OR
	n	%	n	%	n	%		
CC	90	90	60	74.07	150	82.87	0,005	3,150
CT+TT	10	10	21	25.93	31	17.13		
Toplam	100	100	81	100	181	100		

Abortus ve kontrol grubunda VEGF geni -2578C/A ve 936C/T polimorfizmlerinin birleşik genotip analizi değerlendirildiğinde her iki polimorfizmi de heterozigot olarak taşıyan bireylerde her iki polimorfizm için de homozigot normal saptanan bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış risk saptandı (p:0,023) (Tablo 4.16).

Tablo 4.16: Abortus ve kontrol grubunda VEGF geni -2578C/A ve 936C/T polimorfizmlerinin birleşik genotip analizi değerlendirilmesi.

-2578/936	Kontrol		Abortus		Toplam		p	OR
	n	%	n	%	n	%		
CC/CC	36	36.00%	27	33.33%	63	34.81%	1,000	
CC/CT	4	4.00%	3	3.70%	7	3.87%	1,000	1,000
CA/CC	42	42.00%	26	32.10%	68	37.57%	0,590	0,825
CA/CT	5	5.00%	14	17.28%	19	10.50%	0,023	3,733
AA/CC	12	12.00%	7	8.64%	19	10.50%	0,641	0,778
AA/CT	0	0.00%	3	3.70%	3	1.66%	0,999	2,2E+0,09
AA/TT	1	1.00%	1	1.23%	2	1.10%	0,841	1,333
Toplam	100	100.00%	81	100.00%	181	100.00%		

Abortus ve kontrol grubu olguların VEGF geni -2578C/A ve 936C/T polimorfizmlerinin birleşik allel analizi sonucuna göre kontrol grubu olguları 7'sinde (%3,5) risk allelleri olan A/T varlığı bulunmaktayken abortus grubu olguların 19'unda (%11,73) A/T risk allelleri birlikteliği bulunmaktaydı. Buna göre risk allelleri olan -2578C/A polimorfizmi için A alleli varlığı ile, 936 C/T polimorfizmi için T alleli varlığının birlikteliği abortus grubunda daha fazladır ve istatistiksel açıdan daha anlamlı olarak bulunmaktadır ($p=0,008$). Diğer allel birliktelikleri değerlendirildiğinde kontrol ve abortus grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Tablo 4.17).

Tablo. 4.17: Abortus ve kontrol grubunda VEGF geni -2578C/A ve 936C/T polimorfizmlerinin birleşik allel analizi değerlendirmesi.

-2578/936	Kontrol		Abortus		Toplam		p	OR
	n	%	n	%	n	%		
C/C	123	61.50	97	59.88	220	60.77		1,000
C/T	4	2.00	3	1.85	7	1.93	0,948	0,951
A/C	66	33.00	43	26.54	109	30.11	0,423	0,826
A/T	7	3.50	19	11.73	26	7.18	0,008	3,442
Toplam	200	100.00	162	100.00	362	100.00		

Abortus grubu olguları düşük sayılarına göre gruplandırıldığında VEGF geni -2578 C/A polimorfizmi genotip dağılımı için iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ($p=0,195$) (Tablo 4.18).

Tablo 4.18: VEGF geni -2578C/A polimorfizmi genotip dağılımının düşük sayısı ile karşılaştırılması.

-2578	Düşük Sayısı <3		Düşük Sayısı >2		toplam		P
	n	%	n	%	n	%	
CC	26	38.81	4	28.57	30	37.04	0,195
CA	34	50.75	6	42.86	40	49.38	
AA	7	10.45	4	28.57	11	13.58	
Toplam	67	100.00	14	100.00	81	100.00	

Abortus grubu olguları düşük sayılarına göre gruplandırıldığında VEGF geni 936 C/T polimorfizmi genotip dağılımı için iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ($p=0,849$) (Tablo 4.19).

Tablo4.19: VEGF geni 936C/T polimorfizmi genotip dağılımının düşük sayısı ile karşılaştırılması.

936	Düşük Sayısı <3		Düşük Sayısı >2		Toplam		P
	n	%	n	%	n	%	
CC	50	74.63	10	71.43	60	74.07	0,849
CT	16	23.88	4	28.57	20	24.6	
TT	1	1.49	0	0.00	1	1.23	
Toplam	67	100.00	14	100.00	81	100.00	

Abortus grubu olguları düşük sayılarına göre gruplandırıldığında VEGF geni -2578 C/A polimorfizmi allel dağılımı için iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ($p=0,160$) (Tablo 4.20).

Tablo 4.20: -2578 C/A polimorfizmi allel dağılımının düşük sayısına göre değerlendirilmesi

-2578C/A	Düşük Sayısı				Toplam		P
	<3		>2		n	%	
	n	%	n	%			
C	86	64.18	14	50	100	61.73	0,160
A	48	35.82	14	50	62	38.27	
Toplam	134	100	28	100	162	100	

Abortus grubu olguları düşük sayılarına göre gruplandırıldığında VEGF geni 936 C/T polimorfizmi allel dağılımı için iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ($p=0,905$) (Tablo 4.21).

Tablo 4.21: 936 C/T polimorfizmi allel dağılımının düşük sayısına göre değerlendirilmesi

936C/T	Düşük Sayısı				Toplam		P
	<3		>2		n	%	
	n	%	n	%			
C	116	86.57	24	85.71	140	86.42	0,905
T	18	13.43	4	14.29	22	13.58	
Toplam	134	100	28	100	162	100	

Abortus grubu olguları düşük haftalarına göre gruplandırıldığında VEGF geni -2578 C/A polimorfizmi genotip dağılımı için iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ($p=0,734$) (Tablo 4.22).

Tablo 4.22: -2578 C/A polimorfizmi genotiplerinin düşük haftasına göre değerlendirilmesi

-2578C/A	Düşük Haftası				Toplam		P
	<9		>8		n	%	
	n	%	n	%			
CC	15	40.54	15	34.09	30	37.04	0,734
CA	18	48.65	22	50	40	49.38	
AA	4	10.81	7	15.91	11	13.58	
Toplam	37	100	44	100	81	100.00	

Abortus grubu olguları düşük haftalarına göre gruplandırıldığında VEGF geni 936 C/T polimorfizmi genotip dağılımı için iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ($p=0,160$) (Tablo 4.23).

Tablo 4.23: 936 C/T polimorfizmi genotiplerinin düşük haftasına göre değerlendirilmesi

936C/T	Gebelik Haftası				Toplam		P
	<9		>8		n	%	
	n	%	n	%			
CC	27	72.97	33	75.00	60	74.07	0,606
CT	10	27.03	10	22.73	20	24.69	
TT	0	0	1	2.27	1	1.23	
Toplam	37	100	44	100	81	100	

Abortus grubu olguları düşük haftalarına göre gruplandırıldığında VEGF geni - 2578 C/A polimorfizmi allel dağılımı için iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ($p=0,451$) (Tablo 4.24).

Tablo: 4.24: -2578 C/A polimorfizmi allel dağılımının abortus grubunda gebelik haftasına göre değerlendirilmesi

-2578 C/A	Gebelik Haftası				Toplam		p
	<9		>8		n	%	
	n	%	n	%			
C	48	64.86	52	59.09	100	61.73	0,451
A	26	35.14	36	40.91	62	38.27	
Toplam	74	100	88	100	162	100	

Abortus grubu olguları düşük haftalarına göre gruplandırıldığında VEGF geni 936 C/T polimorfizmi allel dağılımı için iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ($p=0,982$) (Tablo 4.25).

Tablo 4.25: 936 C/T polimorfizmi allel dağılımının abortus grubunda gebelik haftasına göre değerlendirilmesi

936 C/T	Gebelik Haftası				Toplam		p
	<9		>8		n	%	
	n	%	n	%			
C	64	86.49	76	86.36	140	86.42	0,982
T	10	13.51	12	13.64	22	13.58	
Toplam	74	100	88	100	162	100	

Abortus grubu olguları eşler arasındaki akrabalık durumuna göre gruplandırıldığında VEGF geni -2578 C/A polimorfizmi genotip dağılımı için iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ($p=0,324$) (Tablo 4.26).

Tablo 4.26: -2578 C/A polimorfizmi genotiplerinin akrabalık durumuna göre değerlendirilmesi.

-2578C/A	Akrabalık				Toplam		P
	Var		Yok		n	%	
	n	%	n	%			
CC	4	36.36	26	37.14	30	37.04	0,324
CA	7	63.64	33	47.14	40	49.38	
AA	0	0	11	15.71	11	13.58	
Toplam	11	100	70	100	81	100	

Abortus grubu olguları eşler arasındaki akrabalık durumuna göre gruplandırıldığında VEGF geni 936 C/T polimorfizmi genotip dağılımı için iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ($p=0,787$) (Tablo 4.27).

Tablo 4.27: 936 C/T polimorfizmi genotiplerinin akrabalık durumuna göre değerlendirilmesi.

936C/T	Akrabalık				Toplam		P
	Var		Yok		n	%	
	n	%	n	%			
CC	9	81.82	51	72.86	60	74.07	0,787
CT	2	18.18	18	25.71	20	24.69	
TT	0	0	1	1.43	1	1.23	
Toplam	11	100	70	100	81	100	

Abortus grubu olguları eşler arasındaki akrabalık durumuna göre gruplandırıldığında VEGF geni -2578 C/A polimorfizmi allel dağılımı için iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ($p=0,503$) (Tablo 4.28).

Tablo 4.28: -2578 C/A polimorfizmi allel dağılımının abortus grubunda akrabalık durumuna göre değerlendirilmesi

-2578C/A	Akrabalık				Toplam		P
	VAR		YOK		n	%	
	n	%	n	%			
C	15	68.18	85	60.71	100	61.73	0,503
A	7	31.82	55	39.29	62	38.27	
Toplam	22	100	140	100	162	100	

Abortus grubu olguları eşler arasındaki akrabalık durumuna göre gruplandırıldığında VEGF geni 936 C/T polimorfizmi allel dağılımı için iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ($p=0,508$) (Tablo 4.29).

Tablo 4.29: 936 C/T polimorfizmi allel dağılımının abortus grubunda akrabalık durumuna göre değerlendirilmesi

936 C/T	Akrabalık				Toplam		P
	VAR		YOK		n	%	
	n	%	n	%			
C	20	90.91	120	85.71	140	86.42	0,508
T	2	9.09	20	14.29	22	13.58	
Toplam	22	100	140	100	162	100	

Abortus grubu olguları yardımcı üreme teknikleri kullanımına göre gruplandırıldığında VEGF geni -2578 C/A polimorfizmi genotip dağılımı için iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ($p=0,071$) (Tablo 4.30).

Tablo 4.30: -2578 C/A polimorfizmi genotiplerinin abortus grubunda yardımcı üreme teknikleri uygulaması arasındaki ilişki

-2578C/A	Yardımcı üreme teknikleri				Toplam		p
	VAR		YOK		n	%	
	n	%	n	%			
CC	3	23.08	27	39.71	30	37.04	0,071
CA	10	76.92	30	44.12	40	49.38	
AA	0	0.00	11	16.18	11	13.58	
Toplam	13	100.00	68	100.00	81	100.00	

Abortus grubu olguları yardımcı üreme teknikleri kullanımına göre gruplandırıldığında VEGF geni 936 C/T polimorfizmi genotip dağılımı için iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ($p=0,790$) (Tablo 4.31).

Tablo 4.31: 936 C/T polimorfizmi genotiplerinin abortus grubunda yardımcı üreme teknikleri uygulaması arasındaki ilişki

936C/T	Yardımcı üreme teknikleri				Toplam		p
	VAR		YOK		n	%	
	n	%	n	%			
CC	9	69.23	51	75.00	60	74.07	0,790
CT	4	30.77	16	23.53	20	24.69	
TT	0	0	1	1.47	1	1.23	
Toplam	13	100	68	100	81	100	

Abortus grubu olguları yardımcı üreme teknikleri kullanımına göre gruplandırıldığında VEGF geni -2578 C/A polimorfizmi allel dağılımı için iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ($p=0,983$) (Tablo 4.32).

Tablo 4.32: -2578 C/A polimorfizmi allel dağılımının abortus grubunda yardımcı üreme tekniği uygulanmasına göre değerlendirilmesi

-2578 C/A	Yardımcı Üreme Teknikleri				Toplam		P
	VAR		YOK		n	%	
	n	%	n	%			
C	16	61.54	84	61.76	100	61.73	0,983
A	10	38.46	52	38.24	62	38.27	
Toplam	26	100	136	100	162	100	

Abortus grubu olguları yardımcı üreme teknikleri kullanımına göre gruplandırıldığında VEGF geni 936 C/T polimorfizmi allel dağılımı için iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamaktaydı ($p=0,758$) (Tablo 4.33).

Tablo 4.33: 936C/T polimorfizmi allel dağılımının abortus grubunda yardımcı üreme tekniği uygulanmasına göre değerlendirilmesi

936 C/T	Yardımcı Üreme Teknikleri				Toplam		P
	VAR		YOK		n	%	
	n	%	n	%			
C	22	84.62	118	86.76	140	86.42	0,758
T	4	15.38	18	13.24	22	13.58	
Toplam	26	100	136	100	162	100	

Abortus grubundaki VEGF geni -2578 C/A polimorfizmi genotip verileri anne yaş gruplarına göre karşılaştırıldığında 35 yaş altı ve 35 yaş üstü anne adayları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0,829$) (Tablo 4.34).

Tablo 4.34: -2578 C/A polimorfizmi allel dağılımının anne yaşına göre değerlendirilmesi

-2578C/A	Yaş Grubu				Toplam		P
	<35		>34		n	%	
	n	%	n	%			
C	82	62.12	18	60	100	61.73	0,829
A	50	37.88	12	40	62	38.27	
Toplam	132	100	30	100	162	100	

Abortus grubundaki VEGF geni 936 C/T polimorfizmi genotip verileri anne yaş gruplarına göre karşılaştırıldığında 35 yaş altı ve 35 yaş üstü anne adayları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0,965$) (Tablo 4.35).

Tablo 4.35: 936 C/T polimorfizmi allel dağılımının anne yaşına göre değerlendirilmesi

936C/T	Yaş Grubu				Toplam		P
	<35		>34				
	n	%	n	%	n	%	
C	114	86.36	26	86.67	140	86.42	0,965
T	18	13.64	4	13.33	22	13.58	
Toplam	132	100	30	100	162	100	

Abortus grubundaki VEGF geni -2578 C/A polimorfizmi genotip verileri anne yaş grupları ve düşük sayılarına göre karşılaştırıldığında 35 yaş altı ve 35 yaş üstü anne adayları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Tablo 4.36).

Tablo 4.36: -2578 C/A polimorfizmi için genotip dağılımının abortus grubunda düşük sayısı ve anne yaşı ile birlikte değerlendirilmesi

Yaş grubu	-2578C/A	Düşük Sayısı				Toplam		p
		<3		>2		n	%	
		n	%	n	%			
<35	CC	21	38.89	4	33.33	25	37.88	0,447
	CA	27	50	5	41.67	32	48.48	
	AA	6	11.11	3	25	9	13.64	
	Toplam	54	100	12	100	66	100	
>34	CC	5	38.46	0	0	5	33.33	0,212
	CA	7	53.85	1	50	8	53.33	
	AA	1	7.69	1	50	2	13.33	
	Toplam	13	100	2	100	15	100	

Abortus grubundaki VEGF geni 936 C/T polimorfizmi genotip verileri anne yaş grupları ve düşük sayılarına göre karşılaştırıldığında 35 yaş altı ve 35 yaş üstü anne adayları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Tablo 4.37).

Tablo 4.37: 936 C/T polimorfizmi için genotip dağılımının abortus grubunda düşük sayısı ve anne yaşı ile birlikte değerlendirilmesi

Yaş grubu	936 C/T genotip	Düşük Sayısı				Toplam		p
		<3		>2		n	%	
		n	%	n	%			
<35	CC	40	74.07	9	75	49	74.24	0,893
	CT	13	24.07	3	25	16	24.24	
	TT	1	1.85	0	0	1	1.52	
	Toplam	54	100	12	100	66	100	
>34	CC	10	76.92	1	50	11	73.33	0,423
	CT	3	23.08	1	50	4	26.67	
	TT	0	0	0	0	0	0	
	Toplam	13	100	2	100	15	100	

Abortus grubundaki VEGF geni -2578 C/A polimorfizmi allel verileri anne yaş grupları ve düşük sayılarına göre karşılaştırıldığında 35 yaş altı ve 35 yaş üstü anne adayları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Tablo 4.38).

Tablo 4.38: -2578 C/A polimorfizminin anne yaşı ve düşük sayısı ile birlikte değerlendirilmesi

Yaş Grubu	-2578 C/A	Düşük Sayısı				Toplam		p
		<3		>2		n	%	
		n	%	n	%			
<35	C	69	63.89	13	54.17	82	62.12	0,374
	A	39	36.11	11	45.83	50	37.88	
	Toplam	108	100	24	100	132	100	
>34	C	17	65.38	1	25	18	60	0,125
	A	9	34.62	3	75	12	40	
	Toplam	26	100	4	100	30	100	

Abortus grubundaki VEGF geni 936 C/T polimorfizmi allel verileri anne yaş grupları ve düşük sayılarına göre karşılaştırıldığında 35 yaş altı ve 35 yaş üstü anne adayları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Tablo 4.39).

Tablo 4.39: 936 C/T polimorfizminin anne yaşı ve düşük sayısı ile birlikte değerlendirilmesi

Yaş Grubu	936 C/T	Düşük Sayısı				Toplam		p
		<3		>2		n	%	
		n	%	n	%			
<35	C	93	86.11	21	87.50	114	86.36	0,858
	T	15	13.89	3	12.50	18	13.64	
	Toplam	108	100	24	100	132	100	
>34	C	23	88.46	3	75	26	86.67	0,461
	T	3	11.54	1	25	4	13.33	
	Toplam	26	100	4	100	30	100	

5. TARTIŞMA

Çalışmamız mevcut literatür bilgisine göre, abortus etyolojisinde fetal VEGF fonksiyonel polimorfizmlerinin katkısını inceleyen ilk çalışmadır. Farklı çalışmalarda maternal VEGF ekspresyonları ve polimorfizmlerinin abortuslarla ilişkileri değerlendirilmiş olmakla beraber [132, 144, 145], erken embriyogenez esnasında fetal dokuda ekspresyonu gösterilmiş olan VEGF'nin endotel hücre proliferasyonu, vasküler permeabilite artışı, anjiogenezi indüklemesi, trofoblast hücre infiltrasyonu ve invazyonu, matür damar endotelinde apoptozisi baskılayıcı etkisi ve fetoplasental yatakta neovaskülarizasyon gibi mekanizmalarla [112, 120, 121, 136, 141] implantasyon sahasında normal gelişim ve tutunma üzerine açık bir etkisi olduğunu destekleyen güçlü kanıtlar bulunmaktadır [137]. Elbette implantasyon sahasının hazırlanması maternal faktörler ile sağlanacaktır. Ancak implantasyon fetomaternal etkileşim sonucu ortaya çıkmaktadır. Çalışmalar insan genomunun 4 hücreli embriyo seviyesinde iken, VEGF'nin ise 8 hücreli iken aktive olduğunu göstermiştir [121]. VEGF'nin en erken aktive olan genlerden biri olması fetusun implantasyona kendini hazırlaması olarak yorumlanabilir. Çünkü VEGF'nin implantasyon için gerekli olan başta vasküler permeabilite artışı, neoanjiogenez, trofoblast infiltrasyonu ve invazyonunda rol oynadığı daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir [121, 131].

Erken gebelikte VEGF'nin merkezi bir rol oynadığı daha önceki hayvan deneylerinde gösterilmiş [132]. İnsan blastokistlerinde VEGF tarafından kodlanan mRNA gösterilmesi, implante olan embriyonun implantasyon bölgesinde vaskülarizasyonun acilen başlatıldığını göstermektedir [8, 136]. Embriyo implantasyonu için implantasyon bölgesindeki permeabilite artışı çok önemlidir. Çalışmalar VEGF'nin endometrial damarların permeabilitesini ve anjiyogenezini regüle ettiğini göstermiştir [118]

Farelerde gebeliğin 4. gününde Flt1 mRNA'sının eksprese olduğu gösterilmiş. Ayrıca Flt1 ve Flk1'in mesometriumda birlikte eksprese olduğu, ancak kan damarı bulunmayan implantasyon bölgelerinde eksprese olmadıkları rapor edilmiştir [119].

Endometrial epitelin proliferasyonu ve diferansiyasyonu için VEGF'nin gerekli olduğu gösterilmiştir [112]. VEGF'nin trofoblast hücre infiltrasyonu ve invazyonunda da rol oynadığı ve feto-maternal sinyal iletiminde fonksiyon gösterdiği bilinmektedir [120].

Bu araştırmalar ışığında VEGF mutasyonları ve/veya polimorfizmlerinin VEGF ekspresyonunu azaltarak gebelik kaybı riskini arttıracığı söylenebilir.

Çalışma grubumuzda abortus olgularının anne yaşı ortalaması $30,62 \pm 5,219(20-44)$ idi. Abortus olgu grubunda anne yaşı ile düşük sayısının karşılaştırılması sonucunda anne yaşı arttıkça düşük sayısının artışının istatistiki olarak anlamlı değildi. Tekrarlayan gebelik kaybı (>2) ile karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı değildi. Abortus grubunda tekrarlayan gebelik kaybı olgusu az sayıda ($12/81- \%18,8$) olduğundan daha geniş grupta çalışılması yerinde olacaktır.

Kromozom anormalliği bulunmayan abortus materyallerinden elde edilen normal karyotipli olgularımızın $\%33,3$ 'ü erkek iken, $\%66,7$ si kız cinsiyete sahipti. Bu bulgu daha önce yayınlanmış çalışmalardan elde edilen verilerle uyumludur. Canlı doğumlarda cinsiyet oranlarının incelendiği çalışmalarda hafif bir erkek fazlalığının (1.05 kat) saptanması, gebelik esnasında dişi fetüslerin erkeklerden daha fazla düşüklere yatkın oldukları yorumuna yol açmıştır [154]. Bu küçük farka yol açan genetik mekanizmalar tam olarak açıklanmamış olmakla birlikte, kromozom anormallikleri ve otoantikör mevcudiyeti gibi bilinen bir etyolojik faktör saptanmayan düşüklere, düşük cinsiyetinin ağırlıklı olarak kız olduğu gösterilmiştir [155]. Fetal cinsiyet oranında meydana gelen bu sapmanın, olası bir nedeni olarak kromozom eldesinde maternal kontaminasyon riskinin bulunması ve fetüsü temsil etmeyen normal anne karyotipine ulaşılması gösterilebilir. Bir çok epidemiyolojik çalışma bu riski açıkça ekarte edememesine rağmen, otoantikör pozitif ve negatif abortus olgularında gösterilen belirgin oran farkı, en azından kısmen etyolojiden bağımsız olduğunu desteklemektedir.

Abortus grubunda cinsiyet ile tekrarlayan gebelik kaybı arasındaki ilişkinin karşılaştırılması sonucunda cinsiyetler arasında tekrarlayan gebelik kaybı açısından istatistiki olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p:0,406$). Ancak erkek cinsiyetlerin tekrarlayan gebelik kaybındaki oranının ($\%22,23$) kız cinsiyete göre ($\%14,82$) daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu durum her ne kadar istatistiki olarak anlamlı görünmese de multifaktöriyel kalıtımın esaslarından olan, bir durumun az görülen cinsiyette

meydana geldiğinde daha ağır seyirli olması ilkesine uymakta olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Abortus grubunda anne baba arasında akrabalık oranı 13/81 (%16,04), kontrol grubunda 15/100 (%15) olarak saptandı. 2006 yılında Türkiye İstatistik Kurumu'nun yaptığı aile yapısı araştırmasının sonuçlarına göre tüm Türkiye'de akraba evliliği oranının %20,9 olduğu, Ege Bölgesi'nde ise bu oranın %17,4 olduğunu düşünürsek çalışmamızdaki akraba evliliği oranının bir miktar daha düşük olmakla birlikte bu parametre açısından genel populasyonu temsil ettiğini düşünmekteyiz [156]

Çalışmaya dahil edilen 81 abortus olgusunun gebelik haftası ortalama değeri 10,96 (6-20) (SD 4,545) olarak saptanmıştır. Olguların %46'sı 8 haftanın altında iken, %26'sı 9-12. Haftalar arasında idi, olguların %72'si ise 12.gebelik haftasının altında kalmaktaydı. Olguların büyük bir bölümünün ilk trimester içinde gerçekleşen gebelik kayıpları olduğu görülmektedir. Amerikan Ulusal Kronik Hastalıkları Engelleme Merkezi'nin verilerine göre 2006 yılında abortusların %88,4'ü gebeliğin ilk 12 haftası içinde meydana gelmiştir. % 62,1 kadarı ilk 8 haftada, %26,3'ü 9-12 haftalarda meydana gelmiştir [34]. Bu çalışmadaki düşüklüklerin çoğunluğu 12 haftanın altında olmasına rağmen Amerikan ulusal datasından elde edilen oranların altında kalması vaka sayımızın düşük olması ile açıklanabilir. 9-12 haftalar arasındaki gebelik haftası yüzdeleri birbiri ile uyumluyken 8 haftadan daha erken gebelikler arasında fark olması ise Amerika'da gebeliğin ülkemizden daha erken teşhis ediliyor olabileceğini akla getirmektedir. Ayrıca 1974-2004 yılları arasında 30 yıllık bir süreyi kapsayan Amerika Birleşik Devletleri'ne ait verilerin analizi, 12. gebelik haftasının altında kalan abortusların tüm abortuslar içerisinde en yüksek oranı oluşturduğunu ve bu oranın yıllar içinde değişmediğini, ancak 1990'lı yıllara kadar 7. gebelik haftasının altında kalan abortus olgularının tanımlanamadığını ve yıllar içerisinde tüm abortus olgularının arasında 8. gebelik haftasının altındaki abortusların oranının giderek arttığını göstermektedir [157].

Yardımcı üreme teknikleri ile oluşmuş gebeliklerdeki kayıpların çalışmamızdaki oranı %16,05 (13/81) idi. 2002 yılında 53 ülkenin katılımı ile gerçekleştirilen kollaboratif bir çalışmada yardımcı üreme teknikleri ile oluşmuş gebeliklerin ortalama %20'sinde spontan abortus meydana geldiği, ancak spektrumun oldukça geniş olduğu (% 2,4-47,3) rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda böyle bir veri bulunmadığı

için çalışmamız bu konuda informatif değildir. Çalışmamızdan elde edilen verilere göre, yardımcı üreme teknikleri ile oluşmuş gebelikler ile spontan gebelikler karşılaştırıldığında VEGF polimorfizmlerinin abortusla ilişkisini değerlendiren tüm analizlerin bir anlamlılık vermediğini saptadık.

Tüm olgular içinde anormal USG bulgusu olanların oranı 11/81 (% 13,58) olarak tespit edildi. Anormal USG bulgusu saptanmış olan olgular içinde en düşük gebelik haftası 13. gebelik haftası olarak saptandı. Gebelik haftaları ortalamaları 17,54 olarak saptandı. Tüm abortuslar içinde küçük bir grubu oluşturması, gözlemlenebilir anormalliklerin daha ileri gebelik haftalarında belirlenebilmesi abortuslara yaklaşımda anormal ultrason bulgularının sınırlı bir değeri olduğunu göstermektedir [158].

Genin fonksiyonlarına etki ettiğinin kanıtlandığı polimorfizmler fonksiyonel polimorfizm olarak tanımlanır. VEGF genine ait birçok polimorfizm tanımlanmıştır. Biz bu çalışmada VEGF geninin fonksiyonel oldukları daha önce gösterilmiş iki polimorfizmini değerlendirdik. -2578 C/A polimorfizmi genin promotor bölgesinde bulunmakta ve bu polimorfizm için risk alleli taşıyanlarda plazma VEGF seviyesinin risk alleli taşımayanlara göre azalmasına yol açtığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [148]. 936 C/T polimorfizmi genin 3'UTR bölgesinde bulunmaktadır. 3'UTR bölgesindeki polimorfizmler, genel olarak mRNA'nın dayanıklılığını ve stabilitesini azaltarak etki gösterirler [159]. 936 C/T polimorfizminin VEGF plazma seviyesini azalttığı daha önceki yayınlarda gösterilmiştir. Ayrıca gen üzerinde bu polimorfizmin bulunduğu dizi, hipoksi ile indüklenen RNA proteini ve heterojen nükleer ribonükleoprotein gibi bazı regülatör proteinlerin bağlanma bölgesine oldukça yakın yerleşimli bulunmaktadır.[152]. 936 C/T polimorfizminin bu bağlanma bölgelerine olan yakınlığı, belki de henüz tanımlanmamış bazı regülatuar proteinlerin bağlanma bölgesi içinde olabileceğini düşündürmektedir.

VEGF geni -2578 C/A (rs699947) ve VEGF geni 936 C/T (rs3025039) polimorfizmleri genotiplerinin allel frekansları Hardy Weinberg eşitliğini sağlamaktaydı.

Biz bu çalışmada -2578 C/A polimorfizminin genotip dağılımı ve allel frekansını abortus ve kontrol grubunda karşılaştırdığımızda istatistiki olarak anlamlı bir fark saptamadık. Daha önce bu polimorfizmin abortusla ilişkisi fetal DNA ile

çalışılmamakla birlikte, çeşitli araştırmacılar tarafından maternal DNA ile yapılan çalışmalar da sınırlı sayıdadır. Papazoglou tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda yaptığı çalışmada bu polimorfizmin abortusla ilişkisiz olduğunu saptamıştır [160]. Ancak yine promotor bölgede bulunan başka bir polimorfizmin (-1154 G/A) abortusa yatkınlık sağladığını göstermiştir. Lee bu polimorfizmi tekrarlayan gebelik kaybına sahip kadınlarda araştırmış ve tek başına anlamlı olmadığını rapor etmiş, ancak sık rastlanan başka 3 polimorfizmle yaptıkları haplotip analizi sonucunda istatistiki olarak düşük anlamlılık saptamıştır [144]. Bizim bulgularımız da bu çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir.

Bu polimorfizm başta çeşitli kanserler olmak üzere birçok farklı hastalıkla da ilişkilendirilmeye çalışılmıştır. Liu A allelinin endometriozisten koruyucu olduğunu göstermiştir[161]. Kang yine A allelinin adenomiyozis riskini azalttığını göstermiştir [162]. Lin ise bu polimorfizmin yaşa bağlı makula dejenerasyonunda kompleman faktör H geni Y402H polimorfizmi ile bağlantılı olarak risk oluşturduğunu ileri sürmüştür [164]. Bu çalışmaların sonuçları da risk allelini taşıyanlarda plazma VEGF konsantrasyonunun veya fonksiyonunun azalmasına bağlı olarak tümör gelişiminin olumsuz yönde etkilenmesi ile açıklanabilir. Smedts ise Hollanda popülasyonunda endokardiyal yastık defekti grubunda yaptığı araştırmada C allelinin endokardiyal yastık defekti riskini artırdığını rapor etmiştir [163].

-2578 C/A polimorfizmi için risk alleli taşıyanlar ile taşımayanların karşılaştırılması sonucunda kontrol ve abortus grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p:0,684).

-2578 C/A polimorfizminin A allel frekansı Avrupalılarda %40,8, Çinlilerde %27,8, Japonlarda %31,8 ve Afrikalılarda %11,7 gibi farklı oranlarda bulunmuştur.(literatür) Biz, kontrol grubumuzda -2578 C/A polimorfizminin A allel frekansını %36,5 olarak saptadık. Çalışmamız bu polimorfizmin ülkemizdeki allel frekansının tespit edildiği ilk çalışmadır.

Çalışmamızda VEGF genine ait 936 C/T polimorfizminin genotip ve allel frekanslarını kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda, genotip (p:0,006) ve allel frekanslarının (p:0,010) istatistiki olarak anlamlı olacak şekilde farklı olduğunu saptadık. Bu polimorfizm için risk allelini heterozigot olarak taşıyanların abortusa kontrol grubuna göre 3,3 kat daha fazla yatkın olduğunu gösterdik. Papazoglou

tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda yaptığı çalışmada bu polimorfizmin abortusla ilişkisiz olduğunu saptamıştır [160]. Lee de bu polimorfizmi tekrarlayan gebelik kaybına sahip kadınlarda araştırmış ve tek başına anlamlı olmadığını saptamış ancak sık rastlanan başka 3 polimorfizmle yaptıkları haplotip analizi sonucunda istatistiki olarak düşük anlamlılık tespit etmiştir [144]. Bizim çalışmamızda bu polimorfizmin anlamlı bulunması popülasyonlara ait farklı özelliklerle açıklanabileceği gibi, çalışılan DNA örneklerinin farklı (fetal – maternal) olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Bu polimorfizm ile yapılan ilişkilendirme çalışmaları da genellikle çeşitli kanser grupları ile yapılmıştır. Bae, 2008 yılında bu polimorfizmin özellikle 55 yaşın altındaki kadınlarda cinsiyete özel yatkınlık sağladığını göstermiştir [165]. Bizim çalışmamızda ise bu polimorfizmin etkisi cinsiyetten bağımsız olarak ortaya çıkmaktadır. Vidaurreta 2010 yılında yaptığı çalışmada, 936 TT genotipinin kolorektal kanserde sağkalım süresinin uzunluğu ile ilişkili olduğunu rapor etmiştir [166]. TT genotipi olanlarda VEGF plazma seviyelerinin ve fonksiyonlarının anlamlı olarak azalması ve tumor neovaskülarizasyonunun sağlanamayıp tumor gelişiminin yavaşlamasına bağlı sağkalım artışı gerçekleşmiş olabilir. Elito ise ektopik gebelik ile ilişkisini araştırmış ancak ilişkili olmadığını kanıtlamıştır [167].

936 C/T polimorfizmi için risk alleli taşıyanlar ile taşımayanların karşılaştırılması sonucunda kontrol ve abortus grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p:0,005). Risk alleli taşıyanların taşımayanlara göre abortusa olan yatkınlığının yaklaşık 3,1 kat daha fazla olduğu tespit edildi.

936 C/T polimorfizminin T allel frekansı Avrupalılarda %18,6, Çinlilerde %17,8, Japonlarda %18,2 ve Afrikalılarda %6,8 gibi farklı oranlarda bulunmuştur (literatür). Kontrol grubumuzda 936 C/T polimorfizminin risk alleli olan T allel frekansını %5,5 olarak saptadık. Çalışmamız bu polimorfizmin ülkemizdeki allel frekansının tespit edildiği ilk çalışmadır.

Abortus ve kontrol grubunda VEGF geni -2578C/A ve 936C/T polimorfizmlerinin birleşik genotip analizi değerlendirmesi sonucunda her iki polimorfizm için de heterozigot olan bireylerde kontrol grubuna göre riskin 3,7 kat artmış olduğu saptandı (p:0,023). Tek başına anlamlı bir fark saptayamadığımız -2578 C/A polimorfizminin 936 C/T polimorfizmi ile kombine edildiğinde her iki

polimorfizm için risk allelini heterozigot olarak taşıyan CA/CT haplotipli abortus olgularının 936 C/T'nin tek başına oluşturduğundan daha yüksek bir risk katsayısı oluşturması her iki polimorfizmin de birlikte çalışarak haplotip değerlendirilmesinin daha etkili olacağını düşündürmektedir. Bu polimorfizmlerin abortus etyopatogenezindeki rolünün daha iyi değerlendirilebilmesi için daha geniş popülasyonlarda çalışılmasına ihtiyaç vardır. Her iki polimorfizm için de risk alleli açısından homozigot olanlarda kontrol grubuna göre anlamlı bir fark saptanmadı. Bu durum olgu sayısının ve 936 C/T polimorfizmi için T allel frekansının düşük olması ile açıklanabilir.

Abortus ve kontrol grubunda VEGF geni -2578C/A ve 936C/T polimorfizmlerinin birleşik allel analizi değerlendirmesi sonucunda AT haplotipinin kontrol grubuna göre riski yaklaşık 3,4 kat artırdığı gösterilmiştir (p:0,008).

-2578 C/A genotipi ile düşük sayısının arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi sonucunda genotip ile düşük sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p:0,195). 936 C/T genotipi ile düşük sayısının arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi sonucunda da genotip ile düşük sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p:0,849). Bu verilere göre VEGF polimorfizmleri tekrarlayıcı düşüklerden daha ziyade düşük potansiyelini genel anlamda öngördürücü bir genetik belirteç olarak kullanılabilir.

-2578 C/A polimorfizminin genotip ve allel dağılımlarının abortus grubunda anne yaşı (>34 ve <35), akrabalık olup olmaması, gebelik yaşı (>8 ve <9) ve yardımcı üreme tekniği uygulanıp uygulanmaması ile ayrı ayrı karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

936 C/T polimorfizminin genotip ve allel dağılımlarının abortus grubunda anne yaşı (>34 ve <35), akrabalık olup olmaması, gebelik yaşı (>8 ve <9) ve yardımcı üreme tekniği uygulanıp uygulanmaması ile ayrı ayrı karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Bu sonuçlara göre 936 C/T polimorfizminin abortus oluşumunda, anne yaşı, akrabalık durumu, gebelik yaşı ve yardımcı üreme tekniğinden bağımsız olarak risk oluşturduğu anlaşılmakla birlikte bu konuda daha büyük gruplarda çalışılması faydalı olacaktır.

Spontan abortus, gebeliğin 20. gebelik haftasından önce herhangi bir müdahale olmaksızın sonlanmasıdır ve son yıllarda daha çok kadının ilk gebelik yaşı

için 30 ve 40'lı yaşlarını tercih etmesi nedeniyle önemi gün geçtikçe artan bir kavramdır. Günümüzde bile spontan tekrarlayan düşükler için genellikle en az 3 kez düşük gerçekleşmesi şartı aranmaktadır. Oysa anne olma yaşının ertelenmesi, fertilité potansiyelinin azalması ve bu konudaki sosyal alışkanlıklar bu tanımın gözden geçirilmesi ihtiyacını doğurmuştur. Çünkü 3 kez düşük gerçekleşmesini beklemek, klinik araştırmalar ve olası tedavi seçeneklerinin başarıyla uygulanabilmesi için geç kalınmasına neden olabilecektir. Ayrıca, tek veya tekrarlayan düşükler arasında etiopatogenezin farklı olduğuna dair ikna edici bir kanıt bulunmamaktadır [25]

Bu çalışma Türk popülasyonunda kromozomal anomalilerin ön plana çıksa da aslında poligenik multifaktöriyel bir problem olan spontan abortuslarla VEGF gen polimorfizmlerinin ilişkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Fetal DNA örneklerinin çalışılması bakımından da ulaşabildiğimiz kadarıyla dünya literatüründe ilk yapılan çalışmadır. VEGF geninin normal gebelik sürecinde trofoblastların infiltrasyonu ve invazyonundan başlayarak hemen hemen tüm süreçte gerekli olan anjiogenez, neovaskülarizasyon, vasküler permeabilite artışı ve matür damar endotelinde antiapoptotik etki gibi fonksiyonel etkileri tanımlanmıştır. Bu multipotansiyel fonksiyonlara sahip VEGF genine ait fonksiyonel polimorfizm olduğu daha önceden belirlenmiş 936 C/T ve -2578 C/A polimorfizmlerinin, daha geniş gruplarda çalışılmak kaydıyla spontan abortusa yatkınlık belirteci olarak kullanılabileceği kanaatindeyiz. VEGF genine ait bu polimorfizmlerin Türk popülasyonunda ilk kez çalışılması nedeniyle allel frekanslarının belirlenmesi için de katkı sağlayacağı inancındayız.

6. SONUÇLAR

Çalışmamız diğerlerinden farklı olarak fonksiyonel VEGF polimorfizmlerinin spontan abortus etiyojisine fetal katkısını inceleyen ilk çalışmadır. 936C/T polimorfizminin kontrole göre spontan abortus riskini tek başına 3,3 kat arttırdığını göstermiş bulunmaktayız.

Her iki polimorfizmin haplotiplerinin değerlendirilmesi ile CA/CT haplotipine sahip fetüslerde spontan abortus riskinin yaklaşık 3,7 kat arttığını tespit ettik. Çalışma grubumuzda tekrarlayıcı gebeliklerin oranı az olsa da 936 C/T polimorfizminin Türk popülasyonunda tekrarlayıcı düşüklerden ziyade genel abortus riskini öngördürücü bir belirteç olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Spontan abortuslarda, 3 ve üzeri abortus öyküsüne sahip ailelerde, genetik inceleme yapılmaktadır. Günümüz tıbbına hakim olan bireyselleştirilmiş tıp yaklaşımlarında, önleyici hekimlik uygulamaları göz önüne alınırsa, ilk abortusunu yapan her kadının tekrarlayıcı gebelik kaybı potansiyelinde ve genetik yatkınlığında olup olmadığını ucuz ve etkin yöntemlerle araştırmak ve bu genetik yatkınlığın erken belirteçlerini keşfetmek, bu yaygın probleme karşı etkili bir önleyici hekimlik yaklaşımını geliştirmekle sonuçlanacağı açıktır.

Daha geniş bir popülasyonda fetal katkılarla beraber maternal katkının da plazma VEGF seviyeleri ve ekspresyon çalışmaları gibi fonksiyonel verilerle kombine edilerek saptanacağı çalışmaların, spontan abortus etiopatogenezinin daha iyi aydınlatılabilmesi için gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Brown, S., *Miscarriage and its associations*. Seminars in Reproductive Medicine, 2008. **26**(5): p. 391-400.
2. Edmonds, D.K., K.S. Lindsay, J.F. Miller, E. Williamson, and P.J. Wood, *Early embryonic mortality in women*. Fertil Steril, 1982. **38**(4): p. 447-53.
3. Rubio, C., T. Pehlivan, L. Rodrigo, C. Simon, J. Remohi, and A. Pellicer, *Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview*. Am J Reprod Immunol, 2005. **53**(4): p. 159-65.
4. Dvorak, H.F., L.F. Brown, M. Detmar, and A.M. Dvorak, *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis*. Am J Pathol, 1995. **146**(5): p. 1029-39.
5. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-76.
6. Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau, and A. Nagy, *Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 435-9.
7. Evans, P., T. Wheeler, F. Anthony, and C. Osmond, *Maternal serum vascular endothelial growth factor during early pregnancy*. Clin Sci (Lond), 1997. **92**(6): p. 567-71.
8. Jackson, M.R., E.W. Carney, S.J. Lye, and J.W. Ritchie, *Localization of two angiogenic growth factors (PDEC GF and VEGF) in human placentae throughout gestation*. Placenta, 1994. **15**(4): p. 341-53.
9. Le Bouteiller, P. and J. Tabiasco, *Killers become builders during pregnancy*. Nat Med, 2006. **12**(9): p. 991-2.
10. Ahmed, A.G. and A. Klopffer, *Detection of subclinical abortion by assay of pregnancy specific beta 1 glycoprotein*. Br Med J (Clin Res Ed), 1984. **288**(6411): p. 113.
11. Jobanputra, V., A. Sobrino, A. Kinney, J. Kline, and D. Warburton, *Multiplex interphase FISH as a screen for common aneuploidies in spontaneous abortions*. Hum Reprod, 2002. **17**(5): p. 1166-70.

12. Osborn, J.F., M.S. Cattaruzza, and A. Spinelli, *Risk of spontaneous abortion in Italy, 1978-1995, and the effect of maternal age, gravidity, marital status, and education*. Am J Epidemiol, 2000. **151**(1): p. 98-105.
13. E, A., *Tekrarlayan gebelik kayıplarında tanı ve tedavinin yönlendirilmesi*. TJD Uzmanlık Sonrası Eğitim Dergisi, 2004. **6**: p. 19-25
14. Ford, H.B. and D.J. Schust, *Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy*. Rev Obstet Gynecol, 2009. **2**(2): p. 76-83.
15. Regan, L., P.R. Braude, and P.L. Trembath, *Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion*. BMJ, 1989. **299**(6698): p. 541-5.
16. <http://www.saglik.gov.tr/extras/aileplanreh/bolum1a.pdf>. 2827 sayılı nüfus planlaması hakkında kanun. 1983.
17. Saultes, T.A., D. Devita, and J.D. Heiner, *The back alley revisited: sepsis after attempted self-induced abortion*. West J Emerg Med, 2009. **10**(4): p. 278-80.
18. Hasan, R., D.D. Baird, A.H. Herring, A.F. Olshan, M.L. Jonsson Funk, and K.E. Hartmann, *Association between first-trimester vaginal bleeding and miscarriage*. Obstet Gynecol, 2009. **114**(4): p. 860-7.
19. Halder, A. and A. Fauzdar, *Skewed sex ratio and low aneuploidy in recurrent early missed abortion*. Indian J Med Res, 2006. **124**(1): p. 41-50.
20. Christiansen, O.B., R. Steffensen, H.S. Nielsen, and K. Varming, *Multifactorial etiology of recurrent miscarriage and its scientific and clinical implications*. Gynecol Obstet Invest, 2008. **66**(4): p. 257-67.
21. B., Y., *Erken gebelik kayıplarında histeroskopi bulguları*, in *T.C.Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi*. 2006.
22. de Crespigny, L.C., D. Cooper, and M. McKenna, *Early detection of intrauterine pregnancy with ultrasound*. J Ultrasound Med, 1988. **7**(1): p. 7-10.
23. Dighe, M., C. Cuevas, M. Moshiri, T. Dubinsky, and V.S. Dogra, *Sonography in first trimester bleeding*. J Clin Ultrasound, 2008. **36**(6): p. 352-66.
24. Snell, B.J., *Assessment and management of bleeding in the first trimester of pregnancy*. J Midwifery Womens Health, 2009. **54**(6): p. 483-91.
25. Bulletti, C., C. Flamigni, and E. Giacomucci, *Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage*. Hum Reprod Update, 1996. **2**(2): p. 118-36.

26. Hannes, M., Y. Englert, W. Gotlieb, and E. Dupont, [*Recurrent spontaneous miscarriage*]. Rev Med Brux, 1992. **13**(4): p. 103-6.
27. Zinaman, M.J., E.D. Clegg, C.C. Brown, J. O'Connor, and S.G. Selevan, *Estimates of human fertility and pregnancy loss*. Fertil Steril, 1996. **65**(3): p. 503-9.
28. Reyniak, J.V., *Immunology of infertility*. Prog Clin Biol Res, 1981. **70**: p. 395-401.
29. Hill, J.A. and D.J. Anderson, *Immunological mechanisms in recurrent spontaneous abortion*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 1990. **38**(1-2): p. 111-9.
30. Coulam, C.B., *Association between infertility and spontaneous abortion*. Am J Reprod Immunol, 1992. **27**(3-4): p. 128-9.
31. Toner, J.P. and J.T. Flood, *Fertility after the age of 40*. Obstet Gynecol Clin North Am, 1993. **20**(2): p. 261-72.
32. Mishell, D.R., Jr., *Recurrent abortion*. J Reprod Med, 1993. **38**(4): p. 250-9.
33. Warren, J.E. and R.M. Silver, *Genetics of pregnancy loss*. Clin Obstet Gynecol, 2008. **51**(1): p. 84-95.
34. Pazol, K., S.B. Gamble, W.Y. Parker, D.A. Cook, S.B. Zane, and S. Hamdan, *Abortion surveillance - United States, 2006*. MMWR Surveill Summ, 2009. **58**(8): p. 1-35.
35. Nielsen, J. and M. Wohler, *Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark*. Hum Genet, 1991. **87**(1): p. 81-3.
36. Byrne, J., D. Warburton, J. Kline, W. Blanc, and Z. Stein, *Morphology of early fetal deaths and their chromosomal characteristics*. Teratology, 1985. **32**(2): p. 297-315.
37. Eiben, B., I. Bartels, S. Bahr-Porsch, S. Borgmann, G. Gatz, G. Gellert, R. Goebel, W. Hammans, M. Hentemann, R. Osmers, and et al., *Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage*. Am J Hum Genet, 1990. **47**(4): p. 656-63.
38. Hassold, T., M. Abruzzo, K. Adkins, D. Griffin, M. Merrill, E. Millie, D. Saker, J. Shen, and M. Zaragoza, *Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology*. Environ Mol Mutagen, 1996. **28**(3): p. 167-75.

39. Hassold, T., D. Pettay, A. Robinson, and I. Uchida, *Molecular studies of parental origin and mosaicism in 45,X conceptuses*. Hum Genet, 1992. **89**(6): p. 647-52.
40. Brancati, F., R. Mingarelli, and B. Dallapiccola, *Recurrent triploidy of maternal origin*. Eur J Hum Genet, 2003. **11**(12): p. 972-4.
41. Cowchock, F.S., Z. Gibas, and L.G. Jackson, *Chromosome errors as a cause of spontaneous abortion: the relative importance of maternal age and obstetric history*. Fertil Steril, 1993. **59**(5): p. 1011-4.
42. Warburton, D., L. Dallaire, M. Thangavelu, L. Ross, B. Levin, and J. Kline, *Trisomy recurrence: a reconsideration based on North American data*. Am J Hum Genet, 2004. **75**(3): p. 376-85.
43. Hassold, T.J., *A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions*. Am J Hum Genet, 1980. **32**(5): p. 723-30.
44. De Braekeleer, M. and T.N. Dao, *Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses*. Hum Reprod, 1990. **5**(5): p. 519-28.
45. *Thompson & Thompson Tibbi Genetik*. 6. ed. Vol. 9. 2005, Nussbaum R., McINNIS RR., WILLARD HF. 151.
46. Tharapel, A.T., S.A. Tharapel, and R.M. Bannerman, *Recurrent pregnancy losses and parental chromosome abnormalities: a review*. Br J Obstet Gynaecol, 1985. **92**(9): p. 899-914.
47. Carrell, D.T., A.L. Wilcox, L. Lowy, C.M. Peterson, K.P. Jones, L. Erickson, B. Campbell, D.W. Branch, and H.H. Hatasaka, *Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss*. Obstet Gynecol, 2003. **101**(6): p. 1229-35.
48. Shaw-Smith, C., R. Redon, L. Rickman, M. Rio, L. Willatt, H. Fiegler, H. Firth, D. Sanlaville, R. Winter, L. Colleaux, M. Bobrow, and N.P. Carter, *Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features*. J Med Genet, 2004. **41**(4): p. 241-8.
49. Wapner, R.J. and D. Lewis, *Genetics and metabolic causes of stillbirth*. Semin Perinatol, 2002. **26**(1): p. 70-4.
50. Robinson, W.P., C. Beever, C.J. Brown, and M.D. Stephenson, *Skewed X inactivation and recurrent spontaneous abortion*. Seminars in Reproductive Medicine, 2001. **19**(2): p. 175-81.

51. Sullivan, A.E., T. Lewis, M. Stephenson, R. Odem, J. Schreiber, C. Ober, and D.W. Branch, *Pregnancy outcome in recurrent miscarriage patients with skewed X chromosome inactivation*. *Obstet Gynecol*, 2003. **101**(6): p. 1236-42.
52. Sierra, S. and M. Stephenson, *Genetics of recurrent pregnancy loss*. *Seminars in Reproductive Medicine*, 2006. **24**(1): p. 17-24.
53. Koyuncu FM, T.A., *Spontan Abortuslar; Etiyoloji: Fetal Faktörler*. *J Surg Med Sci*, 2007. **3**: p. 7-11.
54. Stray-Pedersen, B., J. Eng, and T.M. Reikvam, *Uterine T-mycoplasma colonization in reproductive failure*. *Am J Obstet Gynecol*, 1978. **130**(3): p. 307-11.
55. Matovina, M., K. Husnjak, N. Milutin, S. Ciglar, and M. Grce, *Possible role of bacterial and viral infections in miscarriages*. *Fertil Steril*, 2004. **81**(3): p. 662-9.
56. Simpson, J.L., J.L. Mills, H. Kim, L.B. Holmes, J. Lee, B. Metzger, R. Knopp, L. Jovanovic-Peterson, J. Aarons, and M. Conley, *Infectious processes: an infrequent cause of first trimester spontaneous abortions*. *Hum Reprod*, 1996. **11**(3): p. 668-72.
57. Paukku, M., M. Tulppala, M. Puolakkainen, T. Anttila, and J. Paavonen, *Lack of association between serum antibodies to Chlamydia trachomatis and a history of recurrent pregnancy loss*. *Fertil Steril*, 1999. **72**(3): p. 427-30.
58. Rae, R., I.W. Smith, W.A. Liston, and D.C. Kilpatrick, *Chlamydial serologic studies and recurrent spontaneous abortion*. *Am J Obstet Gynecol*, 1994. **170**(3): p. 782-5.
59. Abalovich, M., S. Gutierrez, G. Alcaraz, G. Maccallini, A. Garcia, and O. Levalle, *Overt and subclinical hypothyroidism complicating pregnancy*. *Thyroid*, 2002. **12**(1): p. 63-8.
60. Rushworth, F.H., M. Backos, R. Rai, I.T. Chilcott, N. Baxter, and L. Regan, *Prospective pregnancy outcome in untreated recurrent miscarriers with thyroid autoantibodies*. *Hum Reprod*, 2000. **15**(7): p. 1637-9.
61. Stagnaro-Green, A., S.H. Roman, R.H. Cobin, E. el-Harazy, M. Alvarez-Marfany, and T.F. Davies, *Detection of at-risk pregnancy by means of highly sensitive assays for thyroid autoantibodies*. *JAMA*, 1990. **264**(11): p. 1422-5.
62. Pratt, D.E., G. Kaberlein, A. Dudkiewicz, V. Karande, and N. Gleicher, *The association of antithyroid antibodies in euthyroid nonpregnant women with recurrent first trimester abortions in the next pregnancy*. *Fertil Steril*, 1993. **60**(6): p. 1001-5.

63. Pearson, D.W., D. Kernaghan, R. Lee, and G.C. Penney, *The relationship between pre-pregnancy care and early pregnancy loss, major congenital anomaly or perinatal death in type I diabetes mellitus*. BJOG, 2007. **114**(1): p. 104-7.
64. Greene, M.F., *Spontaneous abortions and major malformations in women with diabetes mellitus*. Semin Reprod Endocrinol, 1999. **17**(2): p. 127-36.
65. Sagle, M., K. Bishop, N. Ridley, F.M. Alexander, M. Michel, R.C. Bonney, R.W. Beard, and S. Franks, *Recurrent early miscarriage and polycystic ovaries*. BMJ, 1988. **297**(6655): p. 1027-8.
66. Tulppala, M., U.H. Stenman, B. Cacciatore, and O. Ylikorkala, *Polycystic ovaries and levels of gonadotrophins and androgens in recurrent miscarriage: prospective study in 50 women*. Br J Obstet Gynaecol, 1993. **100**(4): p. 348-52.
67. Homburg, R., N.A. Armar, A. Eshel, J. Adams, and H.S. Jacobs, *Influence of serum luteinising hormone concentrations on ovulation, conception, and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome*. BMJ, 1988. **297**(6655): p. 1024-6.
68. Regan, L., E.J. Owen, and H.S. Jacobs, *Hypersecretion of luteinising hormone, infertility, and miscarriage*. Lancet, 1990. **336**(8724): p. 1141-4.
69. Ogasawara, M., K. Aoki, and Y. Hayashi, *A prospective study on pregnancy risk of antiphospholipid antibodies in association with systemic lupus erythematosus*. J Reprod Immunol, 1995. **28**(2): p. 159-64.
70. Lim, W., *Antiphospholipid antibody syndrome*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 233-9.
71. Regan, L. and R. Rai, *Thrombophilia and pregnancy loss*. J Reprod Immunol, 2002. **55**(1-2): p. 163-80.
72. Faulk, W.P. and J.A. McIntyre, *Immunological studies of human trophoblast: markers, subsets and functions*. Immunol Rev, 1983. **75**: p. 139-75.
73. *Worldwide collaborative observational study and meta-analysis on allogenic leukocyte immunotherapy for recurrent spontaneous abortion. Recurrent Miscarriage Immunotherapy Trialists Group*. Am J Reprod Immunol, 1994. **32**(2): p. 55-72.
74. Coulam, C.B. and C.H. Coulam, *Update on immunotherapy for recurrent pregnancy loss*. Am J Reprod Immunol, 1992. **27**(3-4): p. 124-7.

75. Salim, R., L. Regan, B. Woelfer, M. Backos, and D. Jurkovic, *A comparative study of the morphology of congenital uterine anomalies in women with and without a history of recurrent first trimester miscarriage*. Hum Reprod, 2003. **18**(1): p. 162-6.
76. *The American Fertility Society classifications of adnexal adhesions, distal tubal occlusion, tubal occlusion secondary to tubal ligation, tubal pregnancies, mullerian anomalies and intrauterine adhesions*. Fertil Steril, 1988. **49**(6): p. 944-55.
77. Rackow, B.W. and A. Arici, *Reproductive performance of women with mullerian anomalies*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2007. **19**(3): p. 229-37.
78. Jun, S.H., E.S. Ginsburg, C. Racowsky, L.A. Wise, and M.D. Hornstein, *Uterine leiomyomas and their effect on in vitro fertilization outcome: a retrospective study*. J Assist Reprod Genet, 2001. **18**(3): p. 139-43.
79. Surrey, E.S., A.K. Lietz, and W.B. Schoolcraft, *Impact of intramural leiomyomata in patients with a normal endometrial cavity on in vitro fertilization-embryo transfer cycle outcome*. Fertil Steril, 2001. **75**(2): p. 405-10.
80. Kodaman, P.H. and A. Arici, *Intra-uterine adhesions and fertility outcome: how to optimize success?* Curr Opin Obstet Gynecol, 2007. **19**(3): p. 207-14.
81. Simcox, R. and A. Shennan, *Cervical cerclage: a review*. Int J Surg, 2007. **5**(3): p. 205-9.
82. Armstrong, B.G., A.D. McDonald, and M. Sloan, *Cigarette, alcohol, and coffee consumption and spontaneous abortion*. Am J Public Health, 1992. **82**(1): p. 85-7.
83. Himmelberger, D.U., B.W. Brown, Jr., and E.N. Cohen, *Cigarette smoking during pregnancy and the occurrence of spontaneous abortion and congenital abnormality*. Am J Epidemiol, 1978. **108**(6): p. 470-9.
84. Floyd, R.L., P. Decoufle, and D.W. Hungerford, *Alcohol use prior to pregnancy recognition*. Am J Prev Med, 1999. **17**(2): p. 101-7.
85. Kline, J., P. ShROUT, Z. Stein, M. Susser, and D. Warburton, *Drinking during pregnancy and spontaneous abortion*. Lancet, 1980. **2**(8187): p. 176-80.
86. Gardella, J.R. and J.A. Hill, 3rd, *Environmental toxins associated with recurrent pregnancy loss*. Seminars in Reproductive Medicine, 2000. **18**(4): p. 407-24.
87. Greer, I.A., *Prevention of venous thromboembolism in pregnancy*. Best Pract Res Clin Haematol, 2003. **16**(2): p. 261-78.

88. Kupferminc, M.J., A. Eldor, N. Steinman, A. Many, A. Bar-Am, A. Jaffa, G. Fait, and J.B. Lessing, *Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy*. N Engl J Med, 1999. **340**(1): p. 9-13.
89. Greengard, J.S., X. Sun, X. Xu, J.A. Fernandez, J.H. Griffin, and B. Evatt, *Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va*. Lancet, 1994. **343**(8909): p. 1361-2.
90. McColl, M.D., J.E. Ramsay, R.C. Tait, I.D. Walker, F. McCall, J.A. Conkie, M.J. Carty, and I.A. Greer, *Risk factors for pregnancy associated venous thromboembolism*. Thromb Haemost, 1997. **78**(4): p. 1183-8.
91. Gerhardt, A., R.E. Scharf, M.W. Beckmann, S. Struve, H.G. Bender, M. Pillny, W. Sandmann, and R.B. Zotz, *Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium*. N Engl J Med, 2000. **342**(6): p. 374-80.
92. Poort, S.R., F.R. Rosendaal, P.H. Reitsma, and R.M. Bertina, *A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis*. Blood, 1996. **88**(10): p. 3698-703.
93. Verspyck, E., J.Y. Borg, V. Le Cam-Duchez, F. Goffinet, S. Degre, P. Fournet, and L. Marpeau, *Thrombophilia and fetal growth restriction*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2004. **113**(1): p. 36-40.
94. Grandone, E., M. Margaglione, D. Colaizzo, G. D'Andrea, G. Cappucci, V. Brancaccio, and G. Di Minno, *Genetic susceptibility to pregnancy-related venous thromboembolism: roles of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations*. Am J Obstet Gynecol, 1998. **179**(5): p. 1324-8.
95. Martinelli, P., E. Grandone, D. Colaizzo, D. Paladini, N. Sciannone, M. Margaglione, and G. Di Minno, *Familial thrombophilia and the occurrence of fetal growth restriction*. Haematologica, 2001. **86**(4): p. 428-31.
96. Makris, M., *Hyperhomocysteinemia and thrombosis*. Clin Lab Haematol, 2000. **22**(3): p. 133-43.
97. Kupferminc, M.J., *Thrombophilia and pregnancy*. Curr Pharm Des, 2005. **11**(6): p. 735-48.
98. Vefring, H., R.T. Lie, O.D. R, M.A. Mansoor, and S.T. Nilsen, *Maternal and fetal variants of genetic thrombophilias and the risk of preeclampsia*. Epidemiology, 2004. **15**(3): p. 317-22.

99. James, A.H., *Pregnancy and thrombotic risk*. Crit Care Med, 2010. **38**(2 Suppl): p. S57-63.
100. Akin H, Y.H., *Cytogenetic and FISH Analyses of the Abortus Materials: A Useful Approach Towards Genetic Counseling for the Couples with Recurrent Spontaneous Abortions*. Firat Tip Dergisi, 2004. **9**(3): p. 72-74.
101. Tischer, E., R. Mitchell, T. Hartman, M. Silva, D. Gospodarowicz, J.C. Fiddes, and J.A. Abraham, *The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing*. J Biol Chem, 1991. **266**(18): p. 11947-54.
102. Millauer, B., L.K. Shawver, K.H. Plate, W. Risau, and A. Ullrich, *Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant*. Nature, 1994. **367**(6463): p. 576-9.
103. Robinson, C.J. and S.E. Stringer, *The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 5): p. 853-65.
104. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis*. Recent Prog Horm Res, 2000. **55**: p. 15-35; discussion 35-6.
105. Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch, and Z. Poltorak, *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. FASEB J, 1999. **13**(1): p. 9-22.
106. Hood, J.D., C.J. Meininger, M. Ziche, and H.J. Granger, *VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells*. Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 2): p. H1054-8.
107. Valdes, G., P. Kaufmann, J. Corthorn, R. Erices, K.B. Brosnihan, and J. Joyner-Grantham, *Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy*. Reprod Biol Endocrinol, 2009. **7**: p. 79.
108. Lambrechts, D., E. Storkebaum, M. Morimoto, J. Del-Favero, F. Desmet, S.L. Marklund, S. Wyns, V. Thijs, J. Andersson, I. van Marion, A. Al-Chalabi, S. Bornes, R. Musson, V. Hansen, L. Beckman, R. Adolfsson, H.S. Pall, H. Prats, S. Vermeire, P. Rutgeerts, S. Katayama, T. Awata, N. Leigh, L. Lang-Lazdunski, M. Dewerchin, C. Shaw, L. Moons, R. Vlietinck, K.E. Morrison, W. Robberecht, C. Van Broeckhoven, D. Collen, P.M. Andersen, and P. Carmeliet, *VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death*. Nat Genet, 2003. **34**(4): p. 383-94.
109. Kim, B.S. and M.S. Goligorsky, *Role of VEGF in kidney development, microvascular maintenance and pathophysiology of renal disease*. Korean J Intern Med, 2003. **18**(2): p. 65-75.

110. Liu, Y., S.R. Cox, T. Morita, and S. Kourembanas, *Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer*. *Circ Res*, 1995. **77**(3): p. 638-43.
111. Fraser, H.M. and S.F. Lunn, *Angiogenesis and its control in the female reproductive system*. *Br Med Bull*, 2000. **56**(3): p. 787-97.
112. Geva, E. and R.B. Jaffe, *Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology*. *Fertil Steril*, 2000. **74**(3): p. 429-38.
113. Stouffer, R.L., J.C. Martinez-Chequer, T.A. Molskness, F. Xu, and T.M. Hazzard, *Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary*. *Arch Med Res*, 2001. **32**(6): p. 567-75.
114. Otani, N., S. Minami, M. Yamoto, T. Shikone, H. Otani, R. Nishiyama, T. Otani, and R. Nakano, *The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. **84**(10): p. 3845-51.
115. Ferrara, N., H. Chen, T. Davis-Smyth, H.P. Gerber, T.N. Nguyen, D. Peers, V. Chisholm, K.J. Hillan, and R.H. Schwall, *Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis*. *Nat Med*, 1998. **4**(3): p. 336-40.
116. Meduri, G., P. Bausero, and M. Perrot-Applanat, *Expression of vascular endothelial growth factor receptors in the human endometrium: modulation during the menstrual cycle*. *Biol Reprod*, 2000. **62**(2): p. 439-47.
117. Sherer, D.M. and O. Abulafia, *Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development*. *Placenta*, 2001. **22**(1): p. 1-13.
118. Chakraborty, I., S.K. Das, and S.K. Dey, *Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNAs in the mouse uterus around the time of implantation*. *J Endocrinol*, 1995. **147**(2): p. 339-52.
119. Winther, H., A. Ahmed, and V. Dantzer, *Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two specific receptors, Flt-1 and KDR, in the porcine placenta and non-pregnant uterus*. *Placenta*, 1999. **20**(1): p. 35-43.
120. Krussel, J., B. Behr, J. Hirchenhain, Y. Wen, A.A. Milki, S. Cupisti, P. Bielfeld, and M.L. Polan, *Expression of vascular endothelial growth factor mRNA in human preimplantation embryos derived from tripronuclear zygotes*. *Fertil Steril*, 2000. **74**(6): p. 1220-6.
121. Ferrara, N., K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K.S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K.J. Hillan, and M.W. Moore, *Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene*. *Nature*, 1996. **380**(6573): p. 439-42.

122. Fong, G.H., L. Zhang, D.M. Bryce, and J. Peng, *Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice*. Development, 1999. **126**(13): p. 3015-25.
123. Shalaby, F., J. Rossant, T.P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X.F. Wu, M.L. Breitman, and A.C. Schuh, *Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 62-6.
124. Vuorela, P., E. Hatva, A. Lymboussaki, A. Kaipainen, V. Joukov, M.G. Persico, K. Alitalo, and E. Halmesmaki, *Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta*. Biol Reprod, 1997. **56**(2): p. 489-94.
125. QIAN Dong, Z.C., *Functions of VEGF in female reproductive system*. Chinese Science Bulletin, 2003. **48**(3): p. 217-222.
126. Levin, E.R., G.F. Rosen, D.L. Cassidenti, B. Yee, D. Meldrum, A. Wisot, and A. Pedram, *Role of vascular endothelial cell growth factor in Ovarian Hyperstimulation Syndrome*. J Clin Invest, 1998. **102**(11): p. 1978-85.
127. Hunter, A., M. Aitkenhead, C. Caldwell, G. McCracken, D. Wilson, and N. McClure, *Serum levels of vascular endothelial growth factor in preeclamptic and normotensive pregnancy*. Hypertension, 2000. **36**(6): p. 965-9.
128. Fujimoto, J., H. Sakaguchi, R. Hirose, H. Wen, and T. Tamaya, *Angiogenesis in endometriosis and angiogenic factors*. Gynecol Obstet Invest, 1999. **48 Suppl 1**: p. 14-20.
129. Papazoglou, D., G. Galazios, M.I. Koukourakis, I. Panagopoulos, E.N. Kontomanolis, K. Papatheodorou, and E. Maltezos, *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and pre-eclampsia*. Mol Hum Reprod, 2004. **10**(5): p. 321-4.
130. Shim, J.Y., J.K. Jun, B.K. Jung, S.H. Kim, H.S. Won, P.R. Lee, and A. Kim, *Vascular endothelial growth factor gene +936 C/T polymorphism is associated with preeclampsia in Korean women*. Am J Obstet Gynecol, 2007. **197**(3): p. 271 e1-4.
131. Vuorela, P., O. Carpen, M. Tulppala, and E. Halmesmaki, *VEGF, its receptors and the tie receptors in recurrent miscarriage*. Mol Hum Reprod, 2000. **6**(3): p. 276-82.
132. Rabbani, M.L. and P.A. Rogers, *Role of vascular endothelial growth factor in endometrial vascular events before implantation in rats*. Reproduction, 2001. **122**(1): p. 85-90.

133. Rowe, A.J., C. Wulff, and H.M. Fraser, *Localization of mRNA for vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietins and their receptors during the peri-implantation period and early pregnancy in marmosets (Callithrix jacchus)*. *Reproduction*, 2003. **126**(2): p. 227-38.
134. te Velde, E.A., N. Exalto, P. Hesseling, and H.C. van der Linden, *First trimester development of human chorionic villous vascularization studied with CD34 immunohistochemistry*. *Hum Reprod*, 1997. **12**(7): p. 1577-81.
135. Zygmunt, M., F. Herr, K. Munstedt, U. Lang, and O.D. Liang, *Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003. **110 Suppl 1**: p. S10-8.
136. Krussel, J.S., B. Behr, A.A. Milki, J. Hirchenhain, Y. Wen, P. Bielfeld, and M. Lake Polan, *Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA splice variants are differentially expressed in human blastocysts*. *Mol Hum Reprod*, 2001. **7**(1): p. 57-63.
137. Shiraishi, S., K. Nakagawa, N. Kinukawa, H. Nakano, and K. Sueishi, *Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the human placenta*. *Placenta*, 1996. **17**(2-3): p. 111-21.
138. Sharkey, A.M., D.S. Charnock-Jones, C.A. Boocock, K.D. Brown, and S.K. Smith, *Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta*. *J Reprod Fertil*, 1993. **99**(2): p. 609-15.
139. Zhou, Y., M. McMaster, K. Woo, M. Janatpour, J. Perry, T. Karpanen, K. Alitalo, C. Damsky, and S.J. Fisher, *Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome*. *Am J Pathol*, 2002. **160**(4): p. 1405-23.
140. Banyasz, I., S. Szabo, G. Bokodi, A. Vannay, B. Vasarhelyi, A. Szabo, T. Tulassay, and J. Rigo, Jr., *Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe pre-eclampsia*. *Mol Hum Reprod*, 2006. **12**(4): p. 233-6.
141. Brown, K.R., K.M. England, K.L. Goss, J.M. Snyder, and M.J. Acarregui, *VEGF induces airway epithelial cell proliferation in human fetal lung in vitro*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. **281**(4): p. L1001-10.
142. Galan, A., R. Herrer, J. Remohi, A. Pellicer, and C. Simon, *Embryonic regulation of endometrial epithelial apoptosis during human implantation*. *Hum Reprod*, 2000. **15 Suppl 6**: p. 74-80.
143. Coulam, C.B. and R.S. Jeyendran, *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss*. *Am J Reprod Immunol*, 2008. **59**(4): p. 301-5.

144. Lee, H.H., S.H. Hong, S.J. Shin, J.J. Ko, D. Oh, and N.K. Kim, *Association study of vascular endothelial growth factor polymorphisms with the risk of recurrent spontaneous abortion*. Fertil Steril, 2010. **93**(4): p. 1244-7.
145. Choi, H.K., B.C. Choi, S.H. Lee, J.W. Kim, K.Y. Cha, and K.H. Baek, *Expression of angiogenesis- and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy loss patients*. Mol Reprod Dev, 2003. **66**(1): p. 24-31.
146. Brogan, I.J., N. Khan, K. Isaac, J.A. Hutchinson, V. Pravica, and I.V. Hutchinson, *Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene*. Hum Immunol, 1999. **60**(12): p. 1245-9.
147. Steffensen, K.D., M. Waldstrom, I. Brandslund, and A. Jakobsen, *The relationship of VEGF polymorphisms with serum VEGF levels and progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2010.
148. Shahbazi, M., A.A. Fryer, V. Pravica, I.J. Brogan, H.M. Ramsay, I.V. Hutchinson, and P.N. Harden, *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(1): p. 260-4.
149. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=699947.
150. Watson, C.J., N.J. Webb, M.J. Bottomley, and P.E. Brenchley, *Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production*. Cytokine, 2000. **12**(8): p. 1232-5.
151. Renner, W., S. Kotschan, C. Hoffmann, B. Obermayer-Pietsch, and E. Pilger, *A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels*. J Vasc Res, 2000. **37**(6): p. 443-8.
152. Krippel, P., U. Langsenlehner, W. Renner, B. Yazdani-Biuki, G. Wolf, T.C. Wascher, B. Paulweber, J. Haas, and H. Samonigg, *A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk*. Int J Cancer, 2003. **106**(4): p. 468-71.
153. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3025039.
154. Kano, T., T. Mori, M. Furudono, T. Kanda, Y. Maeda, S. Tsubokura, T. Ushiroyama, and M. Ueki, *Sex differences of abortuses and neonates in women with allo-immune recurrent abortions*. Reprod Biomed Online, 2004. **9**(3): p. 306-11.

155. Kano, T., T. Mori, and A. Kimura, *Gender ratio distortion in abortuses and live births from patients with recurrent spontaneous abortion*. Am J Reprod Immunol, 2009. **62**(3): p. 125-7.
156. http://www.tuik.gov.tr/AltKategori.do?ust_id=11.
157. Henshaw SK, K.K., *Trends in the characteristics of women obtaining abortions, 1974 to 2004*. 2008, Guttmacher Institute: New York.
158. Oztekin, O., D. Oztekin, S. Tinar, and Z. Adibelli, *Ultrasonographic diagnosis of fetal structural abnormalities in prenatal screening at 11-14 weeks*. Diagn Interv Radiol, 2009. **15**(3): p. 221-5.
159. Doi, K., E. Noiri, A. Nakao, T. Fujita, S. Kobayashi, and K. Tokunaga, *Functional polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene are associated with development of end-stage renal disease in males*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(3): p. 823-30.
160. Papazoglou, D., G. Galazios, K. Papatheodorou, V. Liberis, N. Papanas, E. Maltezos, and G.B. Maroulis, *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss*. Fertil Steril, 2005. **83**(4): p. 959-63.
161. Liu, Q., Y. Li, J. Zhao, D.L. Sun, Y.N. Duan, N. Wang, R.M. Zhou, and S. Kang, *Association of polymorphisms -1154G/A and -2578C/A in the vascular endothelial growth factor gene with decreased risk of endometriosis in Chinese women*. Hum Reprod, 2009. **24**(10): p. 2660-6.
162. Kang, S., J. Zhao, Q. Liu, R. Zhou, N. Wang, and Y. Li, *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with the risk of developing adenomyosis*. Environ Mol Mutagen, 2009. **50**(5): p. 361-6.
163. Smedts, H.P., A. Isaacs, D. de Costa, A.G. Uitterlinden, C.M. van Duijn, A.C. Gittenberger-de Groot, W.A. Helbing, E.A. Steegers, and R.P. Steegers-Theunissen, *VEGF polymorphisms are associated with endocardial cushion defects: a family-based case-control study*. Pediatr Res, 2010. **67**(1): p. 23-8.
164. Lin, J.M., L. Wan, Y.Y. Tsai, H.J. Lin, Y. Tsai, C.C. Lee, C.H. Tsai, S.H. Tseng, and F.J. Tsai, *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in age-related macular degeneration*. Am J Ophthalmol, 2008. **145**(6): p. 1045-1051.
165. Bae, S.J., D.H. Ahn, S.P. Hong, H. Kang, S.G. Hwang, D. Oh, and N.K. Kim, *Gender-specific association between polymorphism of vascular endothelial growth factor (VEGF 936C>T) gene and patients with stomach cancer*. Yonsei Med J, 2008. **49**(5): p. 783-91.

166. Vidaurreta, M., R. Sanchez-Munoz, S. Veganzones, S. Rafael, M. Gutierrez, V. de la Orden, C. Fernandez, M. Arroyo, F.J. Cerdan, and M. Maestro, *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in patients with colorectal cancer*. Rev Esp Enferm Dig, 2010. **102**(1): p. 20-31.
167. Elito, J., Jr., S. Daher, M.O. Fernandes da Silva, N.M. Marconi, K.P. Pendeloski, A.F. Moron, and L. Camano, *Association study of vascular endothelial growth factor and polymorphisms of its gene with ectopic pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(2): p. 120-5.

8. ÖZET

Spontan abortus, gebeliğin 20. gebelik haftasından önce herhangi bir müdahale olmaksızın sonlanması olarak tanımlanır ve üreme çağındaki kadınların belki de en yaygın problemidir. Özellikle erken spontan abortusların etiyopatogenezinde %50-60 oranında kromozomal anormallikler tespit edilirken olguların önemli bir kısmında herhangi bir sebep bulunamamaktadır. Biz bu çalışmamızda 2007-2010 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na gönderilen spontan abortus materyalleri arasından karyotipi normal saptanan 81 örnekte etiyopatogenezden sorumlu olabileceğine dair önemli bilgi birikimi bulunan VEGF genine ait fonksiyonel olduğu daha önce gösterilmiş -2578 C/A ve 936 C/T polimorfizmlerini araştırdık.

Kontrol grubu olarak sağlıklı 50 adet kadın ve 50 adet erkekte bu polimorfizmleri karşılaştırdığımızda 936 C/T polimorfizminin abortus örneklerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde riski artırdığını saptadık. -2578 C/A polimorfizminin ise abortus ve kontrol grubunda farklı olmadığını gösterdik.

VEGF, kadın reproduktif sisteminin normal fizyolojisi ve normal gebeliğin implantasyon, embriyogenez ve ileriki haftalarında önemli görevleri olan bir büyüme faktörüdür. Başlıca görevleri vasküler permeabilite artışı, anjiyogenez, trofoblast invazyon ve infiltrasyonu, neovaskülarizasyon, damar endotelinin apoptozisten korunmasıdır.

Daha önce VEGF ve spontan abortus ilişkisi çok sayıda olmayan çalışmalarda maternal DNA ile çalışılmış olmasına karşın fetal DNA örnekleri ile yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu açıdan dünyada yapılmış ilk çalışma olma özelliğindedir. Ayrıca ülkemizde VEGF genine ait bu polimorfizmlerin çalışıldığı bir araştırmaya da rastlanmamıştır. Polimorfizmlerin allel frekansları popülasyonlarda farklılıklar gösterebilirler. Bu anlamda da bu polimorfizmlerin ülkemizdeki allel frekanslarının belirlendiği ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Biz bu çalışmadan elde ettiğimiz veriler ışığında Türk toplumunda VEGF geni 936 C/T polimorfizminin önemli bir halk sağlığı problemi olan spontan abortus için tek başına yaklaşık 3,5 kat risk oluşturduğunu saptadık. Sonuç olarak VEGF polimorfizmleri spontan abortus patogenezinde rol oynayabilir.

Anahtar Kelimeler: Spontan abortus, VEGF, Polimorfizm

9. ABSTRACT

Spontaneous abortion, accepted as a noninduced embryonic or fetal death before the 20th week of pregnancy. It is a very common problem among women. The main etiology of spontaneous abortions in 50-60 % of cases is chromosomal whereas the etiology of the remaining spontaneous abortions is unknown. In our study, we aimed to investigate two common polymorphisms, -2578 C/A and 936 C/T in the VEGF gene, which were previously reported to be associated with spontaneous abortions. Eighty-one normal karyotyped spontaneous abortions found at the Ege University Medical Faculty Medical Genetics Department between 2007-2010 were included in the study.

VEGF, is a growth factor which plays a multifunctional role in the normal female reproductive system, implantation of the embryo, and embryogenesis. The primary functions of VEGF are to increase vascular permeability, angiogenesis, invasion and infiltration of trophoblast, neovascularisation and the protection of vascular endothel from apoptosis.

In previous studies the relation between VEGF and abortions were examined in maternal serum. This is the first study to report the role of VEGF in fetal DNA samples of spontaneous abortions and is also the first report to study the allele frequencies of VEGF in a Turkish population. 936 C/T polymorphism was found to be higher in the patient group compared to the control group which included 50 healthy men and 50 women. The other polymorphism -2578 C/A did not differ statistically between the cases and controls.

In our study, the VEGF gene 936 C/T polymorphism was found to increase the risk of abortion 3.5 times. In conclusion, VEGF polymorphisms may play a role in the pathogenesis of spontaneous abortions.

Key Words: Spontaneous Abortion, VEGF, polymorphism