

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Koray ELTER

**NEDENİ AÇIKLANAMAYAN TEKRARLAYAN
GEBELİK KAYIPLARINDA VASKÜLER ENDOTELYAL
BÜYÜME FAKTÖRÜ GENETİK VARYASYONLARININ
ARAŞTIRILMASI**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Mehmet ÇETİN

EDİRNE-2014

TEŐEKKÖR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve mesleki tecrübelerimin oluşmasındaki katkıları nedeniyle başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Füsun VAROL'a, tezimin oluşmasında yol gösterici ve uzmanlık eğitimimde büyük katkıları olan, tez yöneticim Prof. Dr. Koray ELTER'e, Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyesi Prof. Dr. N. Cenk SAYIN'a, Yrd. Doç. Dr. Vedat UĞUREL'e, Yrd. Doç. Dr. Z. Nihal DOLGUN'a, tüm çalışma arkadaşlarıma, desteklerini her zaman yanımda hissettiğim aileme ve sevgili eşim Çisem'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
ABORTUS	3
ABORTUS TANISI	5
HABİTÜEL ABORTUS	5
VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)	15
GEREÇ VE YÖNTEM	22
BULGULAR	25
TARTIŞMA	31
SONUÇLAR	37
ÖZET	39
SUMMARY	41
KAYNAKLAR	43
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

ACTH	: Adrenokortikotropik Hormon
aFA	: Antifosfolipid Antikorları
AFS	: Antifosfolipid Sendromu
ALS	: Amyotropik Lateral Skleroz
CGH	: Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
CRL	: Crown Rump Length (Baş-popo mesafesi)
DM	: Diabetes Mellitus
FGF	: Fibroblast Growth Factor (Fibroblast Büyüme Faktörü)
FISH	: Flörosan İnsitu Hibridizasyon
FLK1	: Fetal Liver Kinase 1
F-VL	: Faktör V Leiden
GF1	: Growth Factor 1(Büyüme Faktörü 1)
HLA	: Human Leukocyte Antigen (İnsan lökosit antijen)
HRE	: Hipoksi Cevap Elementi
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IUFGG	: İntrauterin Fetal Gelişme Gerilikleri
KDR	: Kinase insert Domain Receptor (Kinaz İlaveli Domain Reseptörü)
MTHFR	: Metilentetrahidrofolat Redüktaz
NO	: Nitrik Oksit
NOS3	: Nitrik Oksit Sentetaz 3
OD	: Otozomal Dominant

- OGTT** : Oral Glukoz Tolerans Testi
- OHSS** : Ovaryan Hiperstünilasyon Sendromu
- PDGF** : Platelet-Derived Growth Factor (Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü)
- PKOS** : Polikistik Over Sendromu
- SLE** : Sistemik Lupus Eritematozus
- TGF- β** : Transforming Growth Factor beta (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta)
- TGK** : Tekrarlayan Gebelik Kayıpları
- TORCH** : Toxoplasmosis, Other (Sifiliz, Varicella –zoster), Rubella, Cytomegalovirus,
Herpes simplex virus (HSV)
- TSH** : Tiroid Stimulan Hormon
- USG** : Ultrasonografi
- VEGF** : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
- β hCG** : Humon Koryonik Gonadotropin

GİRİŞ VE AMAÇ

Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK), genellikle 20 haftalık gestasyon süresinden önce fetusun düşüğü (kaybı) ile sonuçlanan mükerrer gebeliklerin ortaya çıkma durumudur. Rahim anomalisi, kromozom anomalileri, endokrin disfonksiyonu, trombofili, bağışıklık bozuklukları, yaşam tarzı faktörleri ve maternal enfeksiyonlar dahil olmak üzere düşüğü etkileyen çeşitli faktörler belirlenmiştir (1). Bununla beraber, TGK' yı tecrübe eden hastaların %50' sine kadarki kısım içinde, temelde yatan sebepler belirsiz kalmıştır (2).

Tekrarlayan gebelik kaybı üreme çağındaki kadınların yaklaşık %1-2'sinde ortaya çıkar (3). Etyolojide güncel olarak %15-20 antifosfolipid sendrom, %10-15 anatomik anomaliler, %5-15 hormonal ya da metabolik problemler, %2-4 sitogenetik bozukluklar, %1-2 alloimmün faktörler ve %50-60 açıklanamayan TGK yer almaktadır (4). Vakaların en az yarısında etyoloji aydınlatılamamaktadır.

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) bir potent anjiyogenetik faktördür ve endotelyal hücre proliferasyonunun primer düzenleyicisidir (5). VEGF geni, fizyolojik ve tümör anjiogenezi esnasında endotelyal hücreler için yaşamı sürdürme faktörüdür ve vazodilatasyon, vasküler permeabilite ve anti-apoptosis fonksiyonları vardır (5, 6).

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü, oosit maturasyonunda, desidüalize endometrial vaskülarizasyonda, erken gestasyonda embriyo implantasyonu/gelişimi ve plasenta anjiogenezi/vaskülarizasyonunda kritik bir rol oynamaktadır (7-10).

Plasental damarsal anormallikler; gebelik kaybı, intrauterin fetal ölüm, intrauterin gelişme geriliği ve preeklampsi de dahil olmak üzere çeşitli gebelik komplikasyonlarına neden olabilir (11, 12).

Gebeliğin erken dönemlerinde, koryon villus damarlanma durumu embriyonik gelişim ile yakından ilişkilidir ve spontan düşüklere desidual endotelinde azalmış plasental trofoblastik VEGF tarif edilmiştir (13).

İlk olarak 2005 yılında Papazoglou ve ark. (14), tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan kadınlarda VEGF polimorfizmini araştırmışlar ve VEGF geni -1154 G/A, 936 C/T, -634 C/G ve 2578 C/A polimorfizmlerinin, nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkili olmadığını rapor etmişlerdir. Ancak daha sonra yapılan çalışmaların bir kısmında ise TGK ile bu gen polimorfizmleri arasında anlamlı ilişki olduğu rapor edilmiştir.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları polikliniği ve Tıbbi Genetik polikliniğine başvuran, aynı partnerle 20 haftadan önce en az 2 ardışık spontan gebelik kaybı olan 46, XX kromozom yapısına sahip hastalarda VEGF gen polimorfizmlerinin gebelik kayıplarıyla ilişkisini araştırdık.

Çalışmaya dahil edilen hastaların yapılan tetkiklerinde ve muayenelerinde gebelik kaybına neden olabilecek anatomik, kan biyokimyası, hormonal, infeksiyöz ve otoimmün hastalık gibi bir neden yoktu. Ayrıca Tıbbi Genetik polikliniğinde yapılan tetkiklerde Faktör V Leiden mutasyonu heterozigot ve/veya homozigot olanlar, Protrombin gen mutasyonu heterozigot ve/veya homozigot mutant olan hastalar ile MTHFR 677 ve MTHFR 1298 polimorfizmleri homozigot mutant olanlar çalışmaya dahil edilmedi.

Nedenini açıklayamadığımız habituel abortuslu 45 hasta grubu ile en az bir sağlıklı doğum yapmış ve hiç gebelik kaybı olmayan 90 kişilik kontrol grubundan alınan maternal kanlar VEGF gen polimorfizmlerine ait kitlelerle çalışıldı. Daha sonra bu gen polimorfizmlerinin genotip ve allel frekanslarını belirleyip ortaya çıkan sonuçları karşılaştırdık.

Çalışma, erken gebelikte, plasenta oluşumunda anjiyogenezin önemini göz önünde tutup, ayrıca VEGF geninin riskli alellerini taşıyan kadınların düşüğe daha yatkın olduğu sonucuna varılan çalışmalardan yola çıkarak, VEGF ve 2578A, -1154A, -634G ve 936T alellerinin nedeni açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıplarındaki rolünü araştırmayı amaçlayan bir çalışmadır.

GENEL BİLGİLER

ABORTUS

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre abortus, 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 tanımlanmıştır. Abortuslar oluş zamanları, oluş şekilleri ve klinik seyrine göre sınıflandırılabilirler.

Oluş Zamanlarına Göre Abortuslar

Oluş zamanlarına göre abortuslar 3 grupta incelenir:

Subklinik abortus: Henüz gebelik tanısı konulmadan meydana gelen abortuslardır (15). Normal zamanında veya birkaç gün gecikme sonrası menstruasyon ile gebelik sonlanır.

Erken abortus: 12.hafta sonuna kadar, yani birinci trimesterde oluşan abortuslardır. Tespit edilebilen abortusların %80 kadarı bu dönemde meydana gelir ve en az %50'si fetal kromozomal anomaliler sonucu ortaya çıkar (16).

Geç abortus: 13-20 haftalar arasında oluşan abortuslardır.

Oluş Şekillerine Göre Abortuslar

Oluş şekillerine göre abortuslar 2 grupta incelenir:

Spontan Abortus: Gebeliğin 20.haftadan önce herhangi bir girişim olmaksızın kendiliğinden sonlanmasıdır. Anne yaşı arttıkça spontan abortus görülme sıklığı artar. Bu oran 20-24 yaş grubundaki annelerde yaklaşık %8 iken 40 yaşından sonra ise %26'ya yükselir (17). Spontan abortus görülme sıklığı önceki obstetrik öykü ile de ilişkilidir. Önceki gebeliği başarılı olan ve anormal obstetrik öyküsü bulunmayan anne adaylarında düşük oranı %4-6

dolaylıdır. Ancak önceki gebeliği kendiliğinden sonlanan anne adaylarında ise bu oran %19-24 olarak tespit edilmiştir. İki kez kendiliğinden düşük sonrası bu oran %24, üç kayıptan sonra %30, 4 ve daha fazla düşük var ise %50'lere kadar çıkmaktadır (1, 18).

Provoke abortus: 2 alt grupta incelenir:

Medikal (terapotik) abortus: Fetüste kromozom anomalisi, gebeliğin devamının hayati tehlike oluşturduğu ağır maternal hastalıklar, ciddi anormal ultrasonografi (USG) bulguları, TORCH (Toxoplasmosis, Other (Sifiliz, Varicella –zoster), Rubella, Cytomegalovirus, Herpes simplex virus (HSV) enfeksiyonu, teratojen ilaç kullanımı gibi nedenlerle gebeliğin sonlandırılmasıdır.

İstemli abortus: Fetüs veya anne için herhangi bir tıbbi risk yok iken gebeliğin sonlandırılmasıdır. Ülkemizde 10.gebelik haftasına kadar gebeliğin eşlerin isteği ile sonlandırılması 2827 sayılı “Nüfus Planlamasına Dair Kanun” vasıtasıyla yasal güvence altına alınmıştır. Yine aynı kanun ile medikal ve elektif gebelik sonlandırma şartları belirlenmiştir (19). Kişinin kendisi ya da bir başkasının uygun olmayan koşullarda gebeliği sonlandırması kriminal abortus, bu işlem esnasında genital organlarda enfeksiyon oluşması sonrası düşüğün gerçekleşmesine septik abortus adı verilir (20).

Klinik Seyrine Göre Abortuslar

Klinik seyrine göre abortuslar 5 grupta incelenir:

Abortus imminens (düşük tehdidi): Gebeliğin 20.haftasından önce vajinal kanama olması şeklinde tanımlanır. İlk aylarda gebelerin yaklaşık %25'inde spot tarzında vajinal kanama görülebilir. İlk trimester şiddetli vajinal kanamalarında düşük riski belirgin şekilde artar (21).

Abortus incipiens (Önlenemeyen düşük): Servikal dilatasyona ilave olarak gros membran rüptürü şeklinde kendini gösterir. Abortus genellikle kaçınılmazdır.

Missed abortuslar: Bir hafta arayla yapılan USG izleminde düzensiz gebelik kesesi ve düzensiz embriyonal imajın birkaç haftada gelişmediğinin izlenmesi olarak tanımlanır. İn-utero ölü fetus mevcuttur ve dışarı atılamamıştır. Etyolojisinde kromozomal anomaliler, polikistik over sendromu, hormonal düzensizlikler, uterus anomalileri ve immünolojik bozukluklar suçlanmıştır (22).

Habituel abortuslar: Tekrarlayan gebelik kayıplarının değerlendirilmesini haklı çıkaran veya araştırma alanını tanımlayan belirlenmiş gebelik kayıp sayısı veya kesin olarak saptanmış kriter yoktur. Kararlar bireyselleştirilmeli ve anne yaşı, erken gebelik kayıp zamanı, kişinin ve ailenin tıbbi öyküsü, çiftin kaygı durumu dikkate alınmalıdır. Günümüzde

TGK çoğunlukla üç veya daha fazla gebelik kaybı (ard arda olması gerekmeden) olarak tanımlanmaktadır (23). Çoğu araştırmacı ayrıca arka arkaya iki spontan gebelik kaybı ve aşağıdakilerden birisinin olması durumunda klinik değerlendirme ve tedavinin uygun olacağını düşünmektedir:

- Erken gebelik kaybı öncesi gözlenmiş embriyonik kalp aktivitesi
- Erken gebelik materyalinde normal karyotip
- Anne yaşının 35'in üzerinde olması
- İnfertilite

Septik abortuslar: Genellikle güvensiz, uygun olmayan şartlarda kontamine bir cisimle düşük yaptırma girişimi neticesinde meydana gelen yaygın enfeksiyon tablosu ile karakterizedir (20).

ABORTUS TANISI

Son adet tarihi, adet düzeni, kanama olup olmadığı, kanama varsa miktarı, parça düşürme olup olmadığı sorgulanmalıdır. Pelvik muayenede kanamanın yeri, miktarı, servikal açılmanın kontrolü ve düşük materyalinin kavite dışına atılıp atılmadığı görülür. Tuşe ile muayenede ise servikal açıklık, uterus büyüklüğü, hassasiyet varlığı ve kıvamı araştırılır. Ultrasonografi, ucuz ve basit bir tanı aracıdır ve ilk trimester gebelik kayıplarının tanısı ve ayırıcı tanısında oldukça kıymetlidir. Erken gebelikte yapılan USG fetal riskleri veya neredeyse gerçekleşecek olan fetal kaybı gösteren bulguları meydana çıkarabilir. USG ile gebelik tanısı en erken 4 hafta 3 günlük iken oluşan gestasyonel sac (gebelik kesesi)' in görüntülenmesi ile konabilir (24). Gebelik tanısı için otörler kanda β hCG seviyesi ile birlikte değerlendirilmesini önermektedir (25). Erken dönem yapılan USG ile fetal kayıp öngörülebilir. Daha önce izlenmiş olan kardiyak aktivitenin kaybı %100 fetal kayıp olarak değerlendirilir. Fetal gelişme geriliği, amniyon sıvıda azalma, kese çapı ile Crown-rump length (CRL) farkı, subkoryonik ve intra uterin hematoma da fetal kayıp lehine olan bulgulardır (26).

HABİTÜEL ABORTUS

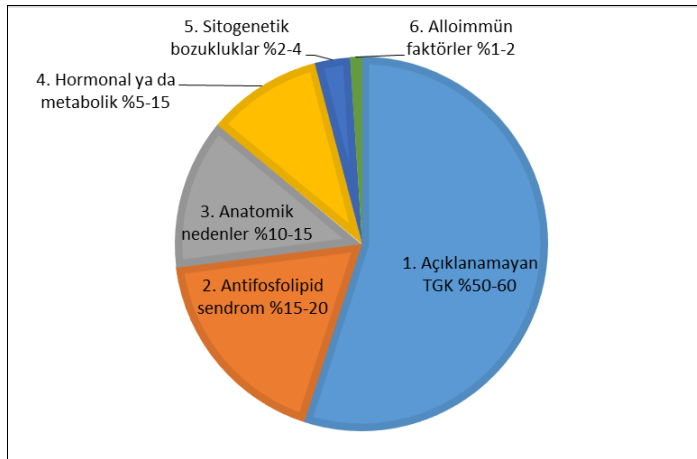
Başarılı bir gebelik ve sağlıklı bir çocuk amaçlayan eşler için tekrarlayan gebelik kayıpları (TGK) bilinmezlik, büyük bir hayal kırıklığı ile birlikte korku uyandıran, tedavisi ve etyolojisiyle birçok faktörü içinde barındıran zor bir klinik durumdur. Duygusal açıdan zor bir

süreç olmasının yanında, tanı ve tedavi uygulamaları hakkında da yetersiz ve kimi zaman çelişkili tıbbi kanıtların bulunması, bu klinik durumun yönetimini daha da zorlaştırmaktadır.

Tekrarlayan gebelik kayıpları ile klasik olarak 20 haftanın altında ardarda gerçekleşen üç ya da daha fazla gebelik kaybı kastedilmektedir. Molar gebelik, ektopik gebelik ve biyokimyasal gebelik bu tanımlamaya dahil değildir. Bazı cemiyetler kayıp sayısını üç olarak kullanırken, bazıları da iki kaybı da bu terminoloji içine dahil etmektedirler. Yüksek duyarlıklı gebelik testi ile tanımlanan gebeliklerin de bu terminolojiye dahil edilmesini savunanlar olsa da, genel olarak gebelik denildiğinde ultrasonografik ya da histopatolojik olarak tanısı konulan gebelikler kastedilmektedir.

Bir sonraki gebelikte düşüğün gerçekleşme ihtimali gözönüne alındığında, ilginç olarak öyküsünde 2 ya da 3 tekrarlayan gebelik kaybı yapmış olmanın arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (bu risk 2 ve üzeri gebelik kaybı yaşayanlarda ortalama %29 iken 3 ve üzeri kaybı olanlarda %31 olarak gözükmektedir) (27, 28). Bu bilgiler ışığında erken değerlendirmeye başlamanın ne denli önemli olduğu sonucuna varılabilir. Dolayısıyla 2 ve üzeri düşük öyküsü olan hastalarda etyolojinin araştırılmasına başlamak daha mantıklı gözükmektedir.

Tanı konulan hastalar primer ya da sekonder TGK olarak iki alt grupta değerlendirilebilir. Primer TGK'da kadının tüm gebelikleri kayıp ile sonuçlanmıştır. Sekonder TGK'da ise sağlıklı bir ya da üzeri gebelik sonrası tekrarlayan düşükler izlenmiştir.



Şekil 1. Tekrarlayan gebelik kayıpları olgularında etyolojik faktörler (4)

Tekrarlayan Gebelik Kayıpları için Risk Faktörleri

Güncellenmiş bilgiler ve araştırmalar sonucunda, TGK için kanıtlanmış az sayıda etyolojik faktör bulunmaktadır. TGK etyolojisi konusunda henüz yeterli kanıt olmamakla

birlikte etyolojiyi aydınlatma yönünde önemli araştırmalar devam etmektedir. Bu bilimsel tablodan, tanımlamadaki farklılıklar, bilgilerin daha çok spontan düşükler hakkında olması, bazı moleküler ve immünolojik mekanizmaların henüz net olarak aydınlatılmamış olması ve çalışma grupları arasında homojenliğin sağlanamaması sorumludur. Bu bilgiler ışığında günümüzdeki tüm araştırmalar baz alındığında, TKG olgularının yaklaşık olarak yarısı henüz açıklanamamış olarak önümüzde duracaktır (Şekil 1).

Tekrarlayan gebelik kayıpları için sıklıkla irdelenmiş risk faktörleri ve olası etyolojiler şunlardır;

Epidemiyolojik ve çevresel faktörler: Anne yaşı ve önceki gebelik kaybı hikayesi, sonraki düşükler için bağımsız birer risk faktörü olarak gözükmektedir (29). Düşük prevelansı ilerleyen anne yaşı ve mevcut gebeliğin çok erken haftada olması (6 haftadan küçük) ile artmaktadır. Özellikle 35 yaşından sonra düşük prevelansı belirgin bir artış göstermekte ve 40 yaşın üzerinde %50'nin üzerine çıkmaktadır. Paternal yaş için de benzer bir ilişki belirtilmiş olup 40 ve üzerindeki yaşlarda fetal kaybın daha sık olduğu belirtilmiştir (30).

Çevresel faktörler için yeterli kanıt düzeyinde veri bulunmamakla birlikte, sigara ve alkol en önemli ve sık izlenen ajan olarak göze çarpmaktadır. Düşük seviyede alkol tüketimi için yeterli kanıt bulunmasa da, orta-yüksek düzeyde alkol tüketimi ölü doğum riskini de arttırdığı gibi embriyotoksik olduğu için düşük riskini de artırmaktadır (31). Sigara için mevcut bilgiler yeterli güçte olmamakla birlikte güncel bir prospektif kohort çalışmada düşük prevelansı ile sigara içme arasında anlamlı bir ilişki gösterilmiştir (32). Dikkat çekilmesi gereken önemli bir nokta da obezite ile spontan düşükler ve açıklanamamış TKG arasında muhtemel bir neden sonuç ilişkisi bulunduğu (33).

Endokrin ve metabolik faktörler: Endokrin faktörler ve TKG arasındaki ilişki çok geniş bir yelpazede tartışılmaktadır. Bunlar faktörler başlıca; luteal faz yetmezliği, diabetes mellitus, tiroid bozuklukları, polikistik over sendromu ve hiperprolaktinemidir.

Luteal faz yetmezliği: Başarılı bir implantasyon, trofoblast invazyonu ve sağlıklı bir gebelik için luteal fazla ve erken gebelikte rol oynayan faktörlerin hayati önemleri olduğu tartışılmazdır (34). Yetersiz progesteron salgısı nedeniyle endometrial histolojik yaş tayininin tanısız değeri olduğu savunulsa da, bu işlemler tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlar vermemiştir (35). Serum progesteron değerleri ile gebelik başarısı arasında ispatlanmış bir ilişki olmamakla birlikte, progesterone takviyesinin riskli olgularda erken gebelik kayıplarını azalttığına yönelik araştırmalar mevcuttur (36). Ancak rutin progesteron takviyesini önermek için yeterli seviyede kanıt henüz mevcut değildir. Bununla beraber, yetersiz progesteron

etkisinin tek nedeninin yetersiz salgılanma olmayabileceği, progesteron ile ilişkili yolakların daha distalinde bulunan diğer moleküler ve genetik mekanizmaların da implantasyon ve erken gebelik döneminde klinik izdüşümleri olabileceğine yönelik çalışmalar halen devam etmekte ve implantasyon araştırmalarının en sıcak konusunu teşkil etmektedir (37).

Diabetes Mellitus: Kontrolsüz diabeti ve bunun sonucunda ortaya çıkan yüksek hemoglobin A1c seviyesi olan kadınlarda fetal anomalili gebelik ve düşük riskinin yüksek olduğu bilinmektedir (38). Günümüzde elde edilen bilgiler ışığında açlık glikoz yüksekliği, düşük riski açısından daha önemlidir. Hiperglisemi vasküler komplikasyonları ya da direkt etkisi ile olası immün etkileri neticesinde embriyotoksik olabilir. Ayrıca TKG olan non-diabetik hastalarda insülin rezistansının daha sık olup olmadığı hakkında farklı raporlar bildirilmiş olmakla birlikte, henüz kesin bir sonuca ulaşılamamıştır (39).

Tiroid bozuklukları: Kontrol edilmemiş tiroid hastalığı (hipo ya da hipertiroidizm) gebelik kaybı ile ilişkilidir (40). Ötiroid olan hastalarda ise tiroid otoantikör varlığı ile TKG arasındaki ilişki tartışmalıdır. Prospektif, tek merkezli bir çalışmada, ötiroid olan idiopatik TKG tanısı konulmuş kadınlarda tiroid otoantikör varlığı ile sonraki gebelik başarısı arasında bir ilişki saptanmamıştır (41). Bunun yanında yakın tarihli bir metaanalizde, tiroid otoantikörleri ile gebelik kaybı ve erken doğum arasında kuvvetli bir ilişki gösterilmiştir (42). Klasik olarak normal sınırlarda kabul edilen TSH değerlerinin (5,0 mIU/L) günümüzde yüksek olarak değerlendirilmesi gerektiği (2,5 mIU/L üzeri yüksek) genel olarak kabul görmeye başlanmıştır.

Polikistik over sendromu: Polikistik over sendromu (PKOS) ve TKG arasında direkt olarak neden sonuç ilişkisi henüz net değildir (43). Günümüzde en çok kabul gören Rotterdam kriterleridir ve bu ilişkinin değerlendirilmesi için daha değerli gözükmektedir. Bu kriterlere göre yapılan bir çalışmada, TKG olan hastalarda PKOS prevalansı önceden kabul edilenlere göre daha düşük saptanmıştır (%10) (43). Bunun yanında TKG olan 195 hasta grubunda prospektif olarak yapılan diğer bir araştırmada, sonraki gebelikteki düşük riski ile PKOS tanısı arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (44). İlginç olan ise daha geniş serili bir çalışmada, TKG' sı olan 571 hastada, yüksek serbest androjen indeksinin sonraki gebelikteki düşük riski için anlamlı bir prognostik faktör olduğu belirtilmiştir (45). Bu veriler, PKOS'nin TKG üzerinde obezite, insülin rezistansı ya da androjen yüksekliği (endometrium üzerinde olumsuz etki) gibi sekonder mekanizmalar üzerinden etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Bu bilgiler ışığında TKG açısından PKOS'nin direkt ve açık bir risk faktörü olduğunu ifade etmek için günümüzde yeterli kanıt mevcut değildir.

Hiperprolaktinemi: Prolaktin seviyelerinin yüksek olmasının menstrüel bozukluklara neden olabileceği bilinmektedir. Bunun yanında follikülogenez, oosit kalitesi ve luteal faz fonksiyonu üzerindeki olası olumsuz etkilerinden dolayı, hiperprolaktineminin TGK etyolojisinde rol alabileceği ileri sürülmüştür. Bununla ilgili en önemli kanıt 1998 tarihli bir çalışmada ortaya konulmuştur (46). Bu çalışmada TGK olan 352 hastanın 64'ünde idiopatik hiperprolaktinemi tespit edilmiş ve bu hastalar randomize edilerek bir kısmına bromokriptin tedavisi başlanmıştır. Sonuç olarak gebelik başarısı, bromokriptin verilenlerde verilmeyenlere göre anlamlı şekilde yüksek olmuştur (sırası ile %85,7 ve %52,4).

Anatomik faktörler: Tekrarlayan gebelik kayıpları etyolojisinde %10-50 arasında anatomik faktörler rol almaktadır. En muhtemel anatomik nedenler; servikal yetmezlik, endometrial polipler, konjenital anomaliler, myomlar ve intrauterin adezyonlardır. Patofiyolojisinde implantasyon ve plasentasyon sırasında bozukluklara neden olabilecekleri ve endometrial beslenmeyi bozarak düşük riskini artırabilecekleri düşünülmektedir.

Konjenital anomaliler tekrarlayan geç düşüklüğü olanlarda daha fazla görülmektedir. Genel olarak değerlendirilmesi ya da tedavisi kadın doğum hekiminin elinde olan patolojiler olduklarından, TGK'nın olası etyolojik faktörlerinden biri olarak incelenmeleri önerilmektedir. TGK ile ilişkisi en sık olan konjenital anomali uterin septumdur. Septum uzadıkça gebelik başarısı azalmaktadır. Bunun yanında arkuat uterusun birinci trimester TGK ile ilişkili olmadığı; unikonus, bikonus ve didelfik uterusun ise gebelik oranları ve başarısızlığı ile ilişkili oldukları düşünülmektedir (47).

Antifosfolipid sendrom: Tekrarlayan gebelik kayıpları etyolojisinde yer alan faktörler arasında ilişki düzeyi en kuvvetli olanı antifosfolipid sendromudur (AFS). Bunun yanında AFS birçok gebelik komplikasyonu ile de ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda trombofili nedenleri arasında en sık izlenen edinilmiş risk faktörüdür. Genel olarak toplumdaki prevalansı %3-5 arasında bildirilmektedir (18). TGK olan hastaların ise ortalama %15 (8-42) kadarında antifosfolipid antikorları (aFA) pozitifliği bildirilmiştir (48). AFS tanımı, aFA ile kötü gebelik sonuçları ya da vasküler trombozların birlikteliğini belirtmektedir. aFA'lar fosfolipidleri bağlayıcı plazma proteinlerine karşı affinitesi olan heterojen bir grup otoantikoru içermektedir.

Sağlıklı popülasyonda yapılan testlerde %5-10 oranında Ig G ya da Ig M grubundan aFA'lar pozitif saptanmakta, takip edildiğinde ise bu grubun az bir kısmında antikorların persite ettiği görülmektedir (%15-20) ve olumsuz etkiler için risk altında olmadıkları düşünülmektedir (49).

Antifosfolipid sendromu ile TGK ya da kötü obstetrik sonuçlar arasındaki ilişkinin patofizyolojisi kesin olarak ortaya konabilmiş değildir. Öne sürülen görüşler, otoantikörlerin trofoblastik fonksiyonlar, farklılaşma ve invazyon üzerine olumsuz etkisini, maternal-fetal arayüzde kompleman sisteminin aktive olması ile nekrotik hasarın oluşmasını ve apoptotik siklusun bozulmasını ve uteroplasental perfüzyon bozukluğunu içermektedir.

Genetik nedenler: Sayısal kromozomal anomaliler, yapısal kromozom anomaliler ve Mendelyan ve poligenik faktörler olmak üzere 3 grupta incelenir:

Sayısal kromozomal anomaliler: Abortuslarda tespit edilen kromozom anormalliklerinin %90'ından fazlası sayısaldir (anöploidi, poliploidi); geri kalanlar ise yapısal anormallikler (translokasyonlar, inversiyonlar) ve mozaisizmdir (50, 51). Toplumda, otozomal trizomiler en sık görülen anormalliktir (genellikle kromozom 13-16, 21 veya 22.kromozomları içerir). Daha sonra monozomi X (45X) ve poliploidiler takip eder (50, 52-54). Birçok spontan abortus nedeni embriyonun anormal karyotipe sahip olmasıyla ilişkilidir. İlk trimester spontan düşüklere en az %50'sinde ikinci trimester düşüklere %5-10'unda ve canlı doğumların %1'inde sitogenetik anormallik bulunmaktadır (55). Hücre kültürlerinden bağımsız yeni tekniklerin analizi [Flörosan insitu hibridizasyon (FISH) ve karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH)] ve daha yeni özenli sitogenetik çalışmalar erken gebelik kayıplarında gerçek kromozomal anormallik insidansının %75'e yakın olduğunu göstermektedir (50, 56).

Sitogenetik olarak anormal yapıda olan embriyolar çoğunlukla mayotik eşleşme hatasına bağlı anöploid ve ya dölleme anomalisine bağlı poliploididir. Birinci trimesterde olan sitogenetik anormali kaynaklı abortusların yarısı otozomal trizomilerdir (57). Triploidi ise abortusların %16'sında görülür, buradaki en temel mekanizma normal haploid bir ovumun iki sperm ile fertilize olmasıdır (dispermi). Trizomiler genellikle mayotik eşleşme hataları sonucunda normal karyotipli ebeveynlerin çocuklarında ve de tesadüfen ortaya çıkar (57).

Trizomi sıklığı yaşla birlikte artış gösterir. Trizomi 16 bütün trizomilerin %30'unu oluşturur ve en çok rastlanandır. Bütün kromozomların trizomileri abort materyallerinde saptamak mümkün iken bunun tek istisnası 1.Kromozomdur. Trizomi 1'in yalnız in vitro fertilizasyonla elde edilmiş gebeliklerin düşüklere bildirilmiş olması ilginç bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bulgu trizomi 1'in henüz preimplantasyon evresindeyken bile ölümcül olduğunu düşündürmektedir (57, 58). Otozomal trizomiler görülse bile seyrekir. Buna rağmen monozomi X (Turner Sendromu) sıklıkla görülür ve spontan düşüklere en sık görülen kromozomal anomalidir. Turner sendromu sitogenetik olarak anormal olan düşüklere

%20 ile 25'ini meydana getirir. Trizomi 21'li fetusların yaklaşık üçte biri ise terme kadar yaşar (59). Geriye kalan genetik bozukluklar arasında anormal döllenmeye bağlı olanlar (tetraploidi, triploidi) sayılabilir, fakat bunlar hayatla bağdaşmazlar. Tetraploidi kromozom anomalisi olan düşüklerin yaklaşık %8'inde izlenir ve aslında farklı bir bozukluğu bulunan diploid zigotla çok erken dönemde bölünme kusuruna bağlıdır (59).

Yapısal kromozom anomalileri: Yapısal varyasyonlar sitogenetik anomalisi bulunan düşüklerin yaklaşık %3'ünde izlenir (60). Yapısal kromozom anomalilerin daha çok anneden bebeğe geçtiğine inanılmaktadır. Erkeklerdeki yapısal kromozom anomalilerin daha az sperm sayısı ve kalitesine sebep olduğuna, bunun da erkek infertilitesine neden olarak daha düşük gebe bırakma oranına ve düşüğe yol açtığına inanılmaktadır. Bunun istisnası ise yardımcı üreme teknikleri ile tedavi edilmiş çiftlerdir; bu teknikle seçilmiş bir sperm oosite enjekte edilmekte ve potansiyel olarak genetik bozukluk bulunabilecek bir sperm dışarıdan gelen destekle döllenebilmektedir. Translokasyon sıklığı düşük sayısıyla orantılı olarak artmaktadır. Kadınların translokasyon taşıyıcılığının erkeklere nazaran daha sık olması da bunun sonuçlarındandır. Dengeli olmayan varyasyonların yarısından fazlası anormal translokasyonlara bağlıdır (İki akrosentrik kromozomun sentromerlerinden birleşimi gibi). Dengeli olmayan translokasyonların nerdeyse yarısı gametogenesis esnasında ortaya çıkar (60). Ailesel translokasyonların ise yaklaşık 2/3'ü anne kaynaklıyken geri kalan 1/3'ü baba kaynaklıdır. İki ve üzeri spontan düşüğü olan çiftlerin % 2-3'ünde eşlerin birinde dengeli translokasyon görülebilir (61). Bu oran spontan düşük, ilave olarak ölü doğum ya da anomalili bebek hikayesi olan çiftlerde %1.7-4.6 gibi yüksek seviyelerdedir. İnversiyonlarda ya da dairesel kromozomlar gibi öbür yapısal bozukluklar çok daha seyreklerdir. Son grup ise gen bozukluklarıdır. Genlere ilişkin bazı mutasyonların bir hastada doğurganlık ya da tekrarlayan düşük tanısına sebep olabilecek bozukluklara neden olabileceği açıktır. Tekrarlayan düşüklerle ilişkisi kanıtlanan tek gen bozukluklarının en iyi modeli otozomal dominant geçişli bir hastalık olan myotonik distrofidir (59).

Mendelyan ve poligenik faktörler: Tek gen veya poligenik etmenler üreme sürecinde seyrek tespit edilirler. Ancak; tekrarlayan öploid kayıplara yol açabilirler. Skewed X inaktivasyonu özgün ebeveyn bir allelde %90 inaktivasyon olarak tanımlanır. Tekrarlayan gebelik kayıpları olan olgularda kontrol gruplarına nazaran daha yüksek oranda bulunmuştur (62). Tekrarlayan düşüklerle ilişkisi kanıtlanan tek gen bozukluklarının en iyi modeli otozomal dominant geçişli bir hastalık olan myotonik distrofidir. Fetusu etkileyen ve abortusa neden olan diğer otozomal dominant (OD) bozukluklar tip 2 osteogenezis imperfekta ve

tanotoforik displazi gibi ölümcül iskelet displazileridir. Bu hastalarda anne ve baba fenotipleri açısından normaldir çünkü fetustaki bozukluk çok büyük ihtimalle gametogenesis esnasındaki mutasyonlardan kaynaklanır. Bu ailelerdeki seyrek görülen tekrarların ebeveynlerin testis yada overlerdeki gonadal mosaisizmle ilişkili olduğu düşünülmektedir. X'e bağlı hastalıklar dişi embriyolarda düşüğe yol açmazken erkek embriyolarda ise seyrek olarak tekrarlayan düşük ile sonuçlanabilir (63).

Tekrarlayan düşüklere iki farklı kromozomal anomaliden kaynaklanabilir;

1-Anne yada baba kaynaklı bir anomali,

2-Genellikle genetik geçiş göstermeyen sayısal bir anomalinin tekrarlama.

Bir düşükteki tespit edilmiş karyotipik anomalinin bir sonraki gebelikteki benzeri anomalinin ön görülüp görülemeyeceğini araştıran çalışmalar da yapılmıştır. Warburton ve ark. (64) anne yaşı da dikkate alınarak yapılan analizde trizomik bir abort sonrasında ikinci bir trizomik abort için riskin artmadığını bulmuşlardır. Benzer biçimde ikinci düşükteki trizomi olma riskinin önceki düşükte değişik bir karyotipik anomali olması halinde de artmadığı görülmüştür. Bunun tersine şayet anormal karyotipli bir düşük gerçekleşirse ikincisinde de nontrizomik anormal benzer karyotipli abortus olma ihtimali yüksek bulunmuştur (64). Tekrarlayan abortuslar sonrasında genetik danışma; Warburton ve ark. (64) yaptığı çalışmada bir düşük sonrasında karyotip analizin yapılması maliyet -etkin olmadığı ortaya çıkarılmıştır. Ancak 1950 yılında Drugan ve ark. (65) önerdiği şekilde 2 düşük sonrasında materyallerin incelenmesi uygundur. Bu çalışmada iki ve üzerinde düşüğü olan 305 kadın koryon villus biyopsisi ya da amniyosentez ile değerlendirilmiştir. Neticede tekrarlayan abortus olan çiftlerde fetal anoploidi riski yüksek bulunmuştur. Hesaplanan risk 40 yaş üstündeki kadınlarda anöploidi riski olan %1.6'ya eşit bulunmuştur. Yaşayan bir trizomik bebeği olan kadının daha sonraki trizomik doğum riski %1 oranının da artmaktadır. Trizomilerin tekrarlama riski yalnızca hayatla bağdaşan trizomi 13, 16, 18 ve 21 yada ailesel mozaik trizomi gibi hastalıklarda belirlenmiştir (65). Bu hastalarda kesinlikle karyotip değerlendirme yapılmalıdır. Hastalarda, düşüğe sebep olan genetik bir neden tespit edildiğinde, günümüzde rutin olarak uygulanan herhangi bir genetik tedavi imkanı olmamakla beraber, hastalara genetik danışma, prenatal tanı metodları, evlat edinme veya donör inseminasyonu önerilebilir.

İmmünolojik faktörler: Otoimmün ve alloimmün bozukluklar olmak üzere ikiye ayrılır:

Otoimmün bozukluklar: Kişinin kendi dokularına karşı oluşan bağışık yanıttır. Antifosfolipit Sendrom (AFS) ve Sistemik Lupus Eritamatozus (SLE) gebelik kayıplarıyla

bağlantılı olan otoimmün hastalıklardır. SLE'de izlenen gebelik kayıpları antifosfolipit antikolarla bağlantılı bulunmuştur (66). AFS tekrarlayan arteryel ve venöz tromboemboli ve yine tekrarlayan düşüklerle ile karakterize, otoimmün bir hastalıktır (67). Klinik ve laboratuvar tanı ölçütleri mevcuttur. Tanı için klinik ve laboratuvar tanı ölçütlerinden en az birer tanesinin olması gerekir. Klinik olarak venöz, arteryel veya küçük damar trombozu ve/veya 10 haftanın altında en az üç, 10 haftadan büyük en az bir veya preeklampsi, plasental yetmezlik, eklampsi nedenleriyle 34 haftadan önce en az bir gebelik kaybından herhangi birine ilave olarak lupus antikoagülanı, anti β 2 glikoprotein-1 antikoları (IgG veya IgM) ve antikardiyolipin antikorumdan (IgG veya IgM) en az birinin bulunması tanı için yeterlidir (67). Laboratuvar bulgularının 6 hafta arayla iki kez izlenmesi gerekir (68).

Alloimmün bozukluklar: Maternal yanıtın plasental ya da fetal antijenlere karşı oluşmasıdır. Baba ve annenin paylaştığı Human Leukocyte Antigen (HLA) antijenlerinin fetal allografta karşı ortaya çıkan maternal immün yanıtı bozarak gebelik kayıplarına neden olduğu düşünülmektedir (69). Bu kuramın sonucu olarak tekrarlayan gebelik kaybı izlenen kadınların eşlerinin lenfositleri ile immünize edilmeleri tedavi olarak denenmiş fakat etkinliği ile ilgili değişik sonuçlar alınmıştır (70, 71).

Enfektif ajanlar: Maternal bakteriyemi ya da viremi yaparak ciddi hastalığa neden olabilen ya da plasental tutulum yaparak plasentasyonu bozan her ağır enfeksiyon, spontan düşüğe sebep olabilir. Fakat enfektif ajanların TGK için risk faktörü olduğunu düşündürecek ikna edici deliller bulunmamaktadır. Eğer böyle bir ajan varsa dahi, bu ajanın annede bariz semptomlar oluşturmayıp tanısı konulmadan uzun seneler persiste edebilen özellikte olması gerekir. Bu ölçütlere uyan ve TGK ile ilişkisi kesin olarak ortaya konulmuş bir ajan mevcut değildir (18).

Konjenital trombofililer: Kalıtsal trombofili sebebiyle gebelerde plasental vasküler hasarlanma, fibrinoid nekroz ve infarktüs nedeniyle ablatio plasenta, tekrarlayan gebelik kayıpları, intrauterin fetal kayıplar, preeklampsi ve intrauterin fetal gelişme gerilikleri (IUFGG) görülmektedir (72). Kupfermanc ve ark. (73) bir çalışmada kalıtsal trombofili sıklığını ablatio plasentada %70, gebelik kaybında %50, preeklampside %64.7 ve IUFGG' de %61.4 bildirmişlerdir. Gebelikte kalıtsal olarak meydana gelen en sık kalıtsal trombofili sebepleri Faktör-V Leiden (F-VL) mutasyonu ve protrombin G20210A ile metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) gen mutasyonlarıdır (72).

Faktör V Leiden mutasyonu: Kalıtsal trombofililerin en sık izlenenidir. Faktör-V'i kodlayan genin 1691.nükleotidinde bulunan guaninle adeninin yer değiştirmesi sonucu faktör-

V' in yapısındaki 506.konumunda arginin yerine glutamin geçmektedir. Protein C normalde protein S ve trombin-trombomodülün kompleksi ile aktive olur ve faktör V ile faktör VIII'i inaktive eder. Mutasyon varlığında bu inaktivasyon 10 misli azalarak, tromboz riskinin arttığı görülür (74). F-VL mutasyonu tespit edilen hastalarda tromboz relatif riski heterozigot gebelerde 4-16 kat, heterozigotlarda 7-10 kat, homozigotlarda 80 kat, hormon replasman tedavisi alanlarda 13- 16 kat, oral kontraseptif kullananlarda 35-50 kat artmıştır (75, 76).

Protrombin G20210A gen mutasyonu: En sık ikinci kalıtsal trombofilidir. Protrombin geni 3 ucunda 20210.konumunda Guanin yerine Adenin nükleotidi gelmesi ile ortaya çıkar (77). Protrombin G20210A gen mutasyonu bulunanlarda tromboz için relatif risk 2-6 kat artmıştır. Şayet oral kontraseptif kullanımı var ise risk 16 kat, gebelikte ise risk 10-15 kat artmaktadır (78, 79).

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) gen mutasyonu: MTHFR, homosisteinin remetilasyonu ve metionine dönüşümünü gerçekleştirir. Bu genin 677.konumunda sitozin yerine timin (C677T) nükleotidinin yerleşmesi ile oluşur. Bu mutasyon sonucunda hiperhomosisteinemi meydana gelebilir (80). Hiperhomosisteinemi, endotelial hasarlanma, düz kas hipertrofisi, intima kalınlaşması, lipoprotein (a) artışı, düşük dansiteli lipoprotein oksidasyonu ve DNA hipometilasyonuna yol açması gibi nedenlerle trombofiliye sebep olabilir (81). Hiperhomosisteinemi in utero fetal gelişme geriliğinde %38, ablasyo plasentada %26, intrauterin fetal ölüme %11, tekrarlayan gebelik kayıplarında %18 oranlarında görülmesine rağmen yapılan araştırmalarda MTHFR gen mutasyonunun tek başına risk etkeni olmadığı belirtilmiştir. Ancak bu mutasyona Folik asit veya Vitamin B12 eksikliğinin eşlik etmesi durumunda riskin arttığı gösterilmiştir (82, 83).

Diğer kalıtsal trombofililer: Ayrıca antitrombin eksikliği, Protein C ve Protein S eksiklikleri de diğer kalıtsal trombofili sebepleridir ve tromboz ile ilişkileri Tablo 1'de özetlenmiştir.

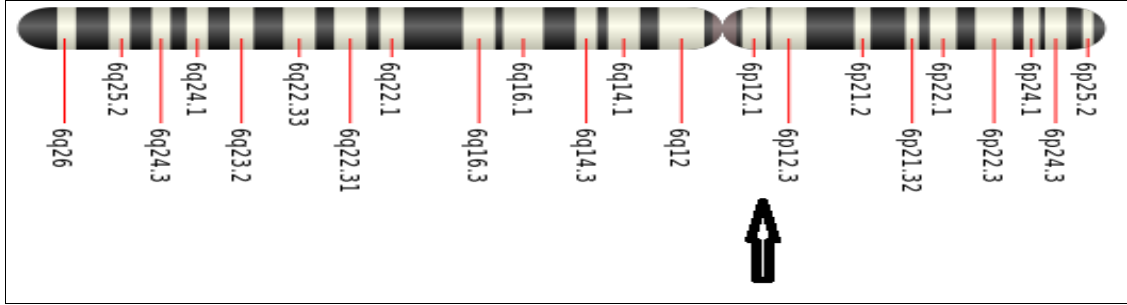
Tablo 1. Kalıtsal trombofililer ve venöz tromboemboli (84)

Trombofili 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

MTHFR: Metilentetrahidrofolat redüktaz.

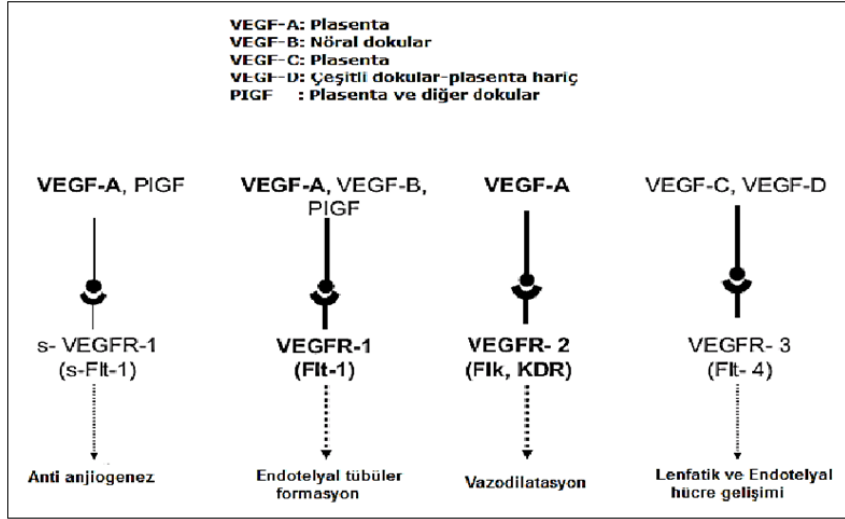
VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)

Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) ve Fibroblast Growth Factor (FGF) gibi büyüme faktörleri birçok değişik hücre çeşidi üzerine etkili mitojenler olmalarına rağmen VEGF yalnızca endotelial hücreler üzerinde mitojen etkinliğe sahiptir. VEGF geni, 6.kromozomun kısa kolunda (6p12) belirlenmiş 8 ekzonlu bir gendir (Şekil 2) (85). VEGF, homodimerik bir glikoprotein yapıda olmakla birlikte moleküler ağırlığı 45000 daltondur. İhtimal dahilinde olan diğer bir konu ise insan tümör anjiogenezinin major regülatörü olabileceğidir. 1994 yılında fare deneyleri neticesinde VEGF ekspresyonunun hipoksi ile arttığı görülmüştür (86).



Şekil 2. Vasküler endotelial büyüme faktörü geninin 6.kromozom üzerindeki lokalizasyonu (87)

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü ailesi, plasenta büyüme faktörü ve VEGF-A,-B,-C,-D,-E'den oluşur. İnsanlarda VEGF, 121, 145, 165, 189 ve 206 aminoasitli, glikozile homodimerik glikoprotein olarak minimum 8 farklı splicing varyantlı şekilde bulunur (88). VEGF'nin, endotelial hücre farklılaşması ve proliferasyonunun uyarılması, endotel üzerine etki ederek vazodilatasyonu sağlamak ve vasküler geçirgenliği artırmak gibi görevleri bulunmaktadır (Şekil 3). Bu özellikleri sebebiyle fizyolojik ve patolojik anjiogenezin major düzenleyicisidir (89). VEGF'nin KDR/FLK1 ve FLT1 adı verilen 2 adet endotelial reseptörü bulunmaktadır (VEGFR-1 ve VEGFR-2). Bu reseptörler yüksek duyarlılıklı transmembran tirozin kinaz reseptörleridir (90). VEGF yapımı, PDGF, TGF-beta, GF1 gibi birçok büyüme faktörü ve sitokinler ile düzenlenir (88, 89). Bunun yanında VEGF, Nitrik Oksit (NO)'ün yapımını ve Nitrik Oksit Sentetaz 3 (NOS3)'ün endotelial hücrelerindeki ekspresyonunu artırır (91).



Şekil 3. Vasküler endotelial büyüme faktörü formları ve başlıca fonksiyonları (92).

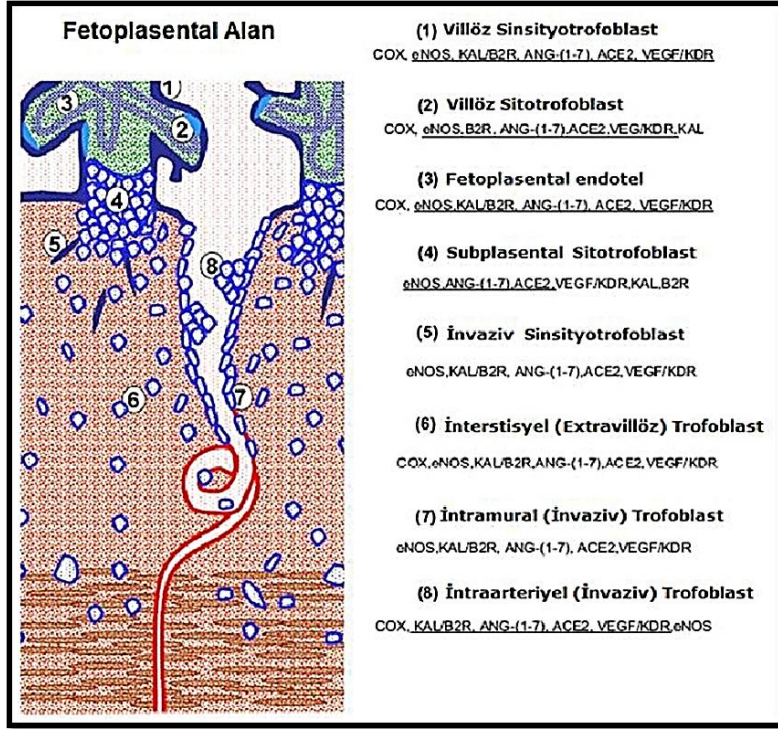
Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Formları, damar hücre endoteline spesifik mitojen etki gösteren, mevcut damarlardan yeni kapillerlerin gelişmesi ve endotel hücre farklılaşması için gerekli bir büyüme faktörüdür. Anjiyogenik etkinlik gösteren çeşitli büyüme faktörleri bulunsada VEGF anjiyogenezin ana düzenleyicisidir. İn situ hibridizasyon metodu ile yapılan çalışmalarda VEGF'ye ait mRNA'nın tümörlerin nekrotik bölgelerine komşu sahalarda arttığı gösterilmiştir. Hipoksi; VEGF geninin ekspresyonunda hem in vitro hem de in vivo ortamda ana düzenleyici rol alır ve VEGF gen transkripsiyonunu uyarır. VEGF geninde promotor bölgede 28 baz çiftlik hipoksi cevap elementi (HRE) bölgesi yer alır ve bu bölgenin silindiği transgenik farelerde ALS (Amyotropik Lateral Skleroz) benzeri klinik tablo ifade edilmiştir (93). Hipoksik şartlarda endotel hücrelerinde, hipoksi ile uyarılabilen faktör-1 (HIF-1alfa/beta), VEGF geninin 3 bölgesindeki enhancer kısmına bağlanır ve promotor bölgedeki HRE, VEGF transkripsiyonunu etkin duruma dönüştürür. Bunun yanında hipoksik koşullarda VEGF'nin düzenlenmesinde transkripsiyon etkinliğine ek olarak mRNA'da stabilite artışı ortaya çıkar.

Hipoksi dışında VEGF ekspresyonunda etkili birçok molekül tarif edilmiştir. IGF, ACTH, TSH gibi birçok hormon, IL-1 gibi inflamatuvar sitokinler ve epidermal büyüme faktörü, TGF-beta yahut keratinosit büyüme faktörü gibi büyüme etmenleri de VEGF mRNA ekspresyonunu düzenleyici olabilir (94, 95).

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü ve Gebelik

Neovaskularizasyon dışı reproduktif sistemindeki bütün organların olağan fonksiyonlarını gösterebilmesi için gereklidir. Birçok araştırmacı VEGF'nin over ve uterusu eksprese olarak ovulasyon, embriyo implantasyonu ve plasental gelişim süreçlerinde gerekli olduğunu göstermiştir. İlave olarak preeklampsi, ovaryan hiperstimülasyon sendromu ve endometriozis ile de ilişkilendirilmiştir (96). Fetoplasental neovaskularizasyon için vasküler permeabilite artışına gereksinim vardır. VEGF, bu aşamada KDR/FLK1(VEGFR-2) reseptörü ile Nitrik Oksit aracılı vazodilatatör ajan olarak görev alır. Fetoplasental alan ve bu alanda etkin olan vazodilatatör genler Şekil 4'te gösterilmiştir. Şekilde yeşil ve mavi renkli alanlar fetal dokuları, kahverengi ve kırmızı alanlar maternal dokuları simgelemektedir (92).



Şekil 4. Fetoplasental alanda eksprese olan vazodilatatör genler (92)

Overde vasküler endotelyal büyüme faktörü: VEGF'nin overde eksprese olduğu ve tüm gelişim, seçim, maturasyon, ovulasyon, korpus luteumun korunması aşamalarında işlev gördüğü 2000'li yılların başında ortaya çıkarılmıştır (97, 98). Overde anjiyogenez, erken folikül gelişimi esnasında teka hücre diferansiyasyonundan önce başlar ve bütün folikülogenez ve ovulasyon süresince devam eder. Çalışmalar VEGF'nin ovulasyonu otokrin etki ile düzenlediğini göstermiştir (99). Luteal fazın biçimlenme ve gelişimi de anjiyogenez

ile ilişkilidir. VEGF ve reseptörleri, endotel ve luteal hücrelerde eksprese olarak vasküler permeabiliteyi ve anjiyogenezi otokrin olarak düzenler (100).

Menstrüel siklusta vasküler endotelyal büyüme faktörü: VEGF'nin insan ve öteki memelilerde, menstrüel siklusta endometriyumda vasküler permeabilite ve anjiyogenezi arttırarak çok önemli rol oynadığını ortaya koyan fazlaca veri bulunmaktadır. Permeabilitede artış ile birlikte ince endometrium kalınlaşır ve daha sonra sekretuar bir yapıya dönüşür. VEGF ekspresyonu menstrüel siklusun geç proliferatif ve luteal fazında artış gösterir. Proliferatif fazda KDR reseptörü, Flt1 reseptörünün iki misli kadarken mid sekretuar fazda azalır ve daha sonra Flt1 reseptörü en yüksek seviyeye ulaşır (101).

Embriyo implantasyonunda vasküler endotelyal büyüme faktörü: İmplantasyon bölgesindeki permeabilite artışı embriyo implantasyonu için çok önemlidir. Çalışmalar VEGF'nin anjiyogenezi ve endometrial damarların permeabilitesini regüle ettiğini ortaya koymuştur (102). Farelerde yapılan çalışmada gebeliğin 4.gününde Flt1 mRNA'sının eksprese olduğu gösterilmiş. Ayrıca Flt1 ve Flk1'in mesometriumda beraber eksprese olduğu, fakat kan damarı bulunmayan implantasyon alanlarında eksprese olmadıkları rapor edilmiştir (103). VEGF'nin endometrial stromal desidualizasyonla bağlantılı olduğu bildirilmiştir. Memelilerde stromal hücreler implante durumdaki embriyoyu çevreler. Endometrial epitelin proliferasyonu ve diferansiyasyonunun gerçekleşmesi için VEGF'nin gerekli olduğu kanıtlanmıştır (96). VEGF'nin trofoblast hücre invazyonu ve infiltrasyonunda rol oynadığı ve fetomaternal sinyal iletiminde fonksiyonu olduğu bilinmektedir (104).

Embriyogenezde vasküler endotelyal büyüme faktörü: Embriyogenez embriyonun maternal dokulara infiltre olduktan hemen sonra başlar ve bu süreçte gerek duyulan anjiyogenez, VEGF ve reseptörleri tarafından denetlenir. İnsan genomunun embriyonun 4 hücreli safhasında aktive olduğu ve VEGF'nin de 8 hücreli iken aktifleştiği tespit edilmiştir (8). Yani insanda en erken aktifleşen genlerden biri VEGF'dir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda VEGF'nin heterozigot kaybının anormal embriyo gelişimine sebep olduğu ve homozigot kayıp durumunda ise gebeliğin 11 ve 12. günlerinde fetal ölümün gerçekleştiği ortaya konulmuştur (105). Yine fare deneylerinde kardiyovasküler sistemin normal gelişiminin VEGF dozajı ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. VEGF yoğunluğundaki azalma geri dönüşümsüz hasarla neticelenmiştir (106). Flk1 reseptörünün homozigot rekombinasyonunu bulunduran farelerin gebeliğin 8,5 ve 9,5. günlerinde kan damarlarının gelişimindeki kusur ve çok düşük hematopoeze bağlı olarak öldüğü, Flt1 reseptöründeki

homozigot kayıplarda da aynı günlerde fetal ölüm izlendiği ancak ölüm nedeninin endotel hücrelerinin fazla gelişmesi ve dizorganizasyonu olduğu gösterilmiştir (107, 108).

Plasental gelişimde vasküler endotelyal büyüme faktörü: İnsan plasentasında VEGF ekspresyonunun maternal ve fetal kaynaklı olarak makrofajlar ve villöz trofoblastlarda lokalize olduğu gösterilmiştir (109). Gebeliğin 6.haftasında maksimum düzeyde iken gebelik süresince azalarak eksprese olmaya devam eder. Gebeliğin erken döneminde villöz kan damarlarının gelişiminde ve anjiyogenezde rol oynarken ilerleyen haftalarda damar permeabilitesi ve sağlamlığının devam etmesini sağlar. VEGF, KDR reseptörü vasıtasıyla endotel hücre proliferasyonunu gerçekleştirir ve kendisinin flt1 reseptörüne bağlanmasını sağlar. İnsan trofoblast hücrelerinde KDR ekspresyonunun tespit edilmesi, VEGF'nin gestasyonel süreçte otokrin etki ile etkili olduğunu ortaya koymuştur (110).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü, Kadın reproduktif sisteminde preeklampsi, Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS) ve endometriozis ile de ilişkilendirilmiştir (111-113). Papazoglou ve ark. (114) 2004 yılında gerçekleştirdiği bir çalışmada preeklampsi ile fonksiyonel, sık izlenen VEGF polimorfizmleri arasındaki bağlantıyı araştırmış ve preeklampsi ile promotör bölgede bulunan -2578 C/A polimorfizmi arasında ilişki bulunamamıştır. Fakat 3' UTR bölgesindeki 936C/T polimorfizminin preeklampsinin ağırlığı ile bağlantılı olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca T alleli taşıyanlarda serum VEGF seviyesi CC genotipine nazaran anlamlı sayılacak şekilde düşük saptanmıştır. Kore'de yapılan bir diğer araştırmada da aynı polimorfizmin preeklampsi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (115).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü ve gebelik kayıpları: İmmun boyama yöntemleri ile midsekretuar faz ve erken gebelik döneminde insan endometriumunda VEGF tespit edilmiştir. Araştırmacılar immünohistokimyasal metodla tekrarlayan düşükleri olanlarda ve normal gebeliklerde 7-11. haftalardaki gebelerde VEGF ekspresyonunu araştırmışlar ve TGK grubunda sitotroblast ve sinsityotroblastlarda VEGF ekspresyonunu izlemekten normal kontrol grubunda zayıf şekilde olsa VEGF ekspresyonunun olduğunu saptamışlardır. Aynı araştırmada VEGF reseptör seviyeleri de normal kontrol grubunda pozitif izlenirken TGK grubunda oldukça zayıf olarak tespit edilmiştir. Plasental villüs ve desidial stromal ile endotel hücrelerde VEGF ekspresyonu bakımından TGK ve kontrol grubunda bir fark izlenmemişken VEGF reseptör seviyeleri bu hücrelerde TGK grubunda kontrole nazaran azalmış olarak izlenmiştir (13). Bu bulgular VEGF seviyelerinin tekrarlayan gebelik kaybına neden olabileceği hipotezini desteklemektedir. 1994 yılında Kanadalı

araştırmacılar immünohistokimyasal metodlar ile sitotrofoblast ve sinsityotrofoblast hücrelerinde VEGF varlığını araştırmışlar ve VEGF'nin birinci trimesterde sadece sitotrofoblastlarda, gebeliğin geri kalan bölümlerinde ise sinsityotrofoblastlarda da var olduğunu saptamışlardır. VEGF'nin özellikle birinci ve ikinci trimesterde yüksek seviyede olması sebebiyle villöz vasküler ağın meydana gelişinde trofoblastların aktif rol oynuyor olabileceği iddia edilmektedir (7).

Erken gebelikte VEGF'nin merkezi bir rolü olduğu daha önceki hayvan deneylerinde ortaya konulmuştur (116). Ayrıca başarılı embriyo implantasyonu için VEGF'nin endotel hücre proliferasyonu ve vasküler permeabilite artışı fonksiyonları gereklidir (117, 118). Embriyonik gelişim ve koryonik villüs vaskülarizasyonu arasında yakın ilişki olduğu saptanmıştır (8, 10). İnsanlara ait blastokistlerde VEGF tarafından kodlanan mRNA tespit edilmesi, implante olmuş embriyo ile implantasyon bölgesinde vaskülarizasyonun hızla başlatıldığını göstermektedir (7, 9). Daha sonraki gebelik haftalarında insan plasentasının verimli bir VEGF kaynağı olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (5, 119, 120). Bu araştırmalar neticesinde VEGF mutasyonları ve/veya polimorfizmlerinin düşük riskini arttıracadığı söylenebilir.

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü sistemi agonist olan KDR ve FLT1 ile bir antagonist olan sFLT reseptörlerini içerir (121). İlave olarak VEGF ligand reseptör etkileşimi sonrası sitotrofoblastların diferansiyasyonu, invazyonu ve canlılığının devamını destekler (122). Ayrıca VEGF'nin olgun damar endotelinde apoptozisi inhibe ettiği saptanmıştır (123, 124). Bu özellikleri sebebiyle VEGF genindeki polimorfizmlerde de görülen ekspresyonun azalabileceği durumlar, trofoblastik etkilerin azalması ve endotel apoptozisinin artması ablasyo plasenta ve spontan abortuslara neden olabilir.

Nitekim VEGF'nin -1154 G>A (rs1570360) polimorfizmi ile TGK arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada iki veya daha fazla gebelik kaybı öyküsü olan 152 kadın ve 65 sağlıklı gönüllünün sanuçları karşılaştırılmıştır. Bu polimorfizm TGK'lı olguların %16'sında ve kontrol grubunun %6'sında homozigot olarak tespit edilmiş ve TGK ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Böylelikle bu polimorfizmi homozigot olarak taşıyanların TGK'ya eğilimli olduğu söylenebilir (125). Kore'li kadınlarda, sık izlenen bazı VEGF polimorfizmleri (-2578C>A, -1154G>A, -634G>C, 936C>T) ve yineleyen spontan düşükler arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada -1154G>A polimorfizmi ile CAGT haplotipinin sınırdan anlamlı bulunduğu rapor edilmiştir (126). Yine Kore'de 2003 yılında yapılan bir ekspresyon çalışmasında 6 kişilik TGK'lı olgu ve 6 kişilik elektif terminasyon olgusunun koryonik villüs

örneklerinde VEGF ekspresyonunun 6. ve 8. gebelik haftalarında araştırılması neticesinde VEGF ekspresyonunun tekrarlayan gebelik kaybı örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı biçimde azaldığı saptanmıştır. Bu araştırma gebelik sırasında yetersiz anjiogenezin fetusun anormal gelişimine ya da düşmesine neden olabileceğini göstermiştir (127).

Tüm bu bilgilerin ışığında amacımız sitogenetik olarak normal olduğu değerlendirilen TGK olgularında etiyopatogenezden sorumlu olabileceğini düşündüğümüz ve literatürde maternal DNA çalışmalarında gebelik kayıpları ile ilişkisi tanımlanmış, fonksiyonel olarak VEGF düzeyini ve ekspresyonunu değiştirme potansiyeli olan -1154 G/A (rs1570360), 936 C/T (rs3025039), -634 C>G (rs2010963) ve 2578 C/A (rs699947) polimorfizmlerinin TGK ilişkisini araştırmak ve abortusların etiyopatogenezini ile ilgili yeni yaklaşımlar geliştirmeye çalışmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamıza 08.05.2013-20.07.2014 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi (TÜTF) Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine ve aynı dönemde Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na TGK öyküsü ile başvuran 145 hastadan dışlama kriterlerimiz dikkate alınarak TGK'lı 45 hasta ile aynı zaman aralığında Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine başvuran ve en az bir sağlıklı doğum öyküsü olup hiç düşük yapmamış 90 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Hasta grubuna 46, XX kromozom yapısına sahip, aynı partner ile 20.gebelik haftasından önce en az 2 ardışık spontan düşük öyküsü olan kadınlar dahil edildi. Faktör V Leiden mutasyonu heterozigot ve/veya homozigot mutant olanlar, Protrombin gen mutasyonu heterozigot ve/veya homozigot mutant olanlar, MTHFR c.677C>T ve MTHFR c.1298A>G polimorfizmleri homozigot mutant olanlar, PAI 4G/4G mutasyonu homozigot mutant olanlar ile tespit edilmiş anatomik nedenler, Diabetes Mellitus, tiroid bozuklukları, Polikistik Over Sendromu ve Antifosfolipid Sendrom, Sistemik Lupus Eritematosus gibi otoimmün nedenlerle düşüğü olduğu bilinen hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Anatomik nedenleri ekarte etmek için hastaların Histerosalpingografileri, hormonal nedenler için hastaların Oral Glukoz Tolerans Testi ve serum Tiroid Stimulan Hormon değerleri incelendi, Antifosfolipid Sendrom antikorlara bakıldı, Tıbbi Genetik polikliniğinde çalışılmış trombofili panelleri değerlendirildi. Belirlediğimiz kriterleri taşımayanlar çalışmaya dahil edilmedi. Çalışmamız prospektif olarak planlandı. Kontrol grubundaki kadınlar ise, en az bir sağlıklı doğum yapmış ve hiç düşük yapmamış olanlardan oluştu.

Çalışmamız 2013/82 protokol numarası ile Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'nın 08.05.2013

tarihli oturumunda görüşülmüş ve onaylanmıştır (Ek-2). Ek olarak çalışmamız proje 2013-138 numarası ile Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP) Komisyonu'nun 01.11.2013 tarihli oturumunda görüşülmüş ve TÜBAP tarafından desteklenmesi kararı alınmıştır (Ek-3). Bu çalışmada yer alan tüm hastaların Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu belirtilen kurallara uygun olarak hazırlandı ve araştırmacı tarafından okutulmuş hastaların doldurmaları sağlandı (Ek-4).

Hasta ve kontrol grubuna dahil edilen bireylerden 2 ml periferik venöz kan örneği Etilen diamin tetra asetik asit'li tüpe alındı. Periferik venöz kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu Qiagen DNA izolasyon kitleri (EZ1® DNA Blood 200 µl Kit, Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak, EZ1 Advanced XL (Qiagen, Hilden, Almanya) nükleik asit izolasyon cihazında, üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirildi. Daha sonra, genomik DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri 260-280 nm dalga boylarında NanoDrop cihazında ölçüldü [Nanodrop 2000C, Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri]. Dalga boyu oranı 1.4–1.8 arasında olan genomik DNA örnekleri çalışmaya dahil edildi. Bu ölçümden sonra çalışılması planlanan polimorfizm (rs699947, rs1570360, rs2010963 ve rs3025039) bölgeleri için polimeraz zincir tepkimesi (PCR) üreticinin önerdiği PCR protokolüne göre, PyroMark PCR kitleri (Qiagen, Hilden, Almanya) ve her bir polimorfizmin deteksiyonu için PyroMark Custom Assay kit (Qiagen, Hilden, Almanya) içindeki primerler kullanılarak gerçekleştirildi. Amplifikasyon PCR'nın şartları Tablo 2'de verildiği gibidir.

Tablo 2. Pyro Mark PCR kit (Qiagen, Hilden, Almanya) üretici polimeraz zincir tepkimesi protokolü

	Aşama	Süre	Sıcaklık
	Başlangıç aktivasyon aşaması	15 dakika	95°C
45 Döngü	Denatürasyon	30 saniye	94 °C
	Bağlanma	30 saniye	60 °C
	Uzama	30 saniye	72 °C
	Son Uzama	10 dakika	72 °C

Polimeraz zincir tepkimesi amplifikasyonundan sonra, hasta ve kontrollerin elde edilen PCR ürünleri, PyroMark Custom Assay kitinin içinde her bir polimorfizm için ayrı ayrı bulunan sekans primerleri kullanılarak, üreticinin talimatlarına göre pyrosekans yöntemiyle

analiz edildi. [PyroMark Q24 Sistemi, Qiagen, Hilden, Almanya] Daha sonra, elde edilen veriler PyroMark Q24 yazılım sisteminde değerlendirildi ve hasta ve kontrol grubundaki bireylerin bu polimorfizmler için genotipleri, dolayısı ile allelleri belirlendi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü geni 936 C/T (rs3025039), VEGF geni -634 C>G (rs2010963), VEGF geni -1154 G/A (rs1570360) ve VEGF geni 2578C/A (rs699947) polimorfik allel ve genotip frekansları hasta ve kontrol gruplarında SPSS 15 (Lisans No: 10240642) istatistik programında karşılaştırıldı. İstatistiksel anlamlılık sınır değeri olarak $p<0,005$ kabul edildi. Bunun yanında devamlı değişkenler t , kategorik değişkenler Ki kare testlerinin yardımıyla karşılaştırıldı.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen kontrol grubu hastalarının yaş ortalaması 33.88 ± 8.4 , hasta grubunun yaş ortalaması ise 29.71 ± 5.7 idi.

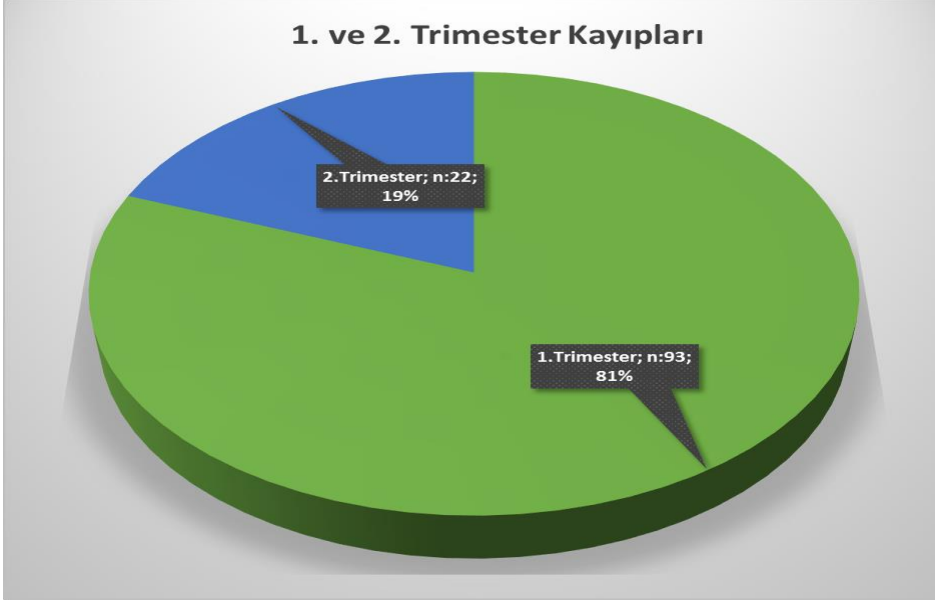
Hasta grubunda ortalama düşük sayısı 2.42 ± 0.99 idi. 45 olgudan oluşan hastaların % 13.33'ünde düşükler öncesinde doğumları mevcut idi (Tablo 3).

Tablo 3. Hasta ve kontrol grubunda ortalama yaş, doğum ve düşük sayıları

	Kontrol	Hasta	
Yaş (Yıl, ort. \pm SD)	33.88 ± 8.4	29.71 ± 5.7	$p=0.003$
Parite (Doğum, ort. \pm SD)	1.72 ± 0.83	0.16 ± 0.42	$p<0.001$
Abortus	0	2.42 ± 0.99	$p<0.001$
Düşükler öncesi doğumu olan hasta sayısı	-	6 (%13.33)	-

SD: Standart değişkenlik,
t-testi ile hesaplanmıştır.

Tekrarlayan gebelik kaybılı 45 hastada toplam 114 düşük saptanırken bu düşüklerin 93 (%81)'ü ilk trimesterde 22 (%19)'si ise ikinci trimesterde gerçekleşti (Şekil 5).



Şekil 5. Hasta grubu olgularında birinci ve ikinci trimester düşük oranları

Tekrarlayan gebelik kaybılı 45 hastanın 14 (%31)'ün de üç veya daha fazla gebelik kaybı yaşanırken, 31 (%69)'in de iki gebelik kaybı öyküsü var idi (Şekil 6).



Şekil 6. Hasta grubu olgularında birinci ve ikinci trimester düşük oranları

Tekrarlayan gebelik kaybı ve kontrol grubunda VEGF geni -1154 G/A polimorfizmi için risk alleli olan A allelini taşıyanların oranı kontrol grubunda 37/90 (%41.11), TGK grubunda 20/45 (%44,45) olarak saptandı. TGK ve kontrol grubunun risk alleli açısından karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 4).

Tablo 4. -1154 G/A polimorfizminin genotip ve allel frekansının hasta ve kontrol grubunda karşılaştırılması

(-)1154 G/A (rs1570360) Genotipi		Grup		Toplam	OR	95%G.A.		P
		Kontrol	TGK			Alt sınır	Üst sınır	
GG	n	53	25	78	0.87	0.42	1.80	0.71
	%	58.89	55.55	57.78				
GA	n	27	16	43	1.29	0.60	2.75	0.51
	%	30	35.56	31.85				
AA	n	10	4	14	0.78	0.23	2.64	0.69
	%	11.11	8.89	10.37				
Toplam	n	90	45	135				
	%	100.0	100.0	100.0				

GG: Guanin-Guanin; **GA:** Guanin-Adenin; **AA:** Adenin-Adenin; **TGK:** Tekrarlayan gebelik kaybı; **n:** Hasta ve sağlıklı gönüllü sayısı; **OR:** Zıtlıklar oranı, **G.A.:** Güven aralığı, Ki-kare testi ile hesaplanmıştır (Anlamlılık sınırı $p > 0,05$).

Tekrarlayan gebelik kaybı ve kontrol grubunda VEGF geni 936 C/T polimorfizmi için risk alleli olan T allelini taşıyanların oranı kontrol grubunda 25/90 (%27.78), TGK grubunda 13/45 (%28,89) olarak saptandı. TGK ve kontrol grubunun risk alleli açısından karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 5).

Tablo 5. 936 C/T polimorfizminin genotip ve allel frekansının hasta ve kontrol grubunda karşılaştırılması

936 C/T (rs3025039) Genotipi		Grup		Toplam	OR	95% G.A.		P
		Kontrol	TGK			Alt sınır	Üst sınır	
CC	n	65	32	97	0.95	0.43	2.09	0.89
	%	72.22	71.11	71.85				
CT	n	25	13	38	1.06	0.48	2.33	0.89
	%	27.78	28.89	28.15				
TT	n	0	0	0				
	%	-	-	-				
Toplam	n	90	45	135				
	%	100.0	100.0	100.0				

CC: Sitozin-Sitozin; CT: Sitozin-Timin; TT: Timin-Timin; TGK: Tekrarlayan gebelik kaybı; n: Hasta ve sağlıklı gönüllü sayısı, OR: Zıtlıklar oranı, G.A: Güven aralığı, Ki-kare testi ile hesaplanmıştır (Anlamlılık sınırı $p > 0,05$).

Tekrarlayan gebelik kaybı ve kontrol grubunda VEGF geni -634 C>G polimorfizmi için risk alleli olan G allelini taşıyanların oranı kontrol grubunda 52/90 (%57.77), TGK grubunda 29/45 (%64.44) olarak saptandı. TGK ve kontrol grubunun risk alleli açısından karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 6).

Tablo 6. -634 C>G polimorfizminin genotip ve allel frekansının hasta ve kontrol grubunda karşılaştırılması

-634 C>G (rs2010963) Genotipi		Grup		Toplam	OR	95% G.A.		P
		Kontrol	TGK			Alt sınır	Üst sınır	
CC	n	38	16	54	0.76	0.36	1.58	0.46
	%	42.22	35.56	40				
CG	n	42	20	62	0.91	0.45	1.88	0.81
	%	46.66	44.44	45.92				
GG	n	10	9	19	2.0	0.75	5.34	0.16
	%	11.11	20	14.07				
Toplam	n	90	45	135				
	%	100.0	100.0	100.0				

CC: Sitozin-Sitozin; CG: Sitozin-Guanin; GG: Guanin-Guanin; TGK: Tekrarlayan gebelik kaybı; n: Hasta ve sağlıklı gönüllü sayısı; OR: Zıtlıklar oranı, G.A.: Güven aralığı, Ki-kare testi ile hesaplanmıştır (Anlamlılık sınırı $p > 0,05$).

Tekrarlayan gebelik kaybı ve kontrol grubunda VEGF geni 2578 C/A polimorfizmi için risk alleli olan A allelini taşıyanların oranı kontrol grubunda 90/90 (%100), TGK grubunda 45/45 (%100) olarak saptandı (Tablo 7).

Tablo 7. 2578 C/A polimorfizminin genotip ve allel frekansının hasta ve kontrol grubunda karşılaştırılması

2578 C/A (rs699947) Genotipi		Grup		Toplam	OR	95%G.A.		P
		Kontrol	TGK			Alt sınır	Üst sınır	
CC	n	0	0	0	-	-	-	-
	%	0	0	0	-	-	-	-
CA	n	0	0	0	-	-	-	-
	%	0	0	0	-	-	-	-
AA	n	90	45	135	-	-	-	-
	%	100.0	100.0	100.0	-	-	-	-
Toplam	n	90	45	135				
	%	100.0	100.0	100.0				

CC: Sitozin-Sitozin, CA: Sitozin-Adenin, AA: Adenin-Adenin, TGK: Tekrarlayan gebelik kaybı, n: Hasta ve sağlıklı gönüllü sayısı, OR: Zıtlıklar oranı, G.A: Güven aralığı.

Ki-kare testi ile hesaplanmıştır (Anlamlılık sınırı $p > 0,05$).

Hasta ve sağlıklı gönüllülere ait demografik bilgiler ve genetik çalışma verileri Ek 5'te verilmiştir.

TARTIŞMA

Tekrarlayan gebelik kayıpları ile VEGF gen polimorfizmi ilişkisini araştıran ilk literatür çalışması Papazoglou ve ark. (14) tarafından bildirilmiştir. Papazoglou ve ark. (14) Yunan popülasyonundan 52 (üç veya daha fazla gebelik kaybı öyküsü olan) hasta ile 82 (iki veya daha fazla canlı doğum öyküsü olan) sağlıklı gönüllüde rs1570360, rs3025039, rs2010963, rs699947 polimorfizmlerini karşılaştırmışlar. VEGF'ye ait rs1570360 (-1154 G/A) polimorfizmi AA genotipinin TGK için bir risk faktörü olabileceğini rapor etmişlerdir.

Literatürde bugüne kadar rs1570369 (-1154 G/A) polimorfizmi ile TGK arasındaki ilişkiyi araştıran 10 tane çalışma bildirilmiştir (14, 125, 126, 128-134). Bu çalışmaların 4 tanesinde tekrarlayan gebelik kayıpları grubuna iki veya daha fazla tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olanlar dahil edilirken, 6 tanesinde üç ve üzerinde tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olanlar dahil edilmiştir (14, 125, 126, 128-134). Bu çalışmaların dört tanesinde rs1570369 (-1154 G/A) polimorfizmi AA genotipi ile TGK arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunurken altı tanesinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (14, 125, 126, 128-134). Zhang ve ark. (135) ise yaptıkları meta-analizde 1166 TGK hastası ile 1099 sağlıklı gönüllüde rs1570369 (-1154 G/A) polimorfizmini karşılaştırmış ve iki grup arasında -1154 G/A gen polimorfizmi açısından anlamlı bir ilişki olmadığını rapor etmişlerdir.

Zhang ve ark. (135) meta-analizinde, değerlendirmeye tabi tutulan 7 çalışmadan ikisinde -1154 G/A polimorfizmi ile TGK arasında anlamlı bir ilişki olduğunu rapor etmişlerdi (Tablo 8) (128, 129).

Tablo 8. 2012' de -1154 G/A (rs1570360) gen polimorfizmini karşılaştıran çalışmaların yer aldığı meta-analiz (135)

Yayınlar	Odss oranı (%95 güven aralığı)
Papazoglou (2005) (14)	1.98 (0.97, 4.06)
Coulam (2008) (125)	1.35 (0.61, 2.98)
Lee (2010) (126)	1.50 (1.00, 2.27)
Su (2011) (128)	1.51 (1.13, 2.03)
Aggarwal (2011) (129)	1.47 (1.15, 1.86)
Eller (2011) (131)	1.25 (0.90, 1.75)
Xing (2011) (130)	1.16 (0.86, 1.57)

Meta-analizden sonra yapılmış olan üç güncel çalışmada ise Magdoud ve ark. (133) Tunus'lu 304 üç veya daha fazla tekrarlayan kaybı olan kadın ile 371 sağlıklı gönüllüyü, Almawi ve ark. (134) Bahreyn'li 296 tekrarlayan kaybı olan hasta ile 305 sağlıklı gönüllüyü, Türkiye'den Şamlı ve ark. (132) ise 38 iki veya daha fazla gebelik kaybı olan hasta ile 30 sağlıklı gönüllüde -1154 G/A (rs1570360) polimorfizmini karşılaştırmışlardır. Magdoud ve ark. (133) -1154 G/A gen polimorfizmi ile TKG arasında anlamlı bir ilişki bildirirken, Almawi ve ark. (134) anlamlı bir ilişki bildirmemişlerdir. Şamlı ve ark. (132) ise Türkiye'de sınırlı sayıda hasta ve sağlıklı gönüllünün dahil edildiği çalışmada AA genotipinin TKG için bir risk faktörü olabileceğini rapor etmişlerdir (AA genotipi, hasta grubunda %23, 7 [9/38] kontrol grubunda ise %3. 4 [1/30] olarak bildirilmiştir, ancak çalışmada P değeri bildirilmemiştir).

Güncel yeni bir metanaliz yapıldığında -1154 G/A (rs1570360) gen polimorfizmi ile TKG arasında anlamlı bir ilişki olmayacağını düşünmekteyiz. Biz de çalışmamızda bu gen ile TKG arasında ilişki gözlemedik.

Bizim çalışmamızda ikinci olarak incelenen 936 C/T (rs3025039) gen polimorfizmi, gene ilk olarak Papazoglou ve ark. (14) tarafından incelenmiştir. O günden bu güne kadar bu polimorfizmle TKG ilişkisini inceleyen toplamda 8 çalışma bulunmaktadır (14, 126, 129, 131-134, 136). Bu çalışmaların 2 tanesinde TKG grubuna iki veya daha fazla tekrarlayan

gebelik kaybı öyküsü olanlar dahil edilirken 6 tanesinde üç ve üzerinde tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olanlar dahil edilmiştir (14, 126, 129, 131-134, 136). Bu çalışmaların ikisi dışında, Türk çalışması da dahil olmak üzere hepsinde bu polimorfizm ile TKG arasında anlamlı bir ilişki olmadığı bildirilmiştir (14, 126, 129, 131-134, 136). Ancak, ilk yapılan 5 çalışmadaki 1288 TKG'lı hasta ile 1400 sağlıklı gönüllünün dahil edildiği meta-analizde anlamlı bir ilişkinin olduğu bildirilmiştir (Tablo 9) (135). Türk çalışmasında bu polimorfizmde CC genotipi, hasta grubunda %71, 0 (27/38) sağlıklı gönüllülerde %76. 6 (23/30) olarak saptanmıştır (132). Bizim çalışmamızda da 936 C/T gen polimorfizmi ile ilgili anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tablo 9. 936 C/T (rs3025039) polimorfizmine ait meta-analiz sonuçları (135)

Çalışmalar	TKG		Kontrol		Odds oranı M-H, Sabit, 95%CI
	Olaylar	Toplam	Olaylar	Toplam	
Aggarwal (129)	64	400	37	400	1.87[1.21,2.88]
Eller (131)	31	194	55	352	1.03[0.64,1.66]
Lee (126)	69	430	33	226	1.12[0.71,1.75]
Papazoglou (14)	18	104	19	164	1.60[0.80,3.21]
Traina (136)	22	160	29	258	1.26[0.70,2.28]
Toplam (95%CI)		1288		1400	1.34[1.07,1.67]
Toplam olaylar	204		173		

Çalışmamızda üçüncü olarak incelenen -634 C>G gen polimorfizmi ile ilgili ilk çalışma diğer ikisinde de olduğu gibi Papazoglou ve ark. (14) tarafından yapılmıştır. Bu polimorfizmle ilgili toplamda 6 çalışma bulunmaktadır (14, 126, 131, 133, 134, 136). Bu çalışmaların iki tanesinde -634 C>G gen polimorfizmi ile TKG arasında anlamlı bir ilişki

olduğu bildirilmiştir (131, 133). Diğer 4 çalışmada bu polimorfizmle TGK arasında anlamlı bir ilişki bildirilmemiştir (14, 126, 134, 136). Ancak ilk 4 çalışmanın (14, 126, 131, 136) yer aldığı 880 TGK'lı hasta ile 918 sağlıklı gönüllüden oluşan meta-analizde bu polimorfizm ile TGK arasında anlamlı bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Tablo 10) (135). Meta-analizden sonra yapılan iki çalışmada Magdoud ve ark. (133) anlamlı bir ilişki bildirirken, Almawi ve ark. (134) anlamlı bir ilişki olmadığını rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da TGK ile bu polimorfizm arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Türk çalışması bu polimorfizmi değerlendirmemişti (132).

Tablo 10. -634 C>G (rs1570360) polimorfizmine ait meta-analiz sonuçları (135)

Çalışmalar	TGK		Kontrol		Odds oranı M-H, Sabit, 95%CI
	Olaylar	Toplam	Olaylar	Toplam	
Papazoglou (14)	54	104	71	164	1.41[0.86,2.32]
Lee (126)	182	430	96	226	0.99[0.72,1.38]
Eller (131)	75	192	109	358	1.46[1.01,2.11]
Traina (136)	71	154	69	170	1.25[0.81,1.95]
Toplam (95%CI)		880		918	1.23[1.01,1.49]
Toplam olaylar	382		345		

İncelediğimiz dördüncü polimorfizm olan 2578 C/A (rs699947) polimorfizmi ile ilgili toplamda 7 çalışma bulunmaktadır (14, 126, 129, 131-134). Bu genle ilgilide ilk çalışma Papazoglou ve ark. (14) tarafından yapılmıştır. Papazoğlu ve ark. (14) yaptığı çalışma ile birlikte toplam 6 çalışmada TGK ile 2578 C/A gen polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki olmadığı bildirilmiştir (126, 129, 132-134). Sadece Eller ve ark. (131) bu polimorfizmle TGK arasında anlamlı bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. İlk dört çalışmanın yer aldığı 1126 TGK'lı hasta ile 1144 sağlıklı gönüllüden oluşan meta-analizde bu polimorfizmle gebelik kayıpları arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır (Tablo 11) (135). Türkiye'de

yapılan çalışmada ise Şanlı ve ark. (132) 2578 C/A polimorfizmi CC genotipi oranını hasta grubunda %52.6 (20/38), kontrol grubunda %53.3 (16/30) olarak bildirmişlerdir (132). Bizim çalışmamızda da hasta grubu ile sağlıklı gönüllüler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Tablo 11. 2578 C/A (rs699947) polimorfizmine ait meta-analiz sonuçları (135)

Çalışmalar	TGK		Kontrol		Odds oranı M-H, Sabit, 95%CI
	Olaylar	Toplam	Olaylar	Toplam	
Aggarwal (129)	120	400	101	400	1.27[0.93,1.73]
Eller (131)	73	192	170	354	0.66[0.46,0.95]
Lee (126)	122	430	61	226	1.07[0.75,1.54]
Papazoglou (14)	53	104	76	164	1.20[0.74,1.97]
Toplam (95%CI)		1126		1144	1.02[0.75,1.38]
Toplam olaylar	368		408		

Sonuç olarak literatürde sıklıkla araştırılmış olan 4 VEGF polimorfizminden iki tanesinin [936 C/T (rs3025039) ve -634 G/C (rs2010963)] TGK ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (135). Diğer taraftan -1154 G/A (rs1570360) polimorfizmi ile ilgili, meta-analiz anlamlı ilişki bildirmemiş ancak meta-analizi takip eden iki çalışmada bu polimorfizm ile TGK ilişkisi anlamlı olarak rapor edilmiştir (133-135). İlerleyen zamanlarda bu iki çalışmanın da dahil edildiği yeni bir meta-analiz yapılırsa belki de -1154 G/A polimorfizmi ile TGK arasında anlamlı bir ilişki olduğu rapor edilebilir.

Bizim çalışmamızda ise bu dört polimorfizm ile TGK arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. Biz bu multipotansiyel fonksiyonlara sahip VEGF genine ait olduğu daha önceden belirlenmiş -1154 G/A, 936 C/T, -634 C/G ve 2578 C/A polimorfizmlerinin Trakya bölgesi popülasyonunda TGK' ya yatkınlık oluşturduğu kanaatinde değiliz. Ancak oluşan bu kanaatin daha geniş grupların yer aldığı çalışmalarla

desteklenmesi ihtiyacı da göz ardı edilmemelidir. Bugüne kadar yapılan en büyük ölçekli meta-analizde VEGF'ye ait iki gen polimorfizminin TGK'ya yatkınlık oluşturduğu bildirilmişti. Biz sonuçlardaki bu farklılıkların, dışlama kriterlerindeki ve populasyonlar arasındaki etnik farklılıklardan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bunun yanında kısıtlı sayıdaki çalışmalarda ortaya çıkan farklılıklara bakılırsa bu konuda yapılacak daha büyük ölçekli çalışmalara ihtiyaç vardır.

SONUÇLAR

Prospektif olarak aynı süre içinde Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ile Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yürüttüğümüz çalışmada hasta (n=45) ve kontrol grubunda (n=90); VEGF gen polimorfizmleri ile TGK arasındaki ilişkiye dair şunları saptadık:

- 1) Çalışmamız Trakya bölgesinde fonksiyonel dört VEGF polimorfizminin [(-1154 G/A (rs1570360), 936 C/T (rs3025039), -634 C>G (rs2010963), 2578 C/A (rs699947)] tekrarlayan gebelik kayıpları etiyojisiyle ilişkisini inceleyen ilk çalışmadır.
- 2) Bu dört polimorfizmin haplotipleri hasta ve sağlıklı gönüllülerde karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.
- 3) Bugüne kadar yapılan çalışmalarda VEGF gen polimorfizmleri ile TGK arasındaki ilişkiye dair farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Bizim yapmış olduğumuz çalışma daha önce yapılan az sayıdaki çalışmanın bir kısmını destekler niteliktedir.
- 4) Büyük ölçekli meta-analizde 936 C/T ve -634 C>G gen polimorfizmleri ile TGK arasında anlamlı ilişki rapor edilirken diğer iki polimorfizmle ilgili olarak bizim çalışmamızda olduğu gibi anlamlı ilişki bildirilmemiştir.

- 5) Kısıtlı sayıda bildirilmiş çalışmada sonuçlar farklılıklar göstermektedir. Dolayısıyla daha geniş hasta gruplarında yapılmış çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

ÖZET

Klasik anlamda tekrarlayan gebelik kayıpları, üç veya daha fazla gebelik kaybı (ard arda olması gerekmeden) olarak tanımlansa da günümüzde çoğunlukla iki ve üzerindeki gebelik kayıplarından sonra nedene yönelik tetkik ve tedavi amaçlı araştırmalar yapılmaktadır. Biz bu çalışmamızda Mayıs 2013-Temmuz 2014 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine başvuran tekrarlayan gebelik kayıpları olan 45 hasta ile aynı zaman aralığında Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine başvuran ve en az bir sağlıklı doğum öyküsü olup hiç düşük yapmamış 90 sağlıklı gönüllüde Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü gen polimorfizmlerini karşılaştırdık. Polikliniğimize başvuran hasta ve sağlıklı gönüllüler arasından istediğimiz kriterlere uygun olan 135 örnekte etiyopatogenezden sorumlu olabileceğine dair bilgiler bulunan vasküler endotelyal büyüme faktörü genine ait fonksiyonel olduğu daha önce gösterilmiş -1154 G/A, 936 C/T, -634 C/G ve 2578 C/A polimorfizmlerini araştırdık. Kontrol grubu olarak 90 sağlıklı gönüllü ile 45 tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan hastada vasküler endotelyal büyüme faktörü gen polimorfizmlerini (-1154 G/A, 936 C/T, -634 C>G, 2578 C/A) karşılaştırdığımız çalışma sonucunda Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü'ne ait bu dört gen polimorfizminin hasta ve kontrol örneklerinde anlamlı bir fark göstermediğini saptadık.

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü, anjiyogenez ve vaskülogenezde, hem fizyolojik hemde patolojik durumlarda medyatör görevi gören endotele spesifik bir proteindir. Embriogenez sırasında optimal damarsal şekil ve fonksiyonun sağlanabilmesi için endotel hücrelerinin bütünlüğünü ve aktivitesini düzenler.

Daha önce Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü ve tekrarlayan gebelik kayıpları ilişkisi kısıtlı sayıdaki çalışmada araştırılmış, ancak tam bir konsensus oluşmamıştır. Irksal

faktörlerin de farklı sonuçların elde edilmesinde etken olabileceği bildirilmiştir. Bilebildiğimiz kadarıyla bizim çalışmamız ülkemizdeki ikinci çalışma, Trakya bölgesinde ise ilk çalışmadır. Biz bu çalışmadan elde ettiğimiz veriler ışığında Trakya bölgesinde hastanemize başvuran kişiler arasında Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü gen polimorfizmlerinin tekrarlayan gebelik kayıpları etyolojisinde önemli bir yer olmadığını saptadık. Sonuç olarak Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü gen polimorfizmleri tekrarlayan gebelik kayıpları patogenezinde rol oynamayabilir.

Anahtar Kelimeler: Tekrarlayan gebelik kayıpları, vasküler endotelyal büyüme faktörü, polimorfizm

RELATIONSHIP BETWEEN VEGF POLYMORPHISMS AND RECURRENT SPONTANEOUS MISCARRIAGE

SUMMARY

In the classical sense, recurrent pregnancy loss is defined as three or more pregnancy losses. However, in current practice, evaluation and treatment frequently begin after two losses. In the present study, which was held between May 2013 and July 2014 at the Thrace University Medical Faculty, we compared the frequencies of 4 vascular endothelial growth factor polymorphisms in 45 women with recurrent pregnancy loss to those in 90 women, who had no abortions but at least one healthy delivery. These four polymorphisms, which can be responsible in the etiopathology and have been studied previously in women with recurrent pregnancy loss, were -1154 G/A (rs1570360), 936 C/T (rs3025039), -634 C>G (rs2010963) and 2578 C/A (rs699947). In the present study, the rates of genotypes were comparable between groups.

Vascular endothelial growth factor is an endothelial cell-specific protein that acts as a mediator of angiogenesis and vasculogenesis under physiological and pathological conditions. Vascular endothelial growth factor regulates the integrity and activity of endothelial cells during embryogenesis, thereby contributing to optimal vascular shape and function.

Several reports investigated the association of vascular endothelial growth factor gene variants and risk, recurrent pregnancy loss but with inconclusive results, and a racial contribution to vascular endothelial growth factor effects in affecting recurrent pregnancy loss

risk was suggested. To our knowledge, the present study is the first one in the Thrace region and second one in our country. In the present study, we did not observe a significant relationship between vascular endothelial growth factor polymorphisms and recurrent pregnancy loss among women who presented to our university in the Thrace region. In conclusion, the role of vascular endothelial growth factor polymorphisms in the etiology of recurrent pregnancy loss may be limited in our population.

Keywords: Recurrent pregnancy losses, Vascular endothelial growth factor, Polymorphism

KAYNAKLAR

1. Regan L, Braude PR, Trembath PL. Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *BMJ* 1989;299(6698):541-5.
2. Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman E, Laird S. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Hum Reprod Update* 2002;8(5):463-81.
3. Christiansen OB, Steffensen R, Nielsen HS, Varming K. Multifactorial etiology of recurrent miscarriage and its scientific and clinical implications. *Gynecol Obstet Invest* 2008;66(4):257-67.
4. Güler T, Özeren S, Deren Ö. Tekrarlayan gebelik kayıplarında risk faktörleri. Günalp S, Yüce K (Editörler). *Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi*. 3. baskı. Ankara: Güneş Kitapevi; 2014. s.1379-80.
5. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9(6):669-76.
6. Benjamin LE, Keshet E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94(16):8761-6.
7. Jackson MR, Carney EW, Lye SJ, Ritchie JW. Localization of two angiogenic growth factors (PDEC GF and VEGF) in human placentae throughout gestation. *Placenta* 1994;15(4):341-53.
8. Krussel J, Behr B, Hirchenhain J, Wen Y, Milki AA, Cupisti S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor mRNA in human preimplantation embryos derived from triprounuclear zygotes. *Fertil Steril* 2000;74(6):1220-6.

9. Krussel JS, Behr B, Milki AA, Hirchenhain J, Wen Y, Bielfeld P, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA splice variants are differentially expressed in human blastocysts. *Mol Hum Reprod* 2001;7(1):57-63.
10. Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;110(1):10-8.
11. Khankin EV, Royle C, Karumanchi SA. Placental vasculature in health and disease. *Semin Thromb Hemost* 2010;36(3):309-20.
12. Reynolds LP, Borowicz PP, Caton JS, Vonnahme KA, Luther JS, Buchanan DS, et al. Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *Int J Dev Biol* 2010;54(2-3):355-66.
13. Vuorela P, Carpen O, Tulppala M, Halmesmaki E. VEGF, its receptors and the tie receptors in recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 2000;6(3):276-82.
14. Papazoglou D, Galazios G, Papatheodorou K, Liberis V, Papanas N, Maltezos E, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2005;83(4):959-63.
15. Ahmed AG, Klopper A. Detection of subclinical abortion by assay of pregnancy specific beta 1 glycoprotein. *BMJ* 1984;288(6411):113.
16. Jobanputra V, Sobrino A, Kinney A, Kline J, Warburton D. Multiplex interphase FISH as a screen for common aneuploidies in spontaneous abortions. *Hum Reprod* 2002;17(5):1166-70.
17. Osborn JF, Cattaruzza MS, Spinelli A. 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):98-105.
18. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol*, 2009;2(2):76-83.
19. Atan SÜ, Kavlak O, Kulak E, Bozkaya M. Attitudes towards family planning among women seeking induced abortion in Izmir, Turkey. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Health Care* 2011;16(3):194-200.
20. Saultes TA, Devita D, Heiner JD. The back alley revisited: sepsis after attempted self-induced abortion. *West J Emerg Med* 2009;10(4):278-80.
21. Hasan R, Baird DD, Herring AH, Olshan AF, Jonsson Funk ML, Hartmann KE. Association between first-trimester vaginal bleeding and miscarriage. *Obstet Gynecol* 2009;114(4):860-7.
22. Halder A, Fauzdar A. Skewed sex ratio and low aneuploidy in recurrent early missed abortion. *Indian J Med Res* 2006;124(1):41-50.

23. Lee RM, Silver RM. Recurrent pregnancy loss: summary and clinical recommendations. *Semin Reprod Med* 2000;18(4):433-40.
24. De Crespigny LC, Cooper D, McKenna M. Early detection of intrauterine pregnancy with ultrasound. *J Ultrasound Med* 1988;7(1):7-10.
25. Dighe M, Cuevas C, Moshiri M, Dubinsky T, Dogra VS. Sonography in first trimester bleeding. *J Clin Ultrasound* 2008;36(6):352-66.
26. Snell BJ. Assessment and management of bleeding in the first trimester of pregnancy. *J Midwifery Womens Health* 2009;54(6):483-91.
27. ACOG practice bulletin. Management of recurrent pregnancy loss. Number 24, February 2001. (Replaces Technical Bulletin Number 212, September 1995). American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* 2002;78(2):179-90.
28. De La Rochebrochard E, Thonneau P. Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. *Hum Reprod* 2002;17(6):1649-56.
29. Stirrat GM. Recurrent miscarriage. *Lancet* 1990;336(8716):673-5.
30. Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* 2000;320(7251):1708-12.
31. Chiodo LM, Bailey BA, Sokol RJ, Janisse J, Delaney-Black V, Hannigan JH. Recognized spontaneous abortion in mid-pregnancy and patterns of pregnancy alcohol use. *Alcohol* 2012;46(3):261-7.
32. Macklon NS, Geraedts JP, Fauser BC. Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update* 2002;8(4):333-43.
33. Lo W, Rai R, Hameed A, Brailsford SR, Al-Ghamdi AA, Regan L. The effect of body mass index on the outcome of pregnancy in women with recurrent miscarriage. *J Family Community Med* 2012;19(3):167-71.
34. Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ. P53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature* 2007;450(7170):721-4.
35. Murray MJ, Meyer WR, Zaino RJ, Lessey BA, Novotny DB, Ireland K, et al. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertil Steril* 2004;81(5):1333-43.
36. Hu W, Feng Z, Levine AJ. The regulation of human reproduction by p53 and its pathway. *Cell Cycle* 2009;8(22):3621-2.
37. Wahabi HA, Abed Althagafi NF, Elawad M, Al Zeidan RA. Progestogen for treating threatened miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;7(12):CD005943.doi: 10.1002/14651858.CD005943.pub4

38. Arredondo F, Noble LS. Endocrinology of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2006;24(1):33-9.
39. Craig LB, Ke RW, Kutteh WH. Increased prevalence of insulin resistance in women with a history of recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2002;78(3):487-90.
40. Sugiura-Ogasawara M, Sato T, Suzumori N, Kitaori T, Kumagai K, Ozaki Y. The polycystic ovary syndrome does not predict further miscarriage in Japanese couples experiencing recurrent miscarriages. *Am J Reprod Immunol* 2009;61(1):62-7.
41. Glueck CJ, Wang P, Goldenberg N, Sieve-Smith L. Pregnancy outcomes among women with polycystic ovary syndrome treated with metformin. *Hum Reprod* 2002;17(11):2858-64.
42. Cocksedge KA, Saravelos SH, Wang Q, Tuckerman E, Laird SM, Li TC. Does free androgen index predict subsequent pregnancy outcome in women with recurrent miscarriage? *Hum Reprod* 2008;23(4):797-802.
43. Stagnaro-Green A. Overt hyperthyroidism and hypothyroidism during pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 2011;54(3):478-87.
44. Rushworth FH, Backos M, Rai R, Chilcott IT, Baxter N, Regan L. Prospective pregnancy outcome in untreated recurrent miscarriers with thyroid autoantibodies. *Hum Reprod* 2000;15(7):1637-9.
45. Lazzarin N, Moretti C, De Felice G, Vaquero E, Manfellotto D. Further evidence on the role of thyroid autoimmunity in women with recurrent miscarriage. *Int J Endocrinol*, 2012. 2012:717185 doi: 10.1155/2012/717185. Epub 2012 Jan 26
46. Hirahara F, Andoh N, Sawai K, Hirabuki T, Uemura T, Minaguchi H. Hyperprolactinemic recurrent miscarriage and results of randomized bromocriptine treatment trials. *Fertil Steril* 1998;70(2):246-52.
47. Lin PC. Reproductive outcomes in women with uterine anomalies. *J Womens Health*, 2004;13(1):33-9.
48. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98(5):1103-11.
49. Vila P, Hernandez MC, Lopez-Fernandez MF, Batlle J. Prevalence, follow-up and clinical significance of the anticardiolipin antibodies in normal subjects. *Thromb Haemost* 1994;72(2):209-13.
50. Philipp T, Philipp K, Reiner A, Beer F, Kalousek DK. Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies. *Hum Reprod* 2003;18(8):1724-32.
51. Ward KJ. Genetic factors in recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2000;18(4):425-32.

52. Hassold T, Chiu D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet* 1985;70(1):11-7.
53. Carr DH. Chromosome studies in selected spontaneous abortions. 3. Early pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 1971;37(5):570-4.
54. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod* 2002;17(2):446-51.
55. Carr DH. Cytogenetic aspects of induced and spontaneous abortions. *Clin Obstet Gynecol* 1972;15(1):203-19.
56. Fritz B, Hallermann C, Olert J, Fuchs B, Bruns M, Aslan M, et al. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH)-Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *Eur J Hum Genet* 2001;9(7):539-47.
57. Jacobs PA, Szulman AE, Funkhouser J, Matsuura JS, Wilson CC. Human triploidy: relationship between parental origin of the additional haploid complement and development of partial hydatidiform mole. *Ann Hum Genet* 1982;46:223-31.
58. Watt JL, Templeton AA, Messinis I, Bell L, Cunningham P, Duncan RO. Trisomy 1 in an eight cell human pre-embryo. *J Med Genet* 1987;24(1):60-4.
59. Byrne JL, Ward K. Genetic factors in recurrent abortion. *Clin Obstet Gynecol* 1994;37(3):693-704.
60. De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum Reprod* 1990;5(5):519-28.
61. Simpson JL, Meyers CM, Martin AO, Elias S, Ober C. Translocations are infrequent among couples having repeated spontaneous abortions but no other abnormal pregnancies. *Fertil Steril* 1989;51(5):811-4.
62. Lanasa MC, Hogge WA, Kubik CJ, Ness RB, Harger J, Nagel T, et al. A novel X chromosome-linked genetic cause of recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185(3):563-8.
63. Lanasa MC, Hogge WA. X chromosome defects as an etiology of recurrent spontaneous abortion. *Semin Reprod Med* 2000;18(1):97-103.
64. Warburton D. Reproductive loss: how much is preventable? *N Engl J Med* 1987;316(3):158-60.
65. Drugan A, Greb A, Johnson MP, Krivchenia EL, Uhlmann WR, Moghissi KS, et al. Determinants of parental decisions to abort for chromosome abnormalities. *Prenat Diagn* 1990;10(8):483-90.

66. Ogasawara M, Aoki K, Hayashi Y. A prospective study on pregnancy risk of antiphospholipid antibodies in association with systemic lupus erythematosus. *J Reprod Immunol*, 1995;28(2):159-64.
67. Lim W. Antiphospholipid antibody syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009;1:233-9.
68. Regan L, Rai R. Thrombophilia and pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2002;55(1-2):163-80.
69. Faulk WP, McIntyre JA. Immunological studies of human trophoblast: markers, subsets and functions. *Immunol Rev* 1983;75:139-75.
70. 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):55-72.
71. Coulam CB, Coulam CH. Update on immunotherapy for recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 1992;27(3-4):124-7.
72. Greer IA. Prevention of venous thromboembolism in pregnancy. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003;16(2):261-78.
73. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340(1):9-13.
74. Greengard JS, Sun X, Xu X, Fernandez JA, Griffin JH, Evatt B. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *Lancet* 1994;343:1361-2.
75. McColl MD, Ramsay JE, Tait RC, Walker ID, McCall F, Conkie JA, et al. Risk factors for pregnancy associated venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1997;78(4):1183-8.
76. Gerhardt A, Scharf RE, Beckmann MW, Struve S, Bender HG, Pillny M, et al. Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. *N Engl J Med* 2000;342(6):374-80.
77. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. 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):3698-703.
78. Verspyck E, Borg JY, Le Cam-Duchez V, Goffinet F, Degre S, Fournet P, et al. Thrombophilia and fetal growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;113(1):36-40.

79. Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Cappucci G, Brancaccio V, et al. 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):1324-8.
80. Martinelli P, Grandone E, Colaizzo D, Paladini D, Sciannone N, Margaglione M, et al. Familial thrombophilia and the occurrence of fetal growth restriction. *Haematologica* 2001;86(4):428-31.
81. Makris M. Hyperhomocysteinemia and thrombosis. *Clin Lab Haematol* 2000;22(3):133-43.
82. Kupferminc MJ. Thrombophilia and pregnancy. *Curr Pharm Des* 2005;11(6):735-48.
83. Vefring H, Lie RT, Degard OR, Mansoor MA, Nilsen ST. Maternal and fetal variants of genetic thrombophilias and the risk of preeclampsia. *Epidemiology* 2004;15(3):317-22.
84. James AH. Pregnancy and thrombotic risk. *Crit Care Med* 2010;38(2):57-63.
85. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266(18):11947-54.
86. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 1994;367(6463):576-9.
87. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/01/Chromosome_6.svg.
88. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001;114(5):853-65.
89. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 2000;55:15-35.
90. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 1999;13(1):9-22.
91. Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1998;274(2):1054-8.
92. Valdes G, Kaufmann P, Corthorn J, Erices R, Brosnihan KB, Joyner-Grantham J. Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:7,11.
93. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* 2003;34(4):383-94.

94. Kim BS, Goligorsky MS. Role of VEGF in kidney development, microvascular maintenance and pathophysiology of renal disease. *Korean J Intern Med* 2003;18(2):65-75.
95. Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 1995;77(3):638-43.
96. Fraser HM, Lunn SF. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. *Br Med Bull* 2000;56(3):787-97.
97. Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril* 2000;74(3):429-38.
98. Stouffer RL, Martinez-Chequer JC, Molskness TA, Xu F, Hazzard TM. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch Med Res* 2001;32(6):567-75.
99. Otani N, Minami S, Yamoto M, Shikone T, Otani H, Nishiyama R, et al. 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):3845-51.
100. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, et al. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 1998;4(3):336-40.
101. Meduri G, Bausero P, Perrot-Appianat M. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in the human endometrium: modulation during the menstrual cycle. *Biol Reprod* 2000;62(2):439-47.
102. Sherer DM, Abulafia O. Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development. *Placenta* 2001;22(1):1-13.
103. Chakraborty I, Das SK, Dey SK. 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):339-52.
104. Winther H, Ahmed A, Dantzer V. 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):35-43.
105. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380(6573):435-9.
106. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380(6573):439-42.

107. Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* 1999;126(13):3015-25.
108. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;376(6535):62-6.
109. Vuorela P, Hatva E, Lymboussaki A, Kaipainen A, Joukov V, Persico MG, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta. *Biol Reprod* 1997;56(2):489-94.
110. Dong Q, Cheng Z. Functions of VEGF in female reproductive system. *Chinese Science Bulletin* 2003;48(3):217-22.
111. Levin ER, Rosen GF, Cassidenti DL, Yee B, Meldrum D, Wisot A, et al. Role of vascular endothelial cell growth factor in Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *J Clin Invest* 1998;102(11):1978-85.
112. Hunter A, Aitkenhead M, Caldwell C, McCracken G, Wilson D, McClure N. Serum levels of vascular endothelial growth factor in preeclamptic and normotensive pregnancy. *Hypertension* 2000;36(6):965-9.
113. Fujimoto J, Sakaguchi H, Hirose R, Wen H, Tamaya T. Angiogenesis in endometriosis and angiogenic factors. *Gynecol Obstet Invest* 1999;48(1):14-20.
114. Papazoglou D, Galazios G, Koukourakis MI, Panagopoulos I, Kontomanolis EN, Papatheodorou K, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and preeclampsia. *Mol Hum Reprod* 2004;10(5):321-4.
115. Shim JY, Jun JK, Jung BK, Kim SH, Won HS, Lee PR, et al. Vascular endothelial growth factor gene +936 C/T polymorphism is associated with preeclampsia in Korean women. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197(3):271.e1-4.
116. Rabbani ML, Rogers PA. Role of vascular endothelial growth factor in endometrial vascular events before implantation in rats. *Reproduction* 2001;122(1):85-90.
117. Rowe AJ, Wulff C, Fraser HM. 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):227-38.
118. Te Velde EA, Exalto N, Hesseling P, van der Linden HC. First trimester development of human chorionic villous vascularization studied with CD34 immunohistochemistry. *Hum Reprod* 1997;12(7):1577-81.
119. Shiraishi S, Nakagawa K, Kinukawa N, Nakano H, Sueishi K. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the human placenta. *Placenta* 1996;17(2-3):111-21.

120. Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Boocock CA, Brown KD, Smith SK. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. *J Reprod Fertil* 1993;99(2):609-15.
121. Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, et al. 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):1405-23.
122. Banyasz I, Szabo S, Bokodi G, Vannay A, Vasarhelyi B, Szabo A, et al. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2006;12(4):233-6.
123. Brown KR, England KM, Goss KL, Snyder JM, Acarregui MJ. VEGF induces airway epithelial cell proliferation in human fetal lung in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281(4):1001-10.
124. Galan A, Herrer R, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Embryonic regulation of endometrial epithelial apoptosis during human implantation. *Hum Reprod* 2000;15(6):74-80.
125. Coulam CB, Jeyendran RS. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2008;59(4):301-5.
126. Lee HH, Hong SH, Shin SJ, Ko JJ, Oh D, Kim NK. Association study of vascular endothelial growth factor polymorphisms with the risk of recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* 2010;93(4):1244-7.
127. Choi HK, Choi BC, Lee SH, Kim JW, Cha KY, Baek KH. Expression of angiogenesis- and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy loss patients. *Mol Reprod Dev* 2003;66(1):24-31.
128. Su MT, Lin SH, Lee IW, Chen YC, Kuo PL. Association of polymorphisms/haplotypes of the genes encoding vascular endothelial growth factor and its KDR receptor with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2011;26(4):758-64.
129. Aggarwal S, Parveen F, Faridi RM, Phadke S, Borkar M, Agrawal S. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in North Indian patients with recurrent miscarriages. *Reprod Biomed Online* 2011;22(1):59-64.
130. Xing X, Yan J, Zhao Y, You L, Bian Y, Chen ZJ. Association of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms with recurrent spontaneous abortion in Chinese Han women. *Am J Reprod Immunol* 2011;65(5):521-5.
131. Eller AG, Branch DW, Nelson L, Porter TF, Silver RM. Vascular endothelial growth factor-A gene polymorphisms in women with recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2011;88(1):48-52.

132. Samli H, Demir BC, Ozgoz A, Atalay MA, Uncu G. Vascular endothelial growth factor gene 1154 G/A, 2578 C/A, 460 C/T, 936 C/T polymorphisms and association with recurrent pregnancy losses. *Genet Mol Res* 2012;11(4):4739-45.
133. Magdoud K, Dendana M, Herbepin V, Hizem S, Ben Jazia K, Messaoudi S, et al. Identification of specific vascular endothelial growth factor susceptible and protective haplotypes associated with recurrent spontaneous miscarriages. *Hum Reprod* 2012;27(5):1536-41.
134. Almawi WY, Saldanha FL, Mahmood NA, Al-Zaman I, Sater MS, Mustafa FE. Relationship between VEGFA polymorphisms and serum VEGF protein levels and recurrent spontaneous miscarriage. *Hum Reprod* 2013;28(10):2628-35.
135. Zhang B, Dai B, Zhang X, Wang Z. Vascular endothelial growth factor and recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis. *Gene* 2012;507(1):1-8.
136. Traina E, Daher S, Moron AF, Sun SY, Franchim CS, Mattar R. Polymorphisms in VEGF, progesterone receptor and IL-1 receptor genes in women with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol* 2011;88(1):53-7.

EKLER

Ek 1



Mehmet Çetin

drmctn@gmail.com

1 gün önce, 11:12

Gönderen: Mehmet Çetin drmctn@gmail.com

Alıcı: gvaldes@med.puc.cl

Tarih: Dün, 13 Ağu 2014 11:12



Dear Dr Valdes

I want to use two figures from your article in the RBE journal in my thesis. The figures are fig. 5 and 8 from the article *Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009. 7: 79. . I will, of course, cite this article.

I will appreciate it if you could give permission to use these figures.

Sincerely,

Mehmet Cetin, M.D.
Trakya University, Edirne, Turkey



Gloria Valdes

gvaldesst@gmail.com

1 gün önce, 17:44

Gönderen: Gloria Valdes gvaldesst@gmail.com

Alıcı: Mehmet Çetin drmctn@gmail.com

Tarih: Dün, 13 Ağu 2014 17:44



Dear Dr. Cetin, you may use figures 5 and 8 from *Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy* published in *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:79.

Please send me the pdf of your thesis.

Sincerely,

Gloria Valdes
Professor
Escuela de Medicina
Pontificia Universidad Catolica
Santiago, Chile

Not: Şekil 3 ve Şekil 4 yabancı kaynaklı bir dergiden (*Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7: 79.) alıntı yapıldı. Ekteki resim, şekillerin kullanımıyla ilgili yazarından izin alındığına dair yazışmadır.

Ek 2

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI						
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye						
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TUTF-GOKAEK 2013/82				
	PROTOKOL ADI	Nedeni Açıklanamayan Tekrarlanan Gebelik Kayıplarında Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) Genetik Varyasyonların Araştırılması				
	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI / ADI	Prof. Dr. Koray ELTER				
	ARAŞTIRMA MERKEZİ					
	DESTEKLEYİCİ					
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 10/ 01			Tarih:08.05.2013		
	Üniversitemiz Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Koray ELTER'in sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Araş. Gör. Dr. Mehmet ÇETİN'in tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenliğ kurumuna ödendiği koşullarda gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TUTF-GOKAEK Yönergesi					
UYELER						
Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Başkan Yardımcısı	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistika.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hasan ÜMIT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Selma Arzu VARDAR Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	K	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sedat ÜSTÜNDAĞ Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Burcu TOKUÇ Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Koray ELTER Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Rugul KÖSE ÇINAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Recep YAĞIZ Üye	Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları	T.Ü.T.F. K.B.B. Hast. A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Berkan DEMİRAL Üye		T.Ü. İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Avukat Baki KURNAZ Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
			*Araştırma ile ilişki **Toplantıda Bulunma			
			Prof. Dr. Recep YAĞIZ Dekan a. Dekan Yardımcısı			

Ek 3

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ SÖZLEŞMESİ

PROJE NO : 2013/138
PRJ NİTELİĞİ : Tıpta Uzmanlık

1- PROJE BAŞLIĞI

Nedeni Açıklanamayan Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) Genetik Varyasyonların Araştırılması

2- PROJE PERSONELİ

	Adı ve Soyadı	Unvanı	Telefon (İş)
Proje Yöneticisi :	Koray ELTER	Prof. Dr.	Cep Tel: 532 265 27 19
Araştırmacılar :	Mehmet ÇETİN	Arş. Gör. Dr.	
	Hakan GÜRKAN	Yrd. Doç. Dr.	
	Hilmi TOZKIR	Yrd. Doç. Dr.	

3- PROJE BÜTÇESİ

Techizatın Tanımı :	Detay listesi ektedir.	Fiyatı (TL)
Ekonomik Kod		
	03.2 Tüketime Yönelik Mal ve Malzeme Alımları	24.000,00 TL
	03.3 Yolluklar	
	03.5 Hizmet Alımları	
	03.7 Menkul Mal, Gayrimaddi Hak Alım, Bakım ve Onarım Giderleri	
	06.1 Mamul Mal Alımları	
TOPLAM ÖDENEK		24.000,00 TL

4- PROJENİN GELİŞİMİ :

1. Projenin Kabul Tarihi: 22.10.2013	4. I. Rapor Tarihi : 30.04.2014	Sonuç : (+/-)
2. Projenin Başlama Tarihi : 31.10.2013	5. II. Rapor Tarihi :	Sonuç : (+/-)
3. Projenin Bitiş Tarihi: 31.10.2014	6. III. Rapor Tarihi :	Sonuç : (+/-)
4. Projenin Süresi: 12 Ay	7. IV. Rapor Tarihi :	Sonuç : (+/-)
	8. Sonuç Raporu Tarihi: 31.10.2014	Sonuç : (+/-)

5- İLGİLİ BÖLÜM VE FAKÜLTE :

Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

6- PROJENİN UYGULANMASI :

1. Bu proje 2547 sayılı YOK Kanununun 4684 sayılı Kanunla değişik 58. maddesi gereğince, Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma Projeleri Hakkında Yönetmelik ve Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Uygulama Yönergesi çerçevesinde yürütülmüştür.		
2. Proje süresinde ve harcama fasıllarında Rektörlük onayı alınmadan değişiklik yapılamaz.		
3. Proje Yöneticisi her 6 ayın sonunda gelişme raporunu, Bölüm Başkanlığı ve ilgili Dekanlık veya Enstitü Müdürlüğü aracılığı ile Rektörlüğe iletmekle yükümlüdür.		
4. Projelerden alınan teçhizat tüm öğretim üyelerinin kullanımına açıktır.		
5. Bir ay geçtiği halde gelişme raporu verilmemiş veya süresi bitmiş olup süre uzatımı talebinde bulunulmamış projeler iptal edilir. Bakiye ödenek, BAP Komisyonu tarafından kabul edilecek yeni projelere tahsis edilir veya diğer projelere aktarılır.		
Proje Yöneticisi :	Adı ve Soyadı Prof. Dr. Koray ELTER	Trakya Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Prof. Dr. Koray ELTER Dip. Tes. No: 67110-69775 Uzm. Tıp. No: 46519
		İmza Tarih 01.11.2013

Komisyon Başkanı

Prof. Dr. Süleyman PIŞKIN
Rektör Yardımcısı

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bir araştırma projesine davet edilmektesiniz. Bu araştırmanın yürütülmesi, Trakya Üniversitesi Girişimsel olmayan klinik araştırmalar Etik Kurulu'nun 08.05.2013 tarih ve 10/01 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Araştırmaya katılmaya karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını anlamanız çok önemlidir.

Araştırmaya katılım tamamen gönüllülük ilkesine bağlı olup katılmayı reddetmeniz herhangi bir cezaya ya da elde edilecek herhangi bir yararın kaybedilmesine kesinlikle yol açmayacaktır.

Aynı şekilde araştırmaya katılmayı kabul ettikten sonra da araştırmanın herhangi bir yerinde hiçbir neden göstermeksizin herhangi bir zarar ya da elde edilmesi beklenen bir yarar kaybına yol açmadan araştırmadan çekilebilirsiniz.

Araştırma kapsamında yapılan işlemlerin mali giderleri araştırmacılar ya da destekleyici (AÇIK AD) tarafından karşılanacak olup size ya da sosyal güvenlik kurumunuza hiçbir mali yük getirmeyecektir.

Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun ve araştırmaya katılmak isteyip istemediğinize karar vermek için lütfen biraz düşünün. Açık olmayan bir bölüm varsa ya da daha ayrıntılı bilgiye ihtiyaç duyuyorsanız ya da araştırmaya katılmaya gönüllü oluktan sonra soracağınız sorular varsa **0530 347 44 15 numaralı cep telefonundan Dr. Mehmet Çetin'e ulaşabilirsiniz.**

1. Araştırmayla İlgili Bilgiler:

- a. **Araştırmanın bilimsel adı: Nedeni Açıklanamayan Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü(VEGF) Genetik Varyasyonlarının araştırılması.**
- b. **Araştırmanın anlaşılabilir basit adı: Tekrarlayan düşükleri olanlarda bozukluğunda düşüğe neden olabileceğini düşündüğümüz damar oluşumunu sağlayan büyüme faktörü geninin araştırılması.**
- c. **Sorumlu Araştırmacının adı ve görev yeri: Prof. Dr. Koray ELTER, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD Başkanlığı**
- d. **Araştırmanın içeriği: Rutin tetkikler amacı ile sizlerden alınan kan -80 C' de muhafaza edilecektir. Alınan bu kanlar ile Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik laboratuvarında çalışılacaktır.**
- e. **Araştırmanın amacı: Hamilelik süresince meydana gelen hormonal, iltihabi ve damarsal değişikliklerin gebelik kayıplarına neden olduğu düşünülmektedir. Biz burda düşüklere neden olduğunu düşündüğümüz damarlarda büyüme ve gelişme sağlayan gen üzerinde çalışacağız.**
- f. **Araştırmanın niteliği (Klinik, Laboratuvar, Epidemiyolojik - Tez çalışması vb...): Tez çalışması**
- g. **Araştırmanın başlama tarihi ve öngörülen süresi: 30.04.2013 başlama tarihi olup çalışmanın öngörülen süresi 16 aydır.**

- h. Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı: Toplamda 160 gönüllü olacak. Bunların 80'i tekrarlayan düşük öyküsü olanlardan, 80'i sağlıklı doğum yapanlardan oluşuyor.
- i. Katılımcının araştırmaya dahil edilme nedeni: Tekrarlayan düşük öyküsü yada sağlıklı doğum yapmış olma.
- j. Araştırmada uygulanacak yöntemler: Sizlerden rutin tahliller için kan alımı sırasında fazladan 1 tüp kan alınıp laboratuarda araştırılacak.
2. Uygulama Sırasında Karşılaşabileceğiniz Riskler ve Rahatsızlıklar: Araştırmanın taşıdığı herhangi bir risk bulunmamaktadır. Çalışma için sizlerden ilave kan alınmayacaktır. Sizlerden çalışma kapsamında herhangi bir ücret istenmeyecektir.
3. Gönüllü İçin Araştırmadan Beklenen Yarar: Türk toplumunda tekrarlayan düşüklerin nedenin araştırılması ve buna yönelik uygun tedavinin geliştirilmesi.
4. Araştırmaya Seçenek Olan Diğer Girişimler: Yok.
5. Zararların Tazmini ve Araştırma Konusundaki Diğer Soruların Cevaplandırılması:
- a. Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ile bir hasta olarak hakları konusunda bilgi almak için bağlantı kurulacak kişinin adı-soyadı, ünvanı, görev yeri ve telefon numarası: **Araştırma Görevlisi Dr. Mehmet Çetin**, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD. Tel: 0530 347 44 15
6. Araştırma Giderleri ve Bütçesi: 24.000 TL (Yirmi dört bin Türk Lirası)
7. Gönüllülük, Çalışmayı Reddetme ve Çalışmadan Çekilme Hakkı, Çalışmadan Çıkarılma: İstedığınız zaman çalışmayı reddedebilir, çalışmadan çekilebilir veya çıkarılabilirsiniz.
8. Kimlik bilgilerinin ve elde edilen verilerin gizliliği nasıl sağlanacak? : Katılımcının kimlik bilgisi sadece araştırmacıda olup çalışmanın sonuçlanmasından sonra bilgiler silinecektir.
9. Araştırma sonunda gönüllülere bilgi verilecek mi? : Araştırma sonuçları sizlerle paylaşılacaktır.

GÖNÜLLÜNÜN ÇALIŞMAYA KATILMA ONAYI

Yukarıda açıkça tanımlanan çalışmanın ne amaçla, kimler tarafından ve nasıl gerçekleştirileceği anlayabileceğim bir ifade ile bana anlatıldı.

Bu araştırmadan elde edilen bilgilerin bana ve başka insanlara sağlayacağı yararlar bana anlatıldı.

Araştırma sırasında meydana gelebilecek riskler ve rahatsızlıklar bana anlayabileceğim bir dille anlatıldı.

Araştırma sırasında oluşabilecek zarar durumunda gerçekleştirilecek işlemler bana anlatıldı.

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ve haklarım konusunda 24 saat bilgi alabileceğim bir yetkilinin adı ve telefonu bana verildi.

Araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik ve testler ile tıbbi bakım hizmetleri için benden ya da bağılı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyeceği bana anlatıldı.

Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.

Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.

Sorumlu araştırmacı / hekime haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmediyimi ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum.

Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı / hekim ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle, benim onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.

Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren Gönüllü Bilgilendirme Formu adlı metni kendi anadilimde okudum.

Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü olarak açıklandı.

Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım.

Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bu metnin imzalı bir kopyasını aldım.

Gönüllünün; (El yazısı ile)

Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....
.....

Tarih:

Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için; (El yazısı ile)

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....
.....

Tarih:

Açıklamaları Yapan Araştırmacının Adı- Soyadı: (El yazısı ile)

İmzası:

Tarih:

Ek 5