

## I-GİRİŞ VE AMAÇ

Çocukluk yaş grupları arasında trombozun en sık görüldüğü dönem yenidoğan dönemidir. Tromboz için risk faktörleri; damar içi kateter kullanımı, dehidratasyon, polisitemi, hipoksi, dolaşım bozukluğu, annede diyabetes mellitus, intrauterin gelişme geriliği (IUGG), sepsis, konjenital kalp hastalığı, yenidoğanın respiratuar distres sendromu (RDS) ve antikoagülan proteinlerin konjenital eksikliği gibi durumlardır (1).

Faktör V (FV) kan koagülasyon sistemindeki en önemli proteinlerden biridir. FV, aktive edilmiş protein C (activated protein C, APC)'nin kofaktörü olarak fonksiyon yapar. APC ile birlikte Faktör VIIIa'yı (FVIIIa) inaktive eder ve ayrıca FV'in kendi aktive formu protrombinin proteolitik aktivasyonunda kofaktör olarak rol oynar ve protrombin trombine dönüştürülür (2).

FV leiden (FVL) mutasyonu, FV geninin DNA'sında 1691. pozisyonundaki adeninin guanin ile yer değiştirmesi sonucu, FV genindeki 506. aminoasit olan argininin glutamine dönüşmesine neden olur. Bu mutasyonu taşıyan kişilerde FV'in inaktive olması, taşımayanlara göre belirgin azalmıştır. Bu da tromboza yatkınlık yaratır (3).

Heterozigot taşıyıcılarda venöz tromboz geliştirme riski, normal populasyona göre 5-10 kat fazla iken, homozigot bireylerde tromboz geliştirme riski 50-100 kat artmıştır (4). Bu nedenle trombofili için yüksek risk taşıyan bireylerin taranması oldukça önemlidir.

Metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR), folat metabolizmasında önemli bir enzimdir (5,6). 667. nükleotitteki T varyantı (MTHFR C677T) ve 1298. nükleotitteki C varyantı (MTHFR A1298C) olmak üzere 2 tipi vardır. MTHFR C677T varyantı, yüksek homosistein ve düşük folat seviyesine neden olur. Bunun da tromboz riskini arttırdığı gösterilmiştir (7).

Protrombin G 20210A (PG 20210A) mutasyonu, protrombin geninin 3' kısmında 20210'uncu pozisyonundaki guanin nükleotidi yerine adenin nükleotidinin gelmesi ile oluşmuştur. Ülkemizde sağlıklı popülasyonda sıklığı %1-2'dir (8).

Tromboz, yenidoğanlarda önemli morbidite ve mortalite nedeni olması nedeni ile erken tanısı önemlidir. Bu çalışmada; tromboz riski yüksek olan IUGG ve prematür bebeklerde FVL, MTHFR, PG 20210A gen mutasyonu araştırılması ve tanıdaki öneminin ortaya konması amaçlanmıştır.

## II-GENEL BİLGİLER

Tromboz; koagölan ve antikoagölan sistem arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkar. Bu denge ya fibrin oluşumunun artması ya da fibrin yıkımının azalması sonucu bozulmaktadır. Her iki durumda da, tromboza eğilim oluşmakta ve bu duruma hiperkoagülabilité adı verilmektedir (9).

Trombozun fizyopatolojisi ilk olarak 1847 yılında Rudolf Virchow tarafından tanımlanmıştır. Tromboz oluşumunda, üç faktörün rol aldığı düşünülmektedir. Bunlar, damar duvarında, kan akımında ve kanın pıhtılaşmasındaki değişiklikler olarak bilinen faktörlerdir. Yenidoğan bebeklerde damar duvarındaki değişikliğe yol açan en önemli neden damar içi kateterlerdir. Umblikal artere kateter takılan bebeklerin yaklaşık %1'inde şiddetli semptomatik trombus bulguları olduğu görülmüştür (10).

Arteriyel trombozlarda endotel hasarı ve trombosit fonksiyonları önem kazanırken, venöz trombozlarda staz ve pıhtılaşma, fibrinolitik sisteme ait bozukluklar ön plana çıkmaktadır (11). Kalıtsal trombofililerin tamamının venöz tromboza eğilim yarattığı çalışmalarda gösterilmiştir (12,13).

Yenidoğan bebeklerde kateter uygulamaları sırasındaki endotel hasarı en önemli neden olarak görülmektedir. Yenidoğan döneminde antikoagölan sistemde protein C (PC), protein S (PS), Antitrombin III (AT-III), heparin kofaktör II düzeyleri düşük; alfa 2 makroglobülin ve trombomodulin düzeyleri yüksektir. Ayrıca plazminojen ve antiplazmin düzeyleri düşük olup, doku plazminojen aktivatör ve plazminojen aktivatör inhibitör 1 düzeyi yüksektir. AT-III, heparin kofaktör II ve PS düzeyleri ortalama 6. ayda normale ulaşırken PC, erişkin düzeye 4 yıldan sonra ulaşır. Ayrıca hemoglobin ve hematokrit yüksekliği yenidoğan dönemindeki riskin artmasında etkilidir (14,15). Adolesan dönemde ise hormonal

değişikliklerle birlikte sigara, alkol, oral kontraseptif alımı gibi çevresel faktörlerin daha etkin olmasının ve azalan alfa 2 makrogobulin düzeyinin sorumlu olabileceği düşünülmektedir (15,16). Hiperkoagülabilitate, primer (konjenital) ve sekonder patolojiler sonucunda oluşur.

Hiperkoagülabilitenin primer (kalıtsal) nedenleri:

1. Antitrombin III eksikliği
2. P C eksikliği
3. P S eksikliği
4. FVL'e bağlı APC direnci
5. Fibrinolizis anormallikleri
  - Plazminojen eksikliği
  - Displazminojenemi
  - Plazminojen aktivatör inhibitörü
  - Alfa 2 makroglobulin eksikliği
6. Diğer sebepler
  - Disfibrinojenemiler
    - Histidinden zengin glikoprotein artışı
    - Homosistinemi
    - Heparin kofaktör II eksikliği

Hiperkoagülabilitenin sekonder nedenleri:

1. Trombosit anormallikleri
  - Trombositoz
  - Diyabetes mellitus
  - Myeloproliferatif hastalıklar
  - Hiperlipidemi
2. Koagülasyon ve fibrinolitik anormallikler
  - Oral kontraseptifler
  - Nefrotik sendrom
  - Vitamin K bağımlı faktör konsantrasyonlarının infüzyonu

## Malignite (Trousseau's Sendromu)

### 3. Vasküler endotel anormallikleri

Ateroskleroz

Vaskülit

Diyabetes mellitus

Homosistinemi

### 4. Diğer sebepler ve kombine anormallikler

Dissemine intravasküler koagülasyon

Lupus inhibitör sendrom

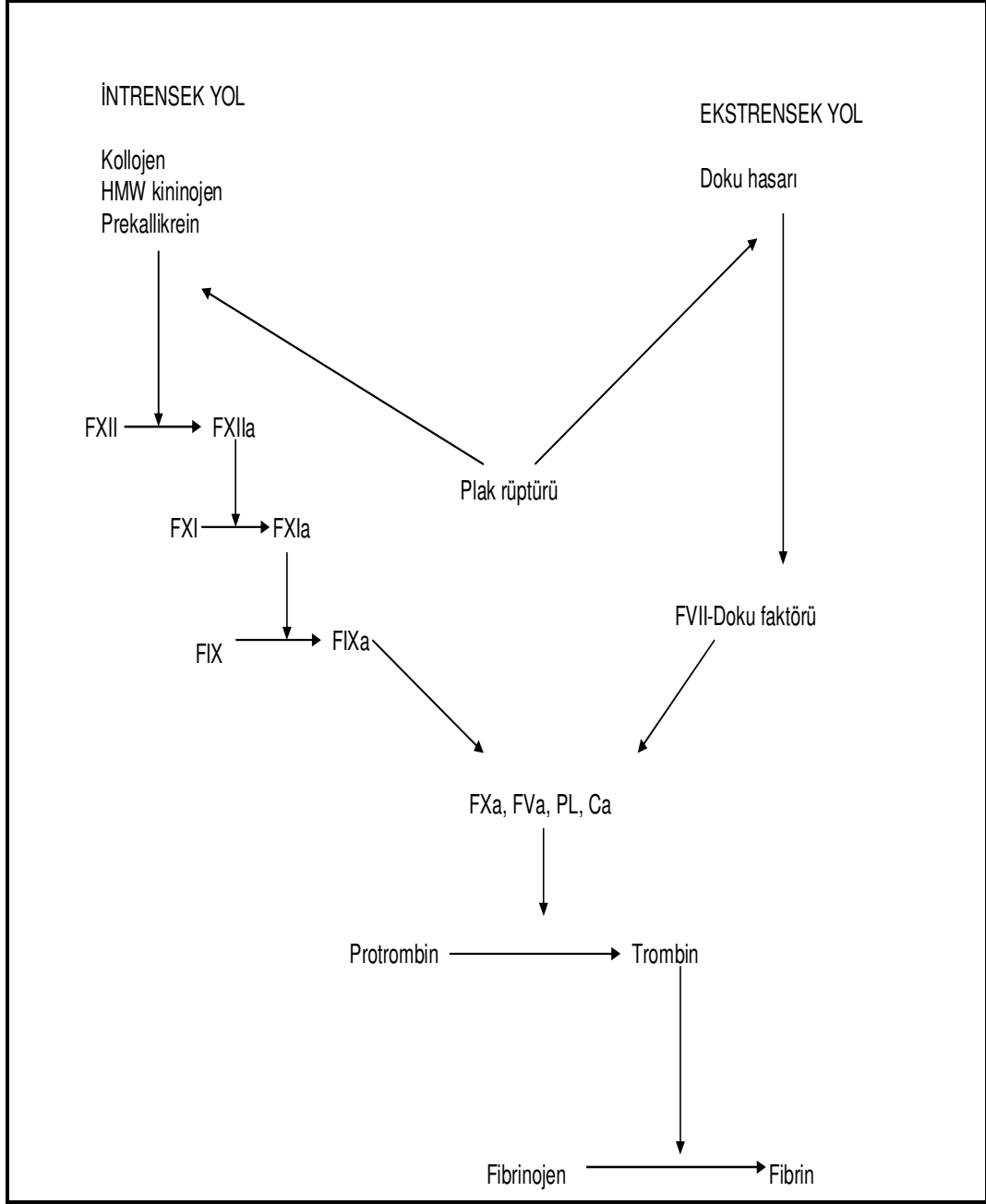
Gebelik, heparine bağlı trombositopeni veya trombositoz

## 2.1. KOAGÜLASYON MEKANİZMASI

Pıhtılaşma proteinleri gerekenin çok üzerindeki miktarlarda aktiflenmemiş zimojenler halinde dolaşımında bulunurlar. İntrensek yol ve ekstrinsek yol olarak 2 aktiveleşme yolu bilinmektedir (Şekil 1). Pıhtılaşma proteinlerinin çoğu karaciğerde yapılıır. Faktör II, VII, IX, X, PC ve PS'in yapımı için K vitamini gereklidir. Fibrinojen, FV ve proteaz inhibitörleri de karaciğerde yapılıır. Yapım ve işlevleri için K vitamini gerekli değildir (17).

### 2.1.1.İntrensek Pıhtılaşma Yolu

İntrensek yol, koagülasyon erken basamağını oluşturmaktadır. Aktivasyon basamağının faktör XII'nin (FXII) aktivasyonu ile başladığı tam olarak anlaşılammakla beraber böyle olduğu düşünölmektedir. FXII aktivasyonuna neden olan başlıca durumlar, kanın kollajenle ya da cam gibi ıslanabilen yüzeyle temas etmesidir. Aktive edici yüzey ile karşılaşan FXII, enzimatik etki ile faktör XI'i (FXI) aktive eder ve intrinsek pıhtılaşmada ikinci basamağı oluşturur. Bu basamak için yüksek moleköl ağırlıklı kininojene ihtiyaç vardır ve prekallikrein de reaksiyonu hızlandırıcı rol oynamaktadır. Aktif haldeki FXII, FXI'i aktiveştirir. Kalsiyum varlığında



Şekil-1: Koagülasyon Şeması

aktive F XI ise hem faktör IX (FIX) hem de faktör VIII'i (FVIII) aktive etmektedir ve fosfolipit bulunan ortamda da aktive haldeki FVIII, faktör X'u (FX) aktifleştirmektedir. Böylece, ortak yolun aktivasyonu başlamış olur. Asidik fosfolipitlerin ve kalsiyum'un bulunduğu ortamda bir araya gelen doku faktörü, faktör VII (FVII) ile birleşip FX'u aktive hale getirmektedir. FVII, intrinsek yolda FIX'u aktifleştirerek FX'un aktiflenmesine neden olmaktadır. FX hem intrinsek hem ekstrinsek

yoldan da aktiflenebilmektedir. FX, faktör Va (FVa) ile kalsiyum ve fosfolipitlerin ortamda bulunması ile protrombin trombine dönüşmektedir (17-19).

### **2.1.2. Ekstresek Pıhtılaşma Yolu**

Hasarlanmış dokulardan salınan doku faktörü doğrudan faktör VII'yi aktifleştirir. Bu da kalsiyum varlığında FX'u, FXa' ya çevirir. Ayrıca doku faktörü, FVIII-kalsiyum kompleksi, faktör XI'i aktifleştirebilir. Doku faktörü aktif endotel ve monositlerde, ayrıca beyinde damarların adventisyasında, deride ve mukozada bulunur.

Aktiflenmiş trombositlerin yüzeyinde, plazma protrombinaz komplekslerinin toplanması, trombosit zarına bağlanmış başka bir kofaktör olan FV'in varlığında, protrombinin (faktör II), trombosit yüzeyinde trombine dönüşmesini sağlar. Trombin, fibrinojeni fibrine dönüştürerek fibrinolitik sistemi aktive hale getirir.

Trombinin, pıhtılaşma üzerindeki bir başka etkisi de; trombositleri uyarak onların pıhtılaşmaya yardımcı işlevlerinin ortaya çıkmasını ve tromboksan, kalsiyum, adenin dinükleotit fosfor (ADP), von Willebrand Faktörü, fibronektin, trombospandin gibi trombosit kümeleştirici faktörlerin salgılanmasını sağlar. FVIII ve FVa'yı parçalayarak pıhtılaşmaya, faktör XIII'ü (FXIII) parçalayarak ise fibrinin sağlamlaştırılmasına katkıda bulunur.

Trombinin endotel üzerine de etkisi vardır. Yüzey proteini, trombomoduline bağlanarak, FVa ve FVIIIa'yı etkisizleştiren ve aynı zamanda fibrinolizi uyaran PC'nin aktifleşmesini sağlar. Trombin, endotel hücrelerinin kasılmasına neden olur. Buna karşılık, endotel de trombinin bağlayıp etkisizleştirebilir ve bazı olgularda trombine yanıt olarak vazodilatör madde prostosiklini üretebilir. Böylece trombinin pıhtılaşmanın başlaması kadar sınırlandırılmasında da etkilidir.

Pıhtılaşma olayının son evresi fibrinolizis yani pıhtı erimesidir. Bu işlem, daha pıhtılaşmanın başında trombinin, PC'yi aktiveleştirerek damar duvarından plazminojen aktiveleştiricilerin salınımına yol açması ile zaten başlamıştır. Plazminojeni plazmine çeviren, plazminojen aktivatörleri; doku plazminojen aktivator (tissue plasminogen activator, t-PA), urokinaz plazminojen aktivator (UPA) olmak üzere 2 tanedir.

Doku plazminojen aktiveleyicilerinin eylemleri fibrine bağlanarak güçlenir, böylece plazmin oluşumu pıhtı ile sınırlı kalır. Bu sistemin kontrolü ise inhibitörlerce sağlanır. Plazmin, alfa 2 antiplazmin, t-PA da plazminojen aktivatör inhibitör 1 (PAI-1)'e bağlanarak inaktive olur. Pıhtılaşma sistemi aktive olduğunda, pıhtılaşmanın tüm duvar sistemine yayılmaması için olayın damar duvarında hasarın olduğu yerde sınırlı tutulması gerekir. TFPI, heparin, AT-III, heparin kofaktör II, dermatan sülfat, trombomodülin, PC, PS koagülasyon sisteminin doğal inhibitörlerdir (17).

## **2.2 ANTİTROMBİN-III**

Karaciğerde sentezlenen AT-III, trombin ve diğer serin proteazları (faktör XIIa, XIa, Xa, IXa) inaktive hale getirmektedir. AT-III'ün, trombin ve heparin bağlayan olmak üzere iki önemli fonksiyonel kısmı vardır. AT-III eksikliği, otozomal dominant (OD) geçişli olup, eksikliğinin başlıca klinik bulgusu trombozlardır. Homozigot AT-III eksikliği, çok nadirdir ve yaşamla bağdaşmaz (20-21). 1966-1999 yılları arasında literatürde 7 olgu bildirilmiştir (20). Heterozigot AT-III eksikliği; FVL, PC ve PS eksikliğine göre nadir fakat daha ciddi tromboz riski oluşturur (21).

## **2.3 PROTEİN S**

Karaciğerde, endotelde ve megakaryositlerde yapılmaktadır. PS, PC'nin etki göstermesi için gerekli bir kofaktördür ve FVa üzerine olan etkiyi arttırmaktadır (22). PS karaciğerde sentez edilmekte olup,



plazmada hem serbest hem de aktif halde bulunmaktadır (23). Heterozigot PS eksikliği OD geçişli olup ilk kez 1984 yılında tanımlanmıştır. PS eksikliğinde ilk trombotik olay, ortalama 28 yaş civarında görülmektedir. Olguların yarısından çoğunda, tromboz spontan gelişirken, diğerlerinde belirlenen bir sebep bulunmamaktadır (24). PS eksikliği, PC eksikliğine rastlanma oranına göre daha az olmaktadır (23). Sağlıklı populasyonda görülme sıklığı; %1'den az iken, trombozlu hastalarda; %5-7 kadar olduğu gösterilmiştir (25).

## **2.4 PROTEİN C VE AKTİVE PROTEİN C'NİN ETKİ MEKANİZMASI**

Trombofili nedeni olarak, kalıtsal bozuklukların en sık rastlanılanı APC direncidir (26,27). Türkiye'de sağlıklı bireylerde taşıyıcılık %7-10 arasında saptanmıştır (28,29). PC'nin optimal aktivasyonunun gerçekleşmesinde kalsiyum, trombin, PS, trombomoduline gereksinim vardır. Trombin, koagülasyon mekanizmasındaki fonksiyonundan farklı olarak, PC'yi aktive hale getirir. Trombin, trombomodulin ile kompleks oluşturur. Bu kompleks oluşumundan sonra trombinin substrat spesifikliğı değişir. PC'nin kalsiyum köprüleri aracılığı ile komplekse bağlandığı aşama, PC'nin aktifleşmesine eşlik eden aşamadır. Trombin, PC'nin N terminalini aşarak aktif serin ucu ile buluştuğunda, PC aktive hale gelmektedir (18). APC fosfolipit bağlı FVa ve FVIIIa'yı spesifik olarak parçalayarak aktive halden, inaktive duruma getirir. Bu özelliğinden dolayı koagülasyon inhibe olur. PS'nin serbest şekli, gösterdiği yüksek afinitesinden ötürü, APC'yi trombosit yüzeyindeki, trombosit mikropartiküllerindeki ve endotel yüzeyindeki fosfolipitlere bağlayarak antikoagülasyonda kofaktör olarak iş görmektedir. PS'nin, FV'in, APC'nin FVIII'i indirgemesi olayında kofaktör rolü oynadığı ileri sürülmüştür (30). Heterozigotlarda 3-8 kat, homozigotlarda 50-80 kat tromboza yatkınlık artmaktadır (26,27,31,32).

## **2.5. HİPERHOMOSİSTEİNEMİ**

Homosistein metioninden sentezlenen bir aminoasiddir (33-34). Sistatyon beta sentetaz ve MTHFR genlerindeki mutasyon sonucunda plazma homosistein düzeyi artar (35). En sık, MTHFR ve sistatyon beta sentetaz enziminde defekt saptanmıştır (36). Toplumun yaklaşık %10'nun MTHFR C677T taşıdığı ve hafif hiperhomosisteinemi olduğu bilinmektedir (27). Hiperhomosisteineminin, tromboz riskini 2.5 kat artırdığı bildirilmiştir (37,38). Annede olan C677T mutasyonunun spina bifida için 2.9 - 3.7 kat risk artışına yol açtığı bildirilmiştir (38). Diğer kalıtsal nedenli trombozlar, genellikle venöz tromboz nedeni olurken, hiperhomosisteinemi arteriyel ya da venöz tromboz nedeni olabilir (39).

## **2.6. FAKTÖR V LEİDEN GENİ VE AKTİVE PROTEİN C REZİSTANSI**

Normal koşullarda APC, FVa ve FVIII'a'yı parçalayarak tromboza eğilimi engellemektedir (4). Aktive PC rezistansında (APCR) ise, FV, APC tarafından parçalanmaya rezistans göstermektedir. Buda tromboza eğilim yaratmaktadır (4,40). APCR olan hastaların %80-95'den FVL mutasyonunun sorumlu olduğu bildirilmiştir (4,40,41). APCR'nın, FVL mutasyonu olmayan olgularda da pozitif olduğu bilinmektedir (42,43). Bunun aksine FVL mutasyonu taşıyan bazı olgularda, APCR normal bulunabilmektedir (44). FVL mutasyonunda, FV geninin 1691. nükleotidi olan, guanin yerine adenin gelmiştir. Bunun sonucu olarak 506. aminoasid olan arginin, glutaminle yer değiştirmiştir (2). Bu mutasyon faktör V Q506, FV R506Q veya FV 1691 G-A olarak adlandırılmaktadır. FVL mutasyonun sağlıklı popülasyondaki sıklığı %2-10 olarak bildirilmiştir (45,46,29). Bölgelere ve ırklara göre FVL sıklığında büyük farklılık olduğu görülmüştür (45-47). Avrupa ve Kuzey Amerika'da, insidans yüksek olmasına karşın, Japonya, Çin, Afrika ve Amerika'nın yerli topluluklarında, mutasyona rastlanmamıştır (48). FVL sıklığı, Avrupa ülkelerinde %3-5, Yunanistan'da %14, Türkiye'de %7.1-10.3 olarak saptanmıştır (49-51). Kıbrıs'lı Türkler'de bu oran %12.2 olarak bildirilmiştir (51). Avrupa'da en sık görüldüğü yer, Yunanistan ve Kıbrıs Rum kesimidir (52). Avrupa dışında oranın en az Yunanistan kadar

yüksek olduğu bir diğer ülke de Azerbaycan'dır ve sıklık %14 olarak rapor edilmiştir (53). Heterozigot FVL mutasyonu taşıyanlarda, venöz tromboz riskinin normallere göre 5-10 kat, homozigot şeklinde ise 50-100 kat arttığı bildirilmektedir (4,45).

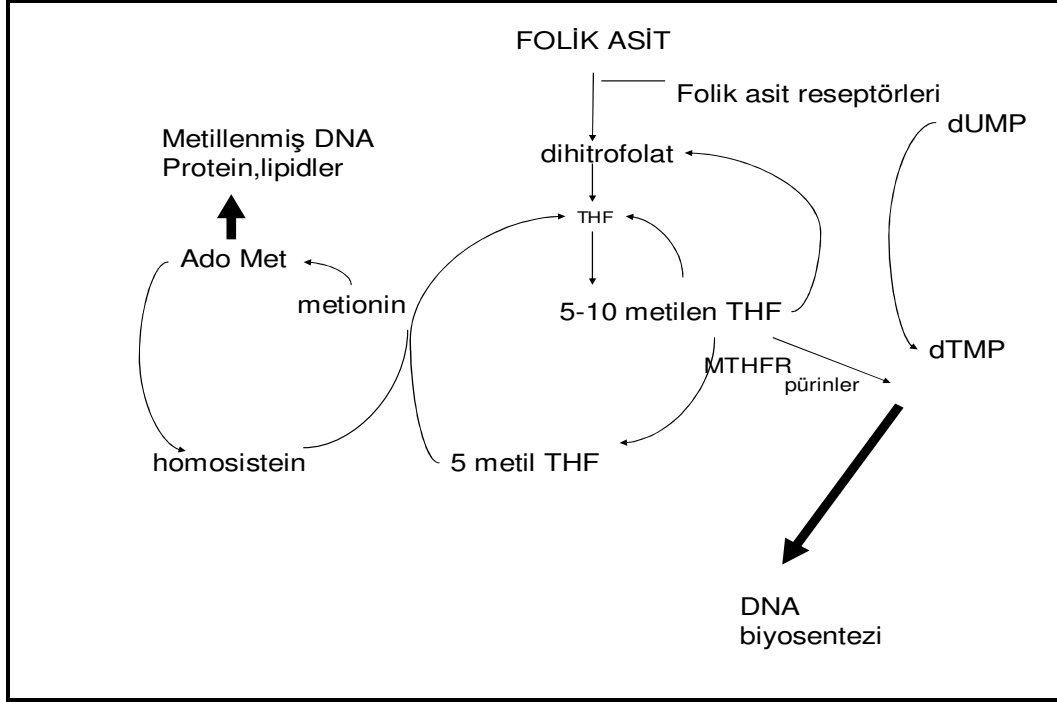
FVL gen mutasyonu ve PC eksikliği, FVL mutasyonu ve PS eksikliği veya FVL ve AT-III eksikliği gibi gen defektlerinin birlikteliği tek bir defektin sahip olduğu riskten daha fazla tromboz riski taşır. Sadece PC eksikliği olanlarda yaşam boyu tromboz riski %31, sadece FVL gen mutasyonu taşıyıcılarında %13 iken; her iki defekti de taşıyan bireylerde bu risk %73 olarak bulunmuştur (54).

## **2.7. METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ GEN MUTASYONU**

Homosistein, metioninin metabolize olması ile oluşur. Bu dönüşüm için hücre içi enzimlere ve vitamin kofaktörlerine gereksinim vardır. Homosistein remetilasyonla tekrar metionine dönüşümü metionin sentetaz ve betaine-homosistein metiltransferaz isimli iki enzim tarafından sağlanır. Ciddi homosisteineminin toplumda görülen en sık nedeni homosisteinin sistationine dönüşümünü sağlayan sistationin B sentetaz enzimidaki homozigot defektir. %5-10 ise metilentetrahidrofolatın metil tetrahidrofolata dönüşümünü sağlayan MTHFR enzimidaki defektir. Remetilasyon mekanizmasındaki bu en sık görülen defekt, nörolojik disfonksiyon, psikomotor retardasyon, periferik nöropati, konvulziyon, prematür vasküler hastalıklar ve tromboembolizmle seyrederek (55). MTHFR geninde görülen 677. nükleotidde bir nokta mutasyonu sonucu sitozinin timine değişimi olmakta ve alanin yerine valin aminoasidi geçmektedir. Bu değişim sonucunda enzimin termolabilitesi artmakta ve aktivitesi %50 azalmaktadır (56). Beyaz ırkta homozigot mutasyon görülme sıklığı %5-20 arasındadır. Türkiye'de ise bu oran %6-8 arasındadır. Bu mutasyon varlığında enzim aktivitesi %50 azalmasına rağmen her olguda hiperhomosisteinemi görülmez. Bu durum hiperhomosisteineminin ortaya çıkışında başka faktörlerin de etkili

olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmalar termolabil MTHFR'nin genellikle düşük serum folik asit varlığında hiperhomosisteinemiye yol açtığını göstermiştir (57,58).

MTHFR, folat metabolizmasında önemli bir enzimdir ve 656 aminoasitten oluşur (59,60). MTHFR enzimi, homosisteinin remetilasyon döngüsünde (homosistein, transsülfürasyon ve remetilasyon yollarını kullanarak metabolize olur) görev yapar (60). MTHFR, 5,10 metilentetrahidrofolatı (5,10-metilen THF) geri dönüşümsüz olarak 5-metil tetrahidrofolata (5-metil THF) dönüştürür (Şekil 2) (60,61). 5-metil THF; DNA metilasyonu ve metiyonin sentezi için metil grubu sağlar. Bunun için 5-metil THF, metil grubunu vererek, homosisteinin dönüşümünde rol oynar. 5,10- metilen THF ise deoksiüridilatın, timidilata dönüşümünde kullanılırken bir taraftan da pürin sentezi için 10-formil THF'a okside olmaktadır (61). MTHFR geninde meydana gelen bir mutasyon (en yaygın olanı C677T polimorfizmi) enzim aktivitesini azaltmaktadır (62). Azalan MTHFR aktivitesi sonucunda 5- metil THF düzeyi azalmakta, 5,10-metilen THF miktarı ile plazma homosistein düzeyi artmaktadır (59,62,63).



Şekil-2: MTHFR enziminin rolünü gösteren mekanizma. Enzim iki kol arasında metil transferinde rol oynar.

## 2.8. PROTROMBİN G20210A MUTASYONU

Kalıtsal trombofiliden sorumlu tutulan PG 20210A mutasyonu, 1996'da tanımlanmıştır. Bu mutasyonda, protrombin geninin translasyona uğramayan 3' bölgesinde, 20210 pozisyonundaki guaninin, adenin ile yer değiştirmesi sonucunda glisin aminoasidi yerine, arjinin gelmektedir. Adı geçen mutasyonu taşıyanlarda, protrombin düzeyinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (8). PG 20210A mutasyonunda, kesilme bölgesinin tanınmasında, 3'ucunun işlenmesinde sorun olmakta ve mRNA birikiminde artma olmaktadır. Bu da, protein sentezinde artmaya sebep olmaktadır (64). Bu mutasyonun heterozigot şekli, sağlıklı populasyonda %1-2, venöz trombozu olan hastalarda %6-8 sıklıkta görülmektedir (8,65,66). PG 20210A mutasyonu taşıyanlarda, tromboz riskinin 2.8 kat arttığı bulunmuştur (67,68). PG 20210A mutasyonu sıklığı bölgelere ve ırklara göre büyük farklılıklar göstermektedir (48,65). Dokuz farklı ülkedeki 11 merkezde 5527 birey üzerinde tarama sonuçlarında hiç homozigot birey saptanmazken, taşıyıcı oranı %0.7-4 arasında saptanmıştır (65). Kuzey

Avrupa'da insidans %1.7 iken güneyde bu oran %3'dr (65). Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise kontrol grubunda heterozigot mutasyon sıklığı %2.2-%2.7 olarak bulunmuştur (69,51). Kıbrıs'lı Türklerde bu oran %8.1 olarak bulunmuştur (51). Ancak FVL'e göre yaklaşık 3 kat daha az trombotik risk oluşturur (65,70-72). FVL ile birlikteliği büyük risk yaratır (72-74).

PG 20210A mutasyonu olan kişilerin büyük kısmında diğer trombofilik anormallikler de bulunmaktadır. Bunlardan en sık olanı FVL mutasyonu ve antifosfolipit antikorlarıdır. PG 20210A mutasyonu taşıyıcılarında %40 oranında FVL mutasyon pozitifliği bulunmuştur (64). PG 20210A mutasyonu saptanan kişilerde %55 oranında diğer trombofilik anormalliklere rastlanmıştır. Bunlardan en sık %25 antifosfolipid antikor mevcudiyeti ve %20 FVL mutasyonudur (75).

### III-GEREÇ VE YÖNTEM

Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Ahmet Necdet Sezer Uygulama ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği'nde Ocak 2006-Aralık 2006 tarihleri arasında doğan 96 olgu çalışmaya dahil edildi. Çalışma için fakülte etik kurul kararı alındıktan sonra, tüm olguların ebebeynlerine çalışma hakkında sözlü ve yazılı olarak bilgi verildi ve gönüllü olur formu imzalatıldı. Tüm olguların kordon kanı örnekleri, pıhtılaşmayı engellemek için, etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) tüplere 2 ml kadar alındı.

Olgularda, tromboza eğilim yaratan risk faktörleri ile MTHFR, PG20210A, FVL mutasyon sıklığı arasındaki ilişkiye bakıldı. Risk faktörleri olarak; annede hipertansiyon, ailede tromboz öyküsü, ebebeynlerin sigara içme durumu sorgulandı. Ailede tromboz araştırılırken; annede, babada, birinci derece akrabalarda derin ven trombozu, ateroskleroz öyküsü olması, tromboz varlığı olarak kabul edildi. Ebebeynlerin sigara içme durumu sorgulanırken; günde 1 tane ve daha fazla sigara içen ebebeynler sigara içiyor kabul edildi. Olgular kendi içinde prematür, term, IUGG, AGA olarak ayrılıp, MTHFR, PG20210A, FVL mutasyon sıklığı açısından değerlendirildi. Term, prematür, IUGG, AGA olarak sınıflama yapılırken, aşağıdaki tanımlara uyuldu:

Term: 37 gebelik haftası ve 37 gebelik haftasının üzerinde doğan yenidoğanlar.

Prematür: 37 gebelik haftasının altında doğan yenidoğanlar.

IUGG: Cinsiyete ve gebelik haftasına göre doğum ağırlığı 10 percentilin altında olan yenidoğanlar.

AGA (Appropriate for gestastional age): Cinsiyete ve gebelik haftasına göre doğum ağırlığı 10-90 percentilde olan yenidoğanlar.

Bu çalışmaya dahil edilen 96 olgunun kordon kanı örneklerinden genomik DNA elde edildi. Amplifiye edilen DNA'nın basit nükleotid primer uzama reaksiyonunu takiben "Pronto ThromboRisk" kiti kullanılarak ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) yöntemiyle genotipleme yapıldı.

Yöntem teorik olarak 3 basamaktan ibaret olup DNA ekstraksiyonu, genotipleme ( DNA amplifikasyonu, amplifiye edilen ekzonların agaroz jelde görüntülenmesi, post amplifikasyon, primer uzatma, ELISA) işlemlerini çermektedir.

## **Değerlendirme**

### **DNA Ekstraksiyonu:**

Olgulara ait kordon kan örneklerinden genomik DNA izole edildi. DNA izolasyonunda "Pronto's® DNA ekstraksiyon" kiti kullanıldı.

### **Genotipleme İçin Kullanılan Çalışma Yöntemi Akış Şeması**

#### **DNA Amplifikasyonu:**

Test edilen mutasyonları içeren DNA parçaları amplifiye edildi. Amplifiye olan DNA primer uzama reaksiyonları için substrat olarak kullanıldı. Amplifikasyon işlemi için 0,2 ml'lik tüplere 19 µl amplifikasyon miks, 0,4 µl Taq DNA polimeraz ile 5 µl örnek DNA konuldu ve "thermal cycler cihazı" 94 °C'de 5 dakika, 94 °C'de 30 saniye, 66°C'de 20 saniye, 72 derecede 20 saniye (15 döngü), 72 °C'de 2 dakika 94°C'de 30 saniye, 58 derecede 30 saniye,72 derecede 30 saniye (25 döngü) ve 72 derecede 5 dakika olmak üzere ayarlanarak örneklere polimeraz zincir reaksiyon (polymerase chain reaction- PCR) işlemi uygulandı.

#### **Post Amplifikasyon**

Post amplifikasyon hazırlanışında amplifiye edilen her 15µl PCR ürününün 5µl'si post amplifikasyon işleminde kullanmak için, 5µl'si pozitif örnekleri tekrar çalışmak için ayrıldı. Amplifikasyon ürününün 5 µl'si 5 µl yükleme tamponu ile %2'lik agaroz jele yüklendi ve yürütüldü.



Ana karışım için 15 µl'lik bir tüp hazırlanıp işaretlendi. Post amplifikasyon karışımı kullanılmadan hemen önce hazırlandı. Tablo I'e göre Pronto Buffer, Solüsyon C ve Solüsyon D test tüpü içerisinde karıştırıldı. Tablodaki hacimler test edilecek örnek sayısının bir fazlasıyla çarpıldı.

Tablo-I: Post Amplifikasyon Karışımının Hazırlanışı

Çözeltiler	Bir Örnek İçin Kullanılacak Hacimler
Pronto Buffer 2	60.0 µl
Solüsyon C	3.0 µl
Solüsyon D	2 µl
Toplam Hacim	65 µl

Solüsyon pipetaj yapılarak karıştırıldı. Test tüplerine 65 µl post amplifikasyon karışımı kondu ve 15 µl 1. PCR ürünü ilave edildi. Pipetaj yaparak post amplifikasyon karışım ile amplifiye olan DNA örneğinin karışması sağlandı ve bir damla "ColoRed <sup>TM</sup>" yağ eklendi. 37 °C'de 30 dakika, sonra 95 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Hemen kullanılmayacak durumlarda maksimum 4 saat 2-8 °C de saklandı.

### Primer uzatma

"Thermocycler cihazı" aşağıdaki protokole göre programlandı.

Tablo-II: "Thermocycler" cihaz protokolü

A	Başlangıç	94 °C	15 saniye
B	20 döngü	94 °C 52 °C	30 saniye 10 saniye
C	Sonlanma	18-25 °C sıcaklığı oda sıcaklığına indirildi	

Kuyunun dibindeki renge dikkat edildi. Test edeceğimiz her örnek için bir pembe kuyu ve bir mavi kuyu kullanıldı. Post amplifikasyon uygulanmış örnekten 8'er µl kuyucuklara dağıtıldı. Amplifikasyon ürününün her bir kuyunun dibinde bulunduğunu kontrol edildi. Her kuyu bir damla

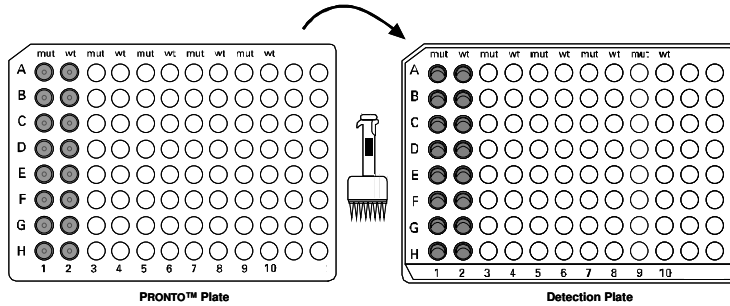
“ColoRed-Oil” ile kaplandı. Bu süreçte damlalığın ağzıyla kuyulara dokunulmamasına özen gösterildi.

”Termal cycler” cihazı çalıştırıldı ve siklus protokolü başlatıldı. Sıcaklık 90° C’ye ulaştığında plate yerleştirildi. Basit primer uzama reaksiyonu tamamlandıktan sonra ELISA ile belirleme aşamasına geçildi.

### ELISA İşlemleri

Biyotinle etkilenmiş primerlerin belirlenmesi ELISA prosedürü ile gerçekleştirildi. Biyotinle etkilenmiş primerler streptavidin kaplanmış ELISA plağına bağlanır ve primerin 5’ antijenik ucuna yönlenmiş peroksidaz reaksiyon TMB (Tetramethylbenzidine) substratın varlığında meydana gelir.

ELISA işlemleri uygulanmaya başlandığında öncelikle bütün reaktifleri oda sıcaklığına getirildi. 20 x “Wash Solüsyon” deiyonize su ile dilue edilip 1x yıkama solüsyonu hazırlandı. “Plate” kenarına test ismi ve tarihi yazıldı.”Pronto plate” ve “Detection plate” aynı oryantasyonda yan yana şekil-3’de gösterildiği üzere yerleştirildi.



Şekil-3: Pronto plate ve Detection plate yerleştirilmesi

Bundan sonra aşağıda sıralanan basamaklar izlenerek ELISA ile belirleme işlemi yapıldı.

Çok kanallı pipet ile “Pronto plate”deki her kuyuya mineral yağın altına girilerek 100 µl “Assay Solüsyon” eklendi, birkaç kez pipetaj

yapılarak assay solüsyonu ile örneğin karışması sağlandı. Assay ve örnek karışımı detection plate'ye aktarıldı. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 10 dakika inkübe edildi.

İnkübasyon devam ederken 3,3 µl "Konjugat HRP 330 µl Assay Solüsyon" içinde 1:100 oranında dilue edildi. Kullanılan her Detection Plate için gerekli olan 11 µl "Assay solüsyon'da dilue edilmiş Konjugat HRP" her testte taze olacak şekilde hazırlandı.

İnkübasyon sonrasında "Detection Plate 1xWash Solüsyon" ile 4 kez yıkandı. Son yıkamadan sonra kuyular kurumaya bırakıldı. Tüm kuyulara çok kanallı pipet ile 100 µl taze hazırlanan konjugat HRP ilave edildi. Plate oda sıcaklığında ve karanlıkta 10 dakika inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında "detection plate 1 x Wash solüsyon" ile 4 kez yıkandı. Son yıkamadan sonra kuyular kurumaya bırakıldı. Tüm kuyulara çok kanallı pipet ile 100 µl "TMB-Substrat" eklendi, oda sıcaklığında ve karanlıkta mavi renk oluşuncaya kadar 15 dakika süreyle inkübe edildi.

### **Sonuçların analizi**

Sonuçlar TMB substrat çözeltisinin ilavesini takiben görülebilir hale geldi. Sonuçların değerlendirilmesinde test için kullanılan "Pronto Plate" kitinde belirtilen test değerlendirme ölçütleri göz önünde bulunduruldu. Mavi rengin oluştuğu kuyucukta test edilen mutasyon noktasında pozitif sonuç olduğuna karar verildi.

### **İstatistik Yöntemi**

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizi bilgisayarda, "SPSS 10.0" paket programı ile yapıldı. İstatistiki yöntem olarak Ki-kare ve mutasyon varlığı üzerine etkili olduğunu düşündüğümüz değişkenlerden (hipertansiyon, sigara, tromboz) hangisinin gerçekten etkili olduğunu anlamak için iki ileri istatistiksel analiz yöntemi (lojistik regresyon, tek yönlü varyans

analiz) kullandık. Lojistik regresyon analizi ve tek yönlü varyans analizi için  $p < 0,001$ , ki-kare yöntemi için  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## IV-BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 96 olgunun, 46'sı (%48) kız, 50'si (%52) erkek idi. Bunların 25 tanesi IUGG, 71 tanesi AGA, 44 tanesi prematür, 52 tanesi term idi.

Olguların doğum ağırlığı, doğum boyu, doğum haftası, IUGG olgularda ponderal indeks ortalaması tablo III'de verildiği gibidir (Tablo III).

Tablo-III: Olguların ortalama değerleri

Doğum ağırlığı (gram) (ort±SD) (min-maks)	Doğum boyu (cm) (ort±SD) (min-maks)	Doğum haftası (ort±SD) (min-maks)	Ponderal indeks (ort±SD) (min-maks)
2373.00 ± 872.85 (450 - 3980)	44.69 ± 5.69 (29 - 52)	35.96 ± 4.07 (24 - 41)	2.39 ± 0.45 (1.5 - 3.4)

Olgular doğum şekillerine göre gruplandırıldığında 39 olgu normal vajinal yolla doğum (%40.6), 57 olgu sezeryan ile doğum (%59.4) olarak saptandı.

Tromboza eğilimi arttıran risk faktörleri açısından gruplara bakıldığında; 42 tanesinde ebebeynlerden hiçbiri sigara içmiyorken (%43.9), 54 tanesinde babanın sigara içme (%56.3) öyküsü mevcuttu. Hastaların hiç birinde annede sigara içme öyküsü saptanmadı. Çalışma grubuna 1. dakika APGAR'ı 7'nin altında olan olgular dahil edilmedi.

72 Hastada (%75) annede hipertansiyon öyküsü yokken, 24 hastada (%25) annede hipertansiyon öyküsü saptandı. Ailede tromboz öyküsü 5 hastada (%5.2) mevcuttu.

Annedeki hipertansiyonun, bebekteki mutasyonlar üzerine gerçekten etkili ve önemli olan değişken olduğunu bulduk ( $r=0,421$  ;  $p<0,001$  ; lojistik regresyon  $p<0,001$  ; Tek yönlü varyans analiz  $p<0,001$ ). Ailede tromboz varlığı ile babanın sigara içme durumunun ise bebekteki mutasyonlara etkisi yoktu (Tablo IV-Tablo V).

Tablo-IV: Risk faktörleri - mutasyon ilişkisi

Mutasyon	Ailede tromboz		Babanın sigara içme durumu		Annede hipertansiyon	
	Yok	Var	İçmiyor	İçiyor	Yok	Var
Yok	47	0	26	21	44	3
Var	44	5	16	33	28	21
P	0.99		0.60		0.0003	
OR	0		0.26		8.65	

Lojistik regresyon analizi

OR: Odds Ratio

Tablo-V: Risk faktörleri - mutasyon ilişkisi

Mutasyon	Ailede tromboz		Babanın sigara içme durumu		Annede hipertansiyon	
	Yok	Var	İçmiyor	İçiyor	Yok	Var
Yok	47	0	26	21	44	3
Var	44	5	16	33	28	21
P	0.24		0.51		0.001	

Univariate analiz

Prematür, term olgular, mutasyona eğilim açısından kıyaslandığında; prematür olgularla, gen mutasyonları arasında pozitif ilişki saptandı (Tablo VI).

Tablo-VI: Prematür, term olgular ile mutasyon ilişkisi

	Mutasyon	
	Yok	Var
Prematür	16	28
Term	31	21
P	0.02	

P= Ki-kare testi

IUGG, AGA olgular mutasyonlara eğilim açısından kıyaslandığında anlamlı fark bulunmadı (Tablo VII).

Tablo-VII: IUGG, AGA olgular ile mutasyon ilişkisi

	Mutasyon	
	Yok	Var
IUGG	10	15
AGA	37	34
P	0.35	

P=Ki-kare testi

IUGG: İntrauterin gelişme geriliği, AGA: Appropriate for gestationel age

IUGG olgular kendi içinde ponderal indeksine göre; simetrik ve asimetric olarak gruplandırıldı. Her iki grup arasında, mutasyonlara eğilim açısından anlamlı fark saptanmadı (Tablo VII).

Tablo-VIII: Simetrik, asimetric IUGG olgular ile mutasyon ilişkisi

	Mutasyon	
	Yok	Var
Asimetric IUGG	3	4
Simetrik IUGG	7	11
P	1	

P=Ki-kare testi

IUGG: İntrauterin gelişme geriliği

## V-TARTIŞMA

Tromboz, erişkin yaş grubunun hastalığı olmasına rağmen son yıllarda çocuklarda da görülme sıklığı giderek artmaktadır. Andrew ve arkadaşları (20), tromboz insidansını yenidoğan bebekler için her 100 000 hastane başvurusunda 240, daha büyük çocuklar için ise 53 olarak bildirmektedirler. Tromboz insidansı, erişkin dönemi için 78/100000'dir. Manco-Johnson grubunun (83) verdiği rakam ise 12/100000'dir. Ülkemizde Gürgey ve arkadaşları (26) tarafından yapılan çalışmada, çocuklarda hastaneye başvuru sırasında tromboz oranı 78/100000 olarak bildirilmekte ve yurdumuz için önemli bir sorun olarak vurgulanmaktadır. Çalışmalarda trombotik atak geçiren çocuklarda trombozun tekrarlama olasılığı %7-18.5, tromboza bağlı ölüm oranı %2.2 olarak belirtilmiştir (71,75). Çocuklarda hemostatik sistemin spesifik özelliklerinden dolayı, tromboembolik olayların pik insidansı yenidoğan ve 1 yaşının altındaki çocuklardadır (76). Vasküler olayların insidansı 1 yaşından sonra azalır, ikinci pik adolesan dönemindedir (77).

Yapılan çalışmalar yetişkinde ve çocuklarda hemostatik sistemin farklılık gösterdiğini ispatlamıştır (33,78-82). Yenidoğanlarda K vitaminine bağlı koagülasyon faktörleri olan F II, VII, IX, X ve bunlarla ilişkili faktörler olan F XI, XII, prekallikrein ve yüksek molekül ağırlıklı kininojenin plazma konsantrasyonları yetişkin değerlerinin %50'si kadardır. Bu değerler yaşamın ilk haftasında hızlı bir şekilde yükselerek 6. ayda yaklaşık erişkin düzeye ulaşır. Buna ek olarak K vitaminine bağlı antikoagülan olan PC, PS düzeyi yenidoğan döneminde düşüktür. Bununla birlikte plazmadaki total PS antijeni düşük olsa da, aktive PS düzeyi yüksektir. Bunun da belirlenememiş C4b binding protein seviyesine bağlı olduğu ve böylece vasküler olaylardaki riski azalttığı ön görülmektedir (79). Antitrombin, heparin kofaktörü 2 ve PC seviyesi erişkinlerdeki değerinin %50'si kadardır. Alfa 2 makroglobulin düzeyi ise doğumda erişkin düzeyinden yüksektir ve 6. ayda erişkin seviyesinin 2 katına ulaşır (78-80). Ayrıca



protrombin konsantrasyonunun yenidoğan plazmasındaki azalma, trombin üretimini azaltır, böylece çocuklarda ve çocukluk döneminde, trombotik olaylara karşı koruma sağlar. Yenidoğan dönemi boyunca prokoagülan koagülasyon sisteminin bazı komponentlerinin özellikleri, tromboembolizm riskini azaltır ama çocuklarda, fibrinolitik proteinlerin vasküler olaylara karşı koruyucu olduğuna dair kanıt yoktur. Yenidoğan döneminde t-PA konsantrasyonunun artmasına rağmen aktive plazminojenin azalması ve t-PA inhibitörü seviyesinin artışı hipofibrinolitik durumdan sorumludur (82).

Perinatal asfiksi, sepsisemi, preeklampsi, maternal diyabet, antifosfolipit antikoru, polisitemi, dehidratasyon, düşük kardiyak output, santral kateterizasyon, FVL, MTHFR, PG20210A gibi çeşitli mutasyonlar, PC, PS yetmezlikleri, yenidoğanda trombozis gelişiminde rol oynar. Son çalışmalarda kalıtsal özellik taşıyan yenidoğanların, %20'sinde yenidoğan trombozisi saptanmıştır (83). Çocukluk döneminde erken vasküler bulgular için en yaygın protrombotik risk faktörü FVL iken, adolesanda PG 20210A mutasyonu daha önemlidir (84).

Riskli gebeliklerin, yenidoğandaki trombofili üzerine etkisi çalışılmasına rağmen, literatürde kalıtsal trombofili ve IUGG arasındaki ilişkiyi inceleyen sadece birkaç çalışma mevcuttur. Ancak, hasta seçiminde kullanılan yöntemler ve hasta sayıları farklılık arz ettiğinden, çalışmalar heterojen grup oluşturmakta ve sonuçlar birbiriyle çelişmektedir. IUGG ile kalıtsal trombofililer arasındaki ilişkiyi inceleyen ve olgu sayısı nispeten düşük olan çalışmalar, kalıtsal trombofilinin IUGG nedenlerinden birisi olabileceğini düşündürmektedir (85, 86). Ancak daha büyük serilerde bu ilişki gözlenmemiştir (87,88).

Arias ve arkadaşları (89), yapmış oldukları çalışmada, preeklampsi ve IUGG olgularında, daha yüksek oranda trombotik süreçlerin izlendiğini bildirmişlerdir. Salafia ve arkadaşlarının (90) yapmış olduğu çalışmalarda da, preeklampsi ve IUGG olgularında, trombofiliye eğilim olduğu

bulunmuştur. Aksi yönde çalışmalar mevcut olmakla birlikte, kalıtsal trombofililerin plasentada tromboza ya da plasenta oluşumu sırasında bozukluğa yol açarak, plasenta yetersizliğine ve IUGG'e neden olabilecekleri düşünülmüştür (89,91-93).

Martinelli ve arkadaşlarının (94) çalışmasında, 61 IUGG ve aynı ırktan olan 93 kontrol grubu ile yapılan çalışmada FVL, protrombinG 20210A, MTHFR gen mutasyonları arasında ilişki incelenmiştir. Sonuçlar, IUGG ile FVL, MTHFR, PG20210A gen mutasyonları arasında ilişki olduğunu vurgulamıştır.

Riward ve arkadaşlarının (95), 493 IUGG ve 472 kontrol grubundan oluşan, olgu kontrol çalışmasında, maternal trombofilik mutasyon açısından korelasyon bulunmamıştır. Aynı araştırmacılar (95) 250 olgu daha ekleyerek, PAİ-1, 4G-5G ve faktör XIII Val134Leu varyantı ile IUGG arasında ilişki olmadığını göstermişlerdir. Aynı zamanda FVL, PG 20210A gen mutasyonları ile IUGG arasında da, ilişki olmadığı saptanmıştır. Robertson ve arkadaşlarının (96), 195 olgu üzerinde yapılan çalışmalarında, IUGG ile trombofili arasında ilişki saptanmıştır.

Verspyck ve arkadaşlarının (86), doğum ağırlıkları %3 persentilin altında olan 203 bebeğin dahil edildiği, toplam 406 olgu ile yaptıkları çalışmalarında, IUGG ve FVL, PG 20210A gen mutasyonları arasında ilişki saptamamışlardır. Bizim çalışmamızda olgu sayısı nispeten az olmasına rağmen, literatürde büyük serilerle yapılan çalışmalarla uyumlu olacak şekilde, MTHFR, PG 20210A ve FVL gen mutasyonlarının, IUGG ile ilişkisi saptanmadı. Bu da, IUGG olguların trombofili ile ilişkili olmadığını düşündürmektedir.

Bir metaanalizde, Howley ve arkadaşları (97) FVL ve PG 20210A gen mutasyonları ile IUGG ilişkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada metaanalize dahil edilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir

heterojenite saptanmakla birlikte bizim çalışmamızdan farklı olarak FVL / PG 20210A gen mutasyonları ile IUGG arasında bir ilişki olabileceği bildirilmiştir.

Howley ve arkadaşlarının (97) yaptığı çalışmada, ilginç olarak, IUGG tanısını doğum ağırlığı %10 persentil ve %5 persentilin altında olan seriler, ayrı ayrı ele alındıklarında, FVL, PG 20210A gen mutasyonları ile IUGG arasındaki ilişki yalnızca fetal ağırlığı %5'in altında olan olgularda saptanmıştır. Plasenta yetersizliğine bağlı olarak gelişen şiddetli IUGG olgularının, doğum ağırlığı %5'in altında olduğu grupta daha sık rastlandığı göz önüne alındığında, şiddetli IUGG ile FVL ve PG 20210A gen mutasyonu arasında, bir ilişki olabileceği görülmüştür. Bizim çalışmamızda, IUGG sınırı %10 persentilin altı kabul edilmiş olup, sonuçların anlamsız çıkması ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Howley ve arkadaşlarının (97) çalışması, bir metaanaliz olması nedeni ile olgu sayısı çok fazla olup, bizim çalışmamızdaki olgu sayısının azlığı nedeni ile IUGG olguları %5 ve %10 persentilin altı olarak, tekrar gruplandırılmadı.

Düşük doğum ağırlıklı bebekler ve kalıtsal trombofili ilişkisini inceleyen çalışmaların hemen tümünde IUGG; doğum ağırlığına göre belirli persentil ya da standart sapmanın altındaki olgular olarak tarif edilmiş, plasenta yetersizliği saptanan olgular ayrıca sınıflandırılmamıştır. Türkiye'de Al ve arkadaşlarının (98) yapmış olduğu bir çalışmada IUGG ve plasenta yetersizliği saptanan grupta olguların %64.7'de en az bir trombofilik faktör tespit edilmiştir. Mc Cowan ve arkadaşları (87), 145 IUGG olgusu ile 290 kontrol grubunu kapsayan çalışmalarında, trombofili insidansı açısından IUGG bebekler ile kontrol grubu arasında bir fark gözlememişlerdir. Ancak, plasenta yetersizliği saptanan, özellikle doğum ağırlığı %3 persentil altında olan bir grup bebekte, istatistiksel olarak fark bulunmamakla beraber trombofili sıklığında artış bildirmişlerdir. Farklı olarak, Verspyck ve arkadaşlarının (86) yapmış olduğu çalışmada,

34 plasenta yetersizliği saptanan olgunun hiçbirisinde trombofilik faktör saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda ise, bu çalışmalardan farklı olarak, plasenta yetersizliği saptanan olgular, ayrıca belirtilmedi.

Kupferminc ve arkadaşları (85), %66'sını prematürlerin oluşturduğu, 44 IUGG olgusu ile yaptıkları çalışmada, %50 oranında en az bir trombofilik faktör saptamışlardır. Aynı araştırmacıların yayınladıkları diğer bir seride, 22-26 gebelik haftalarında, plasenta yetersizliği saptanan ve ciddi gelişme yetersizliği olan bir grup olguyu, kontrol grubu ile karşılaştırmışlardır (99). IUGG grubunda trombofili sıklığı %69, kontrol grubunda ise %14 olarak saptanmıştır. IUGG grubunda %33 sıklığında iki ve daha fazla trombofilik faktör saptanırken, kontrol grubunda hiçbir hastada trombofili gözlenmemiştir. Bizim çalışmamızda kalıtsal trombofili faktörlerinden MTHFR, FVL, PG 20210A gen mutasyonları bakıldı, ancak Kupferminc ve arkadaşlarının (95) çalışmasında, bizim çalışmamızdan farklı olarak, APC rezistansı, PC, PS, lupus antikoagülan, antikardiyolipin IgG, IgM, antifosfolipit IgG, M testlerine de bakılmıştır. Kupferminc ve arkadaşlarının (99) yaptığı çalışmada, bakılan trombofilik faktör sayısının daha fazla olması nedeni ile, anlamlı fark bulunmuş olabilir. Kalıtsal mutasyonlar açısından, ayrı bir istatistiksel analiz yapılmadığından, bizim çalışmamız ile karşılaştırmak mümkün olmamaktadır.

Çalışmamızda, annede hipertansiyon öyküsü ile mutasyon pozitifliği arasında pozitif ilişki saptandı. Anteby ve arkadaşlarının (100) yaptığı çalışmada, annede hipertansiyon öyküsü ve PG 20210A gen mutasyonu arasında pozitif ilişki saptanmıştır. Ancak bu çalışmada diğer iki mutasyon bakılmamıştır. Kupferminc ve arkadaşlarının çalışmasında (85), annede hipertansiyon öyküsü olan olgularda trombofiliye eğilim bildirilmiştir. Ancak daha önce yukarıda belirttiğimiz gibi bu çalışmada çok sayıda trombofili faktörü bakılmıştır. Kalıtsal gen mutasyonları ayrıca değerlendirilmemiştir. Verspyck ve arkadaşları (86), çalışmalarında annede hipertansiyon öyküsü olanlarda FVL, PG 20210A gen mutasyonlarının, istatistiksel

olarak daha fazla olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada, MTHFR mutasyonu bakılmamıştır. Bizim çalışmamız, trombofiliye eğilim yaratan 3 gen mutasyonuna da bakılmış olması açısından, diğer çalışmalardan farklıdır.

Verspyck ve arkadaşlarının (86), yukarıda sözü edilen çalışmasında annede sigara içme öyküsü olanlarda, trombofili sıklığında artış saptanmıştır. Çalışma grubumuzda, gebelik sırasında annede sigara içme öyküsü saptanmadı. Babası sigara içen grupta, mutasyona eğilim saptanmadı. Literatürde, annenin aktif içici olduğu durumlar ile ilgili çok çalışma olmasına rağmen, annenin pasif içiciliğini değerlendiren çalışmaya rastlamadık. Bizim çalışmamız annenin aktif içici olmadığı, ancak yanında sigara içildiği pasif içicilik durumunu değerlendirmesi açısından diğer çalışmalardan farklıdır.

Prematür ve term olan gruplar arasında MTHFR, PG 20210A, FVL gen mutasyonları için anlamlı fark bulduk. Verspyck ve arkadaşlarının (86) yapmış olduğu çalışmada, 37 gebelik haftasının altında doğan olgularda trombofili sıklığında anlamlı artış saptanmıştır. Bu çalışma toplam 406 olguda yapılmış olup, bizim çalışmamız toplam 96 olgu üzerinde yapılmıştır.

Gibson ve arkadaşlarının (101) çalışmalarında, 28 gebelik haftasından önce doğan prematürler ile PG 20210A gen mutasyonu ilişkili bulunmuştur. 28-31 gebelik haftasında doğan olgularda, MTHFR gen mutasyon sıklığının arttığı saptanırken, 32-36 gestasyon haftasında doğan olgularda trombofiliye eğilim saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda, prematürlerde gen mutasyon eğilimi saptandı. Bu sonuç, mutasyon pozitifliğinin, prematür doğumlara sebep olabileceğini düşündürmektedir.

MTHFR geninde, C677T ve A1298C olarak 2 yaygın polimorfizm tanımlanmıştır. Homozigot C677T polimorfizmi, hiperhomosisteinemi ile

sonuçlanır. Hiperhomosisteinemi, endotelin antitrombotik fenotipini değiştirerek, FXII ve V'in aktivitesini arttırarak, PC aktivitesini azaltarak trombofilik etki yaratır. MTHFR A1298C polimorfizmi ise hiperhomosisteinemi ile ilişkili değildir. Gibson ve arkadaşlarının (101) yapmış oldukları çalışmada MTHFR C677T mutasyonunun prematür ve IUGG ile ilişkisi olmadığı, MTHFR A1298C mutasyonunun prematür ve IUGG ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da MTHFR C677T mutasyonu çalışıldı. Ancak homosistein düzeylerine bakılmamış olması nedeni ile hiperhomosisteinemi ile MTHFR C677T mutasyonu arasındaki ilişki gösterilememiştir.

Gibson ve arkadaşlarının (101) çalışmasında, FVL gen mutasyonu ile IUGG ve prematür (32 gebelik haftasının altı) doğum arasında ilişki olmadığı saptanmıştır. Aynı çalışmada IUGG ve prematür doğum (28-31 gestasyon haftası) ile MTHFR A1298C gen mutasyonu ilişkili bulunmuştur. Infante - Rivard (99) ve McCowan (87) çalışmalarında, MTHFR gen mutasyonunun IUGG ve prematür doğum riskini azalttığını, PG 20210A mutasyonu ile prematür olguların ilişkili olmadığını bulmuşlardır. Bu çalışmalar arasındaki tutarsızlığı, farklı etnik gruplarda, farklı kalıtsal trombofilik mutasyonların seçilmiş olması, olgu sayısının farklılığı ile açıklamışlardır. Infante - Rivard (99) ve McCowan (87)'nin çalışmalarında, annesi hipertansif olan olgular çalışmaya dahil edilmemiştir. Bizim çalışmamızda etnik farklılık yoktu, annesi hipertansif olanlar da çalışmaya dahil edildi. Her 3 gen mutasyonu açısından prematür olgularda anlamlı fark bulunurken, IUGG olgularda anlamlı fark bulunmadı. Bu sonuç; daha çok çalışmaya ihtiyaç olmakla beraber Türk toplumunda prematür olgularda trombofilik mutasyonlara eğilim olduğunu, IUGG olgularda trombofilik mutasyonlara eğilim olmadığını düşündürmektedir.

Schlembach ve arkadaşları (102), HELLP (Hemolysis, elevated liver enzymes and low platelet count) sendromlu annelerin bebeklerinde

bakılan; FVL, PG 20210A gen mutasyonu ile IUGG arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Fetal trombofilik mutasyonun, plasental mikrotromboz, fetoplasental kan akımını engellemeye yol açarak, gelişme geriliğine yol açtığını savunmuşlardır. Bizim çalışmamızda, bu çalışmadan farklı olarak HELLP sendromlu anne yoktu.

Verspyck ve arkadaşları (86), 203 IUGG olgu ile kontrol grubunu karşılaştırdıklarında trombofiliye eğilim saptamamışlardır. Ancak IUGG olguları, ponderal indeksine göre, normal baş çevresine sahip asimetric IUGG'lar ile simetric IUGG'lar olarak 2 gruba ayırdıklarında; asimetric IUGG'larda simetric olanlara göre trombofili sıklığının anlamlı şekilde arttığını göstermişlerdir. Bu çalışmada, MTHFR varyantının trombofili risk faktörü olabilmesi için, beraberinde hiperhomosisteinemi varlığı gerektiğinden sadece FVL ile PG20210A gen mutasyonu bakılmıştır. Çalışmamızda ponderal indeksine göre olgular simetric ve asimetric olarak ayrıldıklarında; MTHFR, PG 20210A, FVL gen mutasyonlarına eğilim açısından, anlamlı farklılık saptanmadı. Bizim çalışmamızda IUGG'lı olgu sayısı 25 olup, Verspyck ve arkadaşlarının (86) çalışmasındaki IUGG'lı olgu sayısının 203 olduğu düşünöldüğünde, bu sonuç olasılıkla olgu sayısının azlığından kaynaklanmaktadır. Asimetric IUGG'larda trombofiliye eğilimin arttığını söyleyebilmek için olgu sayısının daha fazla olduğu başka çalışmalara da gereksinim vardır. Asimetric IUGG fetüsteki oksijenin ve substratın sağlanması azaldığı son trimesterde daha sık olup, aslında simetric IUGG'ların etyolojisinde genetik faktörlerin rolü olduğu düşünöldüğünde, Verspyck ve arkadaşlarının (86) çalışması klasik bilgilerimize ters düşmektedir.

Mevcut literatürde trombofilinin, riskli gebelik sonuçları üzerine etkisi çalışılmasına rağmen, IUGG ve prematür ile ilişkisini inceleyen az sayıda çalışma vardır. Biz çalışmamızda, IUGG ile MTHFR, PG 20210A ve FVL gen mutasyonu arasında ilişki olmadığını, prematürite ile ilişkili olduğunu saptadık.

Ayrıca çalışmamızda, ebebeynlerin sigara içme durumu, annede hipertansiyon, ailede tromboz öyküsü ile MTHFR, PG 20210A, FVL gen mutasyonları arasındaki ilişkiye de baktık. Bu parametreler içinde en önemli olduğunu düşündüğümüz literatürde annedeki aktif içicilik değerlendirilmiş olmasına rağmen, çalışmamızda pasif içicilik değerlendirilmiştir. Pasif içiciliğin de, mutasyon sıklığını arttırmadığı saptanmıştır.

Sonuç olarak; MTHFR, PG 20210A, FVL gen mutasyonları ile annede hipertansiyon varlığının ilişkili olduğu, ebebeynlerin sigara içme durumu, ailede tromboz öyküsünün ilişkili olmadığı buduk. Prematür olgularla her 3 gen mutasyonu ilişkili iken, IUGG olgularla her 3 gen mutasyonunun ilişkili olmadığını saptadık. Simetrik ve asimetrik IUGG'ların mutasyona eğilim açısından farklılık göstermediğini bulduk.

IUGG ve prematür bebeklerde rutin trombofili taramasını destekleyen, kesin bir kanıt yoktur. Bu konunun aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Yapılacak çalışmalarda plasenta yetersizliğinin ayrıca sınıflandırılmasının, olgu sayısının arttırılmasının ve daha fazla trombofilik mutasyon taranmasının konunun aydınlatılmasına yardımcı olacağı kanatındeyiz.



## VI-SONUÇLAR

- 1.) Annede hipertansiyon varlığı, yenidoğanlarda, MTHFR, PG20210A, FVL gen mutasyonu ile pozitif ilişkili bulundu.
- 2.) Annede pasif içicilik (babası sigara içen) ve ailede tromboz öyküsünün olması, MTHFR, PG20210A, FVL gen mutasyonu ile ilişkili saptanmadı.
- 3.) Prematürite ile MTHFR, PG20210A, FVL gen mutasyonu arasında pozitif ilişki saptandı.
- 4.) IUGG ile MTHFR, PG20210A, FVL gen mutasyonları arasında ilişki bulunmadı.
- 5.) Simetrik ve asimetrik IUGG ile MTHFR, PG20210A, FVL gen mutasyonları arasında ilişki bulunmadı.

## VII- ÖZET

**AMAÇ:** IUGG ve prematür yenidoğanlarda, Faktör V Leiden (FVL) Metilentetrahidrofolatredüktaz (MTHFR) ve Prothrombin G 20210A (PG 20210A) gen mutasyonu araştırılmasını amaçladık.

**GEREÇ ve YÖNTEM:** Çalışmaya 96 yenidoğan dahil edildi. Olgularda tromboz risk faktörleri ile MTHFR, PG20210A, FVL mutasyon sıklığı arasındaki ilişkiye bakıldı. Tromboz risk faktörleri olarak annede hipertansiyon, ailede tromboz öyküsü, ebebeynlerin sigara içme durumu sorgulandı. Prematüre ve IUGG olan yenidoğanlar çalışma grubu olarak değerlendirilirken, term ve AGA grupları kontrol grubu olarak değerlendirildi. Tüm gruplarda MTHFR, PG20210A, FVL gen mutasyon sıklığı araştırıldı. IUGG yenidoğanlar da, ponderal indeksine göre simetrik ve asimetric olarak ayrıldı. MTHFR, PG20210A, FVL mutasyon sıklığı hem simetrik hem asimetric IUGG olan yenidoğanlarda araştırıldı.

**BULGULAR:** Tromboza eğilimi arttıran risk faktörleri açısından gruplara bakıldığında; 42 tanesinde ebebeynlerden hiçbirisi sigara içmiyorken (%43.9), 54 tanesinde babanın sigara içme (%56.3) öyküsü mevcuttu. Hastaların hiç birinde annede sigara içme öyküsü saptanmadı. Çalışma grubuna 1. dakika APGAR'ı 7'nin altında olan olgular dahil edilmedi. 72 Hastada (%75) annede hipertansiyon yokken, 24 hastada (%25) annede hipertansiyon saptandı. Ailede tromboz öyküsü 5 hastada (%5.2) mevcuttu. Annede hipertansiyon varlığı ile mutasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Ailede tromboz varlığı, ebebeynlerin sigara içmesi ile mutasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Term grupla kıyaslandığında, prematür yenidoğan grubunda, MTHFR, PG20210A, FVL gen mutasyon sıklığı açısından istatistiksel anlamlı fark saptandı. IUGG, AGA olgular mutasyonlara eğilim açısından kıyaslandığında anlamlı fark bulunmadı.

Simetrik ve asimetrik IUGG gruplarında MTHFR, PG20210A, FVL gen mutasyon sıklığı açısından anlamlı fark saptanmadı.

**SONUÇ:** Annede hipertansiyon tromboza eğilim yaratan MTHFR, PG 20210A, FVL gen mutasyon sıklığında artış ile ilişkili bulundu, Annenin pasif sigara içiciliği ve ailede tromboz öyküsü; MTHFR, PG 20210A, FVL gen mutasyonları ile ilişkili bulunmadı. MTHFR, PG 20210A, FVL gen mutasyonları sıklığında artış ile prematür yenidoğanların ilişkili olduğu ancak IUGG ile ilişkili olmadığı saptandı. Simetrik ve asimetrik IUGG olan yenidoğanlar ile MTHFR, PG 20210A, FVL gen mutasyon sıklığı arasında ilişki saptanmadı.

## VIII-SUMMARY

**OBJECTIVE:** We aimed to evaluate the gene mutation of Methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR), Prothrombin gene 20210A (PG20210A), Factor V Leiden (FVL) in IUGR and premature newborns.

**MATERIAL and METHODS:** 96 newborns were included in this study. In those newborns, we evaluated the association between the risk factors for the thrombosis and MTHFR, PG20210A and FVL gene mutation frequencies. Maternal hypertension, family history of thrombosis and smoking history of the parents were questioned as risk factors for the thrombosis. While premature and IUGR newborns were evaluated as study group, term and AGA groups were evaluated as control group. MTHFR, PG20210A and FVL gene mutation frequencies were analyzed in all groups. IUGR newborns were determined as symetric and asymetric according to ponderal index. The mutation frequencies of MTHFR, PG20210A, FVL were searched in both symetric and asymetric IUGR newborns.

**RESULTS:** When we evaluated the groups according to the risk factors for the thrombosis; in 42 (43.9 %) newborns parents were not smoking and in 54 newborns (56.3 %) the fathers were smoking. No maternal smoking history was present for the cases. The cases who had APGAR scores below 7 in the first minute were not included in the study group. Maternal hypertension was present in 24 (25 %) of the cases no maternal hypertension was present in 72 (75 %) of the cases. Familial thrombosis history was present in the 5 cases (5.2 %). Statistically significant difference was detected between the presence maternal hypertension and presence of the mutation. No statistically significant difference was determined between the history of thrombosis in the family of newborns, parental smoking and the presence of mutations.

Statistically significant difference was detected in the premature newborn group compared to the term group in the point of gene mutation frequencies. No statistically significant difference was determined between the IUGR newborn and AGA group in the point of gene mutation frequency. No statistically significant difference was both the symmetric IUGR and asymmetric IUGR groups for the gene mutation frequencies.

**CONCLUSION:** The presence of maternal hypertension was associated with the increased gene mutation frequencies of MTHFR, PG20210A and FVL. Maternal passive smoking and the history of thrombosis in the family were not found to be associated with the increased MTHFR, PG20210A and FVL gene mutation frequencies. There was an association between the presence of premature newborns and increased MTHFR, PG 20210A and FVL gene mutation frequencies. There was no association between the presence of IUGR and increased MTHFR, PG20210A and FVL gene mutation frequencies. There was no association between the increased MTHFR, PG20210A and FVL gene mutation frequencies and the presence symmetric and asymmetric IUGR newborns.

## IX-KAYNAKLAR

- 1) Greenway A, Massicotte MP, Monagle P. Neonatal thrombosis and treatment. *Blood Rev.* 2004;18:75-84.
- 2) Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994;369:64-67.
- 3) Rossing J, Hemker CH, Tans G. Molecular biology and pathophysiology of APC resistance current insights and clinical implications. *Semin Thromb Hemost.* 1998;24:329:335.
- 4) Van Cott EM, Laposata M. Laboratory evaluation of hypercoagulable states. *Hematol Oncol Clin N Am.* 1998;12:1141-1166.
- 5) Rosenblatt DS, Methylenetetrahydrofolate reductase. *Clin Invest Med.* 2001;24:56-59.
- 6) Homberger G, Linnebank M, Winter C, Genomic structure and transcript variants of the human Methylenetetrahydrofolate reductase gene *Eur J Hum Genetic.* 2000;8:725-729.
- 7) Bailey PJ, Jacob S, Common mutation in the Methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formulated tetrahydrofolates in red blood cells *Med Sci.* 1998;95:13217-13220.
- 8) Poort SR, Rossendal FR, Reistma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-prime- untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* 1996;88:3698-3703.
- 9) Bertina RM. Molecular risk factors for thrombosis. *Thromb Haemost* 1999;82:601-609.
- 10) Yurdakök M. Yenidoğanda tromboz. *Katkı Pediatri Dergisi* 2001;22: 161-169.
- 11) Lankowsky P. *Manual of pediatric Hematology and Oncology* 3 th.ed. San Diego Academic pres. 2000;3:233-287.
- 12) Revel VS, Massicotte P. Thromboembolic diseases of childhood. *Blood Reviews.* 2003;17:1-6.

- 13) Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med.* 2001;344:1222-1231.
- 14) Schmidt B, Andrew M. Neonatal thrombosis report of a prospective Canadian and international registry. *Pediatrics.* 1995;96:939–943.
- 15) Bokenkamp A, Von Kries R, Nowak-Göttl U, Gobel U, Hoyer PF. Neonatal renal venous thrombosis in Germany between 1992 and 1994 epidemiology, treatment and outcome. *Eur J Pediatr.* 2000;159: 44–48.
- 16) Monagle P, Adams M, Mahoney M. Outcome of pediatric thromboembolic disease a report from the Canadian childhood thrombophilia registry. *Pediatr Res.* 2000;47:763–766.
- 17) LaFranchi S. Disorders of the thyroid gland. Richard E, Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. *Nelson Textbook of Pediatrics.* Philadelphia, WB Saunders, 2004: 1651-1653.
- 18) Bithell TC. *Wintrobe's Clinical Hematology*, 9 th edition Blood coagulation. 1993: 566-615.
- 19) Bauer KA. Hypercoagulability A New cofactor in protein C Anticoagulant pathway. *N Eng J Med.* 1994;330:566-567.
- 20) Andrew M, Monagle PT, Broker L. Thromboembolic complications during infancy and childhood. In: Andrew M (ed) *Congenital Prothrombotic Disorders: Presentation During Infancy And Childhood.* London: B.C.Decker Hamilton 2000: 51- 102.
- 21) Goodnight SH, Griffin JH. Hereditary Trombophilia. In Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U (ed.). *Willams Hematology.* 6th edition. McGraw-Hill 2001: 1697-1707.
- 22) Nowak-Göttl U, Kosch A, Schlegel N. Thromboembolism in newborns, infants and children. *Thromb Haemost;*2001;86:464-474
- 23) Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P, Batard MA, Griffin JH. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease.*Blood.*1984;64:1297-1300.
- 24) Engesser L, Broekmans A, Briet E. Hereditary protein S deficiency. *Clin Manifest.* 1987;106:677.

- 25) Güneş AM, Baytan B, Günay Ü. Çocukluk Çağında Kalıtsal Tromboz. Güncel pediatri. 2004;2:1-8.
- 26) Gürgey A. Tromboz Katkı Dergisi 2001;22:170-217.
- 27) Griffin JH, Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U (eds). Williams Hematology. 6th Edition. McGraw-Hill. 2001:1551-1581.
- 28) Akar N, Akar E, Dalgın G, Sözüöz A, Ömürlü K. Frequency of Factor V 1691 (G-A) mutation in Turkish Population. Thromb Haemost.1997;78: 1527- 1528.
- 29) Gürgey A, Mesci L. The prevalence of Factor V Leiden 1691 (G-A) mutation in Turkey. Turk J Pediatr. 1997;39:313-315.
- 30) Dahlback B. Inherited thrombophilia resistance to activated Protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. Blood. 1995;85:607-614.
- 31) Hagstrom JN, Walter J, Bluebond-Langner R, Amatriek JC, Manno CS, High KA. Prevalence of the factor V Leiden mutation in children and neonates with thromboembolic disease. J Pediatr. 1998;133:777-781.
- 32) Nowak-Göttl U, Dübbers A, Kececioglu D. Factor V Leiden, protein C, and lipoprotein (a) in catheter-related thrombosis in childhood a prospective study. J Pediatr. 1997;131:608-612.
- 33) Andrew M, Developmental hemostasis relevance to thromboembolic complication in pediatric patients. Thromb Haemost.1995;74:415-425.
- 34) Kavaklı K, Özkayın N, Mir S. Hypercoagulability and preventive mechanism in childhood nephrotic syndrome. Thromb Haemost. 1999;82: 317-318.
- 35) Yap S, Naughten ER, Wilcken B, Wilcken DE, Boers GH. Vascular complications of severe hyperhomocysteinemia in patients with homocystinuria due to cystathionine betasynthase deficiency: effects of homocysteine lowering therapy. Semin Thromb Hemost.2000;26:335-340.
- 36) Brattstorm L, Wilcken D.E, Ohrvick J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia about not to vascular disease the result of a metaanalysis.Circulation.1998;24:24-29.



- 37) Akar N, Akar E, Mısırlıoğlu M, Avcu F, Yalçın A, Cin S. Search for genetic factors thrombosis in Turkish population. *Thromb Research*.1998;79:79-82.
- 38) Bushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assesment of plasma homocystein as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic asid intakes. *JAMA*.1995;274:1049-1057.
- 39) Nowak-Göttl U, Strater R, Heinecke A, Junker R. Lipoprotein a and genetic polymorphisms of clotting factor V, prothrombin and methylenetetrahydrofolate reductase are risk factors of spontaneous ischemic stroke in childhood.*Blood*.1999;94:3678–3682.
- 40) Streif W, Andrew ME. Venous thromboembolic events in pediatric patients. *Haematol Oncol Clin North Am*.1998;12:1283-1312.
- 41) Lawson SE, Butler D, Enayat MS, Williams MD. Congenital thrombophilia and thrombosis: a study in single centre. *Arch Dis Child*. 1999;81:176-178.
- 42) Williamson D, Brown K, Luddington R, Baglin C, Baglin T. Factor V Cambridge: a new mutation (Arg 306 –Thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood*.1998;91:1140-1144.
- 43) Bernardi F, Faioni EM, Castoldi E, Lunghi B, Sacchi E, Mannucci PM. A factor V genetic component differing from factor V R506Q contributes to activated protein C resistance phenotype. *Blood*. 1997;90:1552-1557.
- 44) Chan WP, Lee CK, Kwong YL, Lam CR, Liang R. A novel mutation of Arg 306 of factor V gene in Hong Kong Chinese.*Blood*.1998;91:1135-1139.
- 45) De Stefano V, Finnazzi G, Mannucci PM. Inherited thrombophilia pathogenesis clinical syndromes and management. *Blood*.1996;87:3531-3544.
- 46) Zoller B, Svensson PJ, He X, Dahlback B. Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis prone families with inherited resistance to activated protein C. *J Clin Invest*.1994;94:2521-2524.

- 47) Rees DC, Chapman NH, Webster MT, Guerreiro JF, Rochette J, Clegg JB. Born to clot the European burden. *Br J Haematol.*1999;105:564-566.
- 48) Beauchamp NJ, Daly ME, Hampton KK, Cooper PC, Preston FE, Peake IR. High prevalence of mutation in the factor V gene within UK population relationship to activated protein C resistance and familial thrombosis. *Br J Haematol.*1994;88:219-222.
- 49) Gürgey A, Mesci L, Renda Y, Olcay L, Koçak N, Erdem G. Factor VQ506 mutation in children with thrombosis *Am J Haematol.* 1996;53:37-39.
- 50) Gül A, Özbek U, Öztürk C, İnanç M, Koniçe M, Özçelik T. Coagulation Factor V gene mutation increases the risk of venous thrombosis in Behçet's disease. *Br J Rheumatol.*1996;35:1178-1180.
- 51) Akar N , Akar E, Dalgın G, Sözüöz A, Ömürlü K, Cin Ş. Frequency of factor V mutation Turkish population. *Thromb Haemost.*1997;78:1527-1528.
- 52) Chadia C, Gialeraki A, Tsoukala C, Mandalaki T. Prevalence of the factor v Q506 mutation in the Hellenic population. *Thromb Haemost.*1994;73:739-742.
- 53) Gürgey A, Rustemov R, Parlak H, Balta G. Prevalence of Factor V Leiden and MTHFR C677T mutation in Azerbaijan. *Thromb Haemost.* 1998;80:520-521.
- 54) Koeleman BPC, Reitsma PH, Allaart CF, Bertina RM. Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in protein C deficient families. *Blood.*1994;84:1031-1035.
- 55) Mudd SH, Levy HL, Skovby F, Pettigrew KD, Wilcken B. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet.*1985;37:1-31.
- 56) Ma J, Stampfer MJ, Hennekens JH, Frost P, Selhub J, Horsford J, Malinow MR, Willet WC, Rozen R. MTHFR polymorphism, plasma folate, homocysteine risk of myocardial infarction in US Physicians. *Circulation.* 1996;94:2410-2416.
- 57) Deloughery TG, Evans A, Sadeghi A, McWilliams J, Henner D, Taylor LM, Pres RD. Common mutation in MTHFR correlation with homocysteine

metabolism and late onset vascular disease. *Circulation*.1996;94:3074-3078.

58) Jacques PF, Bostom AG, Williams PR, Wellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg JH, Selhub J, Rozen R. Relation between folate status a common mutation MTHFR and plasma homocysteine concentration. *Circulation*.1996;93:7-9.

59) Rosenblatt DS. Methylene tetrahydrofolate reductase. *Clin Invest Med*, 2001;24:56-59.

60) Homberger G, Linnebank M, Winter C. Genomic structure and transcript variants of the human methylene tetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet*. 2000;8:725-729.

61) Bagley PJ, Jacob S. A common mutation in the methylene tetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Med Sci*, 1998;95:13217-13220.

62) Peng F, Labelle LA, Rainey B. Single nucleotide polymorphisms in the methylene tetrahydrofolate reductase gene are common in US Caucasian and Hispanic American populations. *Int J Mol Med*. 2001;8:509-511.

63) Bailey LB, Duhaney RL, Maneval DR. Vitamin B-12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms. *J Nutr*. 2002;132:24665-24709.

64) Gehring NH, Frede U, Yilik G. Increased efficiency of mRNA 3 prime end formation a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Genet*.2001;28:389-392.

65) Rosendaal FR, Doggen CJM, Zivelin A. Geographic distribution of the 20210G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost*.1998;79:706-708.

66) Franco RF, Trip MD, Ten Cate H. The 20210G mutation in the 3 prime untranslated region of the prothrombin gene and the risk for arterial thrombotic disease. *Br J Haematol*.1999;104:50-54.

67) Walker I. Thrombophilia in pregnancy *J Clin Pathol*. 2000;53:573-580.

- 68) Higgins J. Pregnancy and the impact of inherited thrombophilias. Aust NZJ Obstet Gynaecol 2000; 40: 118-121.
- 69) Gürgey A, Hiçsönmez G, Parlak H, Balta G, Çeliker A. Prothrombin gene 20210 GA mutation in Turkish patients with thrombosis. Am J Haematol.1998;59:179-180.
- 70) Kavaklı K. Çocukluk çağı trombozları. XXXVII.Türk Pediatri Kongresi. İzmir, Bildiri Özet Kitabı.2001:81-92.
- 71) Kemahlı S. Çocuklarda trombozlar. XXXVI.Türk Pediatri Kongresi, Ankara, Bildiri Özet Kitabı.1999:43-54.
- 72) McColl MD, Chalmers EA, Thomas A. Factor V Leiden, prothrombin 20210 GA and the MTHFR C677T mutation in childhood stroke. Thromb Haemost.1999;81:690–694.
- 73) De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. N Engl J Med.1999;341:801–806.
- 74) Souto JC, Coll I, Liobet D, Del RE, Oliver A, Mateo J, Borrel M, Fontcuberta J. The prothrombin 20210 A allele is the most prevalent genetic risk factor for venous thromboembolism in the Spanish population. Thromb Haemost.1998;80:366-369.
- 75) Gürgey A. Çocukluk çağı tromboembolilerinde klinik bulgular. 21. Pediatri Günleri. İstanbul, Bildiri Özet Kitabı.1999:149-154.
- 76) David M, Andrew M. Venous thromboembolic complication in children J Pediatr.1993;123:337-346.
- 77) Nowak-Göttl U, Günther G, Kurnik K. Arterial ischemic stroke in neonates, infants, and children: an overview of underlying conditions, imaging methods, and treatment modalities. Semin Thromb Hemost. 2003;29:405-414
- 78) Ries M, Klinge J. and Rauch R. Age related reference values for activation markers of the coagulation and fibrinolytic systems in children Thromb Res.1997;85:341-344.

- 79).Schwarz H.P, Muntean W, Watzke H. Low total protein S antigen but higher protein S activity due to decreased C4b binding protein in neonates. *Blood*.1988;71:562-565.
- 80) Cvirn G, Gallist S, Muntean W. Effects of antithrombin and protein C on thrombin generation in newborn and adult plasma. *Thromb Res*.1999;93:183-190.
- 81) Andrew M, Schmidt B, Mitchell L, Paes B, Ofofu F. Thrombin generation in newborn plasma is critically dependent on the concentration of prothrombin. *Thromb Haemost*.1990;63:27-30.
- 82) Ries M, Klinge J, Rauch R. In vitro fibrinolysis after adding low doses of plasminogen activators and plasmin generation with and without oxidative inactivation of plasmin inhibitors in newborns and adults. *J Pediatr Hematol Oncol*.1996;18:346-351.
- 83) Manco Johnson M, Nuss R. Neonatal thrombotic disorders. *Neoreviews*. 2000;10:201-204.
- 84) Schobess R, Junker R, Auberger K. Factor V G1691A and PG 20210A in childhood spontaneous venous thrombosis evidence of an age dependent thrombotic onset in carriers of factor V G 1691A and PG 20210A Mutation. *Eur J Pediatr*.1999;158:105-108.
- 85) Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med*. 1999;340:9-13.
- 86) Verspyck E, Borg JY, Le Cam Duchez V, Goffinet F, Degre S, Fournet P. Thrombophilia and fetal growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*.2004;113:36-40.
- 87) McCowan LM, Craigie S, Taylor RS, Ward C, McLintock C, North RA. Inherited thrombophilias are not increased in "idiopathic" small-for-gestational-age pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*.2003;188:981-985.
- 88) Rivard C, Rivard GE, Yotov WV, Genin E, Guiguet M, Weinberg C. Absence of association of thrombophilia polymorphisms with intrauterine growth restriction. *N Engl J Med*. 2002;347:19-25.

- 89) Arias F, Romero R, Joist H, Kraus FT. Thrombophilia a mechanism of disease in women with adverse pregnancy outcome and thrombotic lesions in the placenta. *J Matern Fetal Med.* 1998;7:277-286.
- 90) Salafia CM, Pezzullo JC, Lopez-Zeno JA, Simmens S, Minior VK, Vintzileos AM. Placental pathologic features of prenatally preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173:1097-1105.
- 91) Salafia CM, Minior VK, Pezzullo JC, Popek EJ, Rosenkrantz TS, Vintzileos AM. Intrauterine growth restriction in infants of less than thirty-two weeks' gestation: associated placental pathologic features. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173:1049-1057.
- 92) Mousa HA, Alfirevic Z. Do placental lesions reflect thrombophilia state in women with adverse pregnancy outcome *Hum Reprod.* 2000;15:1830-1833.
- 93) Many A, Schreiber L, Rosner S, Lessing JB, Eldor A, Kupferminc MJ. Pathologic features of the placenta in women with severe pregnancy complications and thrombophilia. *Obstet Gynecol.* 2001;98:1041-1094.
- 94) Martinelli P, Grandone E, Colaizzo D, Paladini D, Sciannama N, Margoglione M. Familial thrombophilia and the occurrence of fetal growth restriction. *Haematologica.* 2001;86:428-431.
- 95) Rivard C, Rivard GE, Guigiet M, Gauthier R. Thrombophilic polymorphism and intrauterine growth restriction. *Epidemiology.* 2005;16:281-287.
- 96) Robertson L, Wu O, Langhorne P. Thrombophilia in pregnancy a systematic review. *Br. J. Haematol* 2006;132:171-196.
- 97) Howley HE, Walker M, Rodger MA. A systematic review of the association between factor V Leiden or prothrombin gene variant and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192:694-708.
- 98) Al RA, Yalvaç S, Öztürkoğlu E, Akkök E, Kandemir Ö, Dölen İ. Frequency of Genetic Thrombophilia in Severe Intrauterine Growth Restriction 2005;13:138-141.

- 99) Kupfermanc MJ, Many A, Bar-Am A, Lessing JB, Ascher- Landsberg J. Mid-trimester severe intrauterine growth restriction is associated with a high prevalence of thrombophilia. BJOG 2002;109:1373-1376.
- 100) Anteby EY, Musalam B, Milwidsky A, Blumenfeld A, Gilis S, Valsky D, Fetal inherited thrombophilias influence the severity of preeclampsia, IUGG and plasental abruption Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.2004;113: 31-35.
- 101) Gibson CS, Maclennan AH, Hague WM, Haan EA, Priest K, Chan A. Association between inherited thrombophilia and adverse pregnancy outcomes. Am J Obstet Gynecol. 2006; 194: 947-957.
- 102) Schlembach D, Beinder E, Zingsem J, Wunsiedler U, Beckmann M, Fischer T. Association of maternal and FVL, PG 20210A mutation with HELLP syndrome and intrauterine growth restriction. Clin Sci 2003;105:279-285.