



T.C
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**MİSSED ABORTUS VE İSTEMLİ EVOKUASYON OLGULARININ
ENDOMETRİUMLARINDA PROANJİYOGENEZ MOLEKÜL
DAĞILIMLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Murat Afşın TURHAN

Danışman

Prof. Dr. Hasan Tayfun ÖZÇAKIR

MANİSA - 2011



T.C
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**MİSSED ABORTUS VE İSTEMLİ EVOKUASYON OLGULARININ
ENDOMETRİUMLARINDA PROANJİYOGENEZ MOLEKÜL
DAĞILIMLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Murat Afşın TURHAN

Danışman

Prof. Dr. Hasan Tayfun ÖZÇAKIR

MANİSA - 2011

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇ KAPAK.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
KISALTMALAR.....	III
RESİM, TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....	V
TEŞEKKÜR.....	VII
ÖZET.....	VIII
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. ABORTUSLAR.....	5
2.2. ANJİYOGENEZ.....	18
2.2.1. ANJİYOGENEZİN TEMEL HÜCRESEL MEKANİZMALARI.....	21
2.2.2. BAZI ANJİYOGENİK ETMENLERİN ÖZELLİKLERİ.....	22
2.2.2.1. VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü).....	22
2.2.2.2. VEGF RESEPTÖRLERİ.....	23
2.2.2.3. TROMBOSPONDİN-1 (TSP-1).....	23
2.3. HİPOKSİ İLE UYARILAN FAKTÖR-1 (HIF-1).....	24
2.4. NİTRİK OKSİT/ NİTRİK OKSİT SENTAZ.....	27
2.4.1. NİTRİK OKSİT SENTEZİ.....	28
2.4.2 NİTRİK OKSİT SENTAZ İZOFORMLARI.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
4. BULGULAR.....	36
5. TARTIŞMA.....	41
6. SONUÇLAR.....	46
7. TABLO, GRAFİK VE RESİMLER.....	47
8. KAYNAKLAR.....	63

KISALTMALAR

ACOG	American Colleege of Obstetricians and Gynecologists
BH4	Tetrahidrobiyopterin
Ca	Kalsiyum
cNOS	Konstitütif nitrik oksit sentaz
CRL	Baş popo mesafesi
D&C	Dilatasyon ve küretaj
DIC	Dissemine intravasküler koagülasyon
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
FAD	Flavin adenin dinukleotid
Fe	Demir
flk-1	Fetal liver kinase-1
flt-1	Fms-like tyrosine kinase-1
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FMN	Flavin mono nukleotid
GCSF	Granülosit koloni uyaran faktör
GS	Gestasyonel sac
GTP	Guanozin trifosfat
hCG	Human koryonik gonadotropin
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HIF	Hipoksi ile indüklenen transkripsiyon faktörü

KISALTMALAR

HLA	Human leukocyte antigen
IL	İnterlökin
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KDR	Kinase domain region
LH	Luteinizan hormon
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger ribonükleik asit
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
PBS	Fosfat tampon solusyonu
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PGE1	Prostaglandin E1
sf	Sayfa
TGF	Transforme edici büyüme faktörü
TK	Tirozin kinaz
TNF α	Tümör nekroz faktör alfa
TSH	Tiroid stimülan hormonu
TSP-1	Trombospondin-1
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
VEGFR	Vasküler endotelial büyüme faktör reseptörü
VHL	Von Hippel Lindau
VPF	Vasküler permeability faktör
WHO	Dünya Sağlık Teşkilatı (World Health Organization)

RESİM, TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Yeni damar oluşumu	19.sf
Şekil 2.2	Normal ve patolojik anjiyogenez	19.sf
Şekil 2.3	Anjiyogenezin etkinleşme ve engellenmesi	20.sf
Şekil 2.4	TSP-1 İle anjiyogenezin baskılanması	24.sf
Şekil 2.5	HIF-1 geninin metabolizmadaki etkileri	25.sf
Şekil 2.6	HIF-1 α 'in VEGF Üzerine Etkisi	26.sf
Şekil 2.7	HIF'in düzenlenmesi ve etkinliğinin şematik gösterimi	26.sf
Şekil 2.8	Nitrik oksit'in damarlar üzerine olan etkileri	28.sf
Tablo 2.1	Anjiyogenezi etkilediği bilinen faktörler	20.sf
Tablo 2.2	NOS enzimlerinin genel özellikleri	29.sf
Tablo 4.1	Missed abortus ve istemli evokasyon grubu obstetrik özgeçmiş	55.sf
Resim 1.	Grupların HE boyamalı histokimyasal incelemesi	47.sf
Resim 2.	Grupların VEGF monoklonal antikor ile immunohistokimyasal analizi	48.sf
Resim 3.	Grupların FLK monoklonal antikor ile immunohistokimyasal analizi	49.sf
Resim 4.	Grupların FLT monoklonal antikor ile immunohistokimyasal analizi	50.sf
Resim 5.	Grupların eNOS monoklonal antikor ile immunohistokimyasal analizi	51.sf
Resim 6.	Grupların iNOS monoklonal antikor ile immunohistokimyasal analizi	52.sf
Resim 7.	Grupların Trombospondin monoklonal antikor ile immunohistokimyasal analizi	53.sf
Resim 8.	Grupların HIF monoklonal antikor ile immunohistokimyasal analizi	54.sf

RESİM, TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Grafik 1.	Grupların plasenta VEGF monoklonal antikor dağılımlarının istatistiksel sonuçları	55.sf
Grafik 2.	Grupların desidua VEGF monoklonal antikor dağılımlarının istatistiksel sonuçları	56.sf
Grafik 3.	Grupların plasenta FLK monoklonal antikor dağılımlarının istatistiksel sonuçları	56.sf
Grafik 4.	Grupların desidua FLK monoklonal antikor dağılımlarının istatistiksel sonuçları	57.sf
Grafik 5.	Grupların plasenta FLT monoklonal antikor dağılımlarının istatistiksel sonuçları	57.sf
Grafik 6.	Grupların desidua FLT monoklonal antikor dağılımlarının istatistiksel sonuçları	58.sf
Grafik 7.	Grupların plasenta eNOS monoklonal antikor dağılımlarının istatistiksel sonuçları	59.sf
Grafik 8.	Grupların desidua eNOS monoklonal antikor dağılımlarının istatistiksel sonuçları	59.sf
Grafik 9.	Grupların plasenta iNOS monoklonal antikor dağılımlarının istatistiksel sonuçları	60.sf
Grafik 10.	Grupların desidua iNOS monoklonal antikor dağılımlarının istatistiksel sonuçları	60.sf
Grafik 11.	Grupların plasenta Trombospondin monoklonal antikor dağılımlarının istatistiksel sonuçları	61.sf
Grafik 12.	Grupların desidua Trombospondin monoklonal antikor dağılımlarının istatistiksel sonuçları	61.sf
Grafik 13.	Grupların plasenta sitotrofoblast hücrelerinde HIF monoklonal antikor dağılımlarının istatistiksel sonuçları	62.sf

TEŞEKKÜR

Meslek hayatımızın en önemli adımlarından birini oluşturan uzmanlık eğitimi sürecinde, bu yolda bize önderlik eden hocamız, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Faik Mümtaz KOYUNCU'ya; eğitimimiz için sunduğu imkanların yanı sıra hoşgörülü ve bizlerin önünü açan tutumlarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmamı yönlendiren ve destekleyen tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hasan Tayfun ÖZÇAKIR'a ve eğitimim boyunca engin bilgi ve deneyimlerini her zaman paylaşan Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

Asistanlığım boyunca desteğini her zaman yanımda hissettiğim, beraber çalışmaktan büyük keyif aldığım değerli dostum Dr. Mehmet ADIYEKE' ye ve tüm asistan arkadaşlarıma,

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını ve desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN'e teşekkür ederim.

Sevgili anne ve babam; tüm hayatım boyunca esirgemediğiniz sonsuz sabrınız, emeğiniz ve şefkatinize teşekkür ederim.

**MİSSED ABORTUS VE İSTEMLİ EVOKUASYON OLGULARININ
ENDOMETRİUMLARINDA PROANJİYOGENEZ MOLEKÜL
DAĞILIMLARININ KARŞILAŞTIRILMASI
ÖZET**

Amaç: Missed abortus ve istemli gebelik terminasyonu yapılan olguların desidualarında anjiyogenezde rol alan faktörlerin dağılımlarını karşılaştırarak, missed abortus etyolojisinde anjiyogenezin rolünü araştırmak amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya Celal Bayar Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum bölümüne başvuran, gebeliğin boşaltılması kararı verilmiş missed abortus tanılı 19 hasta ve 10 hafta altı gebelik terminasyonu istemi ile başvuran 15 hasta alınmıştır. Her iki hasta grubundan endometrial ve plasental doku örnekleri maske anestezi altında yapılan dilatasyon küretaj (D&C) işlemi ile toplandı. Materyaller iki gruba ayrılarak incelendi. Bloklanan bütün örneklerle, Nitrik oksit sentaz izoformları (eNOS ve iNOS), Hipoksi ile indüklenen faktör-1 α , Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), VEGF reseptörleri [VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (flk-1)] ve Trombospondin-1 immünohistokimyasal boyamaları uygulandı. Boyanan hücre sayısı H-Score tekniği ile hesaplandı.

Bulgular: Missed abortus grubundaki 19 olgunun ortalama yaşı 28.7 (18- 41) iken istemli evokasyon grubundaki 15 olgunun ortalama yaşı 27.5 (21-37)' dir. Çalışmaya kabul edilen 34 olgudan 17 kadın nullipardır. Missed abortus grubunda 11 olgu, istemli evokasyon grubunda 6 olgu nullipardır. Obstetrik özgeçmiş bakımından her iki grup arasında anlamlı fark yoktur. Histokimyasal incelemede missed abortus grubunda daha düşük damar oluşumu ve trofoblast yapılanması izlendi. İmmunhistokimyasal incelemelerde missed abortus grubunda desidual vasküler hücrelerde VEGF, eNOS ve Flt-1 immunoreaktivitesi düşük saptanırken Flk-1 immunoreaktivitesi yüksek bulundu. İki grup arasında anlamlı ($p<0.005$) fark tespit edildi. HIF immunoreaktivitesi kontrol grubu sitotrofoblastlarında daha yüksek bulundu ve fark anlamlı ($p<0.05$) idi. Trombospondin-1 ve iNOS immünohistokimyasal incelemesinde desidual ve plasental vasküler hücrelerde missed abortus grubunda kontrol grubuna göre daha fazla boyanma izlendi ve fark anlamlı ($p<0.005$) bulundu.

Sonuç: Missed abortus olgularında sağlıklı olan gebeliklere göre yetersiz vasküler gelişim

söz konusudur. Anjiyogenik faktörlerin azalmış ekspresyonları, antianjiyogenik faktörlerin ise artmış ekspresyonları görülmektedir. Sağlıklı bir gebeliğin oluşumu ve devamı için yeterli anjiyogenez esastır. Proanjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda ise anjiyogenez kontrol edilemez ve gebelik kayıplarına neden olabilir.

Anahtar Kelimeler: Missed abortus, anjiyogenezis, VEGF

**COMPARING OF THE DISTRIBUTION OF MOLECULAR PROANGIOGENIC
FACTORS IN ENDOMETRIUM OF MISSED ABORTION AND VOLUNTARY
FIRST TRIMESTER TERMINATION CASES**

ABSTRACT

Aim: In this study, we have compared distribution of factors that involved in angiogenesis in desiduals of missed abortion and voluntary termination cases to investigate the role of angiogenesis in the etiology of missed abortion.

Materials and Methods: Desidual materials were collected from patients that are diagnosed missed abortion (n=19) and legal voluntary termination cases (n=15) under 10 gestastational week. Tissue samples were collected from each group by dilatation curettage (D&C) under mask anesthesia. Materials were divided into two groups for examination. For all samples, Nitric Oxide synthase isoforms (eNOS ve iNOS), Hypoxia inducible factor-1 alpha, Vascular endothelial growth Factor (VEGF), VEGF receptors [VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (flk-1)] and Thrombospondin-1 immunohistochemical staining were performed. The number of stained cells was calculated using H-Score technique.

Results: Missed abortion group (n=19) mean age was 28.7 (18- 41) and control group (n=15) mean age was 27.5 (21-37). 17 of 34 patients admitted to the study were nullipar. 11 patients were nullipar in missed abortion group and 7 in control group. There is no significant difference between the two groups in terms of obstetric history. In histochemical examination, at missed abortion group a lower vessel formation and structuring of trophoblast viewed. In immunohistochemical examination at missed abortion group, VEGF, eNOS, and FLT-1 immunoreactivity were detected lower in decidual vascular cells. Flk-1 immunoreactivity were detected higher. Between the two groups significantly (p <0.005) difference was found. HIF immunoreactivity was higher than the control group's cytotrophoblast and the difference was significantly (p <0.05). With immunohistochemical examination of Thrombospondin-1 and iNOS, in desidua and placentar vascular cells, when compared with the control group, it was seemed to have more staining in missed abortion group and it was significantly different (p <0.005).

Conclusion: It is shown that compared with healthy pregnant, in missed abortion cases the vascular development is insufficient. In these cases, the expression of angiogenic

factors decreases oppositely, the anti-angiogenic factors increases. A sufficient angiogenesis is essential for the formation and continuing of a healthy pregnancy. If the balance between angiogenic and anti-angiogenic factors deteriorates, angiogenesis cannot be controlled and may result with the loss of pregnancy.

Key words: Missed abortion, angiogenesis, VEGF

1. GİRİŞ

Abortus, tanım olarak ekstrauterin ortamda yaşamını devam ettirme yetisi kazanmamış immatür bir fetusun herhangi bir nedenle uterus dışına atılması ve bu şekilde gebeliğin sonlanmasıdır. 1977 yılında Dünya sağlık örgütü (WHO), gebelik ürününün ağırlığı ve gebelik sürecini kriter alarak yeni bir abortus tanımı getirmiştir. Bu tanıma göre, 20. gebelik haftasından önce, 500 gramdan daha az embriyo veya fetus ve eklerinin, tamamının ya da bir kısmının uterus kavitesi dışına atılması olayına abortus denilmektedir (1).

Spontan gebeliklerin büyük çoğunluğu, son adet tarihinden itibaren ilk bir ay içerisinde olmak üzere, daha gebeliğin ilk üç ayı tamamlanmadan %50-70 kadarının kaybedildiği tahmin edilmektedir. Bu düşükler eğer beklenen adet döneminde olursa çoğunlukla fark edilmez (2). İyi dökümente edilmiş retrospektif ve prospektif kohort çalışmalarda, klinik olarak tespit edilmiş ilk üç aydaki fetal kayıp oranı %10-12 bulunmuştur (3). Spontan gebelik kayıplarının klinik görünümü birçok yolla sınıflandırılabilir. Yaygın olarak kullanılan alt gruplar, abortus imminens (düşük tehdidi), abortus insipiens (önlenemez düşük), inkomplet ve missed abortustur (gecikmiş düşük) (4).

Missed abortus, intrauterin fetal viabilite kaybının olduğu ancak diğer abortus tiplerinde görülen kanama, servikal dilatasyon gibi bulguların olmadığı durumdur. Fetusun uzun süredir ölü olduğu halde uterus kavitesi dışına atılmaması, inutero olarak kalması olarak tanımlanır. Günümüzde, missed abortus tanımlaması doğru değildir, çünkü bu tanım, immunolojik gebelik testleri ve sonografinin gelişiminden yıllar önce yapılmıştır. Kapalı bir servikal kanalla uterus içerisinde günler, haftalar, hatta aylarca kalan, ölü gebelik ürünlerini tanımlamak için kullanılmıştır. Spontan gebelik kayıpları hemen daima embriyofetal ölümden önce olduğu için çoğu, doğru şekilde 'gecikmiş (missed)' olarak tanımlanır (4). Sekizinci gebelik haftasından sonra kaybedilen canlı gebeliklerin %2-3'ünde olduğu gibi, fetal kayıp klinik bulgulardan önce olur (5,6,7). Genel olarak kabul edilen %10-12'lik klinik gebelik kayıp oranına göre, maternal semptomların başlamasından haftalar önce fetal kayıp olduğu sonucu çıkarılabilir. Bu yüzden, 9-12. gebelik haftalarında klinik olarak düşükle sonlanan fetuslar, haftalar önce kaybedilmiştir. Bu da demek oluyor ki, neredeyse tüm düşükler 'missed abortus'dur (8). Etiyopatogenezi tam olarak aydınlatılmamış olan missed abortusların oluşum mekanizmaları için, diğer

abortus tiplerinde olduğu gibi, kromozom anomalileri, enfeksiyonlar, immunolojik faktörler, endokrin bozukluklar, ilaç kullanımı ve çevresel faktörler sayılabilir. Missed abortusda etyoloji tam olarak belirgin olmamasına rağmen, son yıllarda yapılan çalışmalarda, anjiyogenez ile embriyonik gelişim arasındaki yakın ilişkiden söz edilmektedir.

Vasküler gelişim, embriyogenez sırasında organ gelişimi ve farklılaşması için temel bir gerekliliktir. Mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi demek olan anjiyogenez, vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreç olup, bazı durumlarda patolojik de olabilmektedir. Anjiyogenezin sıkı biçimde denetlendiği döllenmeden sonra plasentanın gelişmesi, embriyogenez, yara iyileşmesi, menstruasyondan sonra uterus iç tabakasının yenilenmesi gibi fizyolojik durumlar dışında anjiyogenez organizmada oldukça sınırlıdır (9). Normal koşullarda anjiyogenez, endotel hücrelerinin çoğalmasını ve etkinleşmesini sağlayan pek çok büyüme etmeni ile, buna karşı gelen anti-anjiyogenik etmenler arasında oluşan bir denge ile düzenlenir (10).

Proanjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda anjiyogenez kontrol edilememektedir. Mevcut damarların tomurcuklanarak avasküler dokulara doğru uzamasını ifade eden anjiyogenezin embriyo gelişimindeki rolü bilinmektedir. Anjiyogenezin düzenlenme evreleri pek çok büyüme faktörünün ve düzenleyici proteinin kontrolü altındadır. Anjiyogenik uyarıcılar ve anjiyogenez inhibitörleri arasındaki denge, normalde damarsal bileşenlerin sessiz halde kalmalarını sağlamaktadır. Anjiyogenik uyarıların artışı ve anjiyogenez inhibitörlerinin azalışı anjiyogenezi başlatmaktadır.

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF); anjiyogenezde rol oynayan faktörlerden en önemlisidir. Endotel hücrelerinin çok sayıdaki biyolojik fonksiyonu, sitokin sentezi ve salınımı, trombolitik ve pıhtılaşma yollarında yer alan moleküllerin ekspresyonu ve düz kas hücre hiperplazisi düzenlenmesi VEGF ile yapılmaktadır (11-12). VEGF biyolojik aktivitesini temel olarak üç reseptörü ile gerçekleştirmektedir. Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörleri VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (flk-1/KDR) ve VEGF-R3 (flt-4)'dür. Bunlardan VEGF-R1 ve R2 endotel hücreleri üzerinde iken VEGF-R3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır (13,14,15).

Çeşitli laboratuvarlarda yapılan çalışmalar ile normal ve anormal anjiyogenezin düzenlenmesinde vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) merkezi rolü aydınlatılmıştır (16). Özellikle tek bir VEGF allelinin kaybının dahi embriyonik ölüm ile sonuçlanması bu faktörün vasküler sistemin gelişimi ve farklılaşmasındaki rolünü ortaya

koymaktadır (17,18). Embriyonik damarsal sistemin gelişmesi esnasında meydana gelen olaylar ve embriyonun oksijen ve besin ihtiyacı, aynen erişkin bir organizmada anjiyogenez oluşumunda, özellikle hipoksinin aktive ettiği metabolik cevaplarla benzerlik göstermektedir (19,20).

Ortamda yeterli oksijen bulunamadığı durum olarak tanımlanan hipoksi, pek çok hastalığın patogenezinde önemli rol oynar (21). Embriyo gelişimi de dahil olmak üzere, pek çok ökaryotik organizmanın aerobik metabolizmaları için oksijen, büyük ölçüde gereklidir. Bir yazılım etmeni olan HIF-1 α hipoksik koşullarda anjiyogenez, glukoz taşınması ve anaerobik metabolizma ile ilgili genlerin ifade edilmesini uyararak gebelik desiduası gibi damarlanmanın yoğun olduğu doku hücrelerinde hayati bir rol oynar (22). VEGF ekspresyonunun hipoksi esnasında HIF-1 α ile kontrol edildiği kabul edilmektedir (23).

Anjiyogenez inhibitörleri, matriks yıkımının engellenmesi, endotel hücrelerinin direkt inhibisyonu, anjiogenez aktivatörlerinin engellenmesi ve nonspesifik mekanizmalarla etkilerini göstermektedir (24). TSP-1, anjiyogenik uyarıların değişik türlerine cevap olarak endotel hücrelerde hücre göçünü durdurma, apoptozu uyarma ve yeni damar oluşumunu önleme yeteneğine sahip potansiyel bir anjiyogenez baskılayıcısıdır (25,26). TSP-1'in, ekstrasellüler depolardan VEGF salınımının düzenlenmesinde etkili olması da önemli bir noktadır. TSP-1'in yokluğunda VEGF'nin ve reseptörü VEGFR'nin arttığı gösterilmiştir (27). Doku oksijen seviyesindeki azalma sonucunda hücrenin hipoksiye uyumunda gerekli genlerin uyarıldığı, TSP-1'in ise engellendiği görülmüştür. Bunun sonucunda da yeni damar oluşumları gözlenmiştir (28).

Sistemik kan basıncının düzenlenmesinde rol alan Nitrik oksid (NO), VEGF ile indüklenen angiogenez ve hiperpermeabilitede de kritik, hayati bir role sahiptir. VEGF, endotelial nitrik oksid sentaz (eNOS) enziminin upregulasyonunu ve buna bağlı olarak NO salgısını indükler. Endojen olarak üretilen NO da sonuçta VEGF sentezini artırır. eNOS'un farmakolojik blokajı ya da genetik olarak bozukluğa uğraması VEGF ile indüklenmiş angiogenezi ve hiperpermeabiliteyi inhibe eder. eNOS'un aksine, indüklenebilir NOS (iNOS), VEGF reseptörünü down-regüle ederek angiogenezi inhibe edebilmektedir.

Çalışmamızda; missed abortus ve istemli gebelik terminasyonu yapılan olguların endometrium ve plasenta doku örneklerinde; anjiyogenik moleküller olan VEGF, VEGF reseptörleri, eNOS ve anjiyogenez inhibitörü olan trombospondin-1, iNOS ve hipoksik koşullarda anjiyogenez ile ilgili genlerin ifade edilmesini uyaran HIF-1 α dağılımlarını

karşılaştırdık. Böylece; anjiyogenez üzerine etkisi olan moleküllerin missed abortus etiyojisindeki olası rolünü ortaya koyarak, ileride uygulanabilecek tedaviler ve missed abortus gelişimini önleme konusundaki çalışmalara yol gösterici olmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ABORTUSLAR

Gebeliğin, fetusun hayatta kalmaya yetecek kadar gelişmesinden önce herhangi bir yolla sonlanmasına abortus (düşük) denir. Birleşik Devletler'de bu tanım, son normal mensin ilk günü temel alınarak 20 haftadan önce gebeliğin sonlandırılmasıyla sınırlandırılmıştır. Bir diğer sık kullanılan tanım da ağırlığı 500 gr'dan az olan fetusun doğurtulmasıdır. Dünya Sağlık Teşkilatı (World Health Organization) (WHO) 1977'de gebelik ürününün ağırlığı ve gebelik sürecini kriter alarak bir abortus tanımı getirmiştir. Bu tanıma göre, 20. gebelik haftasından önce, 500 gramdan daha az embriyo veya fetus ve eklerinin, tamamının ya da bir kısmının uterus kavitesi dışına atılması olayına abortus denilmektedir (1). Spontan abortusların çoğu embriyonun ölümünden sonraki bir-üç hafta arasında gerçekleşir. Başlangıçta desidua bazaliste kanama vardır. İmplantasyon yerinde inflamasyon ve nekroz oluşur. Abortus nedeniyle olan vaginal kanamalar birinci ve ikinci trimesterde olan kanamalar arasında ilk sırada yer almaktadır. Abortuslar kanama yapması dışında neden olduğu obstetrik komplikasyonlar sebebiyle de önemli bir patolojidir.

Abortuslar çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir;

A) Oluş zamanlarına göre:

1) **Subklinik abortus (Belirlenemeyen abortus):** Burada olay fekdasyondan hemen sonraki günlerde gerçekleşir. Bu nedenle kadın gebe kaldığını fark etmez. Sonuçta ya zamanında bir menstrüel kanama ya da birkaç gün geciken bir menstrüel kanama ile gebelik sonlanır.

2) **Erken abortus:** Onikinci gebelik haftasının sonuna kadar oluşan abortuslardır. Abortusların %80 den fazlası ilk 12 haftada olmaktadır. Bunların en az yarısına kromozomal anomaliler yol açmaktadır. Bundan sonra düşük oranlarında hızlı bir düşüş olur (29).

3) **Geç abortus:** Gebeliğin 13-20 haftaları arasında oluşan abortuslardır.

B) Tamamlanma şekline göre:

1) **Komplet abortuslar:** Embriyo veya fetus ve eklerinin tamamen uterus kavitesi dışına atılmasıdır.

2) **İnkomplet abortuslar:** Embriyo veya fetus ve eklerinin bir kısmının uterus kavitesi dışına atılıp, bir kısmının ise kavitede kaldığı durumdur. Doku kaybı ile birlikte vaginal

kanama ve ağrılı uterus krampları vardır. Tedavi uterin kavitenin boşaltılmasıdır (30).

C) Oluş şekillerine göre:

1) Spontan abortuslar: Mekanik ya da farmakolojik müdahale ve zorlama olmadan gebeliğin 20. gestasyonel haftadan önce sonlanmasıdır. Kadın yaşı arttıkça spontan abortus riski artar. Klinik olarak saptanmış gebeliği olan 20 yaşından küçük kadınlarda spontan abortus oranı %12 iken, 40 yaşın üzerindeki kadınlarda %26 dır (31).

2) Zorlanmış (provake) abortuslar: Kendi aralarında ikiye ayrılır.

a) Medikal abortus (Terapötik abortus): Tıbbi endikasyonlar nedeniyle gebeliğin sonlandırılmasıdır. Maternal ağır sistemik hastalıklar, böbrek hastalıkları, kalp hastalıkları, gebelik psikoza, sarılık, kanser veya fetusda anomali tespit edilmişse, gebelikte teratojenik ilaç kullanılmışsa, genetik hastalık saptanmışsa, pelvise aşırı radyasyon uygulanmışsa, fenilketonuri-galaktozemi gibi doğuştan metabolik hastalıklar varsa, medikal abortus yaptırılır.

1987 yılında ACOG terapötik abortusun şu durumlarda uygun olduğunu belirtti (32);

- Gebeliğin devamı, annenin hayatını tehdit ediyor ya da onun sağlığını ciddi olarak bozuyorsa,
- Gebelik tecavüz veya ensest ilişki sonucu oluşmuş ise,
- Gebeliğin sürdürülmesi ağır anomalili veya mental retarde bir çocuk doğumuna neden olacaksa.

b) İstemli (Kriminal, Elektif) Abortuslar: Ortada anne ve fetus açısından hiçbir tıbbi sorun yokken, istenmeyen bir gebelik olgusunun 20. gebelik haftasından önce sonlandırılmasıdır. Ülkemizde 1983 yılında çıkarılmış 2827 sayılı ‘nüfus planlamasına dair kanun’ ile elektif abortus ve medikal abortus şartları belirlenmiştir. Onuncu gebelik haftasına kadar olan gebelikler istenmediği takdirde yasal tahliye yapılabilir. Şahsın kendisi veya başkaları tarafından paramedikal aletler kullanılarak düşük yaptırılarak (kriminal abortus), genital organlarda enfeksiyon meydana gelmesi ile sonuçlanan düşük şekline ise septik abortus denilir (33).

D) Klinik seyrine göre abortuslar beş grupta incelenir;

- 1) Abortus imminens (Düşük tehdidi)
- 2) Abortus incipiens (Önlenemeyen düşük)
- 3) Missed abortuslar
- 4) Habituel abortuslar
- 5) Septik abortuslar

1) Abortus imminens (Düşük tehdidi): Yirminci gebelik haftasından önce vaginal kanama olması şeklinde tanımlanır. Gebelerin %20-25'inde ilk aylarda damlama tarzında vaginal kanama olur. Erken gebelikte kanaması olan kadınların yaklaşık yarısında abortus olur. Kanama genellikle azdır ve bu kanama kahverenkli akıntıdan, parlak kırmızıya kadar değişiklik gösterebilir. Kanama genellikle kramp veya pelvik ağrı şeklinde görülen hafif bir ağrı ile birlikte olur. Pelvik muayenede serviks kapalı ve silinmemiştir. Düşen doku ve membran rüptürü yoktur. Uterus beklenen haftasına uygun büyüklüktedir (34).

Klinik olarak abortus tehdidi, komplet abortus ve rüptüre olmamış ektopik gebeliği birbirinden ayırmak çoğunlukla olanaksızdır (32). Abortus imminens klinik tanısı olan gebelerin ultrasonografik muayenesi, gerçek bir düşük tehdidiyle ektopik gebelik, mol hidatiform, unembriyonik gebelik, missed abortus gibi hemen sonlandırılması gereken patolojik gebeliklerin ayırıcı tanısı açısından şarttır. Tek başına ya da çeşitli kombinasyonlar halinde yapılan vaginal sonografi, seri serum kantitatif koryonik gonadotropin (hCG) seviyeleri ve serum progesteron değerleri ölçümlerinin, canlı bir intrauterin gebeliğin var olup olmadığının kesinleştirilmesinde faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Eğer bir gestasyonel kese görülebiliyorsa ve serum hCG seviyesi 1000 mIU/ml'nin altındaysa gestasyonun canlı kalması olasılığı yoktur. 5 ng/ml'nin altındaki serum progesteron seviyesi, ölü gebelikle ilişkilidir ancak bu gebeliğin intrauterin mi yoksa ekstrauterin mi olduğunu belirlemez.

Düşük tehdidinin etkili bir tedavisi yoktur. Önerilmesine rağmen yatak istirahati etkili değildir. Koitustan ve ağır fizik aktiviteden kaçınma önerilir. Koitustan kaçınmak, ilişki sırasında spermdeki prostaglandinlerle temasın uterusun kontraksiyonlarına neden olabilmesi, servikal uyarı nedeniyle endojen prostaglandin salınımının artması, orgazm ve hatta meme başı uyarılması nedeniyle teorik olarak savunulabilir.

2) Abortus incipiens (Önlenemeyen düşük): Düşük, tekil bir olay değil, bir süreçtir. Farklı olgular gibi sınıflandırılmalarına rağmen, kaçınılmaz ve tam olmayan düşüklükler, benzer klinik problemler gösterir ve aynı tedaviyi gerektirir. Abortusun önlenemezliği, servikal dilatasyon varlığında membranların gros rüptürü ile kendini gösterir. Bu koşullarda abortus hemen hemen kesindir. Tam olmayan düşükte, gebelik ürünleri uterus kavitesinden kısmen dışarı çıkmıştır, serviksin dış ağzından görülebilir veya vaginadadır ve kanama ile kramplar sürekli olur. Fetus ve plasenta, 10 haftadan önce oluşan abortuslarda birlikte atılma eğilimindedir, bundan sonraki haftalarda ayrı ayrı atılma eğilimindedirler. Kaçınılmaz veya tam olmayan düşüklerde, fetal yaşam devam edemez ve bu nedenle, gebeliği korumaya yönelik eylemler endike değildir. Tedavinin amacı daha fazla maternal

kanama veya enfeksiyon komplikasyonlarını önlemek için uterusun boşaltılmasıdır.

3) Missed abortus: İntrauterin fetal viabilite kaybının olduğu ancak diğer abortus tiplerinde görülen kanama, servikal dilatasyon gibi bulguların olmadığı durumdur. Fetus uzun süredir ölmüş olduğu halde uterus kavitesi dışına atılmaması, inutero olarak kalması olarak tanımlanır. Kesin tanı ultrasonografide fetal kardiyak aktivitenin olmaması ile konur. Kesin bir zaman diliminden bahsetmek mümkün değildir ve bunun herhangi bir klinik amaç için de bir faydası yoktur. Ölü fetusun atılmama nedeni kesin bilinmemektedir. Bu tür vakaların bir kısmında uterin septum varlığı saptanmıştır (35). Ultrasonografi ve endokrin ölçüm tekniklerinin kullanılmadığı zamanlarda missed abortus tanısının konabilmesi için fetal ölümden sonra en az dört, bazılarında göre ise de sekiz haftanın geçmesi gerekiyordu. Bunun nedeni fetal ölüm tanısının ancak uterusun büyümemesi ile tanınabilmesiydi. Günümüzde ultrasonografinin yaygın kullanımıyla β ve - hCG'nin yükselmediğinin saptanmasıyla hastalara missed abortus tanısı kolayca konulabilmektedir.

Gebeliğin subjektif yakınmalarında kaybolma olur. Çoğu kez kahverengi bir vaginal akıntı vardır. Ağrı şikâyeti çoğu kez yoktur. Bir süre uterus, boyutları bakımından sabit kalabilir ancak meme değişiklikleri genellikle geriler. Takiplerde B-hCG artmaz. Tedavi uterin kavitenin boşaltılmasıdır. Fetal ölümü takiben gebelik ürünleri uterus dışına atılmazsa, gecikmiş olgularda ciddi koagülasyon defekti ve kanama görülebilir (36). Bu daha çok gestasyon, fetusun ölümünden önce ikinci trimestere ulaştıysa olur.

Missed abortusun en önemli komplikasyonu dissemine intravasküler koagülasyondur (DIC). Plasentadaki yüksek miktardaki tromboplastin aktivatörü, DIC'i tetikleyen en önemli faktördür. DIC riski gestasyonel yaş ve fetal ölümün üzerinden geçen süre ile direkt ilişkilidir. Dört haftadan önce risk çok düşüktür. Missed abortus tedavisi cerrahi ya da medikal olarak uterusun boşaltılmasıdır. Rh negatif olgularda işlem sonrası mutlaka anti-D immunglobulin uygulanmalıdır.

4) Habitüel abortuslar (Rekürren abortus): Bu durumun çeşitli sayı ve sıra kriterleriyle tanımı yapılmıştır. Geleneksel olarak son menstürüasyon tarihinden itibaren 20. gebelik haftasından önce klinik olarak fark edilmiş, üç veya daha fazla gebelik kaybı olarak tanımlanır. Üreme çağındaki kadınların yaklaşık %1–2 arka arkaya üç veya daha fazla spontan abortus yaşayacaktır (37). Etyolojide anatomik anomaliler %12–16, endokrinolojik sorunlar %17–20, enfeksiyonlar %0.5–5, antifosfolipid antikor sendromu dahil immunolojik faktörler %20–50 oranında tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkili bulunmuştur. Tam bir değerlendirmeden sonra bile vakaların yaklaşık yarısında olası bir neden bulunamaz (38). Tekrarlayan gebelik kayıplarının değerlendirilmesinde, araştırmaya

başlamak için kesin kriterler ve özel bir düşük sayısı yoktur. Bu konudaki karar kişiselleştirilmeli ve kadının yaşı, çiftin anksiyete düzeyi, kişisel ve ailesel öykü gibi durumlar göz önünde bulundurulmalıdır. Günümüzde tekrarlayan gebelik kaybı, birbirini takip etmesi şart olmamakla birlikte üç ve ya daha fazla gebelik kaybı olarak tanımlanmaktadır. Birçok yazar, özellikle, gebelik kaybından önce fetal kalp aktivitesi saptanmışsa, kadının yaşı 35'ten fazla ise, önceki gebelik kaybındaki konsepsiyon ürününün normal karyotipte olması ve infertil çift olması gibi durumlarda, birbirini takip eden iki spontan düşüğü bulunan çiftlerde klinik araştırma ve tedavi yapılmasını uygun görmektedir.

5) Septik abortuslar: Genellikle kontamine cisimle düşük yaptırma girişimi sonucunda ortaya çıkar. Yaygın bir enfeksiyon tablosu vardır. Endometrit olağan bir sonuçtur ancak parametrit, peritonit, endokardit ve septisemi de oluşabilir. Ajan patojen başta E.coli ve diğer enterik gr(-) bakteriler olmak üzere, B hemolitik streptokoklar, anaerobik ajanlar, bacteriodes, stafilokoklar ve clostridiumlardır. Clostridium perfiringes gibi şiddetli hemolitik egzotoksini olan bir ajan mevcutsa böbrek yetmezliği hemen hemen tüm olgularda ortaya çıkar. Yerleşmiş bir septik abortus tablosunda ciddi hipotansiyon, oligüri, anüri, hemoliz, DIC, paradoksik hipotermi ve lökopeni görülebilir. Tedavide temel prensip uterusu boşaltmak ve şokla mücadele etmek, agresif olarak parenteral antibiyotik tedavisine başlamaktır. Eğer enfekte doku alınamıyorsa adneksiyal veya myometriyal abse oluşumu varsa histerektomi ve salpingooferektomi yapmak gerekebilir.

İNSİDANS:

Klinik olarak fark edilmiş gebeliklerin yaklaşık olarak %12-15'i 4. ile 20. gebelik haftaları arasında abortus ile sonlanır. Ne var ki klinik olarak fark edilen ve fark edilmeyen gebelikleri de hesaba kattığımızda, gerçek erken gebelik kaybı oranları yaşa bağlı olarak iki ile dört kat daha fazladır. Hassas insan koryonik gonadotropin (hCG) kitlerinin kullanıldığı çalışmalarda implantasyondan sonraki gebelik kayıplarının gerçek oranı % 31 olarak bulunmuştur (30). Çeşitli çalışmalar abortus oranlarının önceki obstetrik öykü ile değiştiğini göstermiştir (39,40,41). İlk gebelikleri elektif olarak sonlandırılan ve son gebeliği başarılı olan kadınların abortus riski nispeten düşüktür (%4-6). Aksine, önceki gebeliği kayıp ile sonuçlanan kadınların gelecek gebeliklerindeki düşük riski (%19-24) çok daha fazladır. Klinik olarak fark edilmiş iki kaybı takip eden gebelikteki abortus riski %24, üç kayıptan sonra %30, 4 kayıptan sonra %40-50 olarak hesaplanmıştır (39). Bu bilgiler tekrarlayan gebelik kayıpları ve tedavisi hakkında klinik çalışma yapmayı güçleştirir. Çünkü, önerilen herhangi bir tedavi girişiminin etkinliğini gösterebilmek için, çok geniş

hasta gruplarında çalışma yapmak gerekir (42). Geçmişteki obstetrik öyküsünden bağımsız olarak, klinik olarak tanınmış spontan gebelik kaybı riski yaşla birlikte artmaktadır. 30 yaşın altındaki kadınlarda risk %7-15 iken, 35-40 yaş arası risk %17-28 dir. 40 yaş sonrası kadınlarda risk %34-52'dir (43,44). Eğer tanımlanmış ve fark edilmeyen gebelik kayıpları göz önüne alınırsa, 40 yaş üstü kadınlardaki gebelik kaybı %75'e ulaşır veya %75'i geçer.

PATOLOJİ:

Desidua bazalis içine kanama ve kanamaya bitişik dokularda nekrotik değişiklikler genellikle abortusa eşlik eden durumlardır. Gebelik ürünü kısmen veya tamamen desidua basalisten ayrılır ve böylece uterus yabancı cisimi atmak için kontraksiyonlara başlar (35). Kесе açıldığında sıvının sıklıkla küçük yumuşamış masere bir fetusu çevrelediği görülür ya da kese içinde görülebilir bir fetus olmayabilir ve buna da blighted ovum (unembriyonik gebelik) denir. Tüm abortus materyallerinin histolojik incelemesinde plasental villuslarda dejenerasyon görülmüştür (45). Kan (breus) molü yada carneous mol, ovum etrafına olan kanama sonucunda pıhtılaşmış kandan bir kapsülle çevrili ovumdur. Kapsül değişken kalınlıktadır ve dejenere koryonik villus her yanına dağılmıştır. İçindeki küçük, sıvı içeren boşluk, eski kan pıhtısının kalın duvarlarıyla komprese olmuş ve bozulmuş görünür. Tutulan fetus yumuşamaya uğrayabilir. Kafatasının kemikleri kollabe olur ve abdomen kanla bulaşık sıvıyla distandü olur. Deri yumuşar ve in utero olarak ya da en hafif bir dokunuşta, geride bir koryum bırakarak dökülür. Fetusun rengi mat kırmızı bir renge dönüşür. İç organlar dejenere olur ve nekroza uğrar. Fetus kendisi ile komprese olduğunda ve bir fetus compressus oluşturmak üzere kurduğunda amniyotik sıvı absorbe edilebilir. Bazen fetus en sonunda o kadar kuru ve komprese hale gelir ki parşömene benzer ve fetus papyraceous olarak adlandırılır. Bu duruma daha çok ikiz gebeliklerde fetusun bir tanesi öldüğünde rastlanır.

TEŞHİS:

Tanımda öncelikle yapılması gereken dikkatli bir öykü almaktır. Son adet tarihi özellikle sorgulanmalı ve adet düzeni mutlak sorulmalıdır. Çoğu kez hastalar sekonder bir amenore sonrası olan vaginal kanama şikayeti ile başvururlar. Bu hastaların ayırıcı tanısında olası servikal polipler, vajinit, servikal karsinom, gestasyonel trofoblastik hastalık, ektopik gebelik, alt genital traktüs travmaları ve yabancı cisim düşünülmelidir. Kanama gebeliğin haftasına ve olayın ilerleyiş tarzına göre leke tarzında, bol miktarda veya abondan vasıfta olabilir. Abortus olayının ilerleyişine göre düşen parça öyküsü alınabilir. Eğer gebelik önceden biliniyorsa gebelikte yapılan muayene ve laboratuvar bulguları sorgulanmalıdır.

Pelvik muayenenin zorlamadan ve kolay bir biçimde yapılması gerekir. Önce spekulum ile kanamanın nereden olduğu (uterus kavite, portio vaginalis, vagen duvarı, polipoid odaklar veya lezyone sahalar), servikal dilatasyonun olup olmadığı ve abort materyalinin kavite dışına atılıp atılmadığı anlaşılmalıdır.

Ultrasonografi, erken gebelik kayıplarının tanısında en çok bilgi veren ve ayırıcı tanı yapmayı sağlayan basit ve ucuz bir tanı aracıdır. İlk trimester kanamalarının değerlendirilmesinde temel bir role sahiptir. Çünkü gebeliğin intrauterin olup olmadığı; intrauterin ise, embriyonun canlı olup olmadığını en kısa yoldan gösteren yöntemdir. İntrauterin gebeliğin en erken bulgusu, endometrial kavite içinde eksantrik olarak yerleşmiş, kalın ekojenik bir halkayla çevrili küçük bir sıvı boşluğu ve gestasyonel sac'tır. Endovaginal transduserlerle donatılmış modern sonografik aletler ile gestasyonel kese tesbit edilebildiğinde gebelik yaklaşık olarak son normal menstruasyon periyoduna göre dört-beş hafta arasında ve ortalama gestasyonel sac çapı sadece 2-3 mm.dir (46,47). Erken embriyonik yapılar genellikle gestasyonel kese yaklaşık 10 mm ortalama sac çapına ulaşıncaya kadar görülmez ve sürekli olarak görülebilmesi için 15 mm ortalama çapa ulaşması gerekmektedir. Görülen bu ilk yapı, gelişen amniotik kese ve yolk sac kombinasyonudur. Embriyo ultrasonografik olarak 2-3.9 mm'lik CRL varken görülebilir ve bu menstrual yaşa göre 30-40 gün arasıyla uyumludur. Tüm yaşayan embriyolarda CRL 5 mm'ye ulaştığı zaman kardiyak pulsasyon görülebilir. Bu zamanda ortalama kese çapı 15-18 mm ve menstrual yaş 6.5 haftadır (48).

HCG sinsityotrofoblastlarda üretilen bir glikoproteindir. HCG'nin ikiye katlanma zamanı gestasyonel yaşla korelasyon gösterir. İlk 6 haftalık amenore boyunca serum hCG seviyesi eksponansiyonel olarak artar. Bu süre zarfında başlangıçtaki seviyeden bağımsız olarak hCG'nin ikiye katlanma zamanı kısmen sabittir. 48 saatten fazla bir süre zarfında hCG'deki %66 lık bir artış %85 güven seviyesi ile viable intrauterin gebelikler için normal değerlerin alt sınırındadır (49). Serum progesteronu, hCG seviyelerine bakılma ve ultrasonografi yapma imkanı olmayan yerlerde, normal ve anormal gebeliklerin öngörülmesinde kullanılabilir. 5 ng/ml'den az serum progesteron düzeyleri kuvvetle anormal gebeliği düşündürür. Fakat prediktivitesi %100 değildir. Serum progesteron seviyesi 5 ng/ml'den az olduğunda normal gebelik olasılığı 1/1500'dür. Bu nedenle serum progesteron düzeyi tek başına nonviable gebelik belirlenmesinde kullanılamaz (50).

ETYOLOJİ:

Abortusların %80'den fazlası ilk 12 hafta içinde olur ve bu oran bundan sonra hızla düşer (31). Etiyolojiyi fetal, maternal, paternal nedenler olarak üçe ayırabiliriz. Fetusa ait

sebepler, malformasyonlar ve kromozom anomalileridir. Maternal faktörler arasında enfeksiyonlar, immunolojik faktörler, endokrin bozukluklar, uterus anomalileri, kronik debilizan hastalıklar, ilaç kullanımı, çevresel faktörler, travma ve laparotomi sayılabilir.

1) Fetusa ait faktörler: Abortusların %80'inden fazlası ilk 12 hafta içinde olur ve bu oran bundan sonra hızla düşer. Bu erken abortusların en azından yarısına kromozomal anomaliler neden olur. Sonra benzer şekilde insidansları hızla düşer. Erken abortusların yaklaşık %50 ile 60'ı fetusun bir kromozomal anomalisiyle bağlantılıdır. Klinik olarak fark edilmiş gebeliklerin yaklaşık olarak %12-15'inin 4. ile 20. gebelik haftaları arasında spontan abortus ile sonlandığı belirtilmektedir.

Kromozomal anomalilerin yaklaşık dörtte birinin annedeki, %5'inin de babadaki gametogenez hatalarına bağlı olduğu söylenmiştir (51). Abortuslarda gözlenen kromozomal anomalilerin %90'dan fazlası anöploidi ve poliploidi gibi sayısal anomalilerdir; geri kalanını translokasyon ve inversiyon gibi yapısal anomaliler ve mosaizm oluşturur (52,53). Otozomal trizomi, ilk trimester abortuslarıyla ilgili en sık tanımlanan kromozomal anomalidir. Trizomiler izole nondisjunction, annede ya da babadaki dengeli translokasyon ya da dengeli kromozomal inversiyonun sonucu olabilirler. Abortuslarda birinci kromozom dışındaki tüm otozomlarda trizomiler tanımlanmıştır. 13, 16, 18, 21, 22 nolu otozomlar en sık olanlarıdır. Hiç bir yenidoğanda trizomi 16 görülmemesi bunun ileri derecede fatal olduğunu gösterir.

Monozomi X (45,X0) ikinci sık kromozomal anomalidir. Monozomi X (45,X0), %14.6 oranı ile tek başına en sık rastlanan anormalliktir. Monozomi Y olgularına hiç rastlanmamıştır. Otozomal monozomi son derece nadirdir ve yaşamla bağdaşmaz. Geriye kalan kromozomal anomalilerin çoğu poliploidilerdir. Triploidi (%15) sıklıkta hidropik dejenerasyon ile birlikte dir. Bu olay anne yaşından bağımsızdır. Tetraploid abortuslar nadiren canlı doğar ve sıklıkla gestasyonun erken döneminde abortusa uğrarlar. Abortus materyalinin karyotipini saptamak düşüğü açıklayabilir (anöploidi), dengesiz translokasyon söz konusu olduğunda ebeveyninde kromozomal translokasyon lehine kanıt oluşturabilir ya da normal bulunduğu genetik dışı bir nedene işaret edebilir. Ne var ki karyotipin normal bulunması genetik nedenleri tamamıyla dışlayamaz ve normal bir dışı karyotip doku kültüründeki maternal hücrelerin kontaminasyonu sonucu olabilir.

2) Maternal faktörler: Anneye ait faktörler daha ziyade birinci trimester sonu ile ikinci trimester abortuslarına sebep olur.

a) Enfeksiyonlar: Enfeksiyonlar gebelik kayıplarının potansiyel sebepleri arasında yer almakla beraber çok tartışmalı bir konudur. Düşüklerde spesifik enfeksiyöz ajanların risk

faktörü olarak ileri sürüldüğü periyodik raporlara rağmen bakteriyel veya viral enfeksiyonların tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olduğu konusunda kesin kanıtlar yoktur. Enfeksiyöz organizmaların gebelik kaybına yol açmasında mekanizmalar halen belirsizdir.

Bazı virüslerin doğrudan fetusu ve plasentayı infekte ederek, villus enfeksiyonu ve doku hasarı ile gebelik kaybına yol açtığı düşünülmektedir. Patolojik organizmalara karşı oluşan immun yanıt gebelik kaybı ile ilişkili olabilir. Başka bir teori ise fetusun otoimmun olarak reddini önleyen mekanizma enfekte olmuş plasentanın tanınmasını ve enfeksiyondan temizlenmesini önleyerek patojen mikro organizmanın engellenmeden çoğalmasını sağlayabilir. Bazı yazarlar, genital ureaplasma veya mycoplasma enfeksiyonları ve spontan düşükler arasında ilişkiler bildirmişlerdir. Toxoplasma gondii, listeria monocytogenesis, campylobacter türleri, herpes virüs ve cytomegalovirüsün de gebelik kayıplarıyla ilişkili olduğu söylenmiştir. Chlamydia trachomatis enfeksiyonu, tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda yapılan bir çalışmada annede enfeksiyona karşı abartılmış immün cevabı yansıtan anti-chlamydia antikörlerinin prevelansının yüksek bulunması üzerine ileri sürülmüş, fakat daha sonra yapılan başka bir prospektif çalışmada anti-chlamydial antikörler ve tekrarlayan düşükler arasında bir ilişki bulunamamıştır. Temmerman ve arkadaşları, spontan abortusun bağımsız olarak maternal HIV-1 antikoruyla, maternal sifilis seroreaktivitesiyle ve vajinanın B grubu streptokoklarla kolonizasyonu ile bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir (54). Son zamanlarda düşük riski ile bakteriyel vajinozis arasında bir ilişki ortaya çıkmıştır. Bir çalışmada, gestasyonun 14. haftasından önce yapılan prenatal vizitte bakteriyel vajinozis tanısı 20. gestasyonel haftadan önce beş kat artmış bir gebelik kaybı riski ile ilişkili bulunmuştur. Bir başka geniş çalışmada ise bakteriyel vajinozisin erken gebelik kaybını göstermediği ancak 13. gestasyonel haftadan sonra gebelik kaybında makul bir risk artışı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (55,56,57,58,59).

b) Endokrin bozukluklar: Artmış gebelik kaybı riskine predispozan endokrin faktörler arasında tiroid hastalığı, diabetes mellitus, polikistik over sendromu ve luteal faz defektleri vardır. Tiroid hastalığı olan kadınlarda sıklıkla ovulatuvar disfonksiyon ve luteal faz defekti gibi üreme anormallikleri bulunur. Erken gebeliğin metabolik talebinde artmış tiroid hormonu ihtiyacı vardır. Klinik hipertiroidi ile ilişkili olarak abortus riskinde bir artış olmadığı gösterilmiştir. Halen tartışılabilir da klinik olarak ötiroid olan hastalarda dahil, antitiroid antikör varlığının tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkili olduğuna dair kanıtlar vardır. Başka bir çalışmada, tiroid fonksiyon testleri normal bulunan tedavi edilmiş

hipotiroidi hastalarında gebelik kaybı insidansı çok düşük bulunmuş fakat tedavi edilmemiş subklinik hastalığı olan ve belirgin hastalığı olup da yeterli ekzojen tiroid hormon replasmanı almayan kadınların da dahil edildiği yüksek tiroid stimulan hormonu (TSH) bulunanlarda belirgin olarak artmış risk bulunmuştur (60,61).

Metabolik regülasyonu iyi olan diyabetik kadınların gebelik kaybı yaşama ihtimali nondiyabetik kadınlardan fazla değildir. Fakat ilk trimesterde artmış kan glukoz ve glikolize hemoglobin seviyeleri olan diyabetik kadınlar, spontan düşükler için önemli ölçüde artmış risk altındadır. Hem spontan abortus hem de major konjenital malformasyonlar insüline bağımlı diyabeti olan kadınlarda artmıştır (62,63).

Ovulasyondan gebeliğin 7-9. haftalarına kadar geçen süredeki erken gebeliğin devamı korpus luteumdan progesteron üretimine bağlıdır. Gebeliğin onuncu haftasından önce oluşan gebelik kayıpları progesteronun normal düzeyde üretimi veya kullanımı ile ilişkili bir dizi değişiklikten kaynaklanabilir. Luteal faz yetmezliği ve luteal faz defektleri belli başlı luteal fonksiyonların uygunsuzluğu ile özellikle potansiyel implantasyon bölgelerindeki endometriyum gelişiminin yetersiz veya uygunsuz olması sonucunda kötü obstetrik sonuçlara yol açar. Luteal faz defektlerinin bazılarında luteinizan hormonunun fazla salgılanmasını da içeren çeşitli sebepler vardır. Birçok çalışma artmış LH seviyeleri ile tekrarlayan gebelik kayıpları arasında ilişki saptamıştır. Geçmişte bu ilişki, LH'nin kendisinin yan etkilerine ya da polikistik over sendromlu kadınlarda LH'nin indüklediği hiperandrojenizme dayandırılmıştır (64,65).

c) Beslenme bozuklukları: Çok ileri derecedeki beslenme bozukluklarının abortusa yol açabileceği vurgulanmaktadır. Diyetle herhangi bir besin eksikliğinin ya da tüm besinlerin orta derecedeki eksikliğinin abortusta rolü olduğuna dair kesin bir veri yoktur.

d) Toksik etkenler: Birçok çalışma sigara içimi ve düşük riski arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Bu çalışmalar genel olarak sigara içmenin doza bağımlı bir şekilde spontan abortus riskini attırdığı sonucunu desteklemekte; sigara içmenin yan etkileri 10 sigara/gün kadar içenlerde belirgin hale gelmektedir. Sorumlu mekanizmalar belli değildir fakat sigara dumanındaki nikotin, karbondioksit, siyanür dahil bazı maddelerin vasokonstriktif ve antimetabolik etkileri plasental yetmezliğe yol açabilir (6,66,67). Gebeliğin ilk sekiz haftasında, sık alkol kullanımı hem spontan abortus hem de fetal anomalilere neden olabilir (68). Kline ve arkadaşları, abortus riskini alkol kullanmayanlarla karşılaştırdıkları çalışmada, haftada iki defa alkol alan kadınlarda riskin iki katına, her gün alkol alan kadınlarda ise üç katına çıktığını bildirmişlerdir (69). Maternal kafein tüketimi ile düşük riski arasındaki ilişkiyi inceleyen çoğu çalışma ağır kafein tüketiminin (günde 300mg'dan

fazla- üç fincan kahveye eş değer), spontan abortus riskinde hafif (iki kattan az) bir artış ile ilişkili olduğunu bulmuştur (70,71,72).

Anestetik gazlar, perkloretilen (kuru temizleme solventi) ve başka organik solventler, ağır metallere maruziyet (civa, kurşun) düşüklere yol açmakla ilişkilendirilmiştir (73). Video gösterim terminalleri ve eşlik eden elektromanyetik alanlara maruz kalma abortus riskini attırmamaktadır (74). İstretinoin kesinlikle yükselmiş spontan düşük insidansı ile ilişkilidir (75). 8. ile 15. gestasyonel haftalar arası embriyonun en fazla radyasyon kaynaklı mental retardasyona açık olduğu zamandır. Son kanıtlar ışığında, beş rad'ın altında bir radyasyon dozunda malformasyon, büyüme geriliği veya düşük açısından artmış bir fetal risk yoktur. Brent'e göre 20 rad değerinin altında radyasyona maruz kalan gebe popülasyonunda büyük konjenital malformasyonlarda artış görülmeyecektir. Tek bir teşhis amaçlı x ışını işleminden dolayı fetusun radyasyona maruz kalmış olması terapötik bir abortus için endikasyon değildir. Tek başına hiçbir teşhis amaçlı işlem gelişmekte olan fetus veya embriyonun iyi halini anlamlı düzeyde tehdit edecek kadar radyasyon yayamaz (76,77).

e) Genital organ anomalileri, pozisyon bozuklukları ve tümörleri: Uterus kavitesini çok küçülten konjenital anomaliler (füzyon bozuklukları, bikornuat uterus, uterin septum v.s) myom, fibromyomlar (özellikle submuköz ve intramural olanlar) aşırı retrofleksiyon durumundaki inkansere uterus olguları genelde geç abortus insidansında artışa neden olurlar. Uterin anomaliler uzun zamandır gebelik kayıpları ve obstetrik komplikasyonlar ile ilişkilendirilmektedir. Konjenital uterin malformasyonlu kadınlardaki gebelik kayıplarının patogenezi tam bilinmemektedir. Fakat genel olarak azalmış intrauterin hacimle veya vasküler desteğin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (78). Bikornuat uteruslu kadınlarda yapılan çalışmalarda düşük oranı yaklaşık %30 olarak bulunmuştur. Konjenital uterin anomalilerle ilişkili olarak oluşan servikal yetmezlik insidansı bikornuat uterusu olanlarda en yüksektir ve vaka serilerinde servikal serklajın fetal yaşam beklentisini yükseltebildiği gösterilmiştir (79,80,81). Septat uterus en sık görülen gelişimsel uterin anomalisidir. Hem tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda hem de genel popülasyonda majör malformasyonların %80-90'ını kapsar. Ayrıca kötü gebelik sonuçları ile en fazla ilişkili bulunan malformasyondur. Yapılan çalışmalarda uterus septus ile ilişkili gebelik kaybı oranı yaklaşık %65 olarak bulunmuştur (79,82,83,84).

Büyük ve multiple uterus leiomyomlarının abortusla ilişkili olarak buldukları yer, büyüklüklerinden daha önemli olmaktadır. Gebelik sonuçları submüköz myomlarla kötü yönde etkilenirken subseröz veya 5-7 cm altındaki intramural myomların gebeliği

etkilemediği düşünülmektedir. Uterin myomlar kavitede distorsiyona neden olmadığı ve cerrahi tedavi gerektiren myoma spesifik herhangi bir semptom eşlik etmediği sürece cerrahi endike değildir (85,86,87,88). Asherman sendromu da abortus insidansını artırır. Konjenital uterin anomaliler birinci trimester kayıplarının %10-15'inden sorumludur.

f) Travmalar: Gebeliğin 14. haftasından önceki dönemlerdeki elektrik çarpmaları, amniyosentez girişimleri, ateşli ve delici silah yaralanmaları, trafik kazaları ve ekstra genital orijinli peritonitis tabloları sayılabilir. İlk trimester içinde yapılan laparotomide %30 abortus olduğu bildirilmektedir. Daha ileri haftalarda abortus oranı hızla düşmekte ve 16. hafta civarında % 4 olmaktadır (33).

g) İmmünolojik hastalıklar: İmmun tolerans sistemi yetersiz olan olgularda fetus immunolojik olarak reddedilir. Sorumlu immunolojik mekanizma gebeliğin sonlandığı devreye bağlı olarak olarak değişir. Preimplantasyon döneminde ve implantasyonun sonuna kadar (13. gün) hücresel immün mekanizma erken abortuslardan sorumludur. Kan grubu uyumsuzluklarında özellikle ABO, Rh, Kelly ve subgrup uyumsuzlukları abortusa neden olur. Paternal ve maternal orjinli antijenlerin bazen benzerlikleri, bazen de farklılıkları abortusa neden olabilir. Anne ve babanın MHC (özellikle HLA klas-II ve HLA-B antijenleri) yakınlığı ne kadar fazla ise implantasyon şansı o kadar azalmakta ve tekrarlayan spontan düşüklere sayısı artmaktadır. Bu kadınlar, babanın MHC antijenleri (lenfositleri) ile aşılandıkları takdirde, anti-paternal antikörler oluşmakta ve düşüklere önlenmektedir (19). İmplant olan fetusun annenin bağışıklık sistemi tarafından fark edilmesini önlemeye yönelik birçok mekanizma var ise de hem insan hem de hayvan çalışmaları fetal antijenlere karşı oluşmuş bağışıklık cevaplarının varlığını göstermiştir. Bu cevabın maternal fetal yüzeyde kontrolü kritik öneme sahiptir.

Progesteronun üreme sistemindeki bağışıklığı baskılayıcı etkisini, implante olan semiallojenik fetusun devamlılığının sağlanmasında kısmen sorumlu olduğu öne sürülmektedir (22,89,26,27). Gebeliğe özgü antijenlere karşı humoral cevap oluşur ve tekrarlayan gebelik kayıpları olan hastalarda endometriyum antijenlerine karşı gelişmiş bir humoral cevap oluşabilir. Tekrarlayan gebelik kaybı ve antifosfolipid antikör sendromu ile ilişkili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Antifosfolipid antikörler ile trombotik komplikasyonlar arasındaki ilişkiye antifosfolipid antikör sendromu denir. Antifosfolipid antikör tanısı alması için klinik bulgulardan bir veya daha fazlası ve laboratuvar bulgulardan bir veya daha fazlasına sahip olması gerekir (42,90,91,92).

h) Annenin diğer hastalıkları: Annede, kronik renal ve hipertansif hastalıklar, tüberküloz, kollajen doku hastalıkları, endometriozis, Wilson hastalığı abortus nedeni

olabilir.

3) Paternal faktörler: Bu konuda çok az şey bilinmektedir. Spermdeki transloke kromozomlar abortusa yol açabilmektedir. Steril erkeklerden elde edilen sperm örneklerinin %40'ında adenovirus ya da herpes simplex virüsü bulunmuştur. Virüsler hücrelerin %60'ında latent formda tespit edilmiştir ve aynı virüsler abortuslarda da bulunmuştur. Gametlerin fertilizasyon öncesi kadın genital sisteminde yaşlanması abortus ihtimalini arttırmaktadır. Oligospermi veya hiperspermi, sperm DNA içeriğinin anormal miktarda azalmasına yol açarak abortusa neden olabilir (32,33,90).

TEDAVİ:

Spontan abortus tanısı kesin olarak konduktan sonra üç yaklaşım uygulanabilir:

- . Cerrahi tedavi
- . Medikal tedavi
- . İzleyici yaklaşım

Cerrahi teknikler:

1) Dilatasyon ve Küretaj: Ülkemizde ve dünyada en sık uygulanan tedavi şeklidir. Gebelik canlı değilse, hastanın ateşi, enfeksiyon bulguları, inatçı ve fazla miktarda kanaması varsa veya takip olanakları kısıtlıysa gereklidir. Deneyimli ellerde çok etkili ve güvenli bir yöntemdir. Genel veya lokal anestezi altında, mekanik vakum aspirasyon veya küretaj şeklinde yapılabilir. Uterusun tam boşaltılmaması, perfore edilmesi, işlem sonrası enfeksiyon gelişmesi ve anesteziye bağlı komplikasyonlar görülebilir. Ashermann sendromu riski vakum aspirasyonun ardından keskin küretaj yapılan olgularda en fazladır. Şüpheli olgular dışında rutin antibiyotik profilaksisine gerek yoktur. Küretaj materyali patolojik değerlendirmeden geçirilmeli, gerekli durumlarda genetik değerlendirme yapılmalıdır.

2) Histeretomi, histerektomi: Histeretomi prensip olarak küçük bir sezaryen ameliyatıdır. Günümüzde bir abortus yöntemi olarak kullanılmaz. Histerektomi ise tıbbi endikasyon varsa yapılır. Her iki operasyonun tek avantajı sterilizasyon yapma şansını vermesidir. Bu yöntemler postoperatif morbidite yüksekliği nedeniyle fazla kullanılmaz.

Medikal tedavi: Cerrahi tedaviden kaçınan, spontan rezolusyon için beklemeyen olgular için bir seçimdir. Abortus indüksiyonu sırasında dilatasyon nedeniyle meydana gelebilecek servikal travmaların önüne geçebilmek için serviksin önceden hazırlanması amaçlanmaktadır. Bu amaçla PGE1 (mizoprostol) kullanılması önerilmektedir.

Medikal abortus yaptırmak için kullanılan yöntemler :

- 1) Oksitosin perfüzyonu

2) İnteraamniotik hipertonic maddeler

a) Hipertonic tuz solüsyonu, %20-25 dilüsyonlu olarak hazırlanır ve 150-200cc intraamniyotik verilir. Komplikasyonları; DIC, hipernatremi ve serebral ödemdir.

b) Hipertonic üre, % 30'luk solüsyonu 200cc intraamniotik olarak verilir.

3) Rivanol: İkinci trimesterde tıbbi tahliye ve intrauterin mort fetus (ölü çocuk) vakalarının sonlandırılmasında intraamniyotik ve ekstraamniyotik olarak kullanılmaktadır. İnteraamniyotik rivanol %1'lik olarak kullanılır. Bildirilen nadir komplikasyonlar rivanolün miyometriyum veya over dokusu içine verilmesinden dolayı oluşan akut nekrozlara bağlıdır. Ekstraamniyotik rivanol %0.1'lik olarak uygulanır. Foley kateter intraservikal yerleştirilir ve ağırlıkla tercihen bacağına asılır.

4) Prostaglandinler: Vaginal mizoprostol oral kullanıma göre daha etkilidir ve olguların çoğunda 48 saat içerisinde gebeliğin sonlanmasını sağlayabilmektedir (93). Mifepriston ile bu oran yarı yarıyadır (94). Yedi haftadan küçük gebelerde misoprostol uygulaması ile olguların %90'ından fazlasında tam sonuç alınabilmektedir. Ancak parite arttıkça başarı oranı azalmaktadır (95). Tıbbi tedaviyi tercih eden hastaların bu tedavi sırasında normalden daha fazla vaginal kanama, kasık ağrısı ve bulantı yaşayabileceklerini bilmeleri gereklidir.

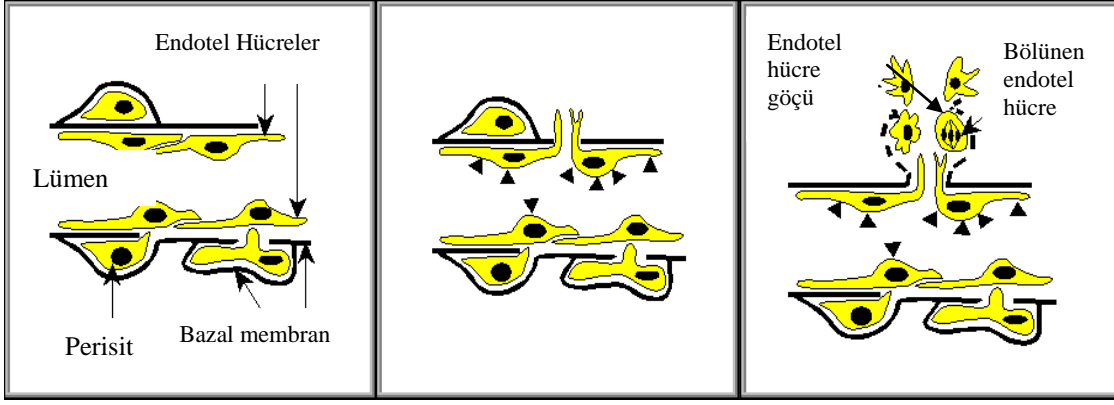
5) RU-486(mifepriston): Antiprogesteron etkili maddedir. Hayvan deneylerinde erken gebelik haftalarında abortus yaptırdığı saptanmıştır.

İzleyici yaklaşım: Hastada cerrahi girişimi zorunlu kılan komplikasyonların hiçbiri yoksa konservatif kalınabilir. Olguların çoğunda 72 saat içinde olay sonuçlanır.

2.2. ANJİYOGENEZ

Mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi demek olan anjiyogenez, vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreç olup, bazı durumlarda patolojik de olabilmektedir. Normal veya neoplastik dokuların büyüüp varlıklarını korumalarında, yeterli damarlanmanın oluşturulup korunması önemli bir yere sahiptir. Vaskülogenez ve anjiyogenez olmak üzere iki farklı damar oluşum mekanizması mevcuttur.

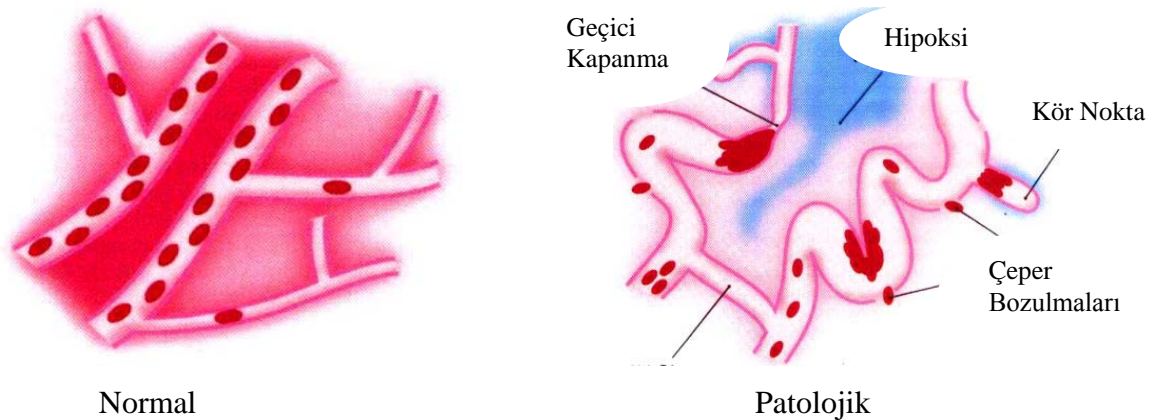
Vaskülogenez ilkel mezenkimal hücrelerin farklılaşarak embriyoda kan damarlarının endotelini oluşturmasıdır. Anjiyogenez mevcut damarların tomurcuklanarak avasküler dokulara doğru uzamasını ifade eder. Vaskülogenez erken embriyogenez safhasında meydana gelirken, anjiyogenez embriyo büyümesinde ve hayatın geri kalanında yeni damarların oluşmasından sorumludur.



Şekil 2.1. Yeni Damar Oluşumu

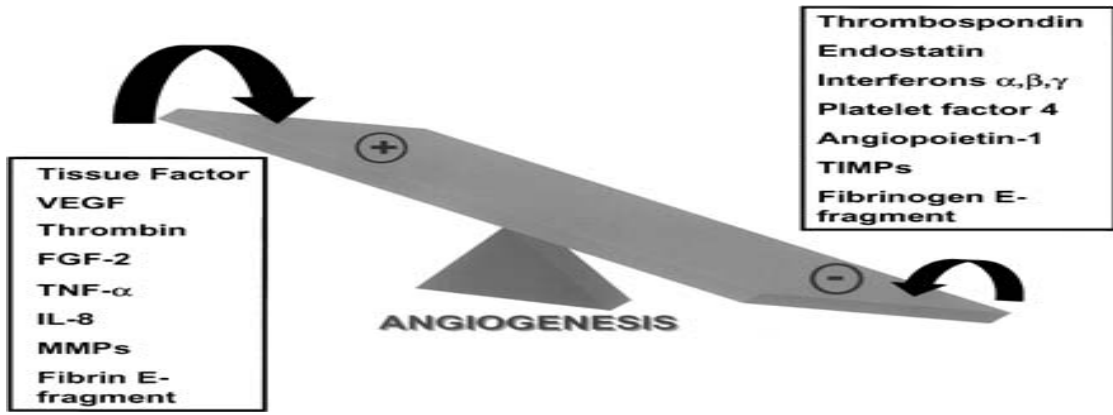
Anjiyogenez terimi ilk olarak 1930'larda plasentadaki yeni damarların oluşumu için kullanılmıştır. Zamanla anlaşılmıştır ki anjiyogenez organların büyümesinde çok önemli bir yere sahiptir. Anjiyogenez ayrıca iskemik kardiyovasküler hastalıklar, retinopatiler, yara iyileşmesi ve enflamasyon gibi pek çok önemli hastalık durumunu da önemli ölçüde etkiler (96,97).

Anjiyogenezin fizyolojik ve patolojik olmak üzere iki çeşidi vardır. Fizyolojik anjiyogenez gelişmekte olan fetusta başlar ve doğum sonrasında, erişkin dokulardaki normal kan damarlarını oluşturacak biçimde devam eder. Fizyolojik anjiyogenez kendi kendini sınırlayan bir olay olmasına rağmen patolojik anjiyogenez uzun süre devam eder (98). Fizyolojik anjiyogenezde kan damarları düzenli, birbirinden yakın boşluklarla ayrılmış ve iyi düzenlenmiş bir dağılım gösterirler. Patolojik anjiyogenezde ise uyarılan yeni kan damarları (örneğin tümörler tarafından) son derece anormaldir, düzensiz dallanırlar ve belirli bir düzene uymazlar. Ayrıca yapısal ve işlevsel açıdan heterojen ve plazma proteinlerine ve plazmaya karşı genellikle yüksek derecede geçirgendirler. Yüzeylerinde pek çok büyüme etmen almaçları taşırlar (96,99) (Şekil 2.2)



Şekil 2.2. Normal ve Patolojik Anjiyogenez

Anjiyogenezin sıkı biçimde denetlendiği döllenmeden sonra plasentanın gelişmesi, yara iyileşmesi, menstruasyondan sonra uterus iç tabakasının yenilenmesi gibi fizyolojik durumlar dışında, anjiyogenez organizmada oldukça sınırlıdır (9). Normal koşullarda anjiyogenez, endotel hücrelerinin çoğalmasını ve etkinleşmesini sağlayan pek çok büyüme etmeni ile, buna karşı gelen anti-anjiyogenik etmenler arasında oluşan bir denge ile düzenlenir (10). Bu etmenler arasındaki denge bozulduğunda anjiyogenez kontrol edilemez.



Şekil 2.3. Anjiyogenezin Etkinleşme ve Engellenmesi

Anjiyogenezin düzenlenme evreleri pek çok büyüme faktörünün ve düzenleyici proteinin kontrolü altındadır. Henüz tüm anjiyogenik etkileşimlerin niteliği açıklığa kavuşmamıştır. En büyük olasılık, anjiyogenik uyarıcılar ve anjiyogenez inhibitörleri arasındaki dengenin, normalde damarsal bileşenlerin sessiz halde kalmalarını sağlıyor olmasıdır. Anjiyogenik uyarıların artışı ve anjiyogenez inhibitörlerinin azalışı anjiyogenezi başlatmaktadır. Anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler Tablo 2.1’de gösterilmektedir. (10)

Tablo 2.1. Anjiyogenezi etkilediği bilinen faktörler

Anjiyogenezi artıran faktörler	Anjiyogenezi azaltan faktörler
VEGF (Vasküler endotelial büyüme faktör)	Trombospondin- 1
PGF (Plasental büyüme faktör)	Anjiyostatin
FGF (Fibroblast büyüme faktör)	Endostatin
FGF-3 (Fibroblast büyüme faktör 3)	Vazostatin
FGF-4 (Fibroblast büyüme faktör-4)	VEGF inhibitörü
TGF-α (Transforme edici büyüme faktör-α)	Trombosit faktör-4 fragmanı

TGF- β (Transforme edici büyüme faktör- β)	Prolaktin derivesi
EGF (Epidermal büyüme faktör)	Restin
HGF (Hepatosit büyüme faktör)	Proliferinle ilgili protein
TNF- α (Tümör nekroz faktör- α)	İnterferon- α - β
PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme faktör)	Anjiyopoetin-2
GCSF (Granülosit koloni uyaran faktör)	Antitrombin-3 fragmanı
IL- 8 (interlökin8)	İnterferon ile indüklenen protein-10
Anjiyogenin	

Çeşitli laboratuarlarda yapılan çalışmalar ile normal ve anormal anjiyogenezin düzenlenmesinde vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) merkezi rolü aydınlatılmıştır (16). Özellikle tek bir VEGF allelinin dahi kaybının embriyonik ölüm ile sonuçlanması bu faktörün vasküler sistemin gelişimi ve farklılaşmasındaki rolünü ortaya koymaktadır (17,18).

2.2.1. ANJİYOGENEZİN TEMEL HÜCRESEL MEKANİZMALARI

Klasik olarak anjiyogenez endotel hücrelerinin, çevrelerindeki damar dışı bölgelere göçüyle başlar, göçen hücreler çoğalmaya başlarlar, kapiller güdükler oluştururlar ve bu güdükler komşu damarlarla birleşerek kan akımını sağlarlar (100). Endotel hücrelerinin göçü mevcut kapillerlerin bazal membranlarındaki değişiklikler ve damar dışında fibrin birikimiyle birlikte olmaktadır. Matriks proteolizi ve kemotaksis sayesinde endotelial hücreler göç edip çoğalırlar ve yeni kapillerler oluştururlar. Büyüme ilerledikçe genişleyen kapillerler, perisitler ve kasılabilir düz kas hücreleriyle sarılırlar ki buna ağaç büyümesine benzerliği nedeniyle kabuklanma denir. Bu yeni damarlar arteriyollerin histolojik özelliklerine sahiptirler.

Erişkin insanlardaki vasküler endotelial hücreler tipik olarak düşük turnover hızında olmalarına rağmen, yaşamları boyunca yeni kan damarları oluşturacak çoğalma kapasitesine sahiptirler. Yetmiş kilogramlık bir insanda bir trilyondan fazla endotelial hücre kan damarlarının içini döşer ve bu da yaklaşık 1000 metrekarelik bir alana eşittir. Endotelial hücrelerin yaşam siklusu (yenilenme süresi) 1000 günü geçmektedir. Anjiyogenezin sıkı denetlendiği kadın üreme sistemi ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik durumlar dışında anjiyogenez organizmada oldukça sınırlı oluşmaktadır (9).

2.2.2. BAZI ANJİYOGENİK ETMENLERİN ÖZELLİKLERİ

2.2.2.1. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

Anjiyogenik moleküller içinde en önemlisi ve üzerinde en çok durulanı vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'dür ve vascular permeability factor (VPF) olarak da bilinmektedir. Önceleri iki ayrı yapı zannedilirken aynı protein oldukları gösterilmiştir ve daha çok VEGF olarak adlandırılmaktadır. VEGF anjiyogenezin kontrolündeki baskın büyüme faktörüdür. Başlangıçta damar geçirgenliğini arttıran bir etmen olarak tanımlanan VEGF, endotel hücrelerinin çok sayıdaki biyolojik işlevini, sitokin sentezi ve salınımını, trombolitik ve pıhtılaşma yollarında yer alan moleküllerin ifade edilmesini ve düz kas hücre hiperplazisini düzenler.

VEGF postnatal damarlanma, yara iyileşmesi, kanser, romatoid artrit, retinada yeni damarlanma ve kalp-damar hastalıkları dahil olmak üzere çok sayıdaki patofizyolojik durumda önemlidir (12,101). VEGF arterlerden, venlerden ve lenflerden gelen mikro ve makrovasküler endotel hücreleri için kuvvetli bir mitojendir (102).

VEGF'in çeşitli alt grupları tanımlanmıştır. VEGF A, B, C, D, E ya da aminoasit sayılarına göre VEGF121, VEGF165, VEGF189, VEGF206 ve VEGF145 gibi izoformları bulunmaktadır (103). VEGF biyolojik aktivitesini temel olarak üç reseptörü ile gerçekleştirmektedir. Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörleri VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (flk-1/KDR) ve VEGFR-3 (flt-4) olarak sıralanabilir. Bunlardan VEGFR-1(flt-1) ve R-2(fl-1) endotel hücreleri üzerinde iken VEGFR-3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır (13,14,15). VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz ve ras GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon, ve diferansiyasyonunu sağlamaktadır (104).

VEGF'in NO sentaz enzimi üzerindeki uyarıcı etkisi sonucu oluşan NO, endotel hücre migrasyonunda rol almaktadır (105,106). Ayrıca, VEGF muhtemel temel anjiyogenik faktör olma özelliği yanında; VEGF'e maruz kalan damarlarda, endotel hücreleri arasında fenestrasyon, veziküler organeller ve transselüler gap oluşumuna olanak sağlayarak vasküler permeabiliteyi artırmaktadır (107).

Düşük glikoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan hypoxia-inducible transcription factor-1 (HIF-1) de VEGF salınımında etkili rol oynamaktadır (108). Embriyonik damarsal sistemin gelişmesi esnasında meydana gelen olaylar ve embriyonun oksijen ve besin ihtiyacı, aynen erişkin bir organizmada anjiyogenez oluşumunda, özellikle hipoksinin aktive ettiği metabolik cevaplarla benzerlik

göstermektedir (19,20). Çeşitli laboratuvarlarda yapılan çalışmalar ile normal ve anormal anjiyogenezin düzenlenmesinde vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) merkezi rolü aydınlatılmıştır (16).

2.2.2.2. VEGF RESEPTÖRLERİ

VEGFR-1 (flt-1): Yedi hücre dışı immünglobulin homoloji bölgesi, tek bir transmembran geçiş bölgesi ve bir hücre içi tirozin kinaz bölgesinden oluşur. Gelişim esnasında, VEGFR-1 önce endotelyumda ve anjiyoblastlarda ifade edilir (97). VEGFR-1 plasental trofoblastlarda, endotel hücrelerinde, osteoblastlarda, monosit/makrofajlarda, renal mezenşial hücrelerde ve ayrıca bazı hematopoetik hücrelerde ifade edilir. VEGFR-1 ifadesi HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) bağımlı mekanizma ile hipoksi tarafından düzenlenir (109). Hayvan deneyleri VEGFR-1'in anjiyogeneziste kritik rolünü göstermiştir (99). Diğer çalışmalar VEGFR-1' in monosit göçünde, endotel hücrelerinde progenitörlerin olgunlaşmasında ve natural killer hücrelerinin adheziv özelliklerinin artışında aktif fonksiyonel role sahip olduğunu göstermektedir (110,111).

VEGFR-2 (flt-1): Yedi immünglobulin benzeri bölge, bir transmembran bölgesi ve yaklaşık 70 amino asitlik bir tirozin kinaz bölgesinden oluşur. VEGFR-2, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D ve VEGF-E'yi bağlar. Endotel hücreleri dışında ayrıca nöron hücrelerinde, osteoblastlarda, megakaryositlerde ve hematopoetik kök hücrelerde ifade edilir. VEGFR-2 aktivasyonu, endotel hücre büyümesini uyarır (112,113). VEGFR-2 antianjiyogenik aracılık için bir merkezi moleküler hedefi simgelemektedir. Çünkü endotel hücre büyümesinde ve göçünde çok önemli bir yere sahiptir.

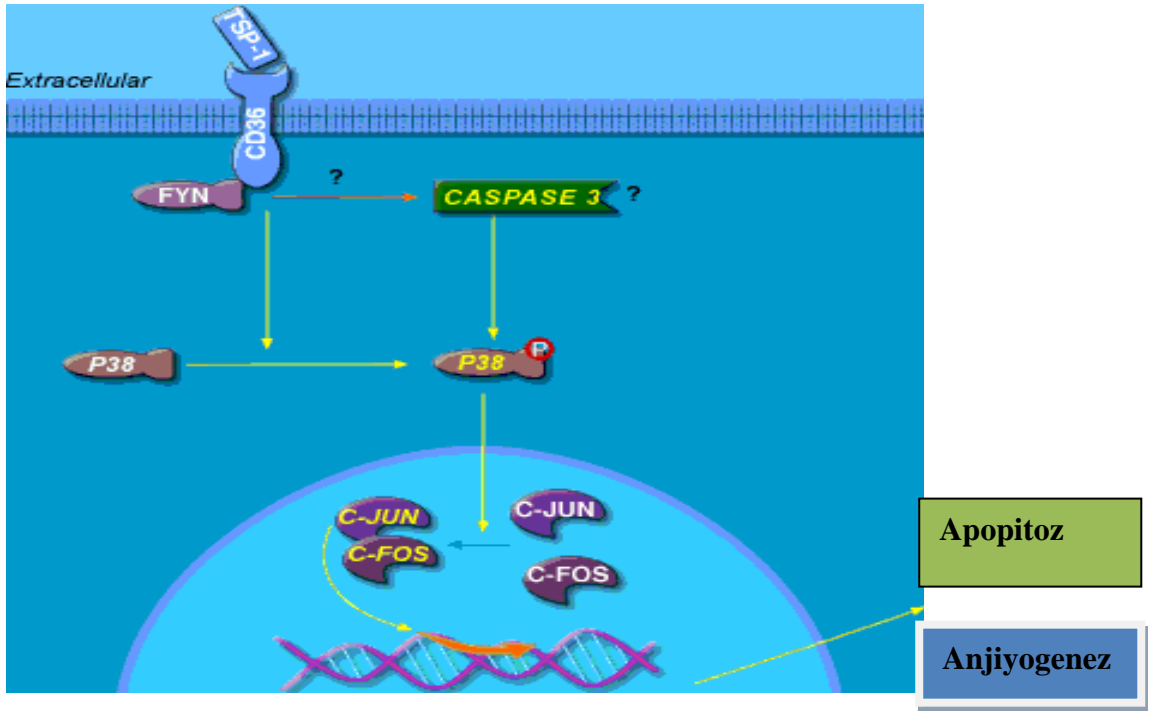
VEGFR-2 mitojenik ve anjiyogenik etki ile permeabilite artışından sorumlu temel reseptördür. VEGF'in VEGFR-2'ye bağlanması reseptör dimerizasyonunu uyarmakta ve ligand-bağımlı tirozin kinaz fosforilasyonu başlatılmaktadır. Bunun sonucunda endotel hücre proliferasyonu, migrasyonu ve sağkalımı aktive olmaktadır (114,115).

VEGFR-3 (flt-4): Endotel hücre reseptör tirozin kinazların bir üyesidir. Sadece altı immünglobulin homoloji bölgesine sahiptir. VEGFR-3 tercihi olarak VEGF-C ve VEGF-D'ye bağlanır. İnsanlarda VEGFR-3 ifadesi kronik inflamatuvar yaralardaki kan damarı endotelyumunda artırılır ve yara iyileşmesinde geçici lenfanjiyogenezis ile uyumludur.

2.2.2.3. TROMBOSPONDİN-1(TSP-1)

Trombospondinler, ekstrasellüler matrikste doğal olarak bulunan bir proteindir. 450 kDa ağırlığında matris bağımlı bir glikoprotein olan TSP-1, yapısal özellikleri aynı olan

çok işlevli, beş üyeden oluşan bir ailenin üyesidir (116,117). İlk olarak trombositlerde keşfedilmiş olup sonradan endotelial hücreler, fibroblastlar, düz kas hücreleri, keratinositler, makrofajlar ve nötrofiller gibi çeşitli hücre tiplerinde de gösterilmiştir (118). TSP-1, anjiyogenik uyarıların değişik türlerine cevap olarak endotel hücrelerde hücre göçünü durdurma, apoptozu uyarma ve yeni damar oluşumunu önleme yeteneğine sahip potansiyel bir anjiyogenez baskılayıcısıdır. TSP-1 kanser hücrelerinde, endotel hücre çoğalmasını, hücre hareketini ve metastazı baskılayıcı role sahiptir (25,26). Artan TSP-1 gen ifadesi damarlanmanın da azalmasına neden olur. p53, anjiyogenezin temel engelleyicisi olan ve hücre dışı matriksin normal bileşiminde yer alan TSP-1'i uyarır (119).



Şekil 2.4. TSP-1 İle Anjiyogenezin Baskılanması (21)

TSP-1'in, ekstrasellüler depolardan VEGF salınımının düzenlenmesinde etkili olması da önemli bir noktadır. TSP-1'in yokluğunda VEGF'in ve reseptörlerinin arttığı gösterilmiştir (27). Doku oksijen seviyesindeki azalma sonucunda hücrenin hipoksiye uyumunda gerekli genlerin uyarıldığı, TSP-1'in ise engellendiği ve bunun sonucunda da yeni damar oluşumları meydana geldiği gözlenmiştir (28).

2.3. HIPOKSİ İLE UYARILAN FAKTÖR 1 (HIF-1)

Ortamda yeterli oksijen bulunmadığı durum olarak tanımlanan hipoksi, pek çok hastalığın patogeneğinde önemli rol oynar (21). Hipoksik uyum için gerekli olan pek çok proteinin düzenlenmesi, transkripsiyon faktörü HIF-1 α 'nın düzenlediği genlerde,

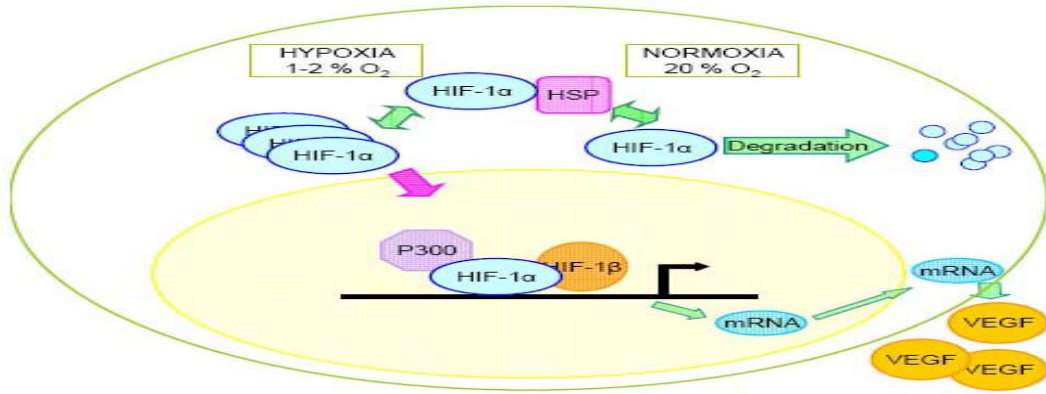
transkripsiyonel induksiyonu içeren gen seviyesindeki düzenlenmeler ile olur (120,121,122).



Şekil 2.5. HIF-1 geninin metabolizmadaki etkileri (123)

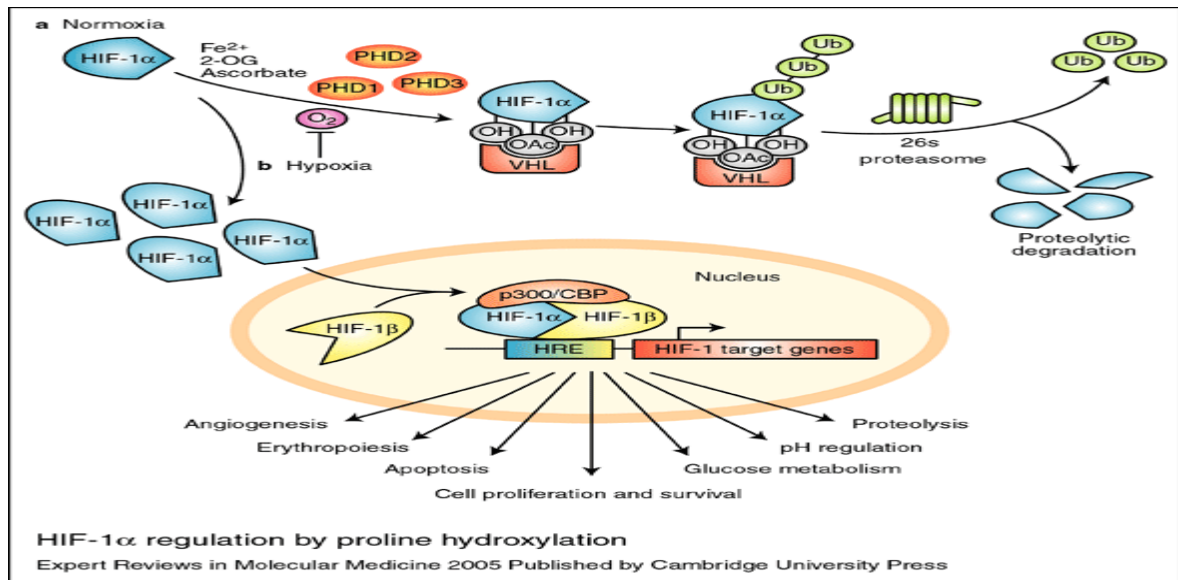
Hipoksi, HIF-1 α yazılım etmeni tarafından denetlenir (124). Düşük oksijen basıncı (hipoksi), HIF-1 α düzeylerini ve ayrıca HIF-1 α 'nın DNA'ya bağlanma kapasitesini artırır. Hipoksik koşullarda HIF-1 α , hipoksiye hücreyel cevap için gerekli olan hedef genlerin yazılımını etkinleştirir (125). HIF-1 anjiyogeneziste kritik bir rol oynar ve iki heterodimer subüniti vardır. HIF-1 alfa (HIF-1 α) ve HIF-1 beta (HIF-1 β). HIF-1 α oksijenle düzenlenen subünittir ve HIF-1 aktivitesini belirler. Hipoksik durumlarda HIF-1'in transkripsiyon aktivitesi hızla artarak HIF-1 α aşırı ekspresyonuna neden olur. VEGF ekspresyonunun da hipoksi esnasında HIF-1 α ile kontrol edildiği kabul edilmektedir (23).

HIF-1 α alt birimleri oksijen düzeyi normal olan hücrelerde bulunmaz ancak hipoksik koşullarda HIF'in alt birimleri birleşerek hipoksiye karşı hücreyel cevap için gerekli olan hedef genlerin yazılımını uyarır. HIF-1 α birçok anjiyogenik etmeni etkinleştirerek damar oluşumuna yol açar ve oksijen düzeyini yükseltir (126). Oksijen stresi çeşitli genlerin ifadesinin düzenlenmesinde anahtar bir role sahiptir. VEGF mRNA ifadesi çeşitli patofizyolojik koşullar altında düşük oksijene maruz kalma sonucu uyarılır. Hipoksi ile uyarılan faktör 1 α (HIF-1 α), hipoksi yanıtının anahtar aracıdır (127).



Şekil 2.6. HIF-1α'in VEGF Üzerine Etkisi

Birinci trimester boyunca plasenta, uterin spiral arteriyollerin ekstravillöz trofoblast oklüzyonu ile hipoksik bir çevrede gelişir. Erken gebelik dönemindeki bu fizyolojik hipoksik çevre fetusu oksijen radikallerinin zararlı ve teratojenik etkilerine karşı korur. Bütün hücreler hipoksiye bir dizi gen modifikasyonu ile cevap verir. HIF, bu süreçte önemli bir mediyatör olup plasental vaskülarizasyonun kolaylaştırılmasının yanısıra, trofoblastik differansiyasyonun sinyalizasyonunu da sağlar (128). Böylece plasenta gelişiminin başladığı erken gebelik dönemindeki düşük oksijen basınçlı çevre, HIF düzeylerini arttırarak başarılı bir gebeliğin devamı için mutlak olan anjiyogenezin uyarılmasını sağlar.



Şekil 2.7. HIF'in Düzenlenmesi ve Etkinliğinin Şematik Gösterimi: A: HIF'in normal oksijen içeren ortamda yıkımı. B: Hipoksik ortamda HIF-1 ve HIF-1 alt birimlerinin birleşerek kalımlılık kazanması ve hücrede etkiledikleri mekanizmalar.

Hipoksik koşullarda artan HIF-1 α etkinliği nedeniyle VEGF, PDGF, bFGF, eritropoetin ve TGF- α gibi büyüme etmenleri salgılanır (129). Salgılanan VEGF ve PDGF kendilerine ait özel almaçlara bağlanır ve bu da hücre içinde tirozin kinaz (TK) almaçlarının uyarılması ile sonuçlanır. TK almaçlarının uyarılması endotel hücre çoğalması, hücre sağ kalımının artması ve anjiyogeneze artış ile sonuçlanır (130).

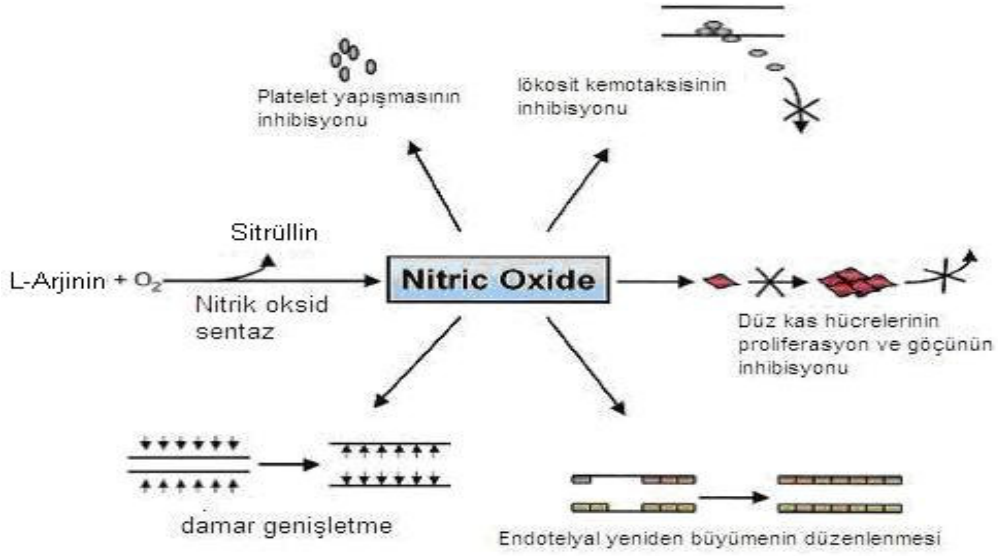
2.4. NİTRİK OKSİT/NİTRİK OKSİT SENTAZ (NO/NOS)

NO, çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik işlemlerde yer alan, organizmanın hemen her yerinde bulunan, yüksek afiniteye sahip, en düşük moleköl ağırlıklı, reaktif, memeli hücresi sekresyon ürünüdür. Serbest radikal yapısında olmasından dolayı yarı ömrü çok kısadır (2–30 sn). Reseptörlerden bağımsız olarak membranlardan kolayca diffüze olabilir. Tüm bu özellikleri ile NO ideal bir haberci moleküldür (131,132).

Hücreler arasında sinyal iletiminde yer alan hormon, nörotransmitter ve büyüme faktörleri gibi moleküllerin çoğu sıklıkla plazma membranı ile bağlantılı olan spesifik protein reseptörleri olarak görev yaparken, NO üretildiği hücreden dışarı diffüze olmakta ve spesifik moleküler hedeflerinin bulunduğu hedef hücrenin içine girerek etkisini göstermektedir (133).

NO'nun çok sayıda ve kompleks biyolojik aktiviteleri olduğu bilinmektedir. Döllenmeden hemen sonra erkek gametositlerinde bulunan NOS aktivitesi yumurtaların aktivasyonu için gereklidir. Bundan sonraki gelişim işlemlerinde de pek çok fizyolojik reaksiyonun gerçekleşmesinde rol almaktadır (133).

Nitrik oksit, başta düz kas gevşemesi olmak üzere pek çok fizyolojik ve patofizyolojik olayda rol alır (131,134). Nitrik oksit, dolaşım sisteminde vazodilatatör, lokal kan akımı ve sistemik kan basıncını düzenleyici ve endoteli koruyucu etki yapmaktadır (131). Vasküler endotelde bazal NO salınımı vardır. Kan akışının damar endoteli üzerindeki mekanik etkileşimi de endotelden NO salınımına yol açar. Alt üriner ve genital sistemde düz kas tonusunun ve kan akımının düzenlenmesinde, sekretuar fonksiyonlarda rol oynar (135).



Sekil 2.8. NO'un damarlar üzerine olan etkileri (133)

2.4.1. NİTRİK OKSİT SENTEZİ

Nitrik oksitin karakterize edilmiş en önemli hedef molekülleri; demir, kükürt ve oksijen türevi yapılardır (136,137,138). Nitrik oksit, sitokrom P-450 redüktazın homoloğu olan nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile L-argininden sentezlenir. NO sentezlenirken NOS dışında moleküler oksijen ve dört tane kofaktöre ihtiyaç duyar. Bu kofaktörler; hem, flavin adenin dinukleotid (FAD), flavin mono nukleotid (FMN) ile tetrahidrobiopterin'dir (BH4). NOS uyarıldığında, iki oksijen molekülünün aktivasyonu ile bir çift oksijen atomu, L-arginine girerek NO ve sitrullin üretilmektedir (131,136,139). NOS ekspresyonu ve aktivitesi transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel mekanizmalarla düzenlenir (133).

2.4.2. NİTRİK OKSİT SENTAZ İZOFORMLARI

NOS enziminin izoformlarının, farklı hücre tiplerinde bulunduğu, farklı yerlerde lokalize olduğu; regülasyonları, katalitik özellikleri ve inhibitör duyarlılıklarının değişik olduğu bildirilmiştir (133).

Nitrik oksit sentaz geni, fizyokimyasal ve kinetik özelliklerine göre iki gruba ayrılmaktadır;

I-Yapısal (Konstitütif) NOS : cNOS

II-Uyarılabilir (inducible) NOS : iNOS (NOS2)

Tablo 2.2. NOS enzimlerinin genel özellikleri (133).

Enzim	Alternatif isimler	Hücre tipi
eNOS	1. konstitif NOS, endotelial tip 2. ecNOS, 3. NOS3	1. endotelial hücreler
nNOS	1. konstitif NOS, nöronal tip 2. ncNOS 3. NOS1 4. beyin NOS	1. nöronlar 2. iskelet kas hücreleri 3. kardiyak kas hücreleri
iNOS	1. indüklenebilir NOS 2. NOS2 3. makrofaj NOS	1. makrofaj 2. nötrofil 3. hepatosit

I- Yapısal (Konstitif) NOS : cNOS: Bu izoformun ayırıcı özelliği aktivitesinin kalsiyuma (ikincil haberci olarak) bağımlı olmasıdır. Hücre içi iyonize kalsiyumu artıran her türlü etkileşim, cNOS'un aktive olmasını sağlar ve NO sentezlenir. Ancak uyarı sonlanınca, hücre içi kalsiyum da azalır, enzim aktivitesi ve NO sentezi de buna paralel olarak azalır. Bu nedenle bu izoform, normal biyolojik sistemlerde düşük miktardaki NO sentezinden sorumludur. Yapısal NOS'un nNOS (nöronal NOS/NOS1) ve eNOS (endotelial NOS/NOS3) olarak adlandırılan iki izoformu mevcuttur. Bu enzimlerin hücre içi yerleşimleri farklıdır. Hücrede eNOS esas olarak hücre membranına bağlı bulunurken nNOS sitozolde bulunmaktadır (136,137,140).

2) Uyarılabilir (inducible) NOS : iNOS (NOS2): Sitozolde bulunmaktadır. iNOS kalmodulinle sıkı bağlandığından aktive olması için kalsiyuma bağımlı değildir. iNOS, enfeksiyon, enflamasyon veya vasküler travma gibi sebeplerle indüklendiği zaman NO üretimi, yapısal formdaki gibi kısa sürmez, saatlerce hatta günlerce devam edebilir. Diğer formların ürettiğinden 100–1000 kat fazla NO üretilir. iNOS hücre yapısında mevcut değildir.

Sistemik kan basıncının düzenlenmesinde rol alan nitrik oksid (NO), VEGF ile indüklenecek angiogenez ve hiperpermeabilitede de kritik, hayati bir role sahiptir. VEGF, endotelial nitrik oksid sentaz (eNOS) enziminin up regulasyonunu ve buna bağlı olarak NO salgısını indükler. Endojen olarak üretilen NO da sonuçta VEGF sentezini artırır.

eNOS'un farmakolojik blokajı ya da genetik olarak bozukluğa uğraması VEGF ile indüklenmiş angiogenezi ve hiperpermeabiliteyi inhibe eder (141). eNOS blokajı ya da

eksikliđi, oksijenle indüklenen retinal vasoklüzyonu ve vitröz neovaskularizasyonu azaltmaktadır (142).

eNOS'un aksine, indüklenabilir NOS (iNOS), VEGF reseptörünü down-regüle ederek angiogenezi inhibe edebilmektedir. İskemik retinopati ile ilgili bir fare modelinde iNOS, VEGF ile sürdürülen neovaskularizasyonu inhibe etmektedir (142).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma yerel etik kurul tarafından onaylandıktan sonra, çalışmamız kapsamına alınmış hastaların tamamı Celal Bayar Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum bölümüne başvuran ve kriterlere uygun olan hastalar arasından seçilmiştir. Çalışmada kullanılan histokimyasal ve immünohistokimyasal boyama için gerekli kimyasal malzemeler ve sarf malzemeleri Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü Fonu tarafından 2010-101 nolu proje ile desteklenmiştir.

Hastaları çalışma grubuna dahil etmeden önce; hastanın yaşı, gebelik sayısı, paritesi, daha önceki gebeliklerindeki abortus sayısı, sistemik hastalık varlığı (diabet, hipertansiyon, kalp hastalığı vb), madde kullanma alışkanlığı (sigara, alkol, ilaç vs), kan grubu uyumsuzluğu, son adet tarihinin ilk günü öyküleri sorgulandı. Sistemik hastalık öyküsü olan, özgeçmişinde abortus için bilinen etyolojik faktör öyküsü bulunan, uterin anomali saptanan, klinik olarak enfeksiyon bulgusu olan ve Rh uygunsuzluğu bulunan olgular çalışmaya alınmamıştır.

Çalışmamızda, Celal Bayar Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum bölümüne istemli gebelik terminasyonu (kontrol grubu) ile başvuran, 5-10 gestasyonel hafta arasındaki 15 hasta ve polikliniğimizde missed abortus olduğu tespit edilmiş 6 ile 11 gestasyonel haftaları arasındaki 19 hastadan, gebelik desiduası ve plasental doku örnekleri toplandı. Materyaller iki gruba ayrılarak incelendi. Bu iki hasta grubu arasındaki farkı vurgulamak için istemli gebelik terminasyonu yapılmış hastaları “istemli evokasyon grubu” (kontrol grubu), missed abortus olgularını ise “ missed abortus grubu” olarak adlandırdık.

İstemli evokasyon (kontrol grubu) grubunda olguların ortalama yaşı 27.53 (21-37), missed abortus grubunda 28.74 (18- 41)’dü. Klinik olarak missed abortus saptanan olgular çalışma grubuna alındılar. İstemli evokasyon grubu olarak ise ultrasonla gebeliği tespit edilmiş 10 gestasyonel haftadan küçük gebelikler çalışmaya alındı. Gebelik haftası düzenli adet görenlerde son adet tarihine göre ve transvajinal ultrason ile CRL veya GS (gestasyonel kese) ölçümleri yapılarak tespit edildi. Son adet tarihinden emin olmayanlar ve son adet tarihi ile ultrason ölçümüne göre hesaplanan gestasyonel büyüklük arasında 1 haftadan fazla fark olanlarda CRL ölçümü esas alınarak gestasyonel hafta hesaplandı. İstemli evokasyon (kontrol grubu) grubunun tamamında fetal kalp atışları izlendi ve

anormal bir ultrason bulgusuna rastlanmadı. Missed abortus grubunun tamamında fetal kalp atışları izlenmedi. Missed abortus grubunda fetal ölüm tespit edildikten sonra en geç 24 saat içerisinde dilatasyon küretaj yapıldı. Her iki çalışma grubunda desidua ve plasenta doku örnekleri maske anestezi altında yapılan dilatasyon küretaj (D&C) ile toplandı. Nekroz ve enfeksiyon bulgusu gösteren örnekler çalışmaya dahil edilmedi. Profilaktik antibiyotik, işlemden önce tüm olgulara uygulandı.

Işık Mikroskopik İnceleme: İstemli evakuasyon ve missed abortus desidua ve plasenta doku örnekleri ışık mikroskopik yöntemle incelemek üzere takip işlemine alındı ve aşağıdaki aşamalardan geçirildi.

Parafin Doku Takibi:

1. Fiksasyon: % 10 formalin	24-48 saat
2. Akarsuda yıkama	12-16 saat
3. %60 etil alkol	30 dk
4. %70 etil alkol	30 dk
5. %80 etil alkol	30 dk
6. %95 etil alkol	30 dk
7. %100 etil alkol I'de	1 saat
8. %100 etil alkol II'de	1 saat
9. Ksilen-alkolde	30 dk
10. Ksilen I' de	45 dk
11. Ksilen II'de	45 dk
12. Ksilen-parafinde	30 dk
13. 60°C'lik etüvde erimiş parafinde	1 saat
14. Parafin I'de	1 saat
15. Parafin II'de	1 saat bekletildiler.

Etüvden çıkarılan parçalar parafine gömülerek bloklandı. Işık mikroskopunda incelenmek üzere hazırlanan parafin bloklardan 5 mikronluk seri kesitler alındı. Preparatların ilk bölümü histokimyasal yöntemlerle Hematoksilen-Eosin (Surgipath) ile boyandı. Seri kesitlerin diğerlerine ise immünohistokimya boyaması yapıldı.

Histokimyasal boyama için ayrılan preparatlar 60°C'lik etüvde 1 gece deparafinize edildi.

Hematoksilen-Eozin Boyaması:

1. Ksilen I 30dk
2. Ksilen II 30dk
3. % 95 alkol 2dk
4. %80 alkol 2dk
5. %70 alkol 2dk
6. %60 alkol 2dk
7. Akarsu 5dk
8. Hematoksilen 3dk
9. Akarsu 5dk
10. Asit-alkol 1sn
11. Akarsu 2dk
12. Eozin 4dk
13. %80 alkol 2dk
14. %95 alkol 2dk
15. Ksilen 30-60dk
16. Entellan ile kapama

İndirekt İmmunhistokimya Yöntemi:

Kullanılan Malzemeler:

Ksilen

Alkol

PBS (Fosfat Tampon Solusyonu)

Sitrat Tamponu (50 ml Sitrat + 450 ml Distile su)

Pap-pen (Beckman Coulter Kat No: IM3580 Fransa)

%3 Hidrojen Peroksidaz (DBS Kat No: K033 Pleasanton-CA)

Bloking solüsyonu (Zymed Kat No:85-9043 USA)

Primer Antikor VEGF (ABBIOTEC, 251901)

Primer Antikor FLK (ABBIOTEC, 251808)

Primer Antikor FLT (ABBIOTEC, 251532)

Primer Antikor Enos (ABBIOTEC, 250785)

Primer Antikor İnos (ABBIOTEC, 250784)

Primer Antikor Trombospondin (abcam, 93653)

Primer Antikor HIF-1 (abcam, 463)

Sekonder Antikor Kit (Zymed Histostain- Plus Broad Spectrum Kat No:85-9943 South San Francisco)

DAB (Kat. No: 1718096 Roche Indianapolis USA)

Mayers Hematoksilen (JTBaker Kat No:2810 Holland)

Entellan (Surgipath Kat No: 16125 USA)

Boyama Yöntemi:

İmmünohistokimyasal yöntemle boyanacak preparatlar 60°C'lik etüvde 1 gece bekletilip deparafinizasyon yapıldıktan sonra boyama başlatıldı.

1. Ksilen 30dk
2. Ksilen 30dk
3. % 95 alkol 2dk
4. %80 alkol 2dk
5. %70 alkol 2dk
6. %60 alkol 2dk
7. Kesitler sitrat tampon içinde mikrodalga fırında 600V 6 dakika kaynatıldı.
8. Distile su 5dk
9. Distile sudan alınan kesitlerin doku etrafındaki su silinip, dakopenle çevresine daire çizildi.Bu işlem dokuların kurummasını engellemek ve uygulanacak maddelerin lam üzerinde dağılmasını engellemek amacıyla yapıldı. Üzerine PBS damlatıldı.
10. PBS ile yıkama gerçekleştirildi (3→5 dk).
11. %3'lük Hidrojen Peroksidaz'da 5 dakika tutuldu.
12. PBS ile yıkama gerçekleştirildi (3→5 dk).
13. Bloking solüsyonu damlatıldı, 1 saat bekletildi.
14. Dokulara primer antikor damlatıldı, 1 saat bekletildi. (Bizim çalışmamızda primer olarak VEGF, FLK, FLT, Trombospondin, HİF-1 α , e-NOS ve i-NOS kullanıldı)
15. PBS ile yıkama gerçekleştirildi (3→5 dk).
16. Biotinlenmiş sekonder antikor uygulandı, 30 dk bekletildi.
17. PBS ile yıkama gerçekleştirildi (3→5 dk).
18. Enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biotin kompleksi (streptavidin) 30 dk uygulandı.
19. PBS ile yıkama gerçekleştirildi (3→5 dk).
20. DAB boyaması yapıldı .3 dk.
21. Distile su ile yıkandı.
22. Mayers hematoksilen ile zıt boyama. 1-2 dk.

23. Distile su ile yıkandı.
24. %80 etil alkol 2 dk.
25. %90 etil alkol 2 dk.
26. Ksilen 30 dk.
27. Entellan ile kapatıldı.

İndirekt immunohistokimya işleminden sonra örnekler kör uygulama ile örnekleri bilmeyen iki histolog tarafından farklı zamanlarda değerlendirildi. İmmünohistokimyasal yöntemle boyanan preparatlar, boyanma derecelerine göre kuvvetli (+++), orta (++) , zayıf (+) ve belirsiz-varyok (\pm) diye tanımlandı. Preparatlar ışık mikroskobu ile iki histolog tarafından değerlendirildi.

İstatistiksel Yöntemler: Araştırmada elde edilen veriler, SPSS (Statistical Package For Social Sciences) 15.0 programında oluşturulan veri tabanına girildi ve verinin istatistiksel analizleri yine aynı program ile yapıldı. Sürekli değişkenlerin alt gruplarına ait; ortalama, standart sapma, medyan, min ve max değerleri sunuldu ve bu değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu araştırıldı. Gerek grafiksel araştırma gerekse normallik testleri ve örnek çapı göz önünde bulundurularak değişkenlerin tümünde normal dağılıma uygunluk koşulları sağlanmadığına karar verildi. Dolayısıyla sürekli değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında non-parametrik bir yöntem olan Mann-Whitney testinden yararlanıldı. Tüm testler %95 güven düzeyinde çift taraflı olarak yapıldı, alfa hata payı 0,05 olarak belirlenip, p değeri 0,05 değerinden küçük olduğu durumlarda gruplar arası fark anlamlı olarak kabul edildi. Alt gruplara ait değişkenlerin medyan, min, max değerleri ve çeyreklikler halindeki dağılımını gösteren box-pilot yöntemi ile grafikler sunulmuştur.

4.BULGULAR

Çalışmamızda, Celal Bayar Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum bölümüne, istemli gebelik terminasyonu ile başvuran 10. gestasyonel haftadan küçük 15 hasta ve missed abortus saptanan 6 ile 11. gestasyonel haftalar arasındaki 19 hasta yer almaktadır. Çalışmaya, sistemik hastalığı olmayan, özgeçmişinde abortus için bilinen etyolojik faktörü bulunmayan, uterin anomali ve Rh uygunsuzluğu olmayan toplam 34 olgu dahil edilmiştir. Tüm hastalardan bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır. Missed abortus grubundaki 19 olgunun ortalama yaşı 28.7 (18- 41) iken istemli evokuasyon grubundaki 15 olgunun ortalama yaşı 27.5 (21-37)' dir.

Çalışmaya kabul edilen 34 olgudan 17 kadın nullipardır. Missed abortus grubunda 11 olgu, istemli evokuasyon grubunda 6 olgu nullipardır. Obstetrik özgeçmiş bakımından her iki grup arasında anlamlı fark yoktur (Tablo 4.1).

Çalışmada kullanılan preparatların ilk bölümü histokimyasal yöntemlerle Hematoksilen-Eosin ile boyanmıştır. Seri kesitlerin diğerlerine ise immünohistokimya boyaması yapılmıştır.

Histokimya Bulguları

Plasentanın Hematoksilen-Eozin ile boyanmış preparatlarının incelenmesinde, embriyonik bölümü oluşturan koryonik plaklar gözlendi. Koryonik plakların oluşturduğu koryonik villuslar trofoblastik hücreler tarafından çevrenmekte idi. Koryonik epitelin dışta daha koyu boyalı sinsityotrofoblast ve içte daha açık boyalı sitotrofoblastlardan oluştuğu gözlendi. Koryonik villusların merkezinde mezenşimal doku yer almakta idi. Bu bölgelerde fusiform şekilli mezenşimal hücreler ve daha koyu boyalı makrofajlar (Hofbaouer hücreleri) bulunmaktaydı. Mezenşimal doku içerisinde umbilikal arterlerin ve venlerin uzantısı olan çok sayıda damarın varlığı gözlendi. Damarların içinde çok sayıda çekirdekli eritrosit bulunmakta idi. (Resim 1a)

Plasentanın maternal kısmını oluşturan desidua bazalis bölgesinin incelenmesinde, stromadaki hücrelerin desidual hücrelere dönüştüğü gözlendi. Desidual hücrelerin oldukça geniş sitoplazmaya sahip oldukları ve sitoplazmalarında çok sayıda granüllerin varlığı gözlendi. Desidual hücrelerin arasında çok sayıda uterin bez ve kan damarı gözlendi. Bazı doku örneklerinde uterusun kas tabakası olan myometrium tabakası

gözlemlendi. Koryonik villuslar trofoblastik hücreler tarafından çevrelenmekte idi. (Resim 1b)

Missed abortuslu vakaların plasentalarının incelenmesinde, koryonik villusların trofoblastik hücreler tarafından çevrelendiği ancak sinsityotrofoblast ve sitotrofoblast kalınlıklarının kontrol grubuna göre daha ince olduğu gözlemlendi. (Resim 1c)

Missed abortuslu vakaların hem koryonik hem de desidual bölgelerinde kan damarı sayılarının kontrol grubuna göre azalmış olması dikkat çekici bulundu. Missed abortuslu vakaların endometrial bezlerinin sayısında da hafif artış gözlemlendi. (Resim 1d)

İmmunohistokimya Bulguları:

VEGF

Kontrol grubunun VEGF monoklonal antikoru ile boyanmış preparatlarının incelenmesinde koryonik villusların yapısını oluşturan sinsityotrofoblast ve sitotrofoblast immunoreaktivitesinin oldukça fazla olduğu buna karşılık missed abortuslu vakalarda immunoreaktivitenin daha düşük olduğu gözlemlendi. Sinsityotrofoblast ve sitotrofoblast immunoreaktivitesinin iki grup arasındaki karşılaştırılmasında aralarında anlamlı ($p<0.005$) fark olduğu tespit edildi (Grafik 1). Plasental villusların stromasında ve damar endotelinde VEGF antikoru ile boyanmalar oldukça orta derecede gözlemlendi ve her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamadı (Resim 2a,c).

Desidual bölgede yapılan immunohistokimyasal incelemede desidual stromal hücrelerin, desidual vasküler endotel hücrelerin ve desidual endometrial bezlerin boyanmasının kontrol grubunda kuvvetli, missed abortus grubunda oldukça zayıf olduğu gözlemlendi ve her iki grup arasında anlamlı ($p<0.005$) fark tespit edildi (Grafik 2), (Resim 2b, d).

FLK

Kontrol grubunun FLK monoklonal antikoru ile boyanmış preparatlarının incelenmesinde, kontrol grubunun embriyoya ait koryonik bölgedeki sinsityotrofoblast ve vasküler endotel hücrelerinde boyanma orta derece gözlenirken, missed abortuslu vakalarda boyanma oldukça zayıf gözlemlendi. Her iki gruba ait sinsityotrofoblast ve vasküler endotel hücrelerinin istatistiksel karşılaştırılmasında gruplar arasında anlamlı ($p<0.005$, $p<0.05$) fark bulundu (Grafik 3). Buna karşılık sitotrofoblast ve stromal hücrelerde gözlenen immunoreaktivite orta derece gözlemlendi ve her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamadı (Resim 3a, c).

Flk monoklonal antikor ile boyanmış doku örneklerinin desiduaları incelendiğinde, kontrol grubu endometrium stromal hücrelerinde, damar endotelinde ve bezlerde orta

derecede boyanma gözlemlendi. Missed abortuslu vakaların ise Flk immunoreaktivitesinin stromal hücrelerde, damar endotelinde ve bezlerde oldukça kuvvetli olduğu gözlemlendi. Her iki grubun desidual stromal hücrelerinin, damar endotelinin ve endometrial bezlerinin immunoreaktivitesi karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0.005$) fark bulundu (Grafik 4), (Resim 3b, d).

FLT

FLT monoklonal antikor ile boyanmış plasenta örneklerinin incelenmesinde, kontrol grubu sitotrofoblastların orta derecede boyandığı buna karşılık sinsityotrofoblast ve stromanın hafif boyanma gösterdiği tespit edildi. Koryonik stromal hücrelerin boyanması ise kontrol grubunda zayıf olarak gözlemlendi. Missed abortuslu vakaların koryonik villusların Flt antikoruna ile boyanmış preparatlarının incelenmesinde, sinsityotrofoblastların ve sitotrofoblastların kuvvetli olarak boyandığı buna karşılık stromal hücrelerin immunoreaktivitesinin düşük olduğu gözlemlendi. Her iki grup sinsityotrofoblast, sitotrofoblast ve vasküler endotel hücrelerinin immunoreaktiviteleri arasında istatistiksel anlamlı ($p<0,05$, $p<0.005$ ve $p<0.005$) fark bulundu (Grafik 5). Missed abortuslu grubun stromal hücrelerindeki immunoreaktivite oldukça düşük gözlemlendi ve kontrol grubu ile arasında anlamlı fark bulunamadı (Resim 4a, c).

Kontrol grubu desidual bölgelerinde desidual hücrelerin, damar endotelinin ve endometrial bezlerin orta derecede boyandığı gözlemlendi. Missed abortus vakalarının desidual hücrelerinin ve endometrial bezlerinin immunoreaktivitesi oldukça fazla gözlemlenirken damar endotelindeki immunoreaktivite zayıf olarak gözlemlendi. Her iki grubun Flt immunoreaktivitesi istatistiksel olarak karşılaştırıldığında desidual hücrelerinin, damar endotelinin ve endometrial bezlerinin arasında anlamlı ($p<0.005$) fark bulundu (Grafik 6), (Resim 4b, d).

eNOS

eNOS monoklonal antikor ile boyanmış preparatların incelenmesinde, kontrol grubuna ait koryon örneklerinde sitotrofoblastların, sinsityotrofoblastların, stromal hücrelerin ve vasküler endotelin orta derecede boyanma gösterdiği tespit edildi. Missed abortuslu vakaların incelenmesinde sitotrofoblastların, sinsityotrofoblastların ve stromal hücrelerin eNOS immunoreaktivitelerinin oldukça düşük olduğu ancak vasküler endotel hücrelerin immunoreaktivitesinin orta derecede olduğu tespit edildi. Her iki grubun sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılmasında sitotrofoblastların, sinsityotrofoblastların ve stromal hücrelerin arasında anlamlı ($p<0.005$, $p<0.05$ ve $p<0.05$) fark bulundu (Grafik 7), (Resim 5a, c).

Desidual eNOS immunoreaktivitesi incelendiğinde desidual hücrelerin, desidual damar endotelinin ve endometrial bezlerin kontrol grubunda orta derecede boyandığı gözlemlendi. Missed abortuslu vakalarda ise desidual hücrelerin, desidual damar endotelinin eNOS immunoreaktivitesinin oldukça düşük olduğu, buna karşılık endometrial bezlerin enos immunoreaktivitesinin oldukça fazla olduğu gözlemlendi. İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında her iki grubun desidual komponentlerinin enos immunoreaktivitesi arasında anlamlı ($p<0.005$) fark bulundu (Grafik 8), (Resim 5b, d).

iNOS

Kontrol grubuna ait koryon örneklerinin inos monoklonal antikor ile boyanmış preparatlarının incelenmesinde, sitotrofoblastların, sinsityotrofoblastların ve vasküler endotel hücrelerinin orta derecede boyandığı gözlemlendi. Kontrol grubunun koryonik stromal hücrelerinin inos immunoreaktivitesi ise düşük olarak gözlemlendi. Missed abortuslu vakaların inos immunoreaktivitelerinin incelenmesinde, sitotrofoblastların, sinsityotrofoblastların ve stromal hücrelerin immunoreaktivitesinin oldukça yüksek olduğu, ancak vasküler endotel hücrelerinin immunoreaktivitesinin zayıf olduğu tespit edildi. Her iki grubun sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılmasında sitotrofoblastların, sinsityotrofoblastların ve stromal hücrelerin arasında anlamlı ($p<0.05$) fark bulundu (Grafik 9), (Resim 6a, c).

Desidual iNOS immunoreaktivitesi incelendiğinde, desidual hücrelerin, desidual damar endotelinin ve endometrial bezlerin kontrol grubunda orta derecede boyandığı gözlemlendi. Missed abortuslu vakalarda ise desidual hücrelerin, desidual damar endotelinin ve endometrial bezlerin iNOS immunoreaktivitesinin yüksek olduğu tespit edildi. Her iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında desidual endotel hücreler ve endometrial bezlerin iNOS immunoreaktivitesi arasında anlamlı ($p<0.005$ ve $p<0.05$) fark bulunurken (Grafik 10), desidual stroma hücreleri arasında anlamlı fark bulunamadı (Resim 6b, d).

Trombospondin

Kontrol grubuna ait koryon örneklerinin trombospondin monoklonal antikor ile boyanmış preparatlarının incelenmesinde, sitotrofoblastların, sinsityotrofoblastların, koryonik stromal hücrelerin ve vasküler endotelin çok zayıf derecede boyandığı gözlemlendi. Missed abortuslu vakaların trombospondin immunoreaktivitelerinin incelenmesinde, sitotrofoblastların, sinsityotrofoblastların ve stromal hücrelerin hafif derecede boyandıkları tespit edildi. Her iki grubun sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılmasında sitotrofoblastların, sinsityotrofoblastların, vasküler hücreler ve stromal hücrelerin arasında anlamlı ($p<0.005$, $p<0.005$, $p<0.005$ ve $p<0.05$) fark bulundu (Resim 7a, c), (Grafik 11).

Trombospondin monoklonal antikor ile boyanmış preparatların desidual

immunoreaktivitesinin incelenmesinde, desidual hücrelerin, desidual damar endotelinin ve endometrial bezlerin kontrol grubunda oldukça zayıf derecede boyandığı gözlemlendi. Missed abortuslu vakalarda ise desidual hücrelerin, desidual damar endotelinin ve endometrial bezlerin trombospondin immunoreaktivitesinin hafif derecede olduğu tespit edildi. Her iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında desidual hücrelerin, desidual damar endotelinin ve endometrial bez hücrelerinin trombospondin immunoreaktivitesi arasında anlamlı ($p<0.005$) fark tespit edildi (Resim 7b, d), (Grafik 12).

HIF

HIF monoklonal antikor ile boyanmış preparatların incelenmesinde, kontrol grubuna ait koryon örneklerinin sitotrofoblastlarının hafif derecede boyandığı, sinsityotrofoblastların, koryonik stromal hücrelerin ve vasküler endotelin ise çok zayıf derecede boyandığı gözlemlendi. Missed abortuslu vakaların HIF immunoreaktivitelerinin incelenmesinde, sitotrofoblast, sinsityotrofoblast ve stromal hücrelerin hemen hemen hiç boyanmadıkları tespit edildi. Her iki grubun sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılmasında sitotrofoblastlar arasında anlamlı fark bulunurken ($p<0.05$), sinsityotrofoblastların, stromal hücrelerin ve vasküler damar endotelinin arasında anlamlı fark bulunamadı (grafik 13), (Resim 8a, c).

Desidual HIF immunoreaktivitesinin incelenmesinde, desidual hücrelerin, desidual damar endotelinin ve endometrial bezlerin kontrol grubunda zayıf derecede boyandığı gözlemlendi. Missed abortuslu vakalarda ise desidual hücrelerin, desidual damar endotelinin ve endometrial bezlerin HIF immunoreaktivitesinin kontrol grubuna benzer biçimde oldukça düşük olduğu tespit edildi. Her iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında desidual hücrelerin, desidual damar endotelinin ve endometrial bez hücrelerinin HIF immunoreaktivitesi arasında anlamlı fark tespit edilmedi (Resim 8b, d).

5. TARTIŞMA

Missed abortus birçok etyolojik faktör ile karşımıza çıkan, birinci trimesterin önemli bir klinik sorunudur. Kromozom anomalileri, malformasyonlar, immunolojik faktörler, endokrin bozukluklar ve çevresel etmenler gibi faktörler missed abortus nedeni olabilir (143). Abortus etyolojisine yönelik araştırmalarda olguların yarısında altta yatan patofizyolojik mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır (143,144).

Missed abortusta etyoloji tam olarak belirgin olmamasına rağmen, son yıllarda yapılan çalışmalarda, anjiyogenez ile embriyonik gelişim arasında yakın ilişki olduğunu destekleyen güçlü kanıtlar sunulmuştur. Sorunsuz bir gebeliğin gelişimi için yeterli koryonik villus vaskülarizasyonu esastır (145,146). Utero-plasental vasküler gelişim dengesindeki anormal değişiklikler gebelik kayıplarının altında yatan bir neden olup, gebeliğin başarılı bir şekilde devam edebilmesi için yeterli ve uygun anjiyogenez gereklidir (147).

Anjiyogenezin tanımlanan en iyi indükleyicisi VEGF'dir (18). VEGF ve reseptörleri fetal anjiyogenik gelişimde temel rol oynar (147). Özellikle tek bir VEGF allelinin kaybının embriyonik ölüm ile sonuçlanması bu faktörün vasküler sistemin gelişimi ve farklılaşmasındaki rolünü ortaya koymaktadır (17,18). Bu çalışmada missed abortus ve kontrol grubu olarak istemli gebelik terminasyonu yapılan hastaların desidua ve plasental doku örneklerinde, yetersiz ve uygun olmayan anjiyogenezin gebelik kayıplarındaki rolünü irdeledik.

Çalışmamızda, VEGF immunoreaktivitesi incelenmesinde, missed abortus grubunun desidual vasküler endotel, desidual stromal hücreler ve endometrial bezleri de içeren tüm desidual hücre örneklerinde düşük VEGF immunoreaktivitesi saptadık. Plasental sinsityotrofoblast ve sitotrofoblast hücrelerinde de kontrol grubuna göre daha düşük VEGF immunoreaktivitesi saptadık. Yapılan birçok çalışmada abortus vakalarında desidual endotelde ve plasental trofoblastlarda azalmış VEGF immunoreaktivitesi tarif edilmiştir (147). Vuorela ve ark.'nın missed abortus ve unembriyonik gebelik olgularını kontrol grubu ile karşılaştırdığı çalışmasında, missed abortus olgularında sitotrofoblast ve sinsityotrofoblastlarda VEGF immunoreaktivitesinin olmadığı saptanırken, endometrial bezler ve desidual vasküler endotel hücrelerinde de daha düşük VEGF immunoreaktivitesi saptanmıştır. Coulam ve ark.'nın fertil fakat gebe olmayan kadınlar ile tekrarlayan gebelik

kaybı olan kadınların endometriumlarında VEGF gen polimorfizminin araştırıldığı çalışmada, VEGF'teki anormal gen polimorfizminin tekrarlayan gebelik kayıplarıyla ilişkili olabileceği belirtilmiştir (148). Yine Dumont ve ark.'nın ratlarda yapılan bir çalışmada; VEGF veya reseptörlerinden herhangi birinin yetersiz ekspresyonunda, azalmış damar gelişimi nedeniyle inutero ölümler olduğu saptanmıştır (149). Bir başka çalışmada, Nardo LG. ve ark.'ları menstruel siklus sırasındaki normal endometrium, implantasyon penceresindeki endometrium ve erken gebelik dönemindeki endometrium dokusunda VEGF ekspresyonunu incelemişlerdir. Endometrial glandular epitel ve endometrial stromal hücrelerde, geç sekretuar fazda ve peri-implantasyon döneminde artmış VEGF ekspresyonu saptamışlar ve anjiyogenezin endometrium dokusunun gelişimindeki önemini ve dolayısıyla bunun da implantasyon ve gebeliğin devamı için önemini vurgulamışlardır (150). Daha önceki yapılan çalışmaların bulgularını değerlendirdiğimizde; desidual ve plasental dokularda düşük VEGF ekspresyonunun yetersiz anjiyogenezle sonuçlanması, VEGF'in gebelik kayıplarındaki rolünü ortaya koymaktadır.

Yaptığımız histokimyasal incelemede; missed abortus grubunda trofoblast kalınlıklarının kontrol grubuna göre daha ince olduğu gözlenirken, hem koryonik hem de desidual bölgelerde kan damarı sayılarının kontrol grubuna göre azalmış olması dikkat çekici bulundu. Meegdes ve ark.'ı intrauterin embriyonik ölüm olgularını normal villus yapısına sahip yasal gebelik tahliyesi olan olgularla karşılaştırdıkları çalışmada, intrauterin ölüm olan vakaların koryonik villuslarında zayıf damar gelişimi ve yetersiz anjiyogenez saptamışlardır (151).

Anjiyogenezde rol oynayan VEGF'in biyolojik aktivitesini temel olarak gerçekleştirdiği reseptörler VEGF-R1 (flt-1) ve VEGF-R2 (flk-1)'dir. Birçok çalışmada her iki reseptörün de (flt-1, flk-1) embriyogenez sırasında kapiller formasyon ve vasküler gelişimde açıkça rol aldığı gösterilmiştir (152,153,154). Flt-1 reseptör immunoreaktivitesini kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda; plasenta vasküler endotel hücrelerinde ve desidua vasküler endotel hücrelerinde, missed abortus grubunda daha düşük Flt-1 immunoreaktivitesi saptadık. Muttukrishna ve ark.'ları anjiyogenik faktör olan solubl endotelyal büyüme faktörü-1 (sFlt-1) ve plasental büyüme faktörü (PIGF)'nün düşük tehdidi olan gebelerde (n=40), asemptomatik gebelerde (n=32) ve luteal fazdaki gebe olmayan kadınlarda(n=14) maternal serum düzeylerini araştırmışlardır. Örnekler gebelik sonucu bazında geriye dönük olarak incelenmiştir. Düşük tehdidi grubundaki 19 kadınının gebeliği komplet abortusla sonuçlanmış ve abortusla sonuçlanmayan gebeliklere göre daha düşük flt-1 düzeyleri saptanmıştır. Gebe olmayan kadınlarla asemptomatik

gebelik grubu karşılaştırmasında, asemptomatik gebelik grubunda daha yüksek sFlt-1 düzeyleri tespit edilmiştir ve sFlt-1 düzeylerinin erken gebelikte arttığını belirtmişlerdir. Bu proteinlerin sonraki gebelik kaybını öngörmeye hassas tahmin göstergeleri olabileceğini belirtmişlerdir (155). Fong ve ark.'nın farelerde erken embriyo gelişiminde, VEGF-R1 lokusundaki mutasyonun araştırıldığı çalışmasında ise mutasyona uğratılan VEGF-R1 olgularında desidua endotel disorganizasyonu ve anormal damar formasyonu izlenmiştir (156).

Çalışmamızda VEGF'in bir diğer reseptörü olan Flk-1 immunoreaktivitesini incelediğimizde kontrol grubuna göre missed abortus grubunda, sinsityotrofoblast ve plasenta vasküler endotel hücrelerinde immunoreaktivitenin oldukça düşük olduğunu gözledik. Bunun yanında, desiduaya ait örneklerde ise Flk-1 immunoreaktivitesini missed abortus grubunda daha yüksek olarak saptadık. Vuorela ve ark.'nın çalışmasında missed abortuslu olgularda plasenta vasküler endotel hücrelerinde flt-1 ve flk-1 immunoreaktivitesini kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında, arada bir fark olmadığını belirtmişlerdir. Fakat desidual vasküler endotel hücrelerde missed abortus grubunda daha düşük immunoreaktivite izlemişler ve tekrarlayan düşüklerdeki vasküler endotel VEGF-R1 ve VEGF-R2 ifade değişikliklerinin plasentadan çok maternal desiduayla ilişkili olabileceğini düşünmüşlerdir (147). Bizim çalışmamızda, plasenta vasküler endotel hücrelerinde Flk-1 ve Flt-1 immunoreaktivitesini missed abortus grubunda sağlıklı kontroller ile karşılaştırdığımızda daha düşük bulduk. Desidua vasküler endotel hücrelerinde ise Flt-1 immunoreaktivitesi kontrol grubunda daha yüksek saptanırken, Flk-1 immunoreaktivitesi missed abortus grubunda daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar, plasentanın damar gelişiminde VEGF'in her iki reseptör üzerinden de etki gösterdiğinin yanısıra, iki reseptörün desidua vasküler endoteldeki farklı ekspresyonları, VEGF'in desidual anjiyogenez sırasında Flt-1 reseptörü üzerinden etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Birinci trimester boyunca plasenta, uterin spiral arteriyollerin ekstravillöz trofoblast oklüzyonu ile hipoksik bir çevrede gelişir. Erken gebelik dönemindeki bu fizyolojik hipoksik çevre fetusu oksijen radikallerinin zararlı ve teratojenik etkilerine karşı korur. Bütün hücreler hipoksiye bir dizi gen modifikasyonu ile cevap verir. HIF bu süreçte önemli bir mediyatördür. Çalışmamızda, desidua ve plasenta dokularında HIF monoklonal antikor incelenmesinde, missed abortus grubunda sitotrofoblast, sinsityotrofoblast ve stromal hücrelerin hemen hemen hiç boyanmadıkları tespit edilirken, kontrol grubu plasenta örneklerinde hafif derecede boyanma tespit edildi. Desidua hücrelerini incelediğimizde ise

missed abortus ve kontrol grubu arasında HIF immunoreaktivitesi açısından anlamlı fark izlemedik. Patel ve ark.'nın oluşturduğu derlemede, yapılan çalışmalarda HIF'in plasenta farklılaşması ve gelişmesindeki önemine değinilmiştir (157). Çeşitli araştırmalarda, erken gebelik döneminde plasenta gelişimi sırasında mevcut olan fizyolojik hipoksik çevrenin HIF'in indüklenmesine neden olduğu ve ortamda eksprese olan HIF'in de VEGF, VEGF reseptörleri ya da insülin benzeri büyüme faktörleri gibi anjiyogenik etmenler üzerinden anjiyogenezin uyarılmasını sağlayarak plasental vaskülarizasyonun artmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (128,157,158,159). Sun ve ark.'ları plasentada anormal HIF-1 yüksekliğinin VEGF modülasyonu ve sFlt-1 transkripsiyonu yoluyla sitotroblast invazyonu ve plasental vasküler rekonstrüksiyonu etkileyerek preeklampsi patogenezinde rol alabileceğini belirtmişlerdir (160).

VEGF ile indüklenen anjiyogenez ve hiperpermeabilitede nitrik oksid (NO) önemli role sahiptir. VEGF, endotelial nitrik oksid sentaz (eNOS) enziminin up-regulasyonunu ve buna bağlı olarak NO salgısını indükler. Endojen olarak üretilen NO da sonuçta VEGF sentezini arttırır. İnsan endometriumunda NOS izoformları ekspresyonu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Son immünohistokimyasal çalışmalar insan endometriyum epitel ve endotel hücrelerinde eNOS protein varlığını ortaya koymuştur (161,162,163). Endometrium eNOS mRNA ifadesi in-situ hibridizasyon ile kanıtlanmıştır (164). eNOS monoklonal antikor incelemesinde kontrol grubuna ait koryon örneklerinde stromal hücrelerin eNOS immunoreaktivitesini missed abortus grubunda oldukça düşük tespit ettik. Missed abortus grubu desidual eNOS immunoreaktivitesini incelediğimizde tüm desidual komponentlerde kontrol grubuna göre oldukça düşük eNOS immunoreaktivitesi olduğunu izledik. NO'nun implantasyon ve gebelik sürecindeki önemli rolü hayvan çalışmalarında da gösterilmiştir (165,166,167,168). Haddad ve ark.'ı azalmış NO'nun erken gebelik kayıplarındaki rolünü fare desidualarında yaptıkları çalışmalarında göstermişlerdir (169). Fukumura ve ark.'ları eNOS'un farmakolojik blokajı ya da genetik olarak bozukluğa uğraması durumunda VEGF ile indüklenmiş anjiyogenezin ve hiperpermeabilitenin inhibe olduğunu belirtmişlerdir (141). Başka bir çalışmada Brooks ve ark.'ları eNOS blokajının ya da eksikliğinin oksijenle indüklenen retinal vasoklüzyonu ve vitröz neovaskularizasyonu azalttığını saptamışlardır (142).

İndüklenebilir NOS (iNOS) ise VEGF reseptörünü down-regüle ederek anjiyogenezi inhibe edebilmektedir. Brooks ve ark.'ları iskemik retinopati ile ilgili bir fare modelinde iNOS'un VEGF ile sürdürülen neovaskularizasyonu inhibe ettiğini saptamışlardır (142). iNOS monoklonal antikor ile boyanmış örneklerin incelenmesinde

missed abortus grubu sitotrofoblast, sinsityotrofoblast ve stromal hücrelerde oldukça yüksek immunoreaktivite olduğunu saptadık. iNOS desidual immunoreaktivitesini incelediğimizde; missed abortus grubu desidual damar endotelinde kontrol grubuna göre immunoreaktivitenin yüksek olduğunu tespit ettik. Haddad ve ark.'ı çalışmalarında farelerde nitrik oksidin desidual makrofajlar tarafından üretildiğini ve VEGF sentezini arttırdığını fakat iNOS'un bu etkiyi inhibe ettiğini göstermişlerdir (169).

Trombospondin-1, anjiyogenik uyarıların değişik türlerine cevap olarak endotel hücrelerinde yeni damar oluşumunu önleme yeteneğine sahip potansiyel bir anjiyogenez baskılayıcısıdır. Artan TSP-1 gen ifadesi damarlanmanın da azalmasına neden olur.

Çalışmamızda missed abortus grubu Trombospondin-1 immunoreaktivitelerinin incelenmesinde, trofoblastların ve stromal hücrelerin hafif derecede boyandıkları tespit edilirken, kontrol grubu koryonik stromal hücreleri ve vasküler endotelinde çok zayıf derecede boyanma gözledik. Desidual komponentlerin değerlendirmesinde; desidual damar endotelinin, desidual hücrelerin, ve endometrial bezlerin kontrol grubunda oldukça zayıf derecede boyandığı gözlenirken, missed abortus grubunda trombospondin immunoreaktivitesinin hafif derecede olduğunu tespit ettik. TSP-1'in yokluğunda VEGF'nin ve reseptörü VEGF-R1'in arttığı gösterilmiştir (27). Jin ve ark.'ı desiduada anormal TSP-1 ekspresyonunun bazı kadınlarda açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olabileceğini belirtmişlerdir (170). Edwards ve ark.'ları gebe olamayan, sağlıklı gebeliği olan ve fetal arrest olan domuzların endometrium ve koryon örneklerinde proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörlerin etkisini araştırmışlardır. Sağlıklı gebelik ve fetal arrest olan domuz gruplarını karşılaştırdıklarında, antianjiyogenik etmen olan trombospondin-1 ve reseptörü CD36 ekspresyonları için iki grup arasında fark bulamamışlardır. Trombospondin-1 ve CD36'nın perivasküler alanlarda lokalize olduğunu immunohistokimyasal olarak gösterdikleri için antianjiyogenez bir rol düşünmüşler fakat fetal arrest olan vakalarda antianjiyogenik aktiviteyi önermek için yeterli kanıt bulamadıklarını belirtmişlerdir (171).

Çalışmamızda desidual ve plasental hücre komponentlerinde kontrol ve missed abortus grubu arasında anlamlı fark ($p<0.005$) tespit edilmiş olup, missed abortus vakalarında iNOS gibi trombospondinin de antianjiyogenik etki ile abortusta rolü olduğu düşünülmüştür.

6. SONUÇLAR

Missed abortusda birçok etyolojik faktör rol almakla birlikte son yıllarda anjiyogenez ile gebelik kayıpları arasında yakın ilişki saptanmıştır.

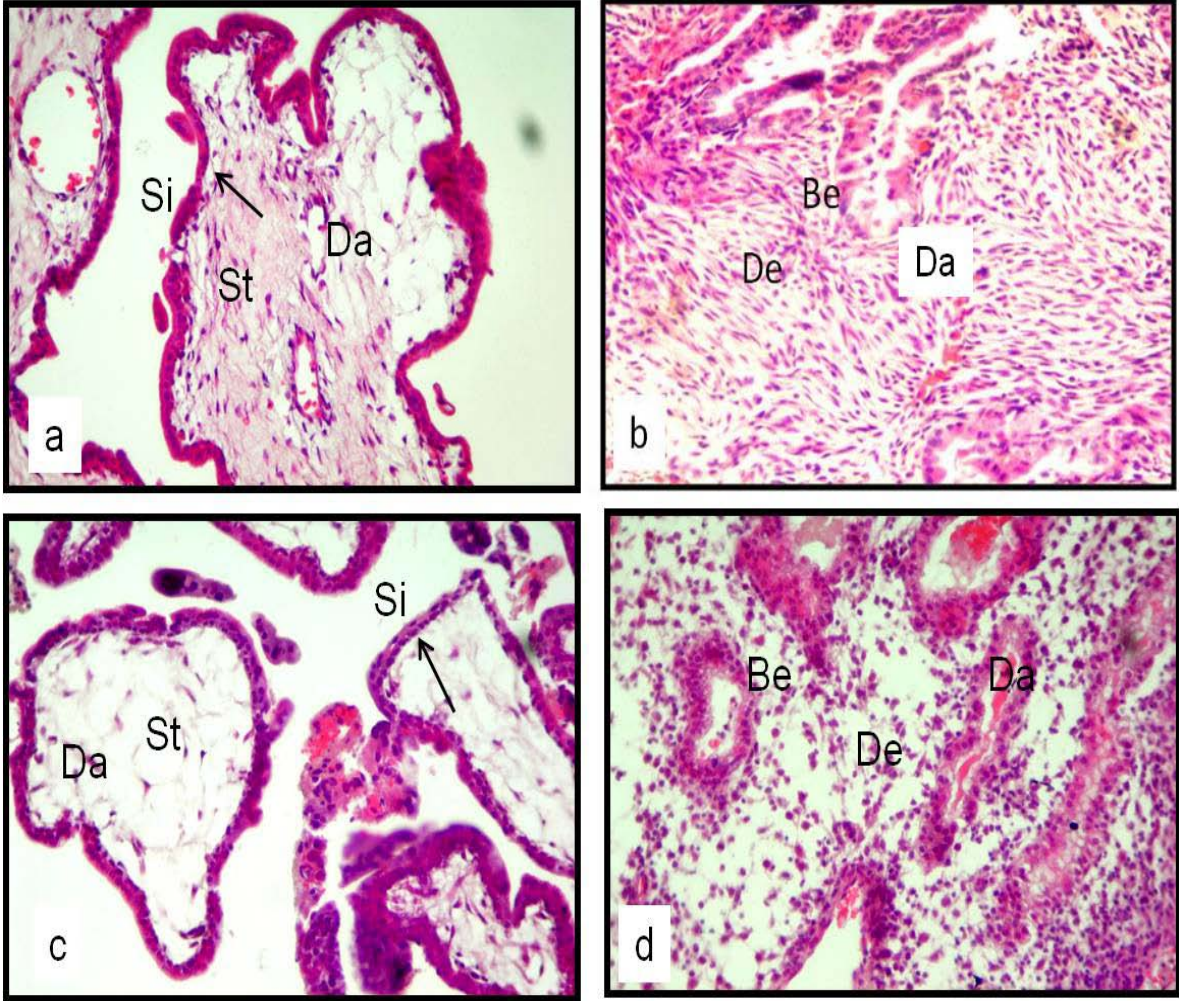
Missed abortusla sonuçlanan gebeliklerde desidua ve plasenta örneklerinde düşük VEGF immunoreaktivitesi saptanması ve yine missed abortus grubunda desidua ve plasenta vasküler hücre komponentlerinde ve desidua stromal hücrelerinde düşük eNOS immunoreaktivitesi tespit edilmesi, abortus grubundaki olgularda yetersiz anjiyogenez varlığına işaret etmektedir. Bunun yanında VEGF reseptör immunoreaktivitelerini değerlendirdiğimizde; VEGF'in desiduanın anjiyogenezi sırasında Flt-1 reseptörü üzerinden etki gösterirken, plasenta anjiyogenezi sırasında ise hem Flt-1 hem de Flk-1 üzerinden etki gösterdiği düşünülmektedir.

Missed abortus grubunda, antianjiyogenik etmenler olan trombospondin ve iNOS immunoreaktiviteleri desidua ve plasenta damar endotellerinde ve stromal hücrelerinde yüksek bulunurken, kontrol grubunda düşük bulunmuştur ve antianjiyogenik etkinin abortusta rolü olduğunu düşündürmüştür. Plasenta anjiyogenezi sırasında, fizyolojik hipoksik çevrenin HIF'in indüklenmesine neden olması ve ortamda eksprese olan HIF'in de VEGF, VEGF reseptörleri gibi anjiyogenik etmenler üzerinden anjiyogenezin uyarılmasını sağlamasından yola çıkarak araştırdığımız HIF immunoreaktivitesinin, her iki grup arasında sadece trofoblastik hücrelerde fark göstermesi HIF'in desiduadan ziyade plasenta anjiyogenezinde rol aldığını düşündürmektedir.

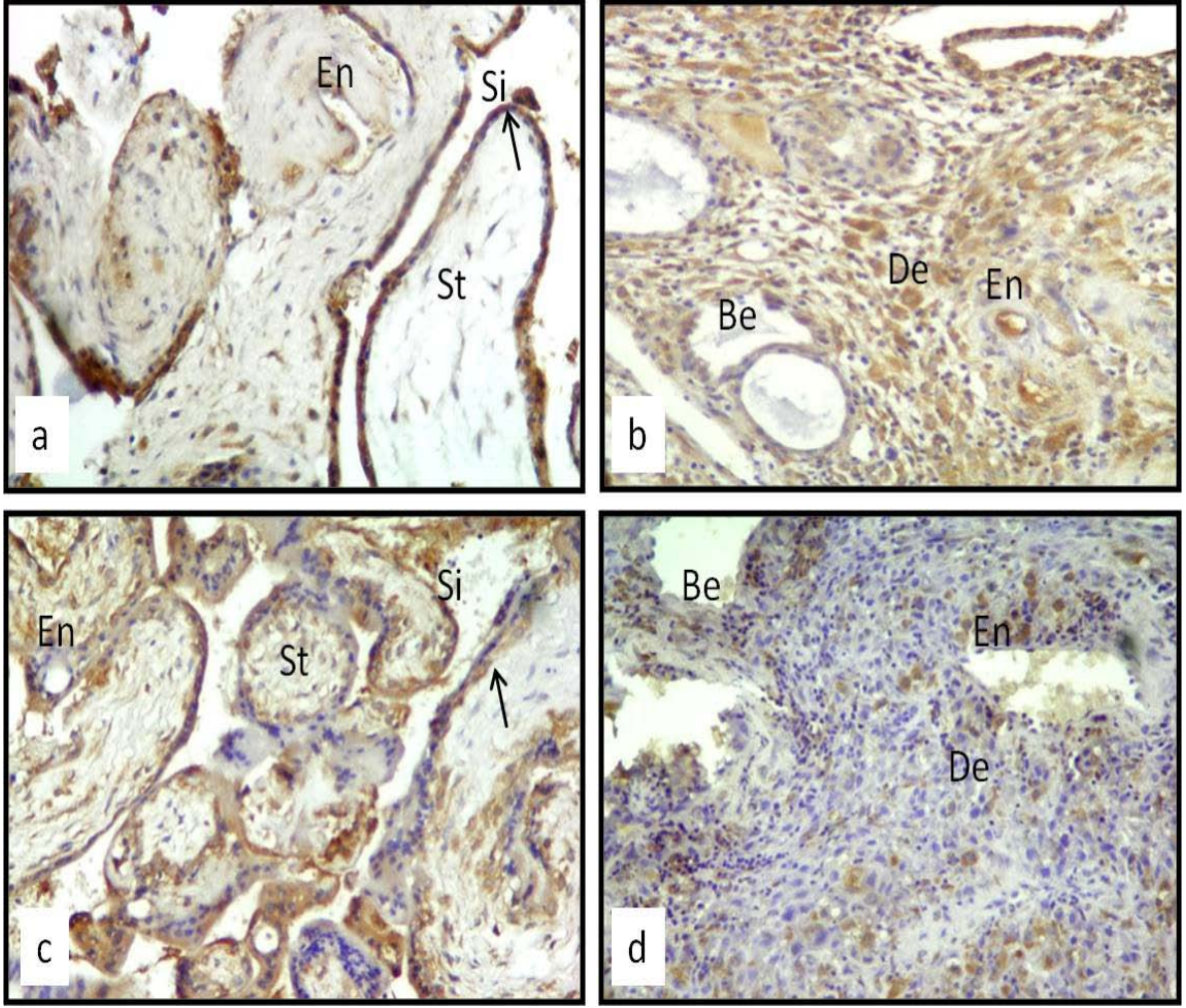
Missed abortus olgularında histokimyasal olarak saptadığımız daha düşük damar oluşumu ve trofoblast yapılanması, bu grupta desidua ve plasenta hücrelerinde anjiyogenezin yetersiz olduğunu göstermektedir.

Sonuçta, sağlıklı bir gebeliğin gelişimi için yeterli anjiyogenez esastır. Proanjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda ise anjiyogenez kontrol edilemez ve gebelik kayıplarına neden olabilir.

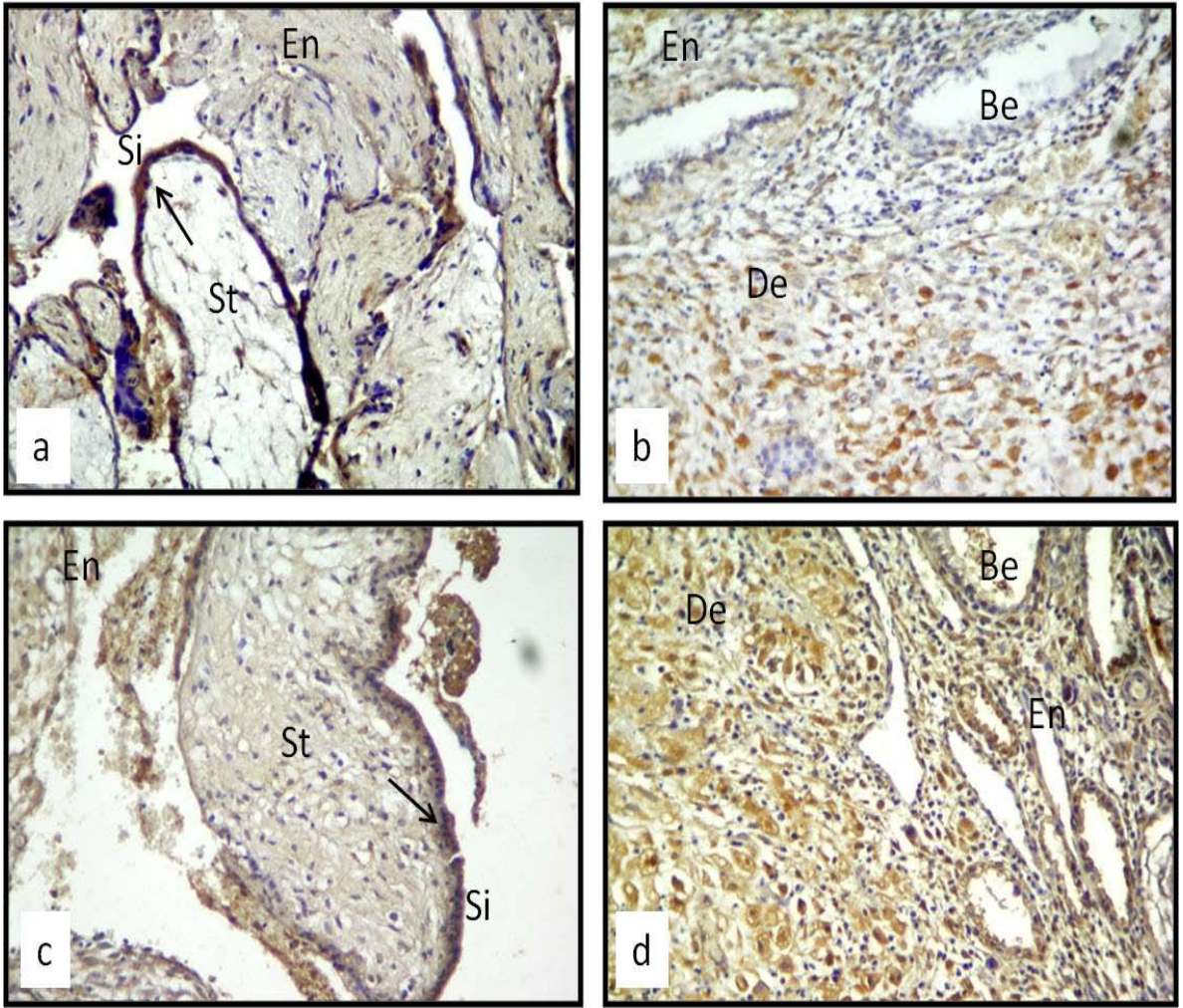
7. TABLO, GRAFİK VE RESİMLER



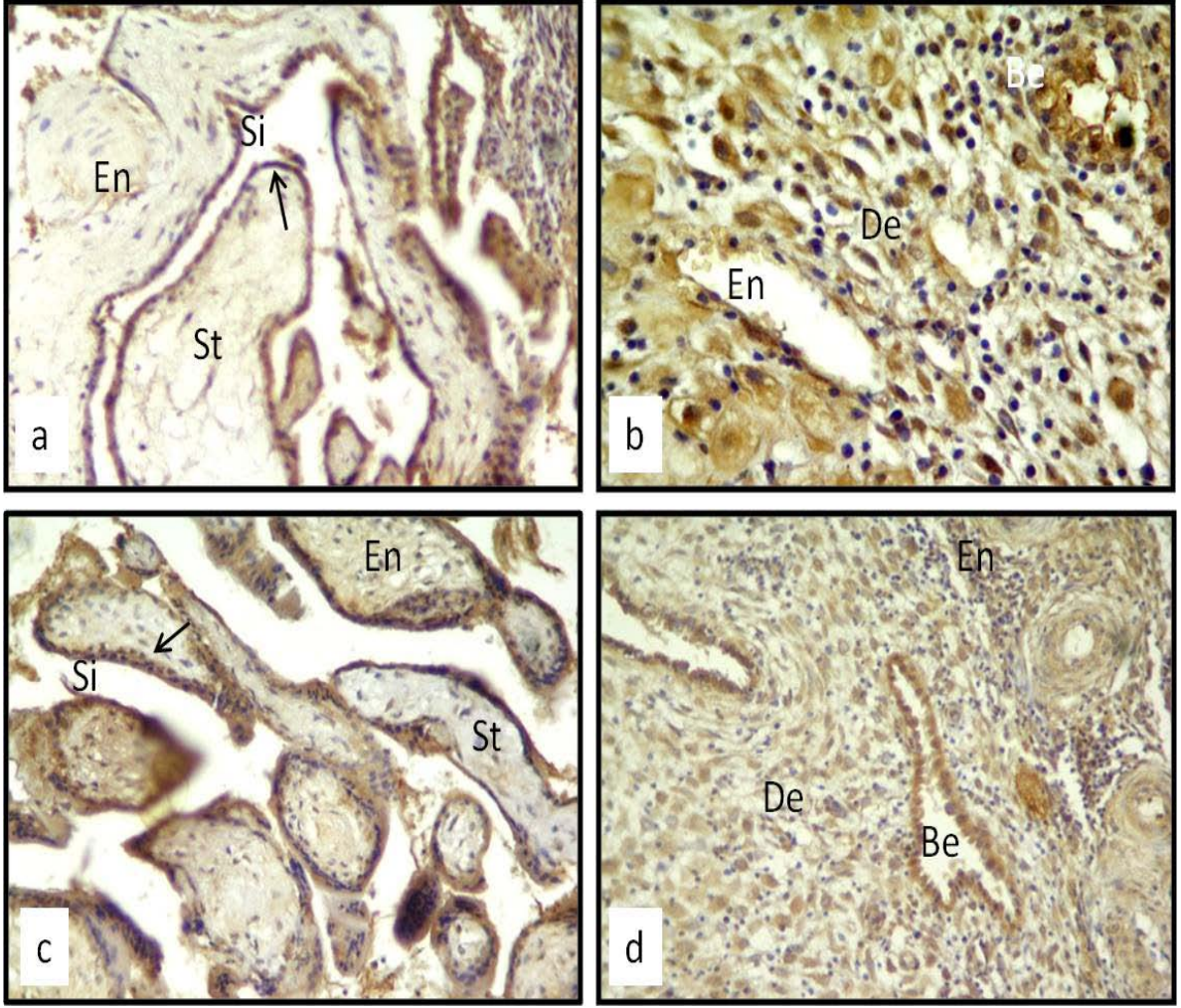
Resim 1. Histokimyasal Teknik: Kontrol grubu (a,b); Missed abortus (c,d). Placenta villuslarının sinsityotrofoblast (Si) ile çevrelediği, altında ise sitotrofoblastlar (Ok) görülmektedir. Villusların merkezini oluşturan mezenşimal stromal hücreler stromayı (St) oluşturmaktadır. Stroma içinde çok sayıda kan damarları (Da) görülmektedir. Desidua içinde çok sayıda geniş sitoplazmalı desidual hücreler (De), kan damarları (Da) ve endometrial bezler (Be) görülmektedir. Missed abortuslu vakaların (c, d) koryonik bölgede sinsityotrofoblastların (Si) ve sitotrofoblastların (Ok) daha ince yapıda oldukları kan damarlarının (Da) sayısının azalmış olduğu görülmektedir (c). Missed abortuslu vakaların desidual bölgelerinde endometrial bezlerin (Be) arttığı, buna karşılık damarların (Da) azaldığı görülmektedir. Orjinal büyütme (x200) Hematoksilen-Eozin



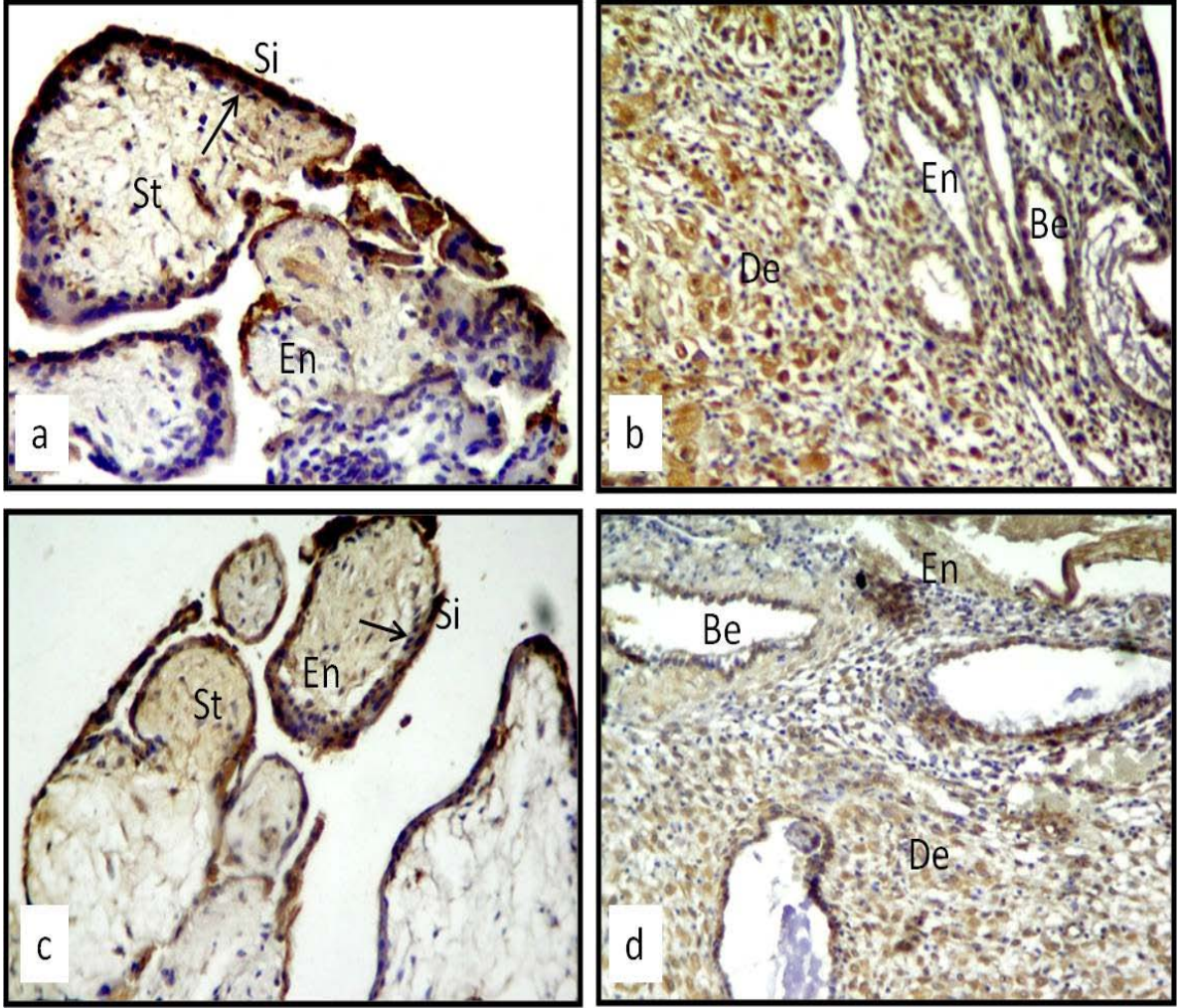
Resim 2. İmmunohistokimyasal teknik kullanılarak VEGF monoklonal antikoruna ile boyanmış doku örneklerinin incelenmesinde kontrol grubu plasenta villusları örten sinsityotrofoblast (Si), sitotrofoblastların (Ok), stromal hücrelerin (St) ve damar endotel hücrelerin (En) kuvvetli derecede boyandığı görülmektedir (a). Kontrol grubuna ait örneklerin desidualarının incelenmesinde desidual hücrelerin kuvvetli boyandığı (De), damar endotel hücrelerinde (En) ve endometrial bezlerin (Be) ise oldukça zayıf boyandığı görülmektedir (b). Missed abortuslu vakaların incelenmesinde (c, d) sinsityotrofoblastların (Si), sitotrofoblastların (Ok), stromal hücrelerin (St) ve damar endotel hücrelerinin (En) boyanmalarının oldukça zayıf olduğu görülmektedir. Plasental VEGF immunoreaktivitesi hafif derecede gözlenirken boyanma çok düşük düzeydedir (c). Missed abortuslu vakaların desiduaları incelendiğinde desidual hücrelerin (D) oldukça zayıf boyandığı gözlenirken damar endotel hücrelerinde (E) ve endometrial bezlerde boyanma gözlenmedi (d). Orjinal büyütme (x200)



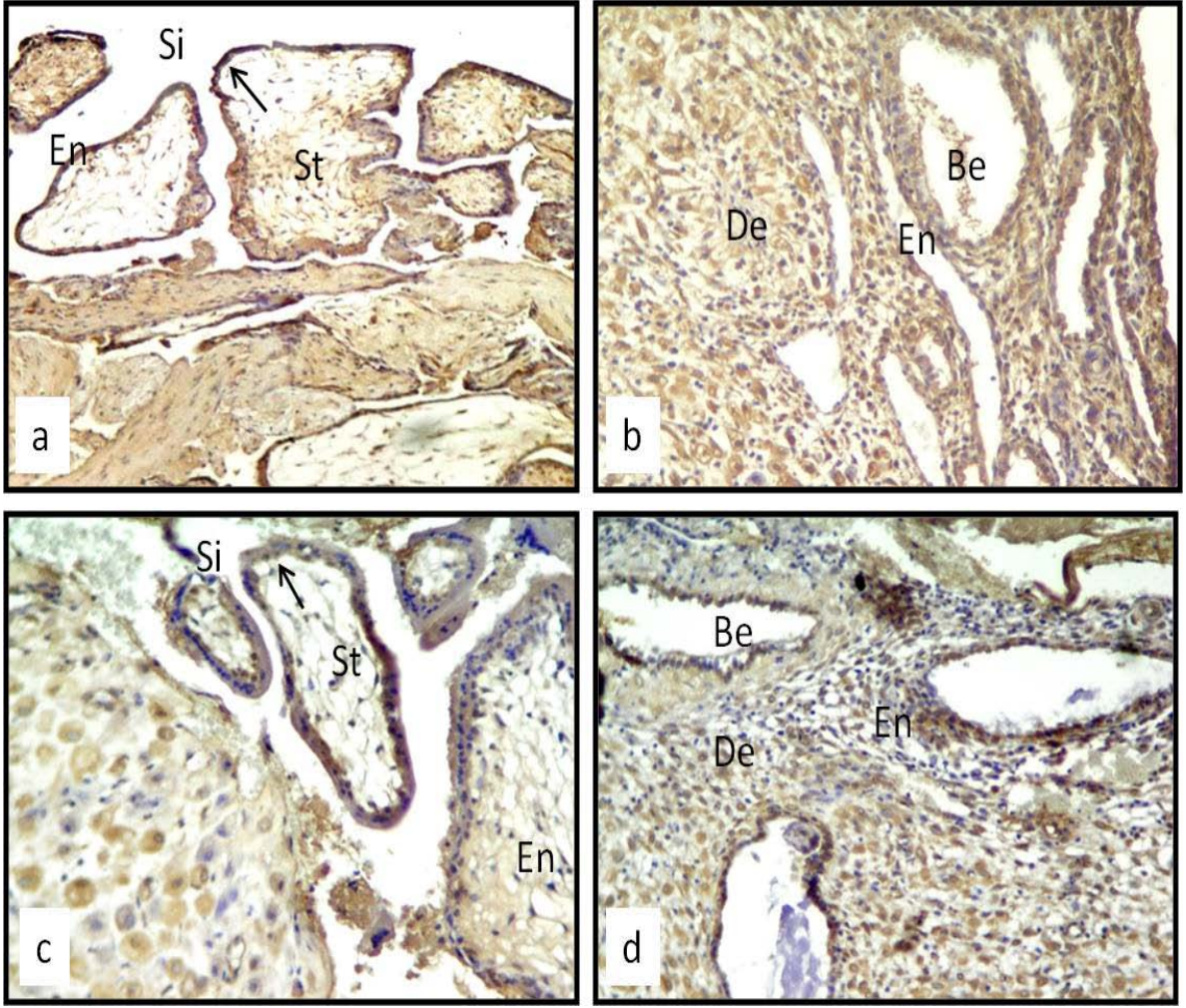
Resim 3. İmmunohistokimyasal teknik kullanılarak FLK monoklonal antikoruna ile boyanmış doku örneklerinin incelenmesinde kontrol grubu (a, b) plasenta villusları örten sinsityotrofoblast (Si) ve damar endotel hücrelerin (En) orta derecede boyandığı (a), missed abortus grubunda ise immunoreaktivitenin daha az olduğu görülmektedir (b). Desidualarının örneklerinin incelenmesinde kontrol grubuna ait desidual hücrelerin (De), damar endotel hücrelerinde (En) ve endometrial bezlerin (Be) orta derecede boyandığı (c) buna karşılık missed abortuslu vakaların kuvvetli boyandığı görülmektedir (d). Orjinal büyütme (x200)



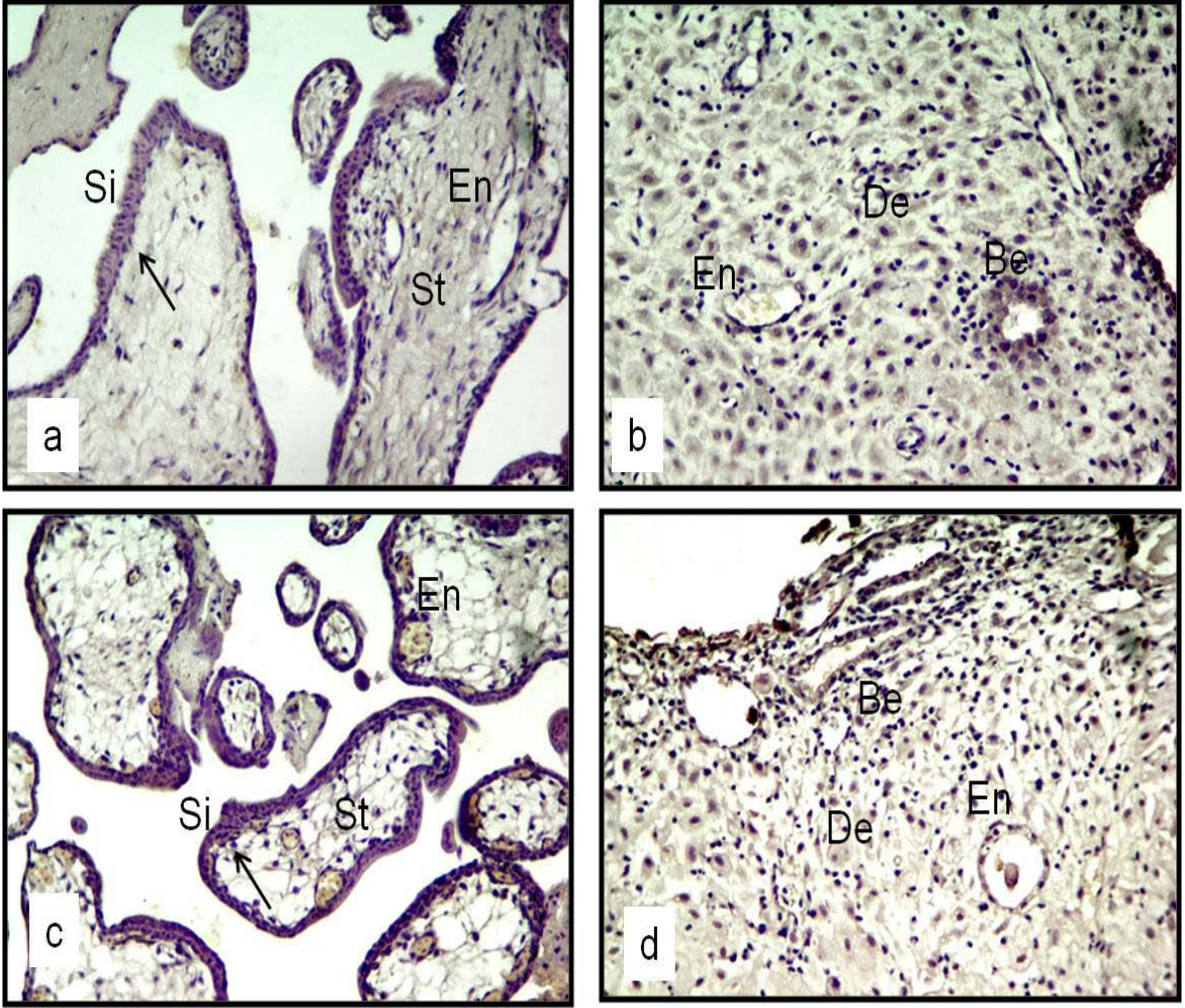
Resim 4. İmmunohistokimyasal teknik kullanılarak Flt monoklonal antikoru ile boyanmış doku örneklerinin incelenmesinde kontrol grubu (a, b) plasenta villusları örten sinsityotrofoblast (Si), sitotrofoblast (Ok) ve damar endotel hücrelerinin (En) orta derecede boyandığı (a), missed abortus grubunda ise immunoreaktivitenin kuvvetli olduğu görülmektedir (b). Desidualarının örneklerinin incelenmesinde kontrol grubuna ait desidual hücrelerin (De) ve endometrial bezlerin (Be) kuvvetli, damar endotel hücrelerinin (En) orta derecede boyandığı (c) buna karşılık missed abortuslu vakaların desidual hücrelerin (De) ve endometrial bezlerin (Be) çok kuvvetli, damar endotel hücrelerinin (En) az miktarda boyandığı görülmektedir (d). Orjinal büyütme (x200)



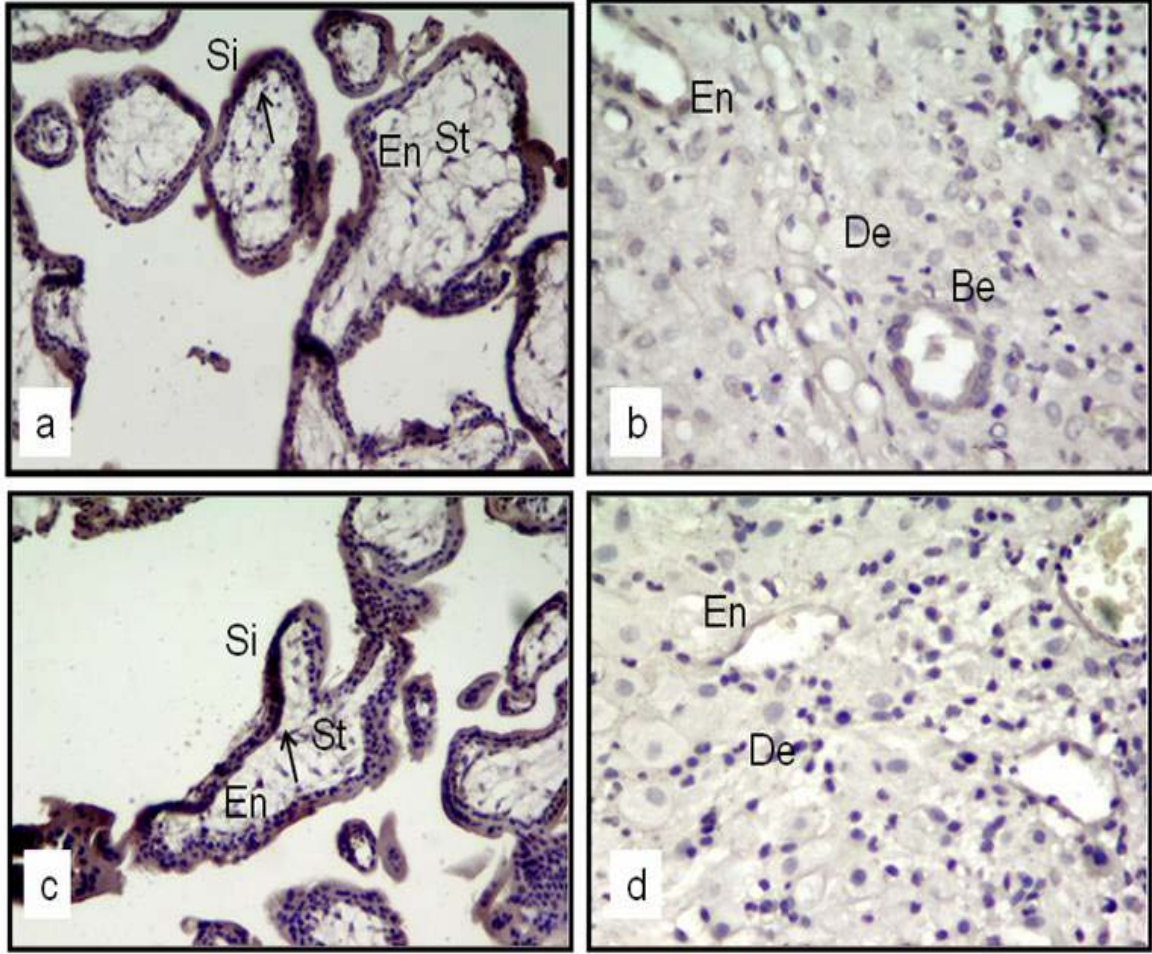
Resim 5. İmmunohistokimyasal teknik kullanılarak eNOS monoklonal antikorunu ile boyanmış doku örneklerinin incelenmesinde kontrol grubu (a, b) plasenta villusları örten sinsityotrofoblast (Si), sitotrofoblastların (Ok) ve stromal hücrelerin (St) orta derecede boyandığı (a), missed abortus grubunda ise sinsityotrofoblast (Si) ve sitotrofoblastların (Ok) immunoreaktivitenin daha az ; stromal hücrelerin (St) immunoreaktivitesinin daha fazla olduğu görülmektedir (b). Desidualarının örneklerinin incelenmesinde kontrol grubuna ait desidual hücrelerin (De) ve endometrial bezlerin (Be) kuvvetli, damar endotel hücrelerinin (En) orta derecede boyandığı (c), buna karşılık missed abortuslu vakaların desidual hücrelerinin (De) orta derecede, endotel hücrelerinin (En) ve endometrial bezlerin (Be) çok kuvvetli, boyandığı görülmektedir. (d). Orjinal büyütme (x200)



Resim 6. İmmunohistokimyasal teknik kullanılarak iNOS monoklonal antikoruna ile boyanmış doku örneklerinin incelenmesinde kontrol grubu (a, b) plasenta villusları örten sinsityotrofoblast (Si), sitotrofoblast (Ok), stromal hücreler (St) ve damar endotel hücrelerinin (En) orta derecede boyandığı (a), buna karşılık missed abortus grubunda ise sinsityotrofoblast (Si), sitotrofoblastların (Ok) ve stromal hücrelerin (St) immunoreaktivitesinin daha fazla olduğu, vasküler immunoreaktivitesinin ise daha az olduğu görülmektedir (b). Desidualarının örneklerin incelenmesinde kontrol grubuna ait desidual hücrelerin (De) ve endometrial bezlerin (Be) kuvvetli, damar endotel hücrelerinin (En) orta derecede boyandığı (c), buna karşılık missed abortuslu vakaların desidual hücrelerinin (De) ve endotel hücrelerinin (En) orta derecede, endometrial bezlerin (Be) ise çok kuvvetli boyandığı görülmektedir (d). Orjinal büyütme (x200)



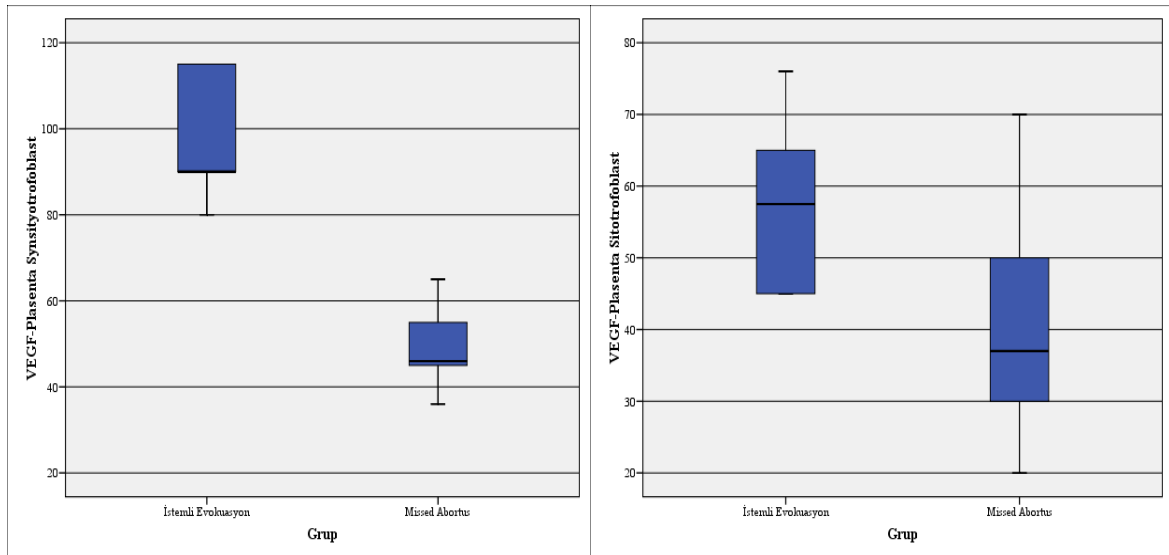
Resim 7. İmmunohistokimyasal teknik kullanılarak trombospondin monoklonal antikoru ile boyanmış doku örneklerinin incelenmesinde kontrol grubu (a, b) plasenta villusları örten sinsityotrofoblastların (Si), sitotrofoblastların (Ok), stromal hücrelerin (St) ve damar endotel hücrelerinin (En) çok az derecede boyandığı (a), buna karşılık missed abortus grubunda ise hafif derecede boyandığı görülmektedir (b). Desidualarının örneklerinin incelenmesinde kontrol grubuna ait desidual hücrelerin (De), endometrial bezlerin (Be) ve damar endotel hücrelerinin (En) oldukça zayıf derecede boyandığı (c), buna karşılık missed abortuslu vakaların boyanmalarının daha fazla olduğu görülmektedir (d). Orjinal büyütme (x200)



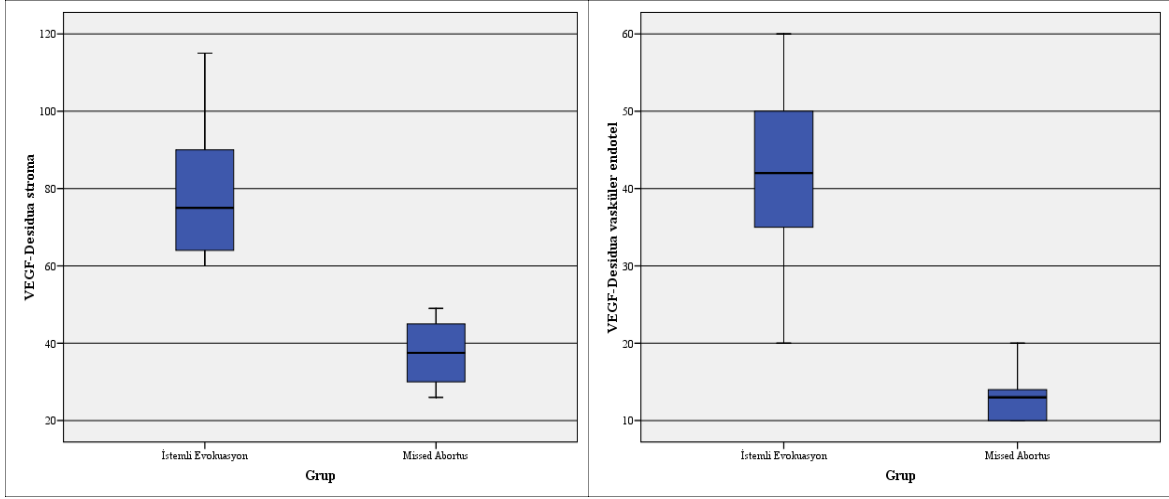
Resim 8: İmmunohistokimyasal teknik kullanılarak HIF monoklonal antikoruna boyanmış doku örneklerinin incelenmesinde kontrol grubu (a, b) plasenta villusları örten sinsityotrofoblast (Si), sitotrofoblastların (Ok), stromal hücrelerin (St) ve damar endotel hücrelerinin (En) çok hafif derecede boyandığı (a), buna karşılık missed abortus grubunda ise sinsityotrofoblastlarda (Si) daha fazla immunoreaktivite gözlenirken, diğer bölgeler kontrol grubuna benzer özellikler göstermektedir (b). Desidualarının örneklerinin incelenmesinde kontrol (c) ve missed abortuslu (d) grupların desidual hücreleri (De), endometrial bezleri (Be) ve damar endotel hücrelerinde (En) benzer biçimde hafif derecede boyanma görülmektedir. Orjinal büyütme (x200)

Tablo 4.1 Missed abortus ve istemli evokasyon grubu obstetrik özgeçmiş

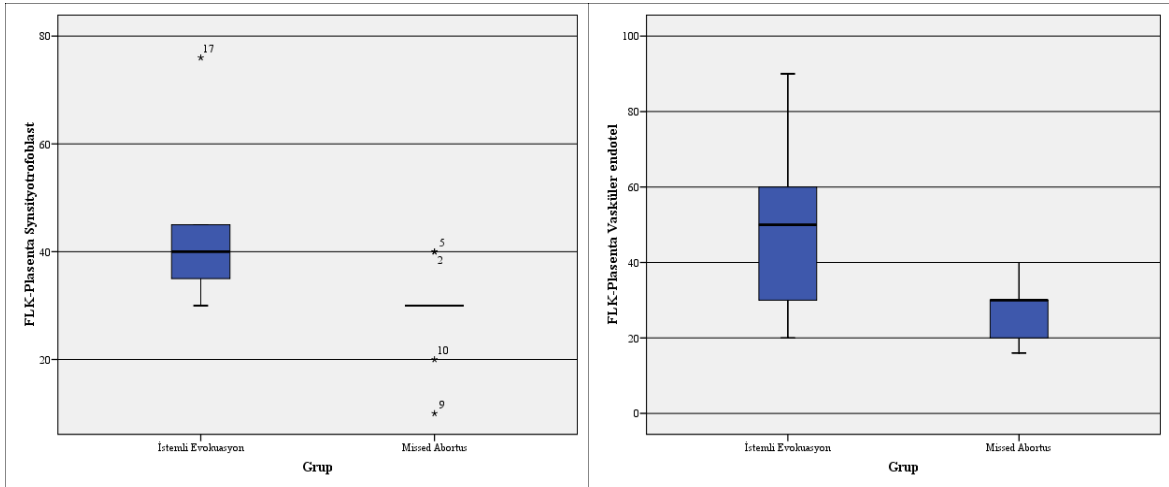
	grup	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
parite	m	19	,79	,976	,224
	i	15	,87	,834	,215
abort	m	19	,42	,961	,221
	i	15	,33	,488	,126
sek	m	19	,11	,315	,072
	i	15	,20	,414	,107
gravida	m	19	2,11	1,410	,323
	i	15	2,40	1,242	,321



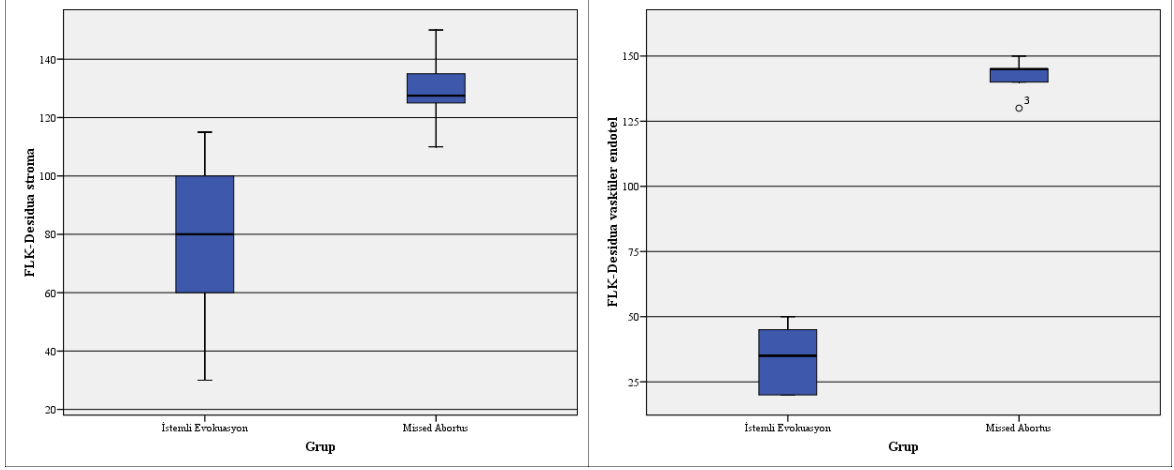
Grafik 1. İstemli evokasyon grubu VEGF plasenta sinsityotrofoblast ve sitotrofoblast değişkenlerinin median değerleri sırasıyla; median 90 (min 80, max 115) ve median 57,5 (min 45, max 76), Missed abortus grubunda VEGF plasenta sinsityotrofoblast ve sitotrofoblast değişkenlerinin median değerleri sırasıyla; median 46 (min 36, max 65) ve median 37 (min 20, max 70) olarak bulundu. Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.005$).



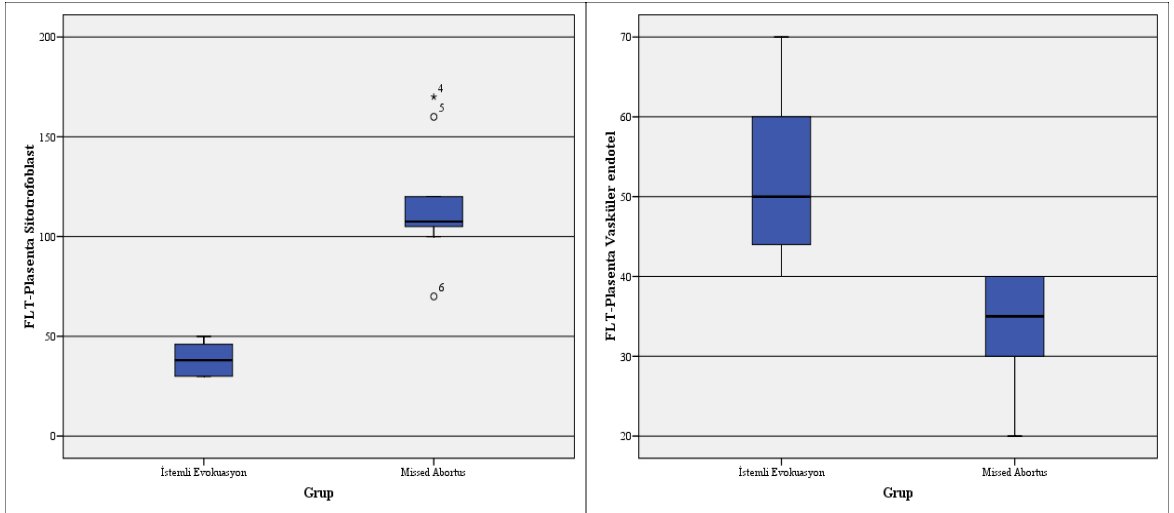
Grafik 2. İstemli evokasyon grubu VEGF desidual stromal hücreler ve desidual vasküler endotel hücrelerinin median değerleri sırasıyla; median 75 (min 60, max 115) ve median 42 (min 20, max 60), Missed abortus grubunda VEGF desidual stromal hücreler ve desidual vasküler endotel hücrelerinin median değerleri sırasıyla; median 37,5 (min 26, max 49) ve median 13 (min 10, max 20) olarak bulundu. Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.005$).



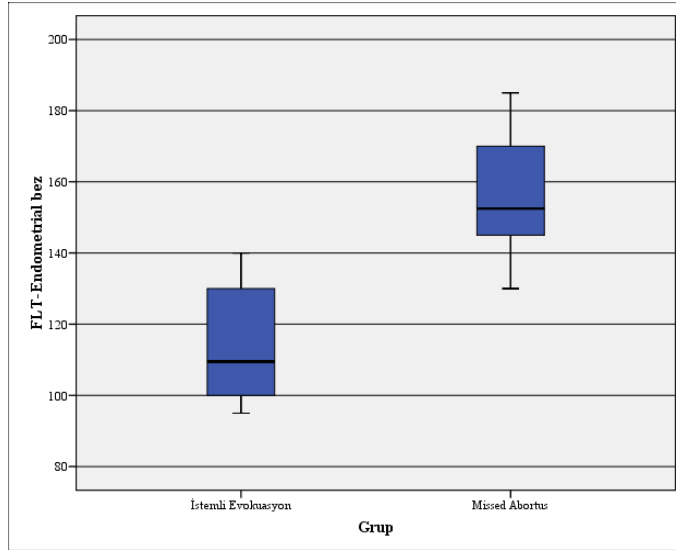
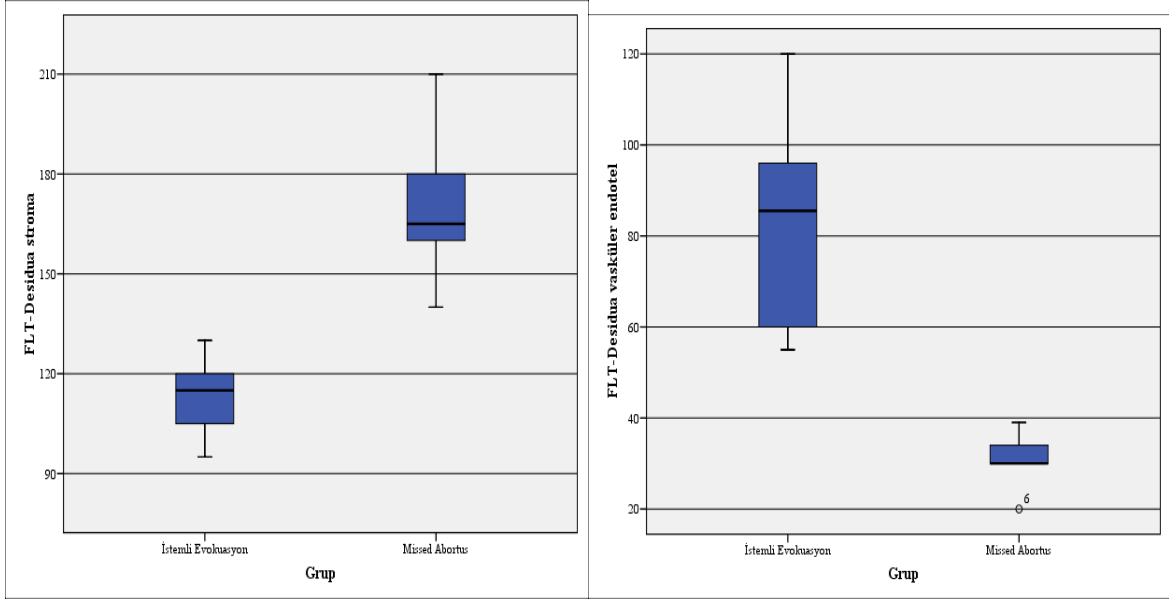
Grafik 3. İstemli evokasyon grubu FLK plasenta sinsityotrofoblast ve vasküler endotel hücre değişkenlerinin median değerleri sırasıyla; median 40 (min 30, max 70) ve median 50 (min 20, max 90), Missed abortus grubunda FLK plasenta sinsityotrofoblast ve vasküler endotel değişkenlerinin median değerleri sırasıyla; median 30 (min 10, max 40) ve median 30 (min 16, max 40) olarak bulundu. Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.005$, $p < 0.05$).



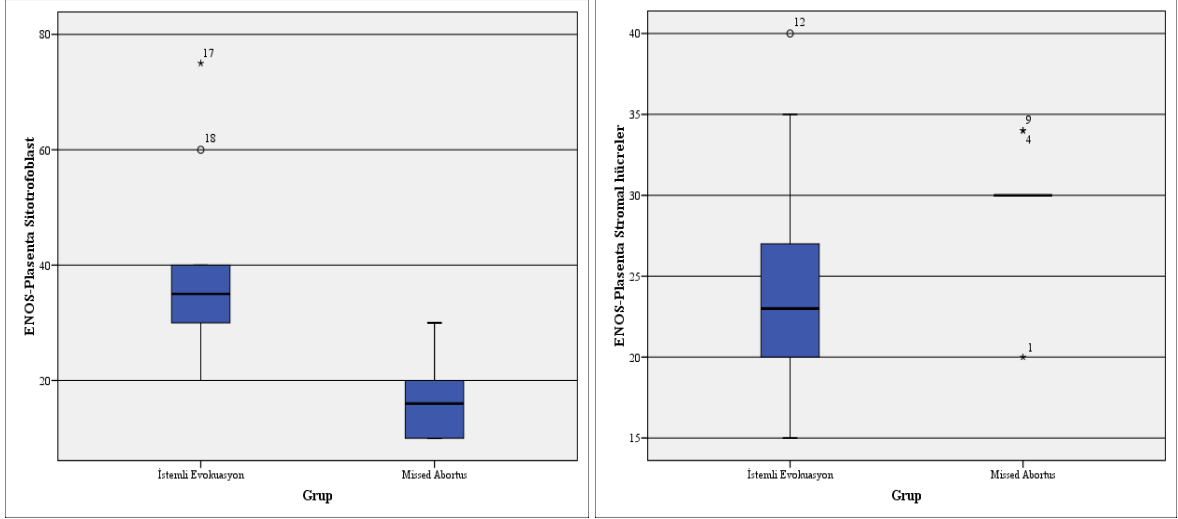
Grafik 4. İstemli evokasyon grubu FLK desidual stromal hücreler ve desidual vasküler endotel hücrelerin median değerleri sırasıyla; median 80 (min 30, max 115) ve median 35 (min 20, max 50), Missed abortus grubunda FLK desidual stromal hücreler ve desidual vasküler endotel hücrelerin median değerleri sırasıyla; median 127,5 (min 110, max 150) ve median 145 (min 130, max 150) olarak bulundu. Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.005$).



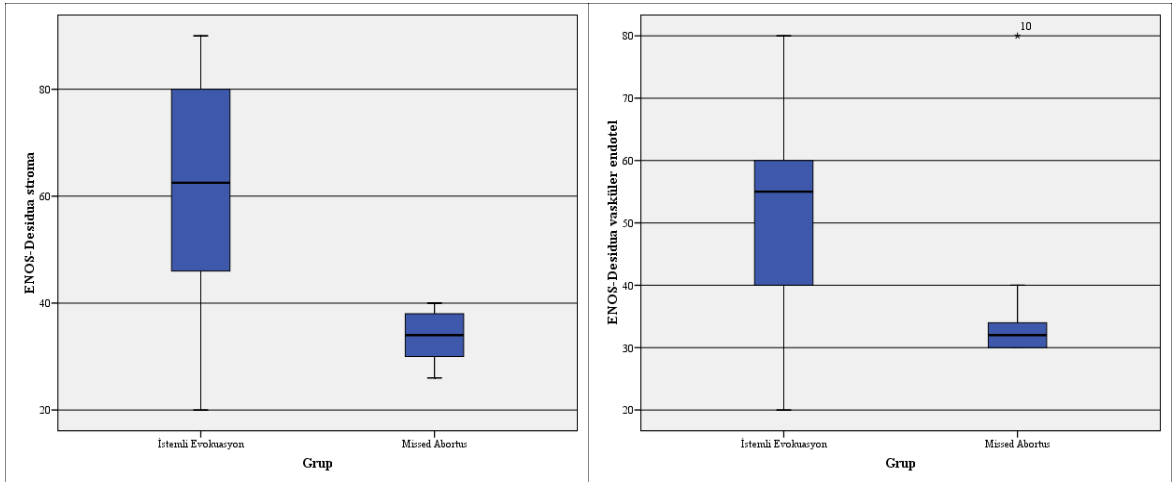
Grafik 5. İstemli evokasyon grubu FLT plasenta sitotrofoblast ve vasküler endotel hücre değişkenlerinin median değerleri sırasıyla; median 38 (min 30, max 50) ve median 50 (min 40, max 70), Missed abortus grubunda FLT plasenta sitotrofoblast ve vasküler endotel hücre değişkenlerinin median değerleri sırasıyla; median 107,5 (min 70, max 170) ve median 35 (min 20, max 40) olarak bulundu. Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.005$ ve $p < 0.005$).



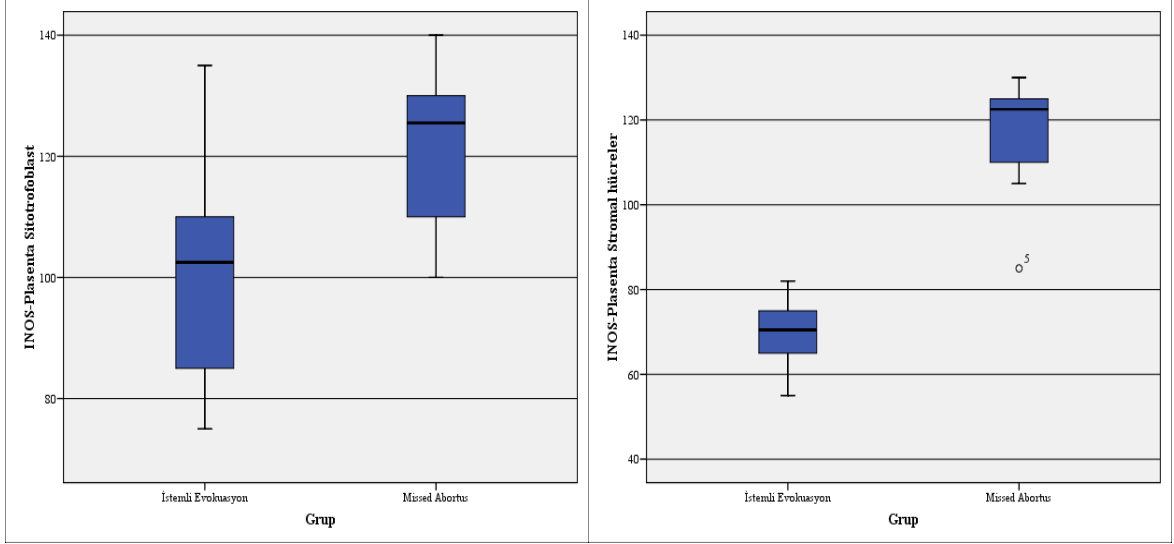
Grafik 6. İstemli evokasyon grubu FLT desidual stromal hücreler, desidual vasküler endotel hücreler ve desidual endometrial bezlerin değişkenlerinin median değerleri sırasıyla; median 115 (min 95, max 130), median 85,5 (min 55, max 120) ve median 109,5 (min 95, max 140), Missed abortus grubunda FLT desidual stromal hücreler, desidual vasküler endotel hücreler ve desidual endometrial bezlerin değişkenlerinin median değerleri sırasıyla; median 165 (min 140, max 210), median 30 (min 20, max 39) ve median 152,5 (min 130, max 185) olarak bulundu. Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.005$).



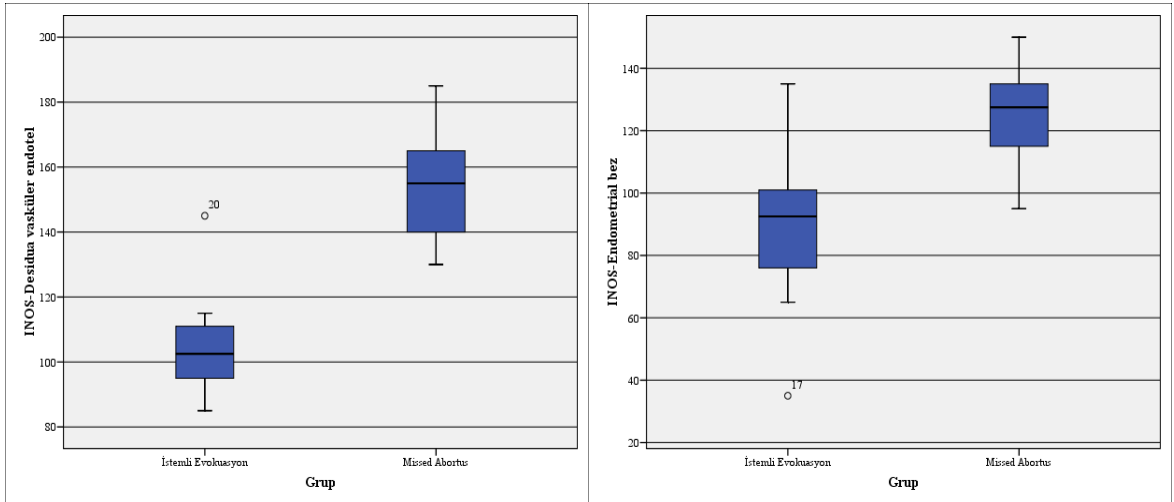
Grafik 7. İstemli evokasyon grubu eNOS plasenta sitotrofoblast ve stromal hücre değişkenlerinin median değerleri sırasıyla; median 35 (min 20, max 75) ve median 23 (min 15, max 40), Missed abortus grubunda eNOS plasenta sitotrofoblast ve stromal hücre değişkenlerinin median değerleri sırasıyla; median 16 (min 10, max 30) ve median 30 (min 20, max 34) olarak bulundu. Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.005$ ve $p < 0.05$).



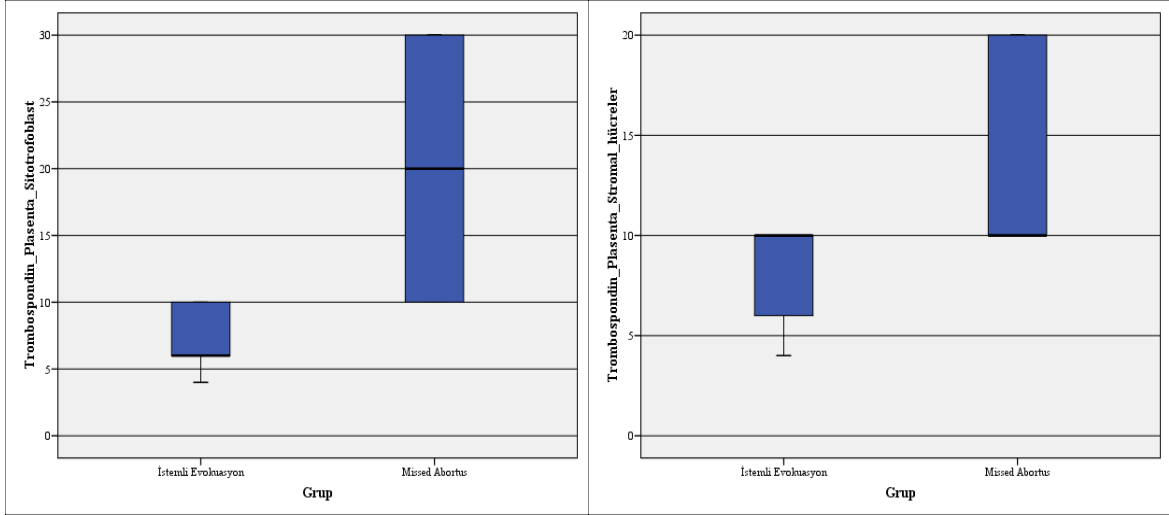
Grafik 8. İstemli evokasyon grubu eNOS desidual stromal hücreler ve desidual vasküler endotel hücrelerin median değerleri sırasıyla; median 62,5 (min 20, max 90) ve median 55 (min 20, max 80), Missed abortus grubunda eNOS desidual stromal hücreler ve desidual vasküler endotel hücrelerin median değerleri sırasıyla; median 34 (min 26, max 40) ve median 34 (min 30, max 80). Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.005$).



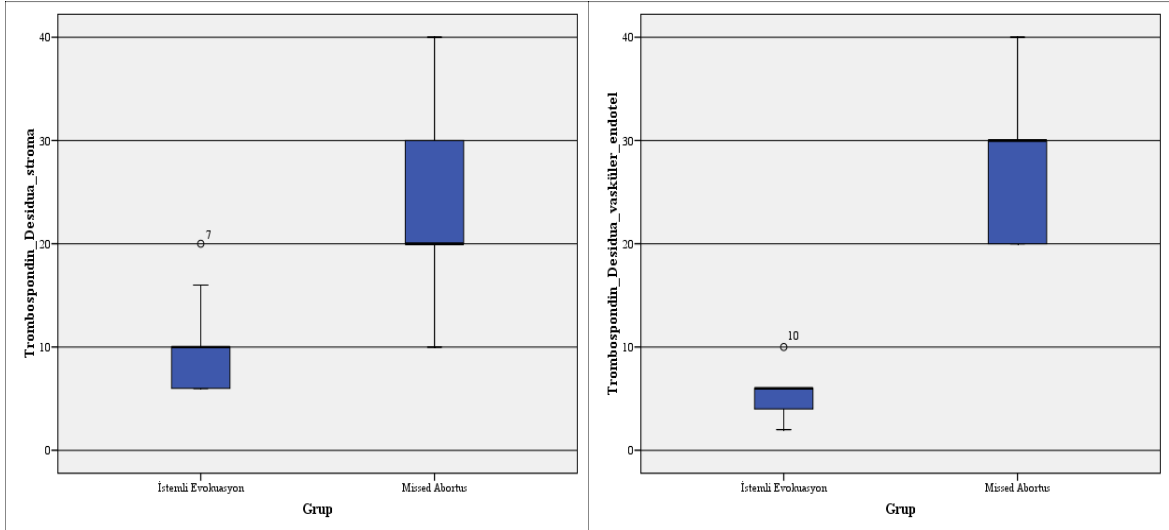
Grafik 9. İstemli evkuasyon grubu iNOS plasenta sitotrofoblast ve stromal hücre değişkenlerinin median değerleri sırasıyla; median 120,5 (min 75, max 135) ve median 70,5 (min 55, max 82), Missed abortus grubunda iNOS plasenta sitotrofoblast ve vasküler endotel değişkenlerinin median değerleri sırasıyla; median 125 (min 100, max 140) ve median 120 (min 85, max 130) olarak bulundu. Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).



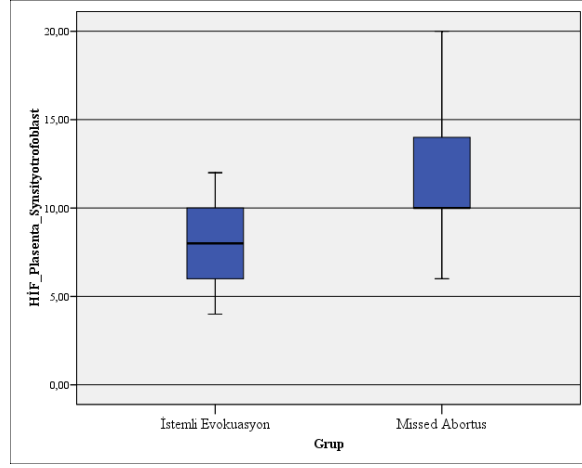
Grafik 10. İstemli evkuasyon grubu iNOS desidual vasküler endotel hücreler ve desidual endometrial bezlerin değişkenlerinin median değerleri sırasıyla; median 117,5 (min 85, max 145) ve median 92,5 (min 35, max 135), Missed abortus grubunda iNOS desidual vasküler endotel hücreler ve desidual endometrial bezlerin değişkenlerinin median değerleri sırasıyla; median 155 (min 130, max 185) ve median 127,5 (min 95, max 150) olarak bulundu. Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.005$).



Grafik 11. İstemi evkuasyon grubu Trombospondin plasenta sitotrofoblast ve stromal hücre değişkenlerinin median değerleri sırasıyla; median 6 (min 4, max 10) ve median 10 (min 4, max 10), Missed abortus grubunda Trombospondin plasenta sitotrofoblast ve stromal hücre değişkenlerinin median değerleri sırasıyla; median 20 (min 10, max 30) ve median 10 (min 10, max 20) olarak bulundu. Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0.005$ ve $p<0.05$).



Grafik 12. İstemi evkuasyon grubu trombospondin desidual stromal hücreler ve desidual vasküler endotel hücreler değişkenlerinin median değerleri sırasıyla; median 10 (min 6, max 20) ve median 6 (min 2, max 10), Missed abortus grubunda Trombospondin desidual stromal hücreler ve desidual vasküler endotel hücreler değişkenlerinin median değerleri sırasıyla; median 20 (min 10, max 40) ve median 30 (min 20, max 40) ve olarak bulundu. Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0.005$).



Grafik 13. İstemli evakuasyon grubu HIF plasenta sitotrofoblast değişkeninin median değeri; median 6 (min 4, max 10), Missed abortus grubunda HIF plasenta sitotrofoblast değişkeninin median değeri; median 6 (min 4, max 16). Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

8. KAYNAKLAR

1. Cunningham FG, MacDonald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap L, Hankins GDV, Clark SL. Williams Obstetrics 20 th edition
2. Steven G. Gabbe, Jennifer R. Niebyl, Joe Leigh Simpson, Obstetrics, Normal and Problem Pregnancies. 5 th edition, 24:628
3. Simpson JL, Carson SA: Causes of fetal loss. In Gray R, Leridon L, Spira F (eds): Symposium on Biological and Demographic Determinants of Human Reproduction. Oxford, Oxford University Press, 1993, p287
4. John O. Schorge, MD. Joseph I. Schaffer, MD. Lisa M. Halvorson, MD. Barbara L. Hoffman, MD. Karen D. Bradshaw, MD. F. Gary Cunningham, MD. Williams Gynecology, 2010, 6:141-142
5. Simpson JL, Mills JL, Holmes LB, et al: Low fetal loss rates after ultrasound-proved viability in early pregnancy. JAMA 258:2555, 1987.
6. Wilson RD, Kendrick V, Wittmann BK, et al: Risk of spontaneous abortion in ultrasonically normal pregnancies. Lancet 2:920, 1984.
7. Hoesli IM, Walter-Gobel I, Tercanli S, et al: Spontaneous fetal loss rates in anon-selected population. Am J Med Genet 100:106, 2001.
8. Steven G. Gabbe, Jennifer R. Niebyl, Joe Leigh Simpson, Obstetrics, Normal and Problem Pregnancies. 5 th edition, 24:629
9. Allure R. Basement membranes: Structure, assembly and role in tumor angiogenesis. Nat Rev Cancer 2003; 3: 422- 433.
10. Haroon ZA, Peters KG, Greenberg CS, Teicher BA et al. Angiogenesis and Oxygen Transport in Solid Tumors. Antiangiogenic Agents in Cancer Therapy. Totowa, Humana Press; 1999. 3- 21.
11. Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, Keshet E. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. J Neurosci. 1995; 15: 4738 - 4747.
12. Turhan MS. Meme tümörlü hastalarda vasküler endotelial büyüme faktörü, nitrik oksit ve ürokinaz plazminojen aktivator. İÜ Cerrahpasa Tıp Fakültesi Tıpta Uzmanlık tezi, 2004.
13. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells visa the lymphatics. Nat Med 2001; 7: 186-91.

14. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis.
15. Kliche S, Waltenberger J. VEGF receptor signaling and endothelial function. *JUBMB Life* 2001; 52(1-2): 61-6.
16. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Trends in Cardiovascular Medicine* 1993; 3:244 –250.
17. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380:435– 439.
18. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O’Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380:439–442.
19. Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: An overview. *EXS Regul Angiogenesis*. 1997; 79: 1–7.
20. Intaglietta M, Johnson PC, Winslow RM. Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc Res*. 1996; 32: 632–643.
21. Koukourakis MI, Giatromalonaki A, Sivridis E, et al. Hypoxia-activated tumor pathways of angiogenesis and pH regulation independent of anemia in head-and-neck cancer. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2004; 59: 67-71.
22. Peter U, Uzzo NJ, Chu CR et al. Tonic activation of hypoxia inducible factor 1 alpha in avascular articular cartilage and implications for metabolic homeostasis. *Arthritis & Rheumatism* 2005; 52:3181-3191.
23. Chen WT, Huang CJ, Wu MT, Yang SF, Su YC, Chai CY: Hypoxia-inducible Factor-1 α is Associated with Risk of Aggressive Behavior and Tumor Angiogenesis in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Japanese J Clin Oncol* 2005; 35(4):207-213
24. Auerbach W, Auerbach R. Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacol Ther* 1994;63:265-311.
25. Ohta Y, Shridhar V, GP Kalemkerian et al. Thrombospondin-1 expression and clinical implications in malignant pleural mesothelioma. *Cancer* 1999; 85 :2570-2576.
26. Hu CJ, Chen SD, Yang D Y et al. Promoter region methylation and reduced expression of thrombospondin-1 after oxygen–glucose deprivation in murine cerebral endothelial cells. *J Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2006; 26: 1519–1526.
27. Rodriguez - Manzanique JC, Lane TF, Ortega MA, et al. Thrombospondin-1

suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98(22): 12485-12490.

28. Yasuyoshi M, Shigehiko K, Kousuke T et al. Expression of thrombospondin derived 4N1K peptide-containing proteins in renal cell carcinoma tissues is associated with a decrease in tumor growth and angiogenesis . Clin Cancer Res 2003; 9 :1734 - 1740.

29. Harlap S , Shiono PH:Alcohol, smoking and incidence of spontaneous abortions in the first and second trimester. Lancet 2:173,1980

30. Wilcox AH, Weinberg CR, O'Connor JF. Incidence of early loss of pregnancy. N.Engl.j Med 1998;319:189-194

31. Harlap S ,Shiono PH, Ramcharan S: A life table of spontaneous abortions and the effects of age, parity and other variables: human Embryonic and fetal death.Academic pres,1980, p 145

32. Kişnişci HA, Gökşin E, Durukan T, Üstay K, Ayhan A, Gürgan T, Önderoğlu LS. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi

33. Atasü T. Şahmay S. Jinekoloji 2. baskı 2001 37:533-545

34. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. Cilt 1. 1991 Merk yayıncılık İstanbul. 1992;747-60

35. Scoott JR, Disaia PJ, Hammond CB, Spellacy WN. Danforth's Obstetrics and Gynecology.7 th edition 10:179

36. Boue J, Boue A, Lazar P: Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous abortions. Teratology 1995;12:11-16

37. Blummenfeld Z, Brenner B: Thrombophilia associated pregnancy wastage. Fertil steril 72:765,1999

38. Stephenson MD. Frequency of factors associated with habituel abortion in 197 couples. Fertil Steril 1996; 66:24-29

39. Regan L, Braude PR, Trembath PL, influence of past reproductive performance on risk of spontaneus abortion, Br med J 1989; 299:541-545

40. Stirrat GM, Reccurrent miscarriage, clinical associations, causes and management; lancet 336:728,1990

41. Bulletti C, Flamigni C ,Giacomucci E, Reproductive failure due to spontaneus abortion Reccurrent miscarriage, Hum reprod update 2:118,1996

42. Jonathan S. Berek.Novak's Gynecology 13. Edition

43. Maurilus GB, Effect of aging on fertility and pregnancy. Seminars reprod endocrinol.

9:165,1991.

44. Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Cristens P, Olsen J, Melbye M, Maternal age and fetal loss: *BR Med J* 320:1708,2000.
45. Sperroff L, Glass RH, Kase NG, *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 5th edition
46. de Crispigny LC, Cooper D, McKenna M: Early detection of intrauterine pregnancy with ultrasound. *J Ultrasound Med* /:7,1988
47. Transvaginal sonography in the first trimester:embryology, anatomy, and hCG correlation. *Semin ultrasound CT MRI* 1990;11:12-21
48. Peter W. Callen *Ultrasonography in obstetrics and gynecology* 6:73 1997
49. Kadar N, Caldwell BV, Romera R. A method of screening for ectopic pregnancy and its indications. *Obstet gynecol* 1981;58:162-165
50. Cowan BD, Vandermolen DT, long CA, et el. receiver operator characteristics, efficiency analysis, and predictive value of serum progesterone concentration as a test for abnormal gestations. *Am J obstet gynecol* 1992;166:1729-1734
51. Jacobs PA, Hassold TJ: The origin of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion. In Porter IH, Hook EB (eds): *Human embryonic and fetal death*. Newyork, academic pres, 1980,289
52. 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* 18:1724,2003
53. Ward KJ, Genetic factor in recurrent pregnancy loss, *Semin Reprod Med* 18:425,2000
54. Temmerman M, Lopita MI, Sanghvi HC, Sinei SK, Plummer FA, Piot P: The role of maternal syphilis, gonorrhea and HIV-1 infections in spontaneous abortion. *Int JSTD AIDS* 3:418,1992
55. Witkin SS, Ledger WJ, Antibodies to chlamydia trachomatis in sera of women with recurrent spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol* 167:135,1992
56. Osser S, Persson K, Chlamydial antibodies in women who suffer miscarriage, *Br J Obstet Gynecol* 103:137,1996
57. Quinn PA, Shewchuk AB, Shuber J, Lie KI, Ryan E, Sheu M, Chipman MI, serologic evidence of ureaplasma urealyticuminfection in women with spontaneous pregnancy loss, *Am J Obstet Gynecol* 145:245.1983
58. Donders GG, Van Bulck B, Caudron J, Londers L, Vereecken A, spitz B, Relationship of bacterial vaginosis and mycoplasmas to the risk of spontaneous abortion, *Am J Obstet*

Gynecol 183:431,2000

59. Oakeshott P, Hay P, Hay S, Steinke F, Rink E, Kerry S, association between bacterial vaginosis or chlamydial infection and miscarriage before 16 weeks gestation: Prospective community based cohort study, *Br Med, J* 325:1334,2002
60. Abalowich M, Gutierrez S, Alceraz G, Maccallini G, Garcia A, Levalle O. Overt and subclinical hipotiroidism complicating pregnancy. *Thyroid* 12:63, 2002
61. Kutteh WH, YetmanDL, Carr AC et al. Increased prevelance of antitiroid antibodies identified in women undergoing assisted reproduction. *Fertil Steril* 1999;71:843-848
62. Milis JE, Simpson JL, Driscoll SG, Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin dependent diyabetic women whose pregnancies were identified withihn 21 days of conception, *New Engl J, Med* 319:1617,1988.
63. Sutherland HW, Pritchard CW, Increased incidence of spontaneous abortion in pregnancies complicated by maternal diabetes mellitus, *Am Obstet Gynecol* 155:135,1986
64. Regan L, Owen EJ, Jacops HS, hypersecretion of luteinizing hormone, infertility, and miscarriage, *lancet* 336:1141,199
65. Homburg R, Armar NA, Eshel A, Adams J, Jacobs HS, Influence of serum luteinising hormone concentrations on ovulation, conception and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome, *Br Med J* 297:1024, 1988
66. Armstrong BG, Mcdonald AD, sloan M, Cigarette alcohol and cofee consumption and spontaneous abortion
67. Hughes EG, Brennan BG, Does cigarette smoking impair natural or assisted fecundity, *Fertil Steril* 66:679, 1996
68. Floyd RL, Decoufle P, Hungerfort DW: Alcohol used prior to pregnancy recognition. *Am J Prev Med.* 17:101,1999
69. Kline J, Stein ZA, Shrou P, Susser M: drinking during pregnancy and spontaneous abortion. *Lancet* 2:176,1980
70. Dlugosz L, Belanger K, Hellenbrand K, Holford TR, Leaderer B, Bracken MB, Maternal caffeine consumption and spontaneous abortion; a prospective cohort study, *Epidemiology* 7:250,1996
71. Rasch V, cigarette, alcohol and caffeine consumption: risk factors for spontaneous abortion, *Acta Obstet Gynecol Scand* 82:182,2003
72. Parazzini F, Chatenoud L, Di cintio E, Mezzopane R, Surace M, Zanconato G, Fedele L, Benzi G, coffee consumption and the risk of hospitalized miscarriage before 12 weeks of gestation, *Hum Reprod* 13:2286, 1998

73. McMartin KI, Chu M, Kopecky E, Eniarson TR, Koren G, Pregnancy outcome following maternal organic solvent exposure: a meta-analysis of epidemiologic studies, *AM J Ind Med* 34:288, 1998
74. Gardella JR, Hill JA, 3rd, Environmental toxins associated with recurrent pregnancy loss, *semin Reprod Med* 18:40, 2000
75. Schnorr TM, Grajewski BA, Hornung RW, Thun MJ, Egeland GM, Murray WE, Conover DL, Halperin WE, video display terminals and the risk of spontaneous abortion. *N Engl J Med* 324:727,1991
76. Brent RL, Utilization of developmental basic science principals in the evaluation of reproductive risks from pre and post conception environmental radiation exposures. *Teratology* 59:182,1999
77. Hall EJ: Scientific view of low level radiation risks .*Radiographics* 11:509,1991
78. Leible S, Munoz H, Walton R, Sabaj V, Cumsille F, Sepulveda W, Uterine artery blood flow velocity waveforms in pregnant women with mullerian duct anomaly: a biologic model for uteroplacental insufficiency, *Am Obstet Gynecol* 178:1048,1998.
79. Propst AM, Hill JA, 3rd; Anatomic factors associated with recurrent pregnancy loss, *Semin Reprod Med* 18:341,2000
80. Golan A, Langer R, Wexler S, Segev E, Niv D, David MP, Cervical cerclageits role in the pregnant anomalous uterus, *Int J Fertil* 35:164, 1990.
81. Blum M, Prevention of spontaneous abortion by cervical suture of the malformed uterus, *Int Surg* 62:213,1977.
82. Jurkovic D, Gruboeck K, Tailor A, Nicolaides KH, Ultrasound screening for congenital uterine anomalies, *Br J Ostet Gynecol* 104:1320,1997.
83. Simon C, Martinez L, Pardo F, Tortajada M, Pellicer A, Mullerian defects in women with normal reproductive outcome, *Fertil Steril* 56:1192,1991
84. Raga F, Bauset C, Remohi J, Bonilla- Musoles F, Simon C, Pellicer A, Reproductive impact of congenital müllerian anomalies, *Hum reprod* 12:2277, 1997
85. Jun SH, Ginsburg ES, Racowsky C, Wise LAi Hornstein MD, Uterine leiomyomas and their effect on in vitro fertilization outcome: a retrospective study, *J Asist Reprod Genet* 18:139,2001.
86. Surrey ES, Lietz AK, Schoolcraft WB, Impact of intramural leiomyomata in patients with a normal endometriyal cavity on in vitro fertilization-embryo transfer cycle outcome, *Fertil Steril* 75:405,2001.
87. Goldernberg M, Sivan E, Sharabi Z, Bider D, Rabinovici J, Seidman DS, outcome of

- hysteroscopic resection of submucous myomas for infertility, *Fertil Steril* 64:714,1995
88. Giatras K, Berkeley As, Noyes N, Licciardi F, Lolis D, Grifo JA, Fertility after hysteroscopic resection of submucous myomas, *J am Assoc Gynecol Laparosc* 6.155, 1999
 89. Tafuri A, Alferink J, Moller P, et al. T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science* 1995:270630.
 90. Cunningham FG, MacDonald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap L, Hankins GDV, Clark SL. *Williams Obstetrics* 21th edition
 91. Lockshin MD, Sammaritano LR, Schwartzman S. Validation of the sapparo criteria for antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2000;43:440-443
 92. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis rheum* 1999;42:1309-1311
 93. Quere I, Bellet H, Hoffet M, Janbon C, Mares P, Gris JC. A woman with five consecutive fetal deaths: case report and retrospective analysis of hyperhomocysteinemia prevalence in 100 consecutive women with recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 1998; 69: 152-4.
 94. Coumans ABC, Huijgens PC, Jacobs C, Schats R, De Vries JIP, Van Pumpus MG: Haemostatic and metabolic abnormalities in women with unexplained recurrent abortion. *Hum Reprod* 1999;14:211-4
 95. Aerts LAGJM, Klaasboer HH, Postma NS, Pertijs JCLM, Eskes TKAB: Stereospecific in vitro embryotoxicity of L-homocysteine in pre- and post-implantation rodent embryos. *Toxicol in vitro*. in press.
 96. Dibbens JA, Miller DL, Damert A et al. Hypoxic regulations of vascular endothelial growth factor mRNA stability requires the cooperation multiple RNA elements. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 907-19.
 97. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669–76.
 98. Dvorak HF. How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am J Pathol* 2003; 162: 1747–57.
 99. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246:1306-309.
 100. Hudlicka O, *Angiogenesis. The growth of the vascular system.* 1986, London: Academic press.
 101. Fernandez PM, Rickles FR. Tissue factor and angiogenesis in cancer. *Curr Opin*

Hematol 2000; 9: 401-406.

102. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Structure and Function* 2001;26:25-35.

103. Ferrara N. VEGF: An update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11: 517-24.

104. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1029-39.

105. Laka KP, Chakraborty C. Role of Nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression. *Lancet Oncol* 2001; 2: 149-55

106. Noiri E, Lee E, Testa J et al. Podokinesis in endothelial cell migration: Role of nitric oxide. *Am J Physiol* 1998; 43: 236-44.

107. Bates DO, Hillman NJ, Williams B et al. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat* 2002; 200: 587-597.

108. Longo R, Sarmiento R, Fanelli M et al. Anti-angiogenic therapy: Rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis* 2002; 5: 237-256.

109. Otrrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2007;38:258-268.

110. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A and Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996;87:3336-3343.

111. Chen WS, Kitson RP, Goldfarb RH. Modulation of human NK cell lines by vascular endothelial growth factor and receptor VEGFR-1 (FLT-1). *In Vivo* 2002;16:439-445.

112. Gille H, Kowalski J, Li B, LeCounter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N and Ferrara N. Analysis of Biological Effects and Signaling Properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:3222-3230.

113. Ekinci D. Metronomik tedavilerde ‘VEGF’ ve diğer parametrelerin klinik gidişi izlemedeki rolü. Yüksek lisans tezi, 2008.

114. Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999;9:211-20.

115. Gutierrez M, Giaccone G. Antiangiogenic therapy in nonsmall cell lung cancer. *Curr Opin Oncol* 2008;20:176-82.

116. Baltacı S, Orhan D, Göğüş Ç et al. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in renal cell carcinoma and their relationship

with multifocality. *Eur Urol* 2003; 44 : 760-81.

117. Yang QW, Liu S, Tian Y et al. Methylation-associated silencing of the Thrombospondin-1 gene in human neuroblastoma. *Cancer Res* 2003; 63: 6299-6310.

118. Ioachim E, Michael MC, Salmas M, et al. Thrombospondin-1 expression in urothelial carcinoma: prognostic significance and association with p53 alterations, tumour angiogenesis and extracellular matrix components. *BMC Cancer* 2006; 6:140- 147.

119. Grossfeld GD, Carroll PR, Lindeman N et al. Thrombospondin-1 expression in patients with pathologic stage T3 prostate cancer undergoing radical prostatectomy: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *Urology* 2002; 59:97-102 .

120. Yeo EJ, Chun YS, Park JW, et al. New Anticancer Strategies Targeting HIF-1. *Biochem. Pharmacol* 2004; 68: 1061-1069.

121. Maxwell PH. The HIF Pathway in Cancer, *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2005;16: 523-30

122. Semenza GL. Expression of Hypoxia-İndukleyen Factor1: Mechanismsand Consequences. *Biochem Pharmacol.* 2000; 59: 47-53.

123. Apaydın Isıl: Meme kanseri ile hipoksi ile induklenen (HIF)-1 alfa gen polimorfizmleri ile ilişkisinin belirlenmesi. Doktora tezi, Gazi Univ. Sağlık Bilimleri Enst. Ankara 2007, s.7-13.

124. de Wit R, Pawinsky A, Stoter G et al. EORTC phase II study of daily oral linomide in metastatic renal cell carcinoma patients with good prognostic factors. *Eur J Cancer* 1997; 33:493-5.

125. Diaz-Gonzalez JA, Russell J, Rouzaut A et al. Targeting hypoxia and angiogenesis through HIF-1alpha Inhibition. *Cancer Biol Ther* 2005; 4:1055-62.

126. Ho T, Rajkumar V, Ponticos M et al. Increased endogenous angiogenic response and hypoxia- inducible factor-1 alfa in human cricital limb ischemia. *J Vasc Surg* 2006; 43: 125-33.

127. Ferrara N and Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Reviews* 1997;18:4-25.

128. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 1997;277(5332):1669e72.

129. Turner KJ, Moore JW, Jones A et al. Expression of hypoxia inducible factors in human renal cell cancer: relationship to angiogenesis and to the von hippel lindau gene mutation. *Cancer Res* 2002; 62: 2957-61.

130. Canda AE, Kırkalı Z. Current management of renal cell carcinoma targeted therapy. *J Urology* 2006; 3: 1-14.
131. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH: Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994;120:227-237.
132. Xu WM, Liu LZ: Nitric oxide: from a mysterious labile factor to the molecule of the Nobel Prize. Recent progress in nitric oxide research. *Cell Res* 1998;8:251-258.
133. Çelik R. Endotelial Nitrik Oksid Sentaz (eNOS) Gen Polimorfizmi ile Miyokard infarktüs (MI) iliksisinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Seçuk Univ. Sağlık Bilimleri Enst. Tıbbi Genetik AD. Konya, 2007 s.5-11.
134. Burnett AL, Ricker DD, Chamness SL, Maguire MP, Crone JK, Bredt DS, Snyder SH, Chang TS: Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of the male rat. *Biol Reprod* 1995;52:1-7.
135. Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ: Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med* 1992;326:90-94.
136. Marletta MA: Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993;268:12231-12234.
137. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.
138. Hegesh E, Shiloah J: Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. *Clin Chim Acta* 1982;125:107-115.
139. McCall TB, Boughton-Smith NK, Palmer RM, Whittle BJ, Moncada S: Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J* 1989;261:293-296.
140. Knowles RG, Moncada S: Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298 (Pt 2): 249-258.
141. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, et al: Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2604-9, 2001
142. Brooks SE, Gu X, Samuel S, et al: Reduced severity of oxygen-induced retinopathy in eNOS-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:222-8, 2001
143. Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman E, Laird S. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Hum Reprod Update* 2002;8:463-481.)

144. Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG, Nisula BC. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1988;319:189–194.
145. Harry LE, Paleolog EM. From the cradle to the clinic: VEGF in developmental, physiological, and pathological angiogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003;69:363–374.
146. Vuorela P, Helseke S, Hornig C, Alitalo K, Weich H, Halmesmaki E. Amniotic fluid – soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000;95:353–357.
147. Vuorela P, Carpén O, Tulppala M, Halmesmäki E. VEGF, its receptors and the tie receptors in recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod*. 2000 Mar;6(3):276-82.
148. Carolyn B Coulam, Rajasingham S Jeyendran. *American Journal of Reproductive Immunology* 59 (2008) 301–305.
149. Dumont, D., Jussila, L., Taipale, J. et al. (1998) Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science*, 282, 946–949.)
150. Nardo LG. et al. Vascular endothelial growth factor expression in the endometrium during the menstrual cycle, implantation window and early pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2005 Aug;17(4):419-23.
151. Meegdes BH, Ingenhoes R, Peeters LL, Exalto N. Early pregnancy wastage: relationship between chorionic vascularization and embryonic development. *Fertil Steril* 1988;49: 216–220.
152. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 2000; 55: 15-35.
153. Hiratsuka S, Nakao K, Nakamura K, Katsuki M, Maru Y and Shibuya M. Membrane fixation of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligand-binding domain is important for vasculogenesis and angiogenesis in mice. *Mol Cell Biol*. 2005; 25: 346-54.
154. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;376: 62-6.
155. Muttukrishna S, Swer M, Suri S, Jamil A, Calleja-Agius J, et al. (2011) Soluble Flt-1 and PlGF: New Markers of Early Pregnancy Loss? *PLoS ONE* 6(3): e18041. doi:10.1371/journal.pone.0018041
156. Fong GH, Zhang L, Bryce DM and Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development*

1999;126:3015-25.

157. J. Patel, K. Landers, R.H. Mortimer, K. Richard. Regulation of Hypoxia Inducible Factors (HIF) in Hypoxia and Normoxia During Placental Development *Placenta* 31 (2010) 951-957

158. Ietta F, Wu Y, Winter J, Xu J, Wang J, Post M, Caniggia I. *Biol Reprod.* 2006 Jul;75(1):112-21. Epub 2006 Apr 12.

159. Cowden Dahl KD, Fryer BH, Mack FA, Compornolle V, Maltepe E, Adelman DM, Carmeliet P, Simon MC. *Mol Cell Biol.* 2005 Dec;25(23):10479-91.

160. Sun SG, Shen N, Zheng YH, Shang T. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2006 Jul;41(7):440-4.

161. Telfer J.F., Irvine G.A., Kohnen, G. et al. (1997) Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in non-pregnant and decidualized human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.*, 3, 69–75.

162. Ota H., Igarashi S., Hatazawa J. et al. (1998) Endothelial nitric oxide synthase in the endometrium during the menstrual cycle in patients with endometriosis and adenomyosis. *Fertil. Steril.*, 69, 303–308.

163. Tschugguel W, Schneeberger C, Unfried G. et al. (1998) Induction of inducible nitric oxide synthase expression in human secretory endometrium. *Hum. Reprod.* 13,436–444.

164. Telfer, J.F., Lyall, F., Norman, J.E. et al. (1995) Identification of nitric oxide synthase in human uterus. *Hum. Reprod.*, 10, 19–23.

165. Sladek S.M., Regenstein, A.C., Lykins, D. and Roberts, J.M. (1993) Nitric oxide synthase activity in pregnant rabbit. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 169, 1285–1291.

166. Figueroa J.P. and Massmann G.A. (1995) Estrogen increases nitric-oxide synthase activity in the uterus of nonpregnant sheep. *Am. J. Obstet. Gynecol.*

167. Huang J., Roby K.F., Pace J.L. et al. (1995) Cellular localization and hormonal regulation of inducible nitric oxide synthase in cycling Mouse uterus. *J. Leukocyte Biol.* 57, 27–35. 173, 1539–1545.

168. Natuzzi E.S., Ursell P.C., Harrison M. et al. (1993) Nitric oxide synthase activity decreases at parturition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194, 1–8.

169. E. K. Haddad, A.J. Duclos, and M. G. Baines Early Embryo Loss Is Associated with Local Production of Nitric Oxide by Decidual Mononuclear Cells *J. Exp. Med.* Volume 182 October 1995 1143-1152

170. The Role of TSP-1 on Decidual Macrophages Involved in the Susceptibility to Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion Jin Y, Wang X, Xiao Y, Lv C, Ding C, Lin

Q. Am J Reprod Immunol. 2009 Mar;61(3):253- 0.

171. Edwards AK, van den Heuvel MJ, Wessels JM, Lamarre J, Croy BA, Tayade C. Expression of angiogenic basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, thrombospondin-1 and their receptors at the porcine maternal-fetal interface. Reprod Biol Endocrinol. 2011 Jan 17;9:5.