



T.C.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI OLAN HASTALARDA  
GLUTATYON S-TRANSFERAZ (GST) POLİMORFİZMİNİN  
BİR RİSK FAKTÖRÜ OLARAK ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Nejmiye AKKUŞ**  
**UZMANLIK TEZİ**  
**Olarak Hazırlanmıştır**

**SİVAS**  
**2015**



**T.C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI OLAN HASTALARDA  
GLUTATYON S-TRANSFERAZ (GST) POLİMORFİZMİNİN  
BİR RİSK FAKTÖRÜ OLARAK ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Nejmiye AKKUŞ  
UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**Yrd. Doç Dr. Hande KÜÇÜK KURTULGAN  
DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ**

**SİVAS  
2015**



Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 10/02/2010 tarih ve 2010 / 1-2 sayılı kararı ile uygun görülen Tıpta Uzmanlık Tez Yazım Yönergesine göre hazırlanmıştır.

**ONAY SAYFASI**

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

**İmza****Üye: Prof. Dr. İlhan SEZGİN****Üye: Prof. Dr. Munis Dünder****Üye: Yrd. Doç. Dr. Hande KÜÇÜK KURTULGAN**

Bu tez, .....tarih ve .....sayılı Yönetim Kurulu Kararı ile belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

**Prof.Dr. Okay BULUT****Tıp Fakültesi Dekanı**

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın aşamalarında değerli görüş ve katkılarından dolayı tez danışmanım ve hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hande KÜÇÜK KURTULGAN'a,

Eğitimime katkılarından dolayı hocam Sayın Prof. Dr. İlhan SEZGİN'e ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Malik Ejder YILDIRIM'a,

Tezimin labaratuvar çalışmalarının yapılmasında ki desteklerinden dolayı Bio. Gökhan BAĞCI'ya,

Gösterdikleri gülyüz ve yakınlıklarından dolayı tüm bölüm arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme, eşim Yasin AKKUŞ'a ve çocuklarım Burak ve Elif'e

En içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

### **Tekrarlayan Gebelik Kaybı Olan Hastalarda Glutasyon S-Transferaz (GST) Polimorfizminin Bir Risk Faktörü Olarak Araştırılması, Nejmiye AKKUŞ, Tıbbi Genetik ABD, Sivas, 2015**

Tekrarlayan gebelik kaybının(TGK) toplumdaki sıklığı %3-5'dir. Açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıplarının sebebinin % 80'in üzerinde genetik nedenli olduğu ileri sürülmektedir

GST genleri tarafından kodlanan glutasyon s-transferaz enzimleri, çevresel kaynaklı kimyasallar ve doğal olarak oluşan birçok metabolitin detoksifikasyonundan sorumludurlar. Yapılan çalışmalarda farklı toplumlarda farklı polimorfizmlerin gebelik kaybı riskini arttırdığı görülmektedir. Literatür taramasında Türk toplumunda tekrarlı gebelik kaybı ve GST gen polimorfizmi ile ilişkiyi araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, Türk toplumunda TGK patogenezinde bir risk faktörü olarak GST gen polimorfizmlerini araştırmaktır.

Bu çalışmaya Tıbbi Genetik Polikliniğine başvuran 107 TGK hastası ile sağlıklı doğum yapmış, düşük öyküsü olmayan 107 kişi kontrol grubuna dahil edilmiştir. Bu olgularda GSTM1 ve GSTT1 gen polimorfizmlerini multipleks PCR, GSTP1 gen polimorfizmi RFLP yöntemi ile araştırıldı.

GSTT1 null genotipi ( $X^2=4,74;P=0,029$ ), GSTT1/GSM1 null genotip( $X^2=3,333;P=0,047$ ) genotipleri hastalarda istatistiksel olarak anlamlı bulundu. GSTM1 null genotipi( $X^2=3,326;P=0,068$ ), GSTT1/ GSTP1, GSTM1/GSTP1 gen polimorfizmlerine bakıldığında istatistiksel bir anlam tespit edilmedi. Bu çalışma GST gen polimorfizmlerinin TGK etyolojisinde bir risk faktörü olabileceğini göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Tekrarlayan gebelik kaybı, glutasyon s-transferaz, polimorfizm

## ABSTRACT

### **Investigation of glutathione s-transferase (GST) polymorphism as a risk factor in patients with recurrent pregnancy loss (RPL), Nejmiye AKKUŞ,**

**The Department Of Medical Genetic, Sivas, 2015**

Risk of having recurrent miscarriage in society is %3-5. It's claimed that more than %80 of those unexplained recurrent miscarriage cases are genetic-based.

Glutathione s-transferase enzymes which are coded by GST genes are responsible for environment based chemicals and many naturally created metabolite detoxification. It can be seen according to the researches that different polymorphisms increase the risk rates in different population.

When we reviewed literature, we found out that there was no research examining relation between recurrent miscarriage and GST gene polymorphism in Turkish population. With this research, it's the first time our society is evaluated. Purpose of our research to investigate GST gene polymorphism within the RPL pathogenesis in Turkish population.

In this study, blood samples of 107 patients with RPL were analysed who consulted our clinic. Our control group consisted of 107 individuals gave healthy birth without history of miscarriage. GSTM1 and GSTT1 polymorphism was examined via multiplex PCR and GSTP1 and gene polymorphism was examined via RFLP methods in our cases.

GSTT1 null genotype ( $X^2=4,74;P=0,043$ ), GSTM1 null genotype ( $X^2=3,326;P=0,046$ ), GSTT1/GSTM1 null genotype ( $X^2=3,333;P=0,047$ ) genotypes were statistically significant in our patients. When GSTT1/GSTP1 gene polymorphisms and GSTM1/GSTP1 gene polymorphisms examined, statistically no significance detected. GST gene polymorphisms within RPL etiology was detected as a risk factor according to results of our research, in coherence with the literature.

**Keywords:** recurrent miscarriage, Glutathione S-Transferase polymorphism

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI .....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT .....	vi
SİMGE VE KISALTMALAR .....	ix
ŞEKİLLER.....	x
TABLolar .....	xi
1.GİRİŞ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	4
2.1.Tekrarlayan Gebelik Kaybı .....	4
2.1.1.Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Etiyoloji.....	4
2.1.2 Epidemiyolojik Faktörler.....	6
2.1.3. Jinekolojik Nedenler .....	7
2.1.4. Endokrin Faktörler.....	7
2.1.5. Genetik Faktörler .....	9
2.1.6. Otoimmün Faktörler .....	12
2.1.7. Hematolojik Nedenler.....	15
2.2. Blastokistin İmplantasyonu .....	23
2.3. Plasental Histopatoloji.....	25
2.4. Tekrarlayan Gebelik Kaybında Tarama .....	26
2.5. Genetik Polimorfizm .....	26
2.5.1. Tanım.....	26
2.6 .Glutasyon .....	29
2.6.1 Glutasyon ve Ksenobiyotik İlişkisi .....	29
2.6.2 Glutasyon-S-Transferaz Enzimleri.....	34
2.6.3 GST Polimorfizminin Kaynağı.....	38
3.İSTATİSTİKSEL ANALİZ .....	40
4.MATERYAL VE YÖNTEM .....	41
4.1. Kullanılan Cihaz ve Aletler .....	41
4.2. Periferik Kandan Total Genomik DNA İzolasyonu .....	42



4.3 GST T1 ve M1 Genotiplerinin Multipleks PCR Yöntemi İle Saptanması.....	43
4.4 Agaroz Jel Elektroforezi.....	45
4.5 GST P1 ekzon 5 İle 105 Val Polimorfizminin PCR-RFLP Yöntemi ile Tayini .	45
5. BULGULAR.....	48
6. TARTIŞMA .....	55
7. SONUÇLAR .....	64
KAYNAKLAR .....	65



## SİMGE VE KISALTMALAR

- TGK:** Tekrarlayan gebelik kayıpları  
**EGK:** Erken gebelik kaybı  
**PCR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
**RFLP:** Restriksiyon parça uzunluk polimorfizm  
**VNTR:** Variable number tandem repeat  
**WHO:** World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)  
**Hyc:** Homosistein  
**MTHFR:** Metil Tetrahidrofolat Redüktaz  
**PCOS:** Polikistik Over Sendromu  
**LH:** Luteinizan Hormon  
**APA:** Anti Fosfolipid Antikor  
**ACA:** Antikardiolipin Antikor  
**LA:** Lupus Antikoagulanı  
**ANA:** Anti nükleer antikor  
**AT:** Antitrombin  
**PC:** Protein C  
**APC:** Aktive Protein C  
**PS:** Protein S  
**APCA:** Anti-parenteral sitotoksik antikorlar  
**Ab2:** Anti-idiotipik antikorlar  
**MLR-Bf:** Mils lenfosit reaksiyon bloke edici ajanlar  
**NK:** Natural Killer  
**DMAH:** Düşük moleküler ağırlıklı heparin  
**UFH:** Unfractionated Heparin  
**HIT:** Heparinin İndüklediği Trombositopeni  
**COX:** Siklooksijenaz  
**PG I2:** Prostaglandin  
**TX A2:** Tromboksan A2  
**IUGR:** İntrauterin gelişme geriliği  
**DM:** Diabetes mellitus  
**İM:** intramusküler  
**Bp:** basepair (baz çifti)

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 2.1.</b> Glutasyon'un Yapısı.....	29
<b>Şekil 2.2.</b> Detoksifikasyon reaksiyonları (Faz I, Faz II, Faz III) .....	30
<b>Şekil 2.3.</b> Glutasyon Ksenobiyotik Mekanizması .....	31
<b>Şekil 2.4.</b> Glutasyon Sentezi ve Siklusu .....	32
<b>Şekil 2.5.</b> GST Enzimlerinin Yapısı .....	35
<b>Şekil 2.6.</b> GSTM1 Gen Bölgesi .....	36
<b>Şekil 2.7.</b> GSTP1 Gen Bölgesi .....	37
<b>Şekil 5.1.</b> Hasta ve kontrol gruplarında GSTT1 genotipi .....	49
<b>Şekil 5.2.</b> Hasta ve kontrol gruplarında GSTM1 genotipi .....	50
<b>Şekil 5.3.</b> GSTT1, GSTM1 ve Albümin Elektroforez Bant Görünümü .....	50
<b>Şekil 5.4.</b> Hasta ve kontrol gruplarında GSTP1 gen polimorfizmi .....	51
<b>Şekil 5.5.</b> Hasta ve kontrol gruplarında GSTT1 ve GSTM1 genotipinin birlikte değerlendirilmesi .....	52

**TABLÖLAR**

<b>Tablo 2.1.</b> Tekrarlayan Gebelik Kayıplarının Etiyolojisi .....	5
<b>Tablo 2.2.</b> Düşük Materyallerinin Kromozomal Yapısı .....	10
<b>Tablo 4.1.</b> GSTT1, GSTM1 ve Albümin primer diziler .....	44
<b>Tablo 4.2.</b> GSTP1 Primer Dizileri .....	46
<b>Tablo 5.1.</b> Hasta ve Kontrol Gruplarında GSTT1 Genotipi .....	48
<b>Tablo 5.2.</b> Hasta ve Kontrol Gruplarında GSTM1 Genotipi .....	49
<b>Tablo 5.3.</b> Hasta ve Kontrol Gruplarında GSTP1 Gen Polimorfizmi .....	51
<b>Tablo 5.4.</b> Hasta ve Kontrol Gruplarında GSTT1 ve GSTM1 Genotipinin Birlikte Değerlendirilmesi .....	52
<b>Tablo 5.5.</b> Hasta ve Kontrol Gruplarında GSTM1 ve GSTP1 Genotipinin Birlikte Değerlendirilmesi .....	53
<b>Tablo 5.6.</b> Hasta ve Kontrol Gruplarında GSTT1 ve GSTP1 Genotipinin Birlikte Değerlendirilmesi .....	54

## 1.GİRİŞ

Tekrarlayan gebelik kaybı gestasyonel 20. haftadan önce üç veya daha fazla tekrarlayan gebelik kaybı olarak tanımlanır. Bazı uzmanlara göre de tekrarlayan gebelik kaybı tanısı için tekrarlayan iki gebelik kaybı yeterlidir. Çünkü tekrarlama riski ve oranı iki gebelik kaybindan sonra aynıdır(1).

Bu çalışmanın amacı, Türk toplumunda TGK patogenezinde GST genlerinin polimorfizmini araştırmaktır.

Sporadik tekrarlayan gebelik kaybında fetal kromozomal anomali oranı %70 dir(2,3). Tekrarlayan gebelik kaybının en az % 50'sinde uygulanan herhangi bir tanı testi ile sebep anlaşılamamaktadır ve idiyopatik nedenli olduğu düşünülmektedir. Tekrarlayan gebelik kaybında çevresel ve yaşam şekli ile ilgili risk faktörleri genetik hassasiyete sebep olmaktadır. Yapılan araştırmalarda 1. derece akrabalarda tekrarlayan gebelik kaybının 2 ile 7 kat arttığı gözlemlenmiştir(4). Kardeşler arasındaki idiyopatik tekrarlayan gebelik kaybının topluma göre 2 kat yüksek olduğu tespit edilmiştir(5). Son yapılan bağlantı analizi çalışmalarında idiyopatik tekrarlayan gebelik kaybına sebep olan genetik heterojenite doğrulanmıştır(6). Tekrarlayan gebelik kaybında potansiyel bir risk için erken tanı ve takip, canlı doğum oranını arttırmaktadır(7).

Klinik olarak tanımlanmış gebeliklerin yaklaşık % 15'inde sporadik abortus oluşmasına rağmen, TGK % 1-3 olarak tanımlanmıştır(8,9). Birçok etiyolojik faktör ortaya atılmıştır fakat TGK'nın etiyolojisi belirsizdir. Tekrarlayan gebelik kaybında endojen ve eksojen maddelere maruziyetde faz I ve faz II enzim sistemleri arasındaki denge bireysel metabolik detoksifikasyon aktivasyonunun genetik çeşitliliği modifiye edilmelidir(10,11). Son zamanlarda, birçok genetik çalışmada metabolik enzimlerle ilişkili genetik polimorfizm ve TGK arasındaki ilişki ortaya çıkmıştır. TGK riskinin, günlük kahve, alkol ve sigara tüketimi gibi yaşam şekli ile ilgili faktörler tarafından arttığı raporlanmıştır(12,13). Sigara, kahve ve alkolde de var olan birçok potansiyel toksik bileşik sitokrom P450-1A1(CYP-1A1) gibi faz I enzimi ile son reaktif bileşik oluşması için aktiflenir(14). Bu aktif formlar faz II enzimlerinden özellikle glutatyon-S-transferazlar(GST) tarafından detoksifiye edilir.

Toksinlerin faz I enzimleri ile aktivasyonu oksidatif stresi artırır ve eliminasyonunu faz II glutatyon detoksifikasyon sistemi yapar. Sitozolik GST 4 ana sınıfa ayrılır: alfa (A), pi(P), teta(T) ve mu (M)(15,16). Her birisi bir veya daha fazla izoenzimden oluşur. GST ve CYP-1A1 enzimlerindeki genetik çeşitlilik faz I ve faz II biyotransformasyonu arasında ki dengeyi bozabilir ve sigara, alkol, kahve veya diğer toksinle ilişkili hastalıklara hassasiyette bireysel farklılıklardan sorumlu olabilir(12). Bu doğrultuda faz I ve faz II biyotransformasyon enzimlerinden her biri TGK olan hastalarla ilişkili olduğu düşünülmektedir(17).

Glutatyon detoksifikasyon yolağının enzimlerinden olan GSTT1 ve GSTM1 embriyoyu oksidatif stresten korur. TGK, genetik mutasyonlar, uterusun yapısal anomalileri, diyabet, maternal yaş, sigara, genital enfeksiyonlar, kahve veya alkol kullanımı, kimyasal kullanımı gibi olası epidemiyolojik risk faktörlerinden etkilenen multifaktöriyel bir hastalıktır(18). Gebelik kaybında risk stres, alkol, sigara, kahve tüketimi ve çevresel faktörler tarafından artmaktadır(19). Anormal plasenta reaktif oksijen ürünlerinin üretimine neden olur ve embriyoyu istila eden zararlı etkilerle sonuçlanır. Oksidatif stresin abortusun etiopatogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir(20).

Fizyolojik redoks konsantrasyonu embriyogenez için önemli olabilir. Düşük O<sub>2</sub> konsantrasyonunda erken embriyo kültürü hem hücrel mekanizmaları hemde embriyonik gelişimi sağlayan genlerin ekspresyonunu etkiler(21). Reaktif oksijen ürünlerinin aşırı üretimi embriyoya zarar vermektedir. Süperoksid anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri fetüs üzerinde zararlı etkiye sahip olabilir(22). Aşırı oksidatif stres DNA kırıklarına, gen ekspresyonunda değişikliklere, organel ve membran hasarına neden olabilir. Bu nedenle oksidatif stres aracılı makromolekül hasarı fetal kayıpta önemli rol oynamaktadır(23).

Biyotransformasyon fonksiyonlarını bozulan detoksifikasyon genlerinin allelik varyasyonları reproduktif toksisiteye hassasiyeti artırabilir ve TGK' na neden olur(24). GST çeşitli toksik ve karsinojenik elektrofililerin tripeptid glutatyona konjugasyonunu katalizler. GST substratlarının çoğunluğu xenobiyotikler veya oksidatif stres ürünleridir. GST toksik yabancı kimyasallara veya oksidatif strese karşı hücrel korumada kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir(25). Tüm genin

homozigot delesyonundan dolayı enzim aktivitesi yoktur bu duruma nul genotip denir. Hastalıklarda araştırmak için önemli aday gen GST detoksifikasyon yolağıyla bağlantılıdır. Sigara veya kimyasallara prenatal olarak maruz kalan bayanlar arasında GST izoenzimlerindeki genetik çalışmalarda redoks durumunu bozar ve bu durum gebelik kaybından sorumlu olabilir(26).

Çalışmamızda Türk toplumunda GST gen polimorfizmi ve TGK hastaları arasındaki ilişki araştırılmıştır.



## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1.Tekrarlayan Gebelik Kaybı

TGK gebeliğin sık görülen bir komplikasyonudur. Çiftler için maddi ve manevi travmatik bir sürecin oluşmasına neden olmaktadır. Abortusun tanımı 1997 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) tanımına göre gebeliğin ilk 20 haftası içinde, ağırlığı 500 gr' dan az embriyo veya fetus ve eklerinin tamamının veya bir kısmının uterus kavitesi dışına atılması olarak yapılmıştır.

TGK'ları üç ana grup içinde incelenmektedir:

1. Primer Tekrarlayan Düşük: En az üç kez ard arda gebelik kaybı olan çiftin hiç canlı doğumu olmamasıdır.
2. Sekonder Tekrarlayan Düşük: En az üç kez ard arda gebelik kaybı olan çiftin gebelik kayıplarından en az bir tanesinin 20. gebelik haftası üzerinde gerçekleşmiş olmasıdır.
3. Tersiyer Tekrarlayan Düşük: Canlı doğumu olan çiftin, bu doğum sonrasında olan en az üç kez ard arda gebelik kaybı olmasıdır.

#### 2.1.1.Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Etiyoloji

TGK heterojen komponentler içeren bir durumdur ve zemininde birden fazla neden bulunabilir. Tekrarlayan düşüklerin nedenlerini Rodger ve arkadaşları genel olarak aşağıdaki gibi sınıflandırmışlardır:

1. Hematolojik hemostaz bozukluğuna bağlı nedenler: %53
2. Anatomik nedenler: %15
3. Endokrin nedenler: %15
4. Kromozomal nedenler: %17
5. Diğer nedenler( Enfeksiyon, immünolojik, çevresel): %10(27)



**Tablo 2.1.** Tekrarlayan gebelik kayıplarının etiyolojisi

<b>Etiyoloji</b>	<b>Hastalık</b>
<b>Epidemiyolojik</b>	Hasta yaşı Hastanın üreme öyküsü
<b>Beslenme</b>	Hiperhomosisteinemi Folat eksikliği Vitamin B12 eksikliği
<b>Jinekolojik</b>	Servikal yetmezlik Myoma uteri Uterus yapısal bozuklukları (uterin septum, uterus didelphis, bikornuat uterus) In utero DES maruziyeti Primer endometrial bozukluk (Asherman send., endometrial fibrzis)
<b>Enfeksiyon</b>	Ureoplasma urealyticum Mycoplasma hominis Toxoplasmosis Cytomegalovirus Listeria monocytogenes Parvovirus B19 Klebsiella pneumoniae
<b>Endokrin</b>	Hipertroidizm Hipotroidizm Diabetes mellitus Hiperglisemi ve insülin rezistansı LH hipersekresyonu Hiperandrojenemi Hiperprolaktinemi Polikistik over sendromu
<b>Genetik</b>	Fetus veya düşük materyaline ait kromozomal anomaliler (dengelitranslokasyonlar, inversiyon) SYCP3 gen mutasyonu Oosit mitokondri mutasyonu ABO uyumsuzluğu HLA G polimorfizmi Annexin A5 gen polimorfizmi Sitokin gen polimorfizmi TNF-a gen polimorfizmi IFN-y gen polimorfizmi IL-1 β gen polimorfizmi IL-1 reseptör antagonist polimorfizmi IL-4 gen polimorfizmi IL-6 gen polimorfizmi IL-10 gen polimorfizmi TGF-β gen polimorfizmi
<b>İmmunolojik otoimmün</b>	Antifosfolipid antikor sendromu Romatoid Artrit Sjögren hastalığı Otoimmün trombositopenik purpura Miyastenia Gravis Otoimmün tiroiditis SLE Psöriasis Çölyak hastalığı Behçet hastalığı Otoimmün hemolitik anemi Ig M gamopatisi
<b>Alloimmün</b>	Rh uyumsuzluğu ABO uyumsuzluğu
<b>Hematolojik</b>	Trombofili (akkiz ve konjenital) Homozigot orak hücreli anemi

### 2.1.2 Epidemiyolojik Faktörler

#### Anne yaşı

Yaşa bağlı artan anormal kromozomlu gebelikler ya da azalan over ve uterus işlevleri nedeniyle düşük riski anne yaşıyla birlikte artar. (28).

#### Üreme Öyküsü

Önceki gebeliklerin öyküsü, beklenen bir gebeliğin geleceğini tek başına etkiler. Sonraki düşüklerde risk, arka arkaya 3 gebelik kaybı sonrasında yaklaşık %40'lara ulaşacak şekilde her düşük sonrasında yükselir(29).

#### Hiperhomosisteinemi

Trombofilik etkeni olan bir diğer mutasyon ise metiltetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimini kodlayan gende 677. nükleotid olan Timidin yerine Sitozin gelmesi ile ortaya çıkar (C677T). Bu mutasyon sonucunda oluşan termolabil MTHFR enzimi hiperhomosisteinemiye, dolayısıyla artmış arteriyel ve venöz tromboz riskine yol açmaktadır (30). Bu mutasyon düşük folat seviyeleri ile birlikte ise artmış derin ven trombozu riskinin belirgin olduğu öne sürülmektedir. Yapılan çalışmalar fetal kaybı olan kadınlarda kontrol grubuna göre homozigot MTHFR prevalansında sınırda bir yükselme ve fetal kayıpta relatif bir risk artışını göstermiştir (31,32). 17. gebelik haftasından önce gerçekleşen iki ve üzerindeki gebelik kayıpları olan kadınlarda kontrol grubunu oluşturan ve başarılı gebeliği olan kadınlara göre MTHFR düzeylerinin 2–3 kat fazla olduğu görülmüştür. Diyetle folat eklenmesinin gebelik kaybı riskini azaltıp azaltmadığı belirgin değildir (31-34). Yine başka bir çalışma, tekrarlayan düşüklerde Faktör V Leiden ve Protrombin G20210A mutasyonlarının rolü olduğunu saptarken, MTHFR C677T mutasyonunun ilişkisi olmadığını belirtmektedir (35)

#### Maternal Enfeksiyonlar

Birçok maternal enfeksiyon (viral, bakteriyel, zoonotik ve fungal) teorik olarak TGK nedeni olabilmektedir. Bakteriyel vajinoz, Chlamydia trachomatis ve Mycoplasma enfeksiyonlarının TGK ile ilişkisi araştırılmış ancak kesin ilişki gösterilememiştir (28).

### 2.1.3. Jinekolojik Nedenler

Konjenital uterin malformasyonlar, müllerian kanal gelişimi, füzyonu, kanalizasyonu ve septal rezorpsiyonu sorunlarından kaynaklanmaktadır. TGK'da konjenital uterin anormalliklerin ne kadar katkısı olduğu açık değildir. Çünkü genel populasyondaki gerçek prevalansı bilinmemektedir. TGK hastalarındaki uterus yapısal bozuklukların dağılımını %1,8 ile %37,6 arasında oldukça farklı bildiren yayınlar bulunmaktadır (28).

TGK'na yol açan ve en sık görülen uterin malformasyon uterin septumdur ve major uterin anomalilerin %80-90'nını oluşturur (36). İkinci en sık neden ise servikal yetmezliktir. Servikal yetmezliğin tanısı; tekrarlayan 2. ve 3. trimester gebelik kayıpları, ağrısız servikal dilatasyon, membranların prolapsusu ya da rüptürü, canlı fetusun dışarı atılmasıdır. Deneysel çalışmalarda, servikal yetmezlik olgularına efektif serklaj ile canlı doğum oranının %27'den %93'e yükseltilebildiği gösterilmiştir (37).

Uterin miyomlar yerleşim yerleri ve büyüklüklerine bağlı olarak gebelik kaybına neden olabilecek üreme sorunlarına yol açabilir. Bu durum miyomun yol açtığı; uterin kavitenin mekanik torsiyonu, anormal vaskülarizasyon, anormal endometrial gelişim, endometrial inflamasyon, anormal endokrin ortam, kontraktıl bozukluklar gibi faktörler ile açıklanabilmektedir. İntrauterin adezyonlar Asherman sendromu, gebelik atıklarının uterus içinde kalması sonrası yapılan kürtajlarda, yada zorlamalı küretaj yapılan olgularda intrauterin oluşan travma sonrası gelişir. Buda endometrial inflamasyona neden olarak uterus duvarları arasında fibriler adezyonlar ile sonuçlanır (28).

### 2.1.4. Endokrin Faktörler

Gebeliğin başlangıcı ve sağlıklı olarak devam etmesi endokrin faktörlerin kontrolündedir. Gebelik öncesinde kadınların çoğunda endokrin anomaliler yoktur. Ancak yaklaşık olarak gebelik kayıplarının %8-12'si endokrin faktörlerin sonucudur (38). Luteal faz eksikliği, hiperprolaktinemi, polikistik over sendromu, tiroid hastalıkları, hipoparatiroidizm, kontrol edilemeyen diyabet, azalmış over rezervi

tekrarlayan gebelik kayıplarının etiolojisinde yer almaktadır.

### **Tiroid hormon eksikliği**

Tiroid hormonları gelişen fetusun varlığı için esansiyeldir. Hipotroid bir kadının gebeliği sırasında ihtiyacı olduğu tiroksin tedavisi normalden daha fazladır çünkü tiroid hormon seviyeleri hem kendisi hem de gelişen fetus için ideal olmalıdır. 12. gebelik haftasının sonuna kadar fetusun tiroid bezleri gelişimi tamamlanmaz. Annenin yeterli tiroid hormon düzeyi sağlanamaz ise gebelik düşük ile sonuçlanacaktır. Gebeliklerin birinci trimesterin sonu ve daha geç tanı aldığı durumlarda tiroid hormon profili hakkında bilgisi olunamayan gebelikler düşükle sonuçlanabilmektedir. Bu nedenle gebelik tanısı alan kadında tiroid hormonları en kısa zamanda değerlendirilmelidir(11).

### **Luteal faz Defekti**

Luteal faz yetmezliği, defektif korpus luteumu ifade eden gecikmeli endometrial gelişim ile birlikte olup yetersiz progesteron salınımı ile giden bir durumdur. Başarılı bir implantasyon ve gebeliğin erken dönemdeki devamlılığı için progesteron gereklidir. Dolayısıyla progesteron eksikliği tekrarlayan düşüklere neden olabilir(39).

### **Polikistik Over Sendromu, Luteinizan Hormon Hipersekresyonu ve Hiperandrojenemi**

PCOS (polikistik over sendromu), infertilite ve düşük ile ilişkilidir. Polikistik overler, yüksek luteinizan hormon ve hiperandrojenemi, PCOS'nun klasik bulgularıdır ve tekrarlayan düşüklere için risk faktörleridir. PCOS olgularının %36-56'sında TGK saptanmaktadır. PCOS olgularında gebelik kaybı luteinizan hormon (LH), testosteron, androstenedion artışı ve insülin direncine bağlanmaktadır. Bunun yanında fertil gruba göre de sadece insülin direnci (PCOS olmadan) olan olgularda da TGK sıklığı artmaktadır (40).

### **Diabetes Mellitus**

Pregestasyonel diyabet gebelik komplikasyonları riskini arttırarak maternal, fetal ve yenidoğan döneminde olumsuz etkiler doğurur. Diyabet ayrıca kongenital

malformasyon ve spontan abortus riskini de arttırmaktadır (28).

### 2.1.5. Genetik Faktörler

Birçok spontan düşüğün nedeni embriyonun anormal karyotipe sahip olmasıdır. İlk trimester gebelik kayıplarının %50' sinde, ikinci trimester kayıplarının %30' unda ve ölü doğumların %3' ünde kromozomal anomali tespit edilmiştir (41,42).

Düşüklerde tespit edilen kromozomal anomalilerinin %90' ından fazlası sayısaldır (anöploidi, poliploidi), geri kalanlar yapısal anomaliler (translokasyon, inversiyon) ve mosaizmdir. En sık görülen anomali otozomal trizomilerdir (kromozom 13, 16, 21 veya 22).

Trizomi insidansı yaşla birlikte artar. Trizomi 16 tüm trizomilerin %30' unu oluşturur ve en sık rastlanılandır. Daha sonra monozomi X (45XO) ve poliploidiler gelmektedir. Turner Sendromu sitogenetik olarak anormal olan abortusların %20-25' ini oluşturur.

Diğer genetik anomaliler arasında anormal fertilizasyona bağlı olanlardan tetraploidi ve triploidi gibi anomaliler sayılabilir, ancak bunlar yaşla bağdaşmazlar.

Yapısal kromozom anomalileri üçüncü kategorideki bozukluklardır. Yapısal değişimler sitogenetik anomalisi bulunan düşüklerin yaklaşık %3' ünde görülür (43).

Son grup ise gen anomalileridir. Genlere ait bazı mutasyonların bir hastada infertilite ya da habitüel abortus tanısına neden olabilecek bozukluklara yol açabileceği açıktır. Habitüel abortusla ilgisi kanıtlanan tek gen bozukluklarının en iyi örneği yüksek geçişli otozomal dominant bir hastalık olan myotonik distrofi. Fetüsü etkileyen ve düşüğe yol açan diğer otozomal dominant bozukluklar thanatoforik displazi ve tip II osteogenesis imperfecta gibi ölümcül iskelet displazileridir.

Artmış gebelik kayıplarına yol açan anneye bağlı bozukluklardan bazıları da Marfan Sendromu, Ehlers-Danlos Sendromu, homosistinüri ve psödoksantoma elastikum gibi bağ dokusu hastalıklarıdır(44)

**Tablo 2.2.** Düşük Materyallerinin Kromozomal Yapısı

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

Genetik faktörler %20 oranında rol oynamaktadır. Genetik anomaliler fetal ve parental kaynaklı olabilmektedir. Bu anomalilerin saptanması; tedavi algoritmasının belirlenmesi ve tedavi masraflarının düşürülmesi açısından büyük önem taşımaktadır(45).

TGK olan kadınların %75'inde embriyonik anomali ve boş gebelik tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada 233 missed abort olgusunun 200'ünde anensefali, ensefalosel, spina bifida, sindaktili, psödo-sindaktili, polidaktili, pençe el gibi fetal

anomaliler embriyoskopi ile saptanmıştır (46).

### **SYCP3 Gen Mutasyonu**

Sinaptonemal kompleks mayoz I'in profaz aşamasında homolog kromozomlar arasındaki bağlantıyı yapan üç parçalı bir proteindir. SYCP3 (MIM 604759) sinaptonemal kompleksin aksial ya da lateral elementinin esansiyel olan komponentidir.

Yapılan bir çalışmada SYCP3 genindeki mutasyon kromozomal ayrılma bozukluğuna yol açtığı gösterilmiştir (47).

### **Oosit Mitokondri Mutasyonu**

İnsan mitokondrisi sirküler çift zincirli DNA taşır. Maternal mitokondri insan oositindeki ve erken embriodaki en önemli organellerdir. Mitokondrinin temel görevi hücrel oksidatif ATP üretimidir. Diğer önemli görevi olan apoptozis embrionik gelişim için çok önemli görev üstlenmektedir. Mitokondrinin embriyonun gelişiminde çok önemli rolü olduğu bilinmektedir. Mitokondrinin ATP üretim kapasitesi ya da apoptozis kaskadını aktive edebilme yeteneği embriyonun uterus içerisindeki varlığını belirlemektedir. Yetersiz mtDNA kopyası ya da ATP seviyesini etkileyen nokta mutasyonları, kromozomal işlevlerin yerine getirilmesini engelleyip preimplantasyon döneminde embriyo gelişiminin duraklamasına neden olabilmektedir (48).

### **HLA-G Polimorfizmi**

İnsan lökosit antijeni-G fetomaternal yüzeydeki ekstrasvillöz trofoblast popülasyonu tarafından eksprese edilir. HLA-G'nin hücrel adezyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ve blastokistin endometrial epitel hücrelere adezyonunu sağlamaktadır. Bazı çalışmalarda tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlardaki HLA-G'de polimorfik olarak farklılık olmadığı gösterilmiş olsa da (49) son çalışmalarda tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkili farklı HLA-G proteinlerinin (HLA-G 0105N) (54), HLA-G 0104 (52), HLA-G 0103 (47) varlığından bahsedilmektedir.

### **TNF- $\alpha$ Geni**

İnflamatuvar hücrelerden salınan TNF- $\alpha$  gebelik kaybı ile ilişkili

bulunmuştur. Gebe insan çalışmalarında başarılı gebelikte Th2 tip immünitinin önemi anlaşılmıştır. TNF- $\alpha$  hormon sentezi, embrionik gelişimsel plasental fonksiyonlarda düzenleyici rolü olan bir Th1 sitokindir. Farelerde yapılan bir çalışmada TNF- $\alpha$ 'nın artmış seviyeleri gebelik kaybı ile ilişkili bulunmuştur. Murin modellerindeki çalışmalarda da TNF- $\alpha$  blokajı ile stres ile indüklenen düşüklüğün önüne geçildiği gösterilmiştir. Bu da TNF- $\alpha$ 'nın direkt etki ile doku hasarına neden olabileceğini düşündürmüştür (48).

### **TGF Süper Ailesi**

Menstrüel siklusun her evresinde TGF $\beta$  süper ailesine ait çeşitli moleküller sentezlenmektedir. Üç TGF $\beta$ (1,2,3) izoformu hem epitel hem de stromal hücrede lokalizedir. TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 sentezi menstrüel siklus boyunca değişiklik göstermezken, TGF $\beta$ 3 geç sekretuar fazla yüksek miktarda sentezlenir. Bu da TGF $\beta$ 3'ün endometriyumun implantasyona hazırlığında rolü olduğunu düşündürmektedir (54).

Son çalışmalarda MMP2 gen ekspresyonu ve bu genin implantasyona etkileri üzerinde durulmaktadır ve implantasyon sahasında MMP2'nin aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (50-55). Skrzypek ve arkadaşlarının çalışmasında TGK olan hastalar ve aynı sayıdaki kontrol grubundan 7, 8.ve 9. günlerde alınan endometrial biopsiler incelenmiş ve bu dokularda TGF $\beta$ 2, MMP2, MMP9, TIMP1 ekspresyonu incelenmiştir. TGK olan kadınlarda endometrial dokuda TGF $\beta$ 2 sentezinin 2,8 kat daha fazla iken, MMP9 sentezinin belirgin oranda azaldığı saptanmıştır (50).

### **2.1.6. Otoimmün Faktörler**

#### **Antifosfolipid Antikorlar**

Antifosfolipid antikorlar negatif yüklü fosfolipidler ile kompleks yapan proteinlerdeki antijenik belirleyici bölgelerle etkileşen heterojen otoantikor ailesidir. TGK etyolojisinde klinik önemi en fazla olan üç AFA tipi; lupus antikoagulan (LA), antikardiolipin antikorlar (ACA) ve anti beta-2 glikoproteini I'dir (58).

Fosfolipid antikorları hücre membranının komponentleridir. Plasenta yapısında yer alan hücreleri bir arada tutar. Fizyolojik koşullarda anyonik



fosfolipidler; plazma membranının iç yüzeyinde yer alırlar.

Antiposfolipid antikorların neden olduğu trombozların mekanizması farklı bir çok mekanizmanın sonucu olarak açıklanabilir. Antifosfolipid antikorlar tek başlarına fetal kayıba neden olmazlar. Damar duvarına iç yüzeyden başlayarak hasarlar ve hasar gören bu bölgelerde pıhtı oluşur. Bu da plasental beslenmenin azalmasına ve fetusun gelişme geriliğine yol açar (59). Ayrıca antifosfolipid antikorları trofoblast yüzeyindeki annexin V molekülünü uzaklaştıran anyonik fosfolipidlerin açıkta kalmasına neden olur ve bu da trombin üretiminde artış ile sonuçlanır.

Yapılan bir çalışmada yetersiz trofoblast invazyonu ve intervillöz trombozun antifosfolipid ilişkili TGK'daki temel histolojik anormallik olduğu gösterilmiştir (60). Yapılan bir çalışmada antifosfolipid antikorların extra-villöz trofoblast farklılaşmasını da bozduğu gösterilmiştir (61). Başka bir çalışmada da tümör nekroz faktör alfa (TNF-alfa), IL-6 gibi sitokinlerin antifosfolipidlere bağlı trombozlara aracılık yaptığı gösterilmiştir (61).

Antifosfolipid sendromu tanısı için aşağıda verilen klinik kriterlerinden bir tanesinin ve ek olarak en az altı-sekiz hafta arayla alınan iki örnekte ACA, LA'nın pozitif olması gerekmektedir (62):

- üç kez ilk trimester gebelik kaybı veya
- bir kez midtrimester gebelik kaybı veya
- otuzyedinci haftadan evvel doğumu gerektiren ciddi preeklampsi, IUGR veya ablasyo varlığı.

Antifosfolipid antikorların protein C antikuagulan sistemine de zarar verdiği düşünülmektedir (63).

### **Non-APA Faktörler**

Tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan hastalara ANA (anti nükleer antikor)'ların yüksek düzeylerde saptanması farklı otoimmün etkenlerin de

olabileceğini düşündürmektedir (64). Fetal kayıp ayrıca yüksek tiroglobulin antikoları ve tiroid peroksidaz antikolar ile ilişkili bulunmuştur. Tekrarlayan gebelik kaybı olan hastaların yaklaşık %31'inde bu antikoların pozitifliği saptanmıştır. Normal gebelik öyküsü olan hastalarda %10-18 oranında antitiroglobulin ve anti-tiroperoksidaz antikoları pozitif saptanmıştır. İmplantasyon sırasında trofoblastik mononükleer hücrelerin endovasküler göçü olduğu saptanmıştır ve bu göç antiendotelial hücre antikoları ile inhibe edilip fetal kayıplar ile sonuçlanabilir (65).

### **Tiroid Otoimmunitesi**

Birçok çalışmada mekanizması net olarak açıklanamasa da tiroid otoimmunitesi ile tekrarlayan düşükler arasında ilişki olduğu belirlenmiştir.

Muhtemel mekanizmalar şu şekilde sıralanabilir:

- 1) Feto-plasental üniteye karşı vücudun verdiği aşırı reaksiyon: Tiroid otoimmun hastalığı olan kadınlar daha uyarılabilir yapıda bir immün sisteme sahip olabilirler. Çalışmalar şunu göstermiştir ki; APA'nın varlığında düşükler 22 gestasyonel haftada, tiroid antikör taraması olan hastalarda fetal kayıp fetusun anne tiroidlerine kritik düzeyde bağımlı olduğu 1. trimesterde gerçekleşmektedir (66).
- 2) Tiroid otoantikörlerinin varlığı konsepsiyona engel olarak infertilite faktörü olabilir. Tiroid otoantikörü olan kadınların gebelikleri daha geç yaşlarda olmakta ve yüksek düşük riski ile karşı karşıya kalmaktadırlar (66).
- 3) Ötiroid kadınlardaki tiroid otoantikörlerinin varlığı tiroid hormon konsantrasyonlarında minimal eksilme veya tiroid bezi gebelik ürününe adaptasyonda yetersiz kalabilir. Ek olarak TSH'nın ortalama serum değerleri tiroid otoantikörleri olan kadınlarda olmayan kadınlara göre daha yüksektir. Bu durum tiroid hormonlarına daha fazla gereksinim duyulan gebelik durumunda düşük tiroid rezervine yol açabilir. Dahası tiroid otoantikörleri pozitif olan kadınlarda serum TSH seviyeleri gebelik başladığında düşmeye başlar ve gebelerin%19'unda TSH seviyeleri yüksek saptanmaktadır (67).

Tiroksin tedavisinin gebeliğin erken dönemlerinden itibaren verilmeye başlandığında düşük sayısının azaldığı görülmektedir. Çünkü maternal otoimmün tiroid hastalığında düşükler ilk trimesterde gerçekleşmektedir (68).

Unutulmaması gereken bir nokta da selenyum ve iyod gibi tiroid hormon sentezinde sorumlu maddelerin eksikliğinde de tekrarlayan gebelik kayıpları görülebilmektedir. Gebelik boyunca selenyum uygulamasının tiroid otoantikör konsantrasyonlarını düşürdüğü saptanmıştır (69).

### **2.1.7. Hematolojik Nedenler**

#### **Hemostaz, İnflamasyon ve Koagulasyon Sistemi**

Hemostaz kanama kontrolünden sorumlu defans mekanizmasıdır. Damar duvarının hasarı ile başlar, trombosit aktivasyonu, koagulasyon kaskadı, doğal antikoagulan ve fibrinolitik sistem aktivasyonu ile devam eder. İnflamasyon yaralanma ya da enfeksiyona bağlı gelişen doku hasarının tarihidir. Koagulasyon ve inflamasyon sistemleri ortak kısa yollar ile aktive edilirler. İntrensek kısa yol hasarlı yüzey ile FXII'nin kontakt aktivasyonu ile başlar. Bunu FXI ve FIX'nin aktivasyonu ile devam eder. Sonunda ekstrinsek yol ile birlikte ortak yolun başlangıcındaki FX aktive olur.

Zedelenen doku veya damar bölgesinden doku faktörü açığa çıkar. Doku faktörü-FVIIa kompleksi etkisi ile FIX aktive olur ve ortak yolun ilk basamağındaki FX aktive olur ve pıhtılaşma kaskadı başlatılır.

Hasarlanan damar dokusu ile uyarılan trombositler sitokinler, büyüme faktörleri, çeşitli proinflamatuvar mediatörlerin salınmasına neden olur. Doku faktörü ve trombin inflamasyon ve koagulasyon sistemlerini birleştirmede aktif görev yapar.

İnflamatuvar sitokinler, lökositlerde ve endotel hücrelerde doku faktörünün ekspresyonunu indükler. FVIIa yada FXa ile doku faktörü'ün kompleks oluşturması inflamatuvar süreçlerin başlatılmasında direkt etki oluşturur (70).

Doğal antikoagulanlar arasında en önemli üç tanesi; doku faktörü kısa yolu inhibitörü, antitrombin, protein C/S'dir. Trombin endotelial trombomoduline

bağlanır, protein C ve kofaktörü olan protein S aktive olur, FVa ve FVIIIa inaktive edilerek koagülasyon kaskadı kontrol altına alınır. Bu mekanizma ayrıca antiinflatuar rol üstlenmektedir (70).

Heparin antitrombin III ile trombin arasında köprü görevi yapmaktadır.

### **Gebelik Boyunca Gelişen Koagülasyon Değişiklikleri**

Östrojen total Protein S seviyelerini düşüşe neden olurken ve C4b seviyelerinde yükselmeye neden olur. Bu da gebelikteki koagulan faktörlerinde özellikle de faktör II, VII, VIII, IX, X ve Willebrand faktör seviyeleri yükselişe, protein S seviyelerinde ise ilk trimesterden itibaren %40-%60'a kadar düşüşe neden olur. Ayrıca postpartum 3 ay boyunca düşük seviyelerde seyrederek. Artan Faktör V ve azalan protein S seviyeleri aktive olmuş protein C rezistansına yol açar (71).

### **Trombofili**

Trombofili pıhtılaşmaya eğilim anlamına gelmekte ve batı popülasyonunun en az %15'ini etkilemektedir. Yenidoğanların %50'sinde venöz tromboemboli ile kendini gösterir. Gebelikte ilişkili derin ven trombozunun ve pulmoner embolinin en önemli nedenidir. Trombofilinin neden olduğu obstetrik komplikasyonlar; tekrarlayan gebelik kayıpları, preeklampsi, IUGR(intrauterin gelişme geriliği) (45).

### **Faktör V Leiden Mutasyonu**

Faktör V plazmada inaktive kofaktör olarak bulunur ve trombin tarafından aktive olur. Aktive olmuş Faktör V (Va), Faktör VIIIa ile birlikte protrombinin trombine dönüşümünde kofaktör olarak görev yapar. FV Leiden mutasyonu; 1691. nükleotid olan Adenin yerine Guanin geçmesi ve bunun Faktör V'in 506. pozisyonunda bulunan Argininin Glutamin ile yer değiştirmesiyle sonuçlandırıldığı nokta mutasyonudur. Bu da aktive protein C için hatalı bağlanma bölgesi oluşturarak F Va'nın daha yavaş inaktive olmasına yol açar (71).

Aktive protein C rezistansı olan vakaların %95'inde FV Leiden mutasyonu saptanmıştır. FV Leiden mutasyonu otozomal dominant kalıtılır (1q21). Dolayısıyla

tüm taşıyıcılar etkilenmiştir. Venöz tromboz riski heterozigot olgularda 3-10 kat, homozigot olgularda 50-100 kat artar (72).

F V Leiden heterozigot mutasyonu en sık kongenital trombofili nedenidir.

Taşıyıcıların yaklaşık %2'sinde gebelikle ilişkili venöz tromboemboli(VTE) gelişir ve en fazla puerperium döneminde meydana gelir. F V Leiden homozigot kalıtımı çok daha nadir görülmesine rağmen tromboz riskini Odss Ratio 34 oranına yükselir (73).

Normalde gebeliğin 2. ve 3. trimesterinde active protein C rezistansı gelişmektedir. F V Leiden mutasyonu taşıyıcılarında 28. gebelik haftasından önce gebelik kaybı riski vardır. Mutasyonu taşıyan fetuslarda kontrollere göre abort riskinin 2 kat arttığı gösterilmiştir. Taşıyıcı annelerde TGK riski ise 2 kat artmaktadır (73).

### **Protrombin Gen Mutasyonu**

Protrombin gen mutasyonu TGK olgularının %4-9'unda görülür. Kalıtsal trombofililer arasında ikinci sıklıkta görülen protrombin G20210 gen mutasyonu ilk kez 1996 yılında Poort ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Geniş serileri kapsayan meta-analiz sonuçlarına göre, protrombin gen mutasyonu tüm TGK'yı, ilk trimester TGK ve geç dönemdeki fetal kayıpları iki-üç kat arttırmaktadır. Protrombin genindeki 20210. pozisyondaki Adenin yerine Guanin geçmesi ile protrombin mRNA 3' end sentezi artar ve transkripsiyon hızından bağımsız olarak protrombin sentezinin artması ile sonuçlanır. Heterozigot hastalarda gebelikte VTE insidansı %2.3'e ve puerperiumda VTE insidansı %1.9'a yükselirken homozigot taşıyıcılarda %26'ya ulaşır (73).

### **Kombine Heterozigot Mutasyon**

F V Leiden ve Protrombin gen mutasyonunun birlikte olmasıdır. Çok nadirdir ve Kafkas popülasyonunun %0.01'inde görülür.

### **Antitrombin III Eksikliği**

Antitrombin III olarak da bilinen antitrombin; karaciğer hücreleri ve endotel hücrelerinden sentezlenen doğal bir glikoproteindir. Trombinin temel inhibitörüdür ve ayrıca pıhtılaşma faktörlerinden FX, FIX, FXI, FXII ve FVIIa'ya bağlanmış doku faktörünü inhibe eder. Heparin varlığında inhibitör aktivitesi 5000-40.000 kat artar (74).

Antitrombin (AT) eksikliği heterogen bir bozukluktur:

1. Tip-I eksikliği: AT molekülü az miktarda sentezlenir, dolayısıyla fonksiyonel testlerde bozuk bulunur. Şimdiye kadar bu eksikliğe neden olan 39 mutasyon bildirilmiştir.

2. Tip-II eksikliği: Varyant AT molekülüdür. AT miktarı normal, fonksiyonu bozuktur. Bunun 3 tipi vardır:

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

Antitrombin eksikliği ilk tanımlanmış kalıtsal trombofilidir ve trombofili nedenleri arasında en trombojenik olandır. Eksikliği nadirdir ve toplumda 600-1000 kişide bir görülür. Tedavi almayan hastalarda tromboembolik atak riski %70-90'nın üstündedir (75). Gebelik venöz trombo emboli riskini gebe olmayan kadınlara göre 4-5 kat arttıran bir durumdur (76). Gebelikte antitrombin eksikliğinde VTE riski daha fazla yükselir ve bir çalışmaya göre %73'e kadar ulaşır (73), puerperiumda ise %30 oranında devam eder (75).

### **Protein C ve Protein S Eksikliği**

Protein C ve protein S, karaciğerde vit K bağımlı sentezlenen proteinlerdir. Protein S ayrıca megakaryositlerde sentezlenir. Protein C aktive edildiğinde F Va ve F VIIIa'yı inhibe eder. İnhibitör etkisi Protein S'in kofaktör etkisi ile arttırılır.

Protein C ve S eksikliği popülasyonda nadir görülür ve toplumun sırasıyla %0,2-0,5 ve %0,03-0,2'sini etkiler.

PC pıhtılaşma sisteminin aktivasyonu sırasında trombin tarafından kesilerek aktive protein C (APC) halini alır. APC, FVa ve FVIIIa'yı selektif olarak proteolize uğratar. PC geni 2. kromozomdadır (2q13-2q14). PC geninde şimdiye kadar 160'dan fazla mutasyon tarif edilmiştir.

İki tip eksiklik tanımlanmaktadır:

**1) Tip I PC eksikliği:** Hem PC miktarı hem de fonksiyonu azalmıştır, dolayısıyla fonksiyonel testlerde bozuk ile sonuçlanır.

**2) Tip II PC eksikliği:** PC miktarı normaldir, ancak fonksiyonu bozuktur.

PS, APC'nin FVa ve FVIIIa'yı inaktivasyonunda nonenzimatik kofaktördür.

Plazmada %40'ı serbest, %60'ı C4b- bağlayıcı protein (C4b-BP) ile bağlı dolaşır. Sadece serbest kısmı APC'ye kofaktörlük yapar. PS kinaz ve protrombinaz komplekslerini inhibe edebilir, bu reaksiyon APC'den bağımsızdır. PS ayrıca tirozin kinaz reseptörüne ve damar düz kas hücrelerinde spesifik reseptörlere bağlanarak hücre proliferasyonuna katılır (77). PS geni 3. kromozomdadır (3p11.1 - 3p11.2). Üç tip eksiklik tanımlanmıştır:

**1) Tip I PS eksikliği:** Total ve serbest PS miktarları azalmıştır ve fonksiyonel testlerde bozuk bulunur.

**2) Tip II PS eksikliği:** Total ve serbest PS miktarları normaldir, fonksiyonu bozuktur.

**3) Tip III PS eksikliği:** Total PS miktarı normaldir, serbest PS miktarı azalmıştır, fonksiyonel test bozuktur. Gebelik sırasında Protein S eksikliği tanısı konulamaz, çünkü östrogen varlığında Protein S seviyesi fizyolojik olarak düşer. Tanı ancak doğumdan ya da östrojen tedavisi bırakıldıktan 3 ay sonra ve 1.derece akrabalarda araştırılabilir.

PS seviyeleri bakılarak ailesel eksiklik araştırılabilir (71). Doğal antikoagulan olan PC, PS ve AT eksikliği nadir görülür. PS, PC eksikliği ile faktör Va, VIIIa inaktivasyonu, AT eksikliği ile de trombin ve diğer enzimlerin inaktivasyonu bozulur ve tromboz riski artarak fetal kayıp riski artmaktadır. PS, PC veya AT eksikliği olan ailelerde, olmayanlara göre hem erken hem de geç fetal kayıp riskinde iki kat artış olmaktadır. Ancak literatürde fetal kayıp, doğal antikoagulan eksikliği ile ilgili araştırmalar tartışmalı sonuçlar vermektedir. Geniş serili meta-analiz sonuçlarına göre PS eksikliğinde TKG riskinde 15 kat, 22 hafta sonrası geç fetal kayıp riskinde ise 7 kat artış saptanırken, protein C ve antitrombin eksikliği ile fetal kayıp riski arasında anlamlı ilişki gösterilememiştir (78).

### **Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz Polimorfizmi**

Artmış homosistein ve azalmış folat seviyeleri arteriyel ve venöz tromboz ile ilişkili bulunmuştur. Oysaki son randomize, plasebo-kontrollü çalışmalara göre hiperhomosisteinürlü hastalarda; folat, pridoksin ve Vit B12 kullanılarak homosistein seviyeleri normale indiğinde VTE tekrarlamasında ya da ilk atağın ortaya çıkmasında azalma olmadığı sonucuna varılmıştır(79). Ek olarak homosistein seviyeleri gebelikte %50 oranında azalır ve folat tedavisi nöral tüp defektlerini engellemek için gebelikte rutin olarak verilir (73).

Metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) gen spesifik nokta mutasyonu (C677T) termolabil enzim aktivitesine neden olup, homosisteinin remetilasyonu bozulur. Bu enzim homozigot mutasyonu genel popülasyonda %10-20 oranında görülüp hafif hiperhomosisteinemiye neden olup plasental vaskülopati yaparak fetal komplikasyonlara neden olduğuna inanılmaktadır. Heterozigot mutasyonda hiperhomosisteinemi olmaz, arteriyel-venöz tromboz ve gebelik komplikasyonu için risk oluşturmaz. Birkaç araştırmada homozigot mutasyonun TKG'ya neden olduğu söylenmesine rağmen, meta-analiz sonuçlarına göre tekrarlayan erken ve geç gebelik kaybı ile ilişkisi yoktur (80).

### **Trombomodulin**

Trombomodulin 559 aminoasitten oluşan ve temel olarak büyük damarların endotel hücrelerinde, plasental sinsityotrofoblastlarda sentezlenen glikoprotein



reseptörüdür. Sağlam endotelde trombomodulin trombin ile kompleks oluşturur ve bu kompleks PC'nin APC'ye dönüşmesini sağlar.

### **Alloimmun Faktörler**

Plasenta gebelik boyunca maternal immün reaksiyonu engelleyen bir bariyer olarak görev yapar. Gebeliğin başlangıcında bu görevi mekanik yapısı ile yapar.

Gebeliğin ilerleyen dönemlerinde trofoblastların yüzeyindeki histokompatibil antigenler de barrier görevine katılır. Gebelik boyunca maternal immün sistem çeşitli alloantikörlerin sentezini indükler, bu antikörler trofoblastları sararak maternal immunitenin sitotoksik cevabından korur. Yapılan çalışmalarda bu alloantikör sentezinde eksikliğinde gebeliklerin fetal kayıp ile sonlanabileceği gösterilmiştir (81).

### **NK (Natural Killer) Hücre Sitotoksitesi**

NK (natural killer) hücreler istilacı trofoblastlara karşı immün savunmada anahtar rol oynar. Aynı zamanda TNF-alfa tarafında NK hücreler aktive edildiğinde trofoblastlarda apoptozu indükleyerek düşüklere yol açabilirler. Yapılan bir çalışmada sağlıklı fertilitesi olan gebe ve gebe olmayan kadınlara göre, tekrarlayan gebelik kaybı olan hastalarda periferik kanlarında CD56+ NK hücre sayısı daha fazla saptanmıştır. Dolayısıyla gebelikte ve gebelik öncesi kanda bakılan CD56+ NK hücre sayısı tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda gebelik sonuçları hakkında önceden bilgi verebilir.

TGK olan kadınlarda implantasyon sahasının immunhistokimyasal incelemesinde; aktive lökositlerin ve CD57 NK sayısının önemli oranda artmış olduğu saptanmıştır. Bu da TGK'daki muhtemel patofizyolojiyi açıklayabilir. TGK olan kadınlardaki uterus NK hücreleri trofoblast yüzeyindeki HLA-Cw moleküllerine spesifitesinin eksik olduğu dolayısıyla NK hücre aktivitesinin inhibisyonu bozulmakta ve embriyo yabancı hücre reaksiyonundan korunamamaktadır (82).

### **NK T hücreler**

Desiduala bulunan TCR alfa-beta lenfosit popülasyonunun üyesi olan CD3+T hücrelerin bir kısmı NK hücre markırı olan CD56 eksprese etmektedirler. Bu hücelere NK T hücreler denir. Bu hücreler NK ve T hücreleri tanıyan CD3+/CD56+ reseptörleri içerirler ve CD3+ insan desidual hücrelerinin %0.48'ini oluştururlar.

Normal gebelikte desidual NK T hücrelerin oranı periferik hücreler ile aynıdır. Ancak missed abortus ve TGK'da desidual NK T hücre oranı periferik kandan daha düşük saptanmaktadır (83).

### **Th1-Th2 Dengesi**

Gebelik boyunca maternal immüniteyi temel olarak sıvısal bağışıklık sistemi oluşturur (84).Feto-maternal yüzeyde Th2 sitokin cevabı trofoblastlar ve desidual lökositler tarafından yönetilir. Spontan düşükten sorumlu tutulan 2 temel sitokin mevcuttur;

TNF-alfa ve IFN-gama. Bu sitokinler in vitro ortamda trofoblastların apoptozunu indükler. Ek olarak IFN-gama ve TNF-alfa Fas ekspresyonunu uyarır ve trofoblastların Fas aracılı apoptozusa duyarlılığını artırır. Fas/Fas ligandı sistemi hücre proliferasyonunu kontrol eden en önemli kısa yoldur. Bu nedenle Fas ekspresyonunun arttırılması gebelik kaybının indüklenmesi ile ilişkili olabilir (85).

### **Reguluar T Hücreler**

Reguluar T hücreler (Treg) periferik kandaki CD4 ve CD25 eksprese eden CD4+ alfa-beta T lenfositlerdir. Gebelik süresince estrodiol ve TGF-β' nin etkisi ile CD4+CD25- Treg hücre prekürsörleri; CD4+CD25+ hücelere dönüşür.

Fertil ve gebe olmayan kadınlarda CD4+25+FoxP3+ Treg hücreler serum östrojen seviyelerine paralel olarak folliküler faz boyunca sentezlenir. TGK öyküsü olan kadınlarda bu Treg hücrelerin hem folliküler hem de luteal fazla sayılarının postmenapozal dönemde olduğu gibi düşük olduğu saptanmıştır. Düşük sayıya ek olarak TGK olan kadınlarda Treg hücre aktivitesi bozuk olarak saptanmıştır (86).

### **Anti Laminin 1 Otoantikörleri**

Laminin-1 embrionun implantasyonu ve plasentasyonu, embriogenez aşamasında en erken sentezlenen proteinlerden biridir. Basal membranın temel komponenti olan bir glikoproteindir. 3 subünitesi vardır; alfa-1, beta-1 ve gama 1 zincirleri.

Lamininlerin çeşitli işlevleri vardır; hücre adesyonu, göç, proliferasyon, farklılaşma. Erken embriodan kaynaklanan Laminin-1 tip IV kollagen sentezini artırır ve peri-implantasyon aşamasında trofoblastların maternal matrikse tutunmasında görevlidir. Anti- Laminin otoantikörleri ilk kez 1989 yılında Carey ve Klein tarafından üreme bozukluğu olan maymunlarda saptanmıştır. Bu makalede TGK ile başvuran 177 kadında %31.1 oranında IgG anti-laminin-1 antikörleri saptanmıştır. Ayrıca bu antikörlerin seviyeleri TGK olan kadınlarda sağlıklı gebe ve gebe olmayan kadınlara oranlara çok daha yüksek oranda saptanmıştır (sırasıyla;  $P=0.0043$  ve  $0.0073$ ). IgG anti-laminin-1 otoantikörleri pozitif olan TGK olan kadınlarda negatif olan kadınlara oranla sonraki gebeliklerinde canlı doğum oranları önemli oranda daha az saptanmıştır ( $P=0.032$ ) (89).

### **2.2. Blastokistin İmplantasyonu**

İmplantasyon süreci fertilizasyondan sonraki 6-7 gün içinde başlar ve temel olarak 3 evreden oluşur: appozisyon, adesyon ve invazyon.

Appozisyon ilk evredir; apikal uterus epiteli yüzeyindeki mikroprotrüzyonlar olan pinodopodlar, blastokistin yüzeyindeki apikal sinsisyotrofoblastların mikrovillüsleri ile hücreler arası ilişkiye girer. İkinci basamak adezyondur; blastokist ve uterus epiteli arasındaki yüksek fiziksel etkileşim ile gerçekleşen yapışmadır. Son evre; invazyon evresidir.

Sinsityotrofoblastlar uterus epitel hücrelerine penetre olur ve bunu mononükleer sitotrofoblastların uterus epitelinin derinliklerine, myometriuma ve uterus damarlarına infiltrasyonu ile devam eder. Villöz sitotrofoblast hücreleri villüslerin tepesinde yer alır, bazal membranın altında çoğalıp maternal spiral arterlere invaze olur ve endovasküler trofoblast hücrelerini oluştururlar. Trofoblast

invazyonu ve migrasyonu temel olarak trofoblastların kendileri ve maternal mikroçevre tarafından kontrol edilir (90).

Apozisyon, adezyon ve invazyon aşamalarında; blastokist endometrium arasındaki ilişkiyi oluşturmaktan sorumlu olan moleküller uzun zamandır çalışılmaktadır. Bu moleküller arasında en önemli olanlar integrinler, MUC-1, ekstrasellüler matriks proteinleri, implantasyondan sorumlu büyüme faktörleri olarak sıralanabilir.

İntegrinler menstürel siklusun midluteal evresi boyunca, progesteron cevabı altında, uterus epitel hücrelerinin apikal çıkıntıları olan pinodopodlar ortaya çıkar.

Pinodopodların biyolojik yapısı tanımlanamamıştır. Fakat implantasyon sürecindeki kısa süreli varlıkları, blastokistin yüzeyel sinsisyotrofoblastlarının apikal yüzeyi ile ilişkiye geçip implantasyonu sağladıklarını düşündürmektedir. Blastokistin trofektoderm hücrelerinin pinodopodlara adezyonu, pinodopod membranında yer alan E-katedrin gibi adeziv moleküller aracılığıyla olmaktadır. İn vitro çalışmalarda trofektoderm ve pinodopodlar arasında hiçbir direkt ilişki olmadığı gözlenmemiştir.

Ayrıca blastokistin, kültüre edilmiş endometriyum epitelyum hücreleri yüzeyinde pinodopodlar aracılığıyla yürüdüğü gözlenmiştir. İntegrinler heterodimerik membran proteinleridir ve alfa ve beta subünitelerinden oluşur, çeşitli ekstrasellüler matriks (ECM) yapılarına bağlanma kapasitesi taşırlar ve migrasyon, invazyon, hücre iskeleti reorganizasyonu, hücre sel sinyal iletimi gibi görevleri üstlenirler. Endometrial integrinler hormon bağımlıdır ve menstürel siklus boyunca değişkendir. Endometriyumun integrin içeriğinin başarılı implantasyonda önemli görev üstlendiği düşünülmektedir (91). Embriyo yerleşimi sırasındaki integrinlerin ekspresyonunda  $\alpha V\beta 3$  ve  $\alpha 4\beta 1$  integrinleri uterus ta saptanmıştır (92).  $\alpha V\beta 3$  embrionun adezyonu sırasında yüksek oranda sentezlendiği saptanmıştır ve eksik sentezinin infertilite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (93,94).

Tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda  $\alpha 4\beta 1$  ve  $\alpha 5\beta 1$  integrinlerinin, implantasyon sürecinde düşük konsantrasyonda olduğu bulunmuştur(71). Trofoektodermda ayrıca çeşitli integrinler sentezlenmektedir;  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$

ve bu integrinler blastokist adasyonu ile ilişkili olduğu dőünőlmektedir (73). Farklı bir sőrü molekülünde integrin molekőleri ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Örneğin IGF-1, ekstrasellőz trofoblast hőrelerinin migrasyonunu indőklemektedir.

Uterin hőrce yőzey glikoproteinleri (örneğin MUC 1), trofoblast invazyonunda bariyer sağlar. MUC 1 endometrial dokuda proliferatif fazdan sekretuar faza doğru artar ve geç sekretuar fazda azalmaya başlar. Progesteron östrojenle birlikte MUC 1'in sentezini arttırırlar. Blastokistlerin implantasyon sahasında MUC 1'i lokal olarak tükettiği gösterilmiştir. Yani MUC 1 böylece embrionun uterusu girişinden 3 gün sonra blastokistin endometriuma blastokistin yerleşimini engelleyen anti-adeziv molekül gibi davranmaktadır (98)

Trofoblastik hőrelerin bazal membrana ve matriks proteinlerine tutunmasını sağlayan extrasellőler matriks proteinleri: kollogenler (Col), fibronektin (FN), laminin (LN), vitronektin (VN), trofin ve tastindir (98).

İmplantasyondan sorumlu büyüme faktörleri: Epidermal growth faktör, Heparin bağlayıcı EGF –benzeri büyüme faktörü, Transforming Growth Faktör, İnsülin benzeri growth faktör bağlayıcı protein-1, Sitokinler; Lökemi inhibitör faktör, İnterlökün-1, Hormonlar: Human koryonik gonodotropin, Progesteron, İnflamatuar Faktörler olan Kortiko-sağılatacı faktör, Tumor nekrosiz faktör-  $\alpha$ , Prostaglandinler, Extrasellőler matriks proteinazları; MMPs (Matriks metalloproteinazları), TIMPs (Tissue inhibitors of matriks metalloproteinazları), Serin proteinazları olarak sıralanabilir (98)

### **2.3. Plasental Histopatoloji**

Plasenta çift 2 dolaşım sistemine sahip fetal gelişimden sorumlu organdır. Plasental trofoblastlar hemostaz ve plasental farklılaşmadan sorumlu koagulyasyon ürünlerini sentezlerler. Gebelik boyunca fetal gelişim için gerekli olan uterin değişimler gerėekleřir; dilatasyon, spiral arterlerde aşırı genişleme, spiral arter endotelinde destrüksiyon ve trofoblastlar tarafından invazyonu. Sadece yeterli plasental kan akımı sağlandığında normal plasental gelişim sağlanabilir. Gebelikte meydana gelen normal uterin farklılaşmaların yetersiz olduğu durumlarda plasental

gelişiminde yetersizliğe neden olur. Bu da intrauterin büyüme kısıtlılığı (IUGR), erken doğum, preeklampsi, gebelik toksemisi ile sonuçlanacaktır. Tekrarlayan gebelik kaybı ya da kötü gebelik sonuçları olan kadınlarda plasentadaki temel patoloji trombozdur (97).

#### **2.4. Tekrarlayan Gebelik Kaybında Tarama**

TGK öyküsü olan kadınlarda tarama kriterleri, risk faktörleri ile belirlenir.

Önceden tromboembolik atak geçirme öyküsü olanlarda tarama yapılmalıdır. Bu hastalarda trombofilik saptanır ise antikoagulan tedavi başlanmalıdır.

Tromboembolik atak öyküsü olmayıp aile öyküsü olan hastalarda tarama konusu hala tartışmalıdır. Ancak birinci derece akrabalarda antitrombin III, protrombin gen mutasyonu, FV Leiden homozigot mutasyonu var ise hastanın yüksek risk taşıdığı düşünülerek tarama yapılmalıdır (98).

TGK öyküsü olup sekonder yada tersiyer habituel abortusu olan hastalarda, önceki gebeliklerinde IUGR, preeklampsi, ikinci ve üçüncü trimesterde intrauterin fetal ölüm ve plasenta dekolmanı öyküsü varlığında antifosfolipid sendromu ve herediter trombofililer araştırılmalıdır (98)

Homosistein MTHFR polimorfizmi ve PAI-1 polimorfizmi ile TGK nedeni olması konusunda net veriler bulunmadığından TGK tarama panelindeki veri netlik kazanmamıştır.

#### **2.5. Genetik Polimorfizm**

##### **2.5.1. Tanım**

İnsan Genom Projesi'nin sonuçlanmasını izleyen yıllarda bilimsel ilgi daha çok genetik varyasyonların haritalarının çıkarılması üzerine yoğunlaşmıştır(99). Bir genin belli bir lokusta yer alan alternatif kopyalarından her birine allel denir. Alleller genel popülasyonda %1'den daha fazla sıklıkta bulunuyorsa, bu durum 'genetik polimorfizm(genetik çeşitlilik)' olarak adlandırılır. Aksine, alleller %1'den daha az

sıklıkta ise ‘nadir değişimler’ olarak isimlendirilir. Genetik hastalığa neden olan zararlı mutasyonların birçoğu nadir değişimlerdir.

Genetik polimorfizm teriminden toplumda yaygın olarak rastlanan ve genellikle hastalık etkeni olmayan genom değişiklikleri anlaşılır. Genetik polimorfizm, Mendel kurallarına göre aktarılır. Genetik polimorfizm, kodlanan veya kodlanmayan DNA dizilerinde meydana gelebilir. İntronlarda ve genler arasındaki DNA dizilerinde meydana gelen değişikliklerin genellikle etkisi yoktur. Ancak intron bölgelerindeki bazı polimorfizmlerin gen ekspresyonunu etkileyerek fenotipik değişiklikler meydana getirebileceği belirtilmektedir. Genlerin kodlanan bölgelerindeki (ekzon) polimorfizmler ise protein fonksiyonuna etki edebilir.. Promotor bölgede meydana gelen polimorfizm ise transkripsiyon düzeyinde değişikliğe neden olabilir.

Polimorfik değişiklikler çok çeşitli tiplerde olabilir. DNA dizisinde her 1000 bazda bir tek baz farklılığı gözlenir. Bu da aynı tür içerisinde genom farklılığının bir göstergesidir. SNP insan genomundaki en basit ve en yaygın genetik polimorfizm çeşitidir. Tüm polimorfizmlerin %90’ını oluşturur(100). İkinci sıklıkta görülen polimorfik değişiklik ise genomda ardışık olarak tekrarlayan DNA dizilerinin sayısında görülen değişikliklerdir. İnsan genomunda ardışık tekrarlayan DNA dizileri vardır(Minisatellite ya da VNTR; ‘Variable number of tandem repeats’ 5-55 tekrar dizisi içeren 10-60 baz uzunluğunda; kısa DNA dizileridir. Microsatellite ya da ‘short tandem repeats’; STR; 1-6 bazlık tekrarlardan oluşan kısa DNA dizileridir). Bu dizilerin tekrar sayıları her bireyde farklıdır(101). SNP’lerin bazı alt grupları vardır. SNP’leri; Amino asit değişimine neden olmayan SNP’ler (synonymous) veya amino asit değişimine neden SNP’ler (nonsynonymous) olarak ikiye ayırabiliriz. Amino asit değişimine neden olan SNP’ler, protein fonksiyonuna etki ederek fenotip üzerinde etki meydana getirebileceği öne sürülmektedir. SNP’ler DNA dizisinde restriksiyon enzim(RE) kesim bölgesi meydana getirebilir veya mevcut kesim bölgesini ortadan kaldırabilir. Bu değişiklikler RE’lerince DNA’nın farklı uzunlukta kesilmesine yol açar. DNA bantlarının uzunluğu ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe RFLP (restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi) denir. Genetik

polimorfizmler, membran proteinlerinin ekspresyonu, enzimlerin katalitik aktivitesini, yapısını veya ekspresyon düzeyini etkileyebilir ve fonksiyonel değişimlere yol açabilir(101).

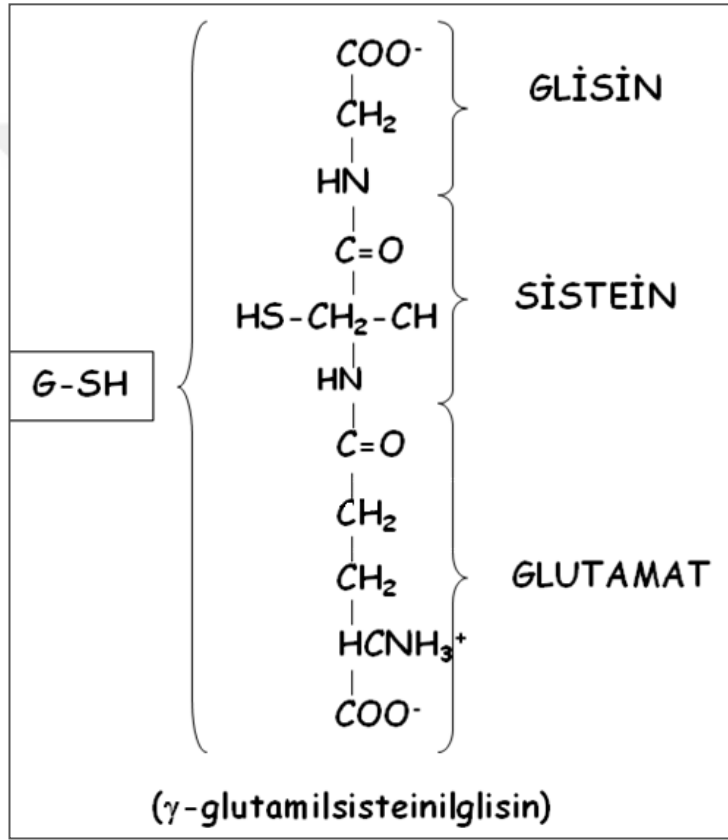




## 2.6 .Glutasyon

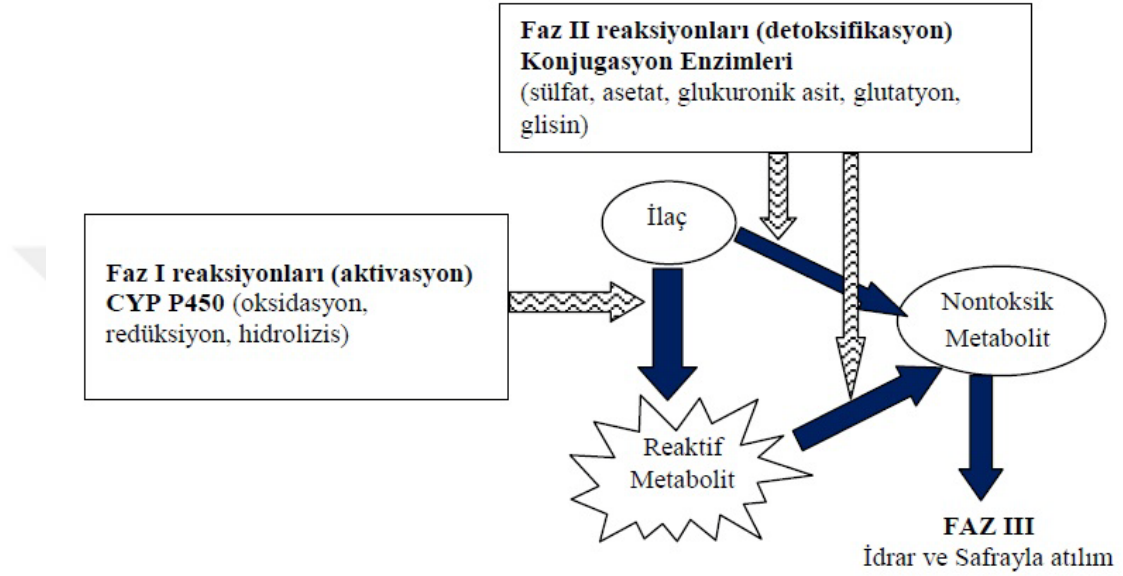
### 2.6.1 Glutasyon ve Ksenobiyotik İlişkisi

Glutasyon ( $\gamma$  glutamil sisteinil glisin) glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptiddir (102,104). İlk defa 1888'de izole edilmiş, fakat yapısı 40 sene sonra açıklanmıştır (105). DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve hücre dışı transportlar gibi hücresel fonksiyonları dışında antioksidan olarak hücre savunmasında da rol oynar.



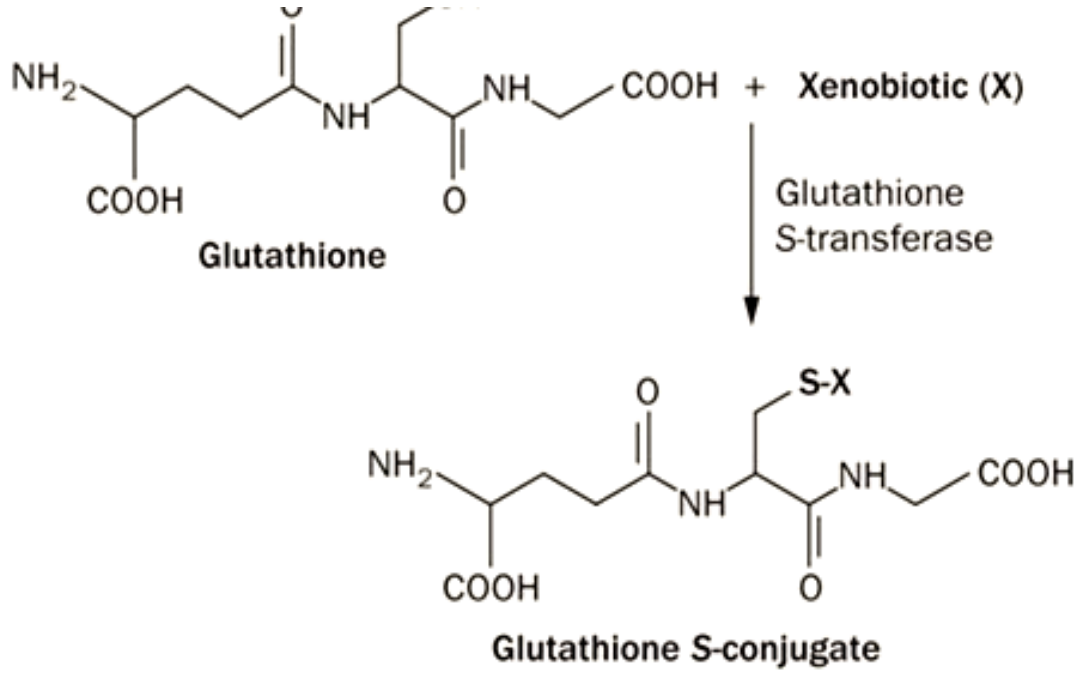
Şekil 2.1. Glutasyon'un Yapısı

Ksenobiyotik metabolizmasında Faz I ve faz II reaksiyonları olmak üzere iki ayrı reaksiyon kullanılır. Faz I'e katılan temel reaksiyon, monooksijenazlar veya sitokrom P-450 olarak adlandırılan enzimlerce katalizlenen hidroksilasyondur. Faz I'in diğer reaksiyonları redüksiyon ve hidrolizdir. Faz I'de oluşan hidroksile bileşikler faz II'de çeşitli polar metabolitlere dönüştürülmektedir(97)



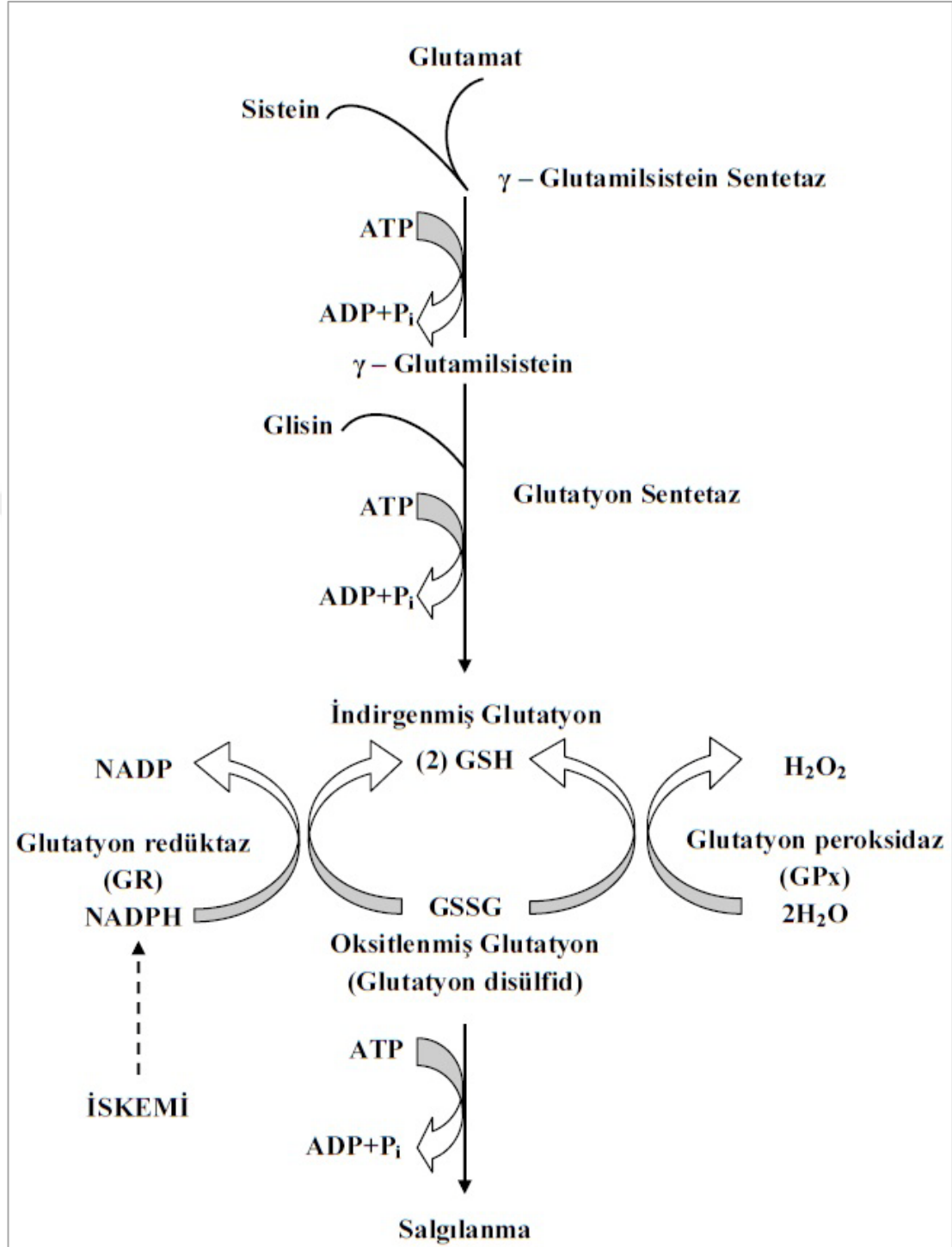
**Şekil 2.2.** Detoksifikasyon reaksiyonları (Faz I, Faz II, Faz III)

Ksenobiyotik metabolizmasındaki bu iki fazın baştan sona amacı ksenobiyotiklerin sudaki çözünürlüklerini (polarite) artırmak ve bu şekilde vücuttan atılımlarını kolaylaştırmaktır (103).



**Şekil 2.3.** Glutasyon Ksenobiyotik Mekanizması

Kanserojenik etkilerden korunmada glutasyonun önemli bir rolü vardır. Reaktif ara metabolitler olan epoksidler ve diğer bazı toksik bileşikler dokularda nükleofilik endojen bileşiklerle özellikle glutasyon ile konjuge edilerek inaktif duruma getirilirler.



Şekil 2.4. Glutatyon Sentezi ve Siklusu(104)

Glutatyon (GSH), organizmada L-glutamik asid, L-sistein ve glisinden,  $\gamma$ -glutamilsisteinsentetaz ve glutatyon sentetaz enzimlerinin etkisiyle iki aşamada meydana gelmektedir (102,107).

Glutasyon genelde GSH olarak kısaltılır; SH, sistenin sülfidril grubuna işaret eder ve molekülün alışveriş yapan kısmıdır. Glutasyon ile ksenobiyotiklerin reaksiyonlarını katalizleyen enzimlere "*glutasyon- S-transferazlar*", kısaca "*GST*" denir (108).

GST'lar ve onların merkaptürik asit biyosentezindeki rolleri ilk kez 1961'de Booth ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (108). Ksenobiyotik metabolizmasında glutasyonun rolü; faz I enzimlerince oluşturulan reaktif türlerin glutasyon ile konjugasyona girmesi ve sonuçta hücre makromolekülleri (DNA, RNA, protein) ile bağlanmasını engelleyerek hücre hasarını önlemesi şeklinde gerçekleşmektedir. Ksenobiyotiğin reaktif türleri, bir proteine bağlanıp onu değişikliğe uğratarak antijenik özelliğini değiştirebilir. Ksenobiyotikler bir hapten, yani tek başına antikor sentezini uyarılmayan ancak antikorla birleşince hücreyi hasara götürebilen molekülüdür (97).

Glutasyon (GSH), OH ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türevlerinin temizleyicisidir. Serbest radikallerle ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif tahribata karşı korumaktadır. Bunun dışında GSH protein yapısındaki -SH gruplarını indirgenmiş halde ve demirin de ferröz (Fe<sup>+2</sup>) halinde tutulmasını sağlayarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engelleyebilir ve hatta rejenere olmalarını sağlayabilir (105).

Glutasyon-s-transferazlar elektrofilik ksenobiyotikleri inaktive ederek vücuttan atılmak üzere konjugasyonunu sağlayan dimerik enzimlerdir (102,109). Glutasyon konjugasyonu elektrofilik merkezi bulunan bir bileşikle glutasyonun bir tiyoeter bağı oluşturması esasına dayanır (102,105).

GST, elektrofilik merkez içeren bileşiklerle GSH'ı bağlama kabiliyetindedir (110).

Konjugasyon reaksiyonu için gerekli elektrofilik fonksiyonel grupta bir C, bir N veya bir S atomu yer almalıdır. GST aynı zamanda pestisidlerin, çevresel kirleticilerin, oksidatif stres ürünlerinin, kemoterapide kullanılan ilaçların detoksifikasyonunda yer alır (111). GSH ve elektrofiller arasında bir bağ oluşumu,

ana bileşikten daha az reaktif bir konjugat oluşturur ve böylece detoksifikasyon gerçekleşir (112).

Reaktif elektrofiller, nükleik asitler ve selüler proteinlerde bulunan nükleofilik gruplarla kovalan bağ yaparak toksik etkilere, yani doku zedelenmesi, kanser oluşumu, gen yapısında bozukluk ve teratojenik etki gibi durumların ortaya çıkmasına neden olurlar (107). Glutasyon, nükleofilik sülfidril grubu ile bileşiklere bağlanarak organizmayı reaktif kimyasal bileşiklere karşı korur (106).

Çoğu dokularda mevcut olan tripeptid yapısındaki glutasyon ksenobiyotiklere bağlandıktan sonra daha ileri bir biyotransformasyonla karaciğer ve böbreklerde bulunan mikrozomal gama-glutamiltanspeptidaz ve sisteinilglisinaz enzimleri yardımı ile peptid bağları açılır. Peptid (amid) bağlarının hidrolizi sonucu sadece sistein kalır, sisteinin mikrozomal asetilasyonu ile merkaptürik asid konjugatı oluşur (107).

### **2.6.2 Glutasyon-S-Transferaz Enzimleri**

GST'lar doğada bakteriler, maya, küf, yumuşakçalar, kabuklular, solucanlar, kurbağalar, böcekler, bitkiler, balıklar, kuşlar ve memelilerde bulunur. En çok sıçanlarda ve insanlarda çalışılmıştır (108).

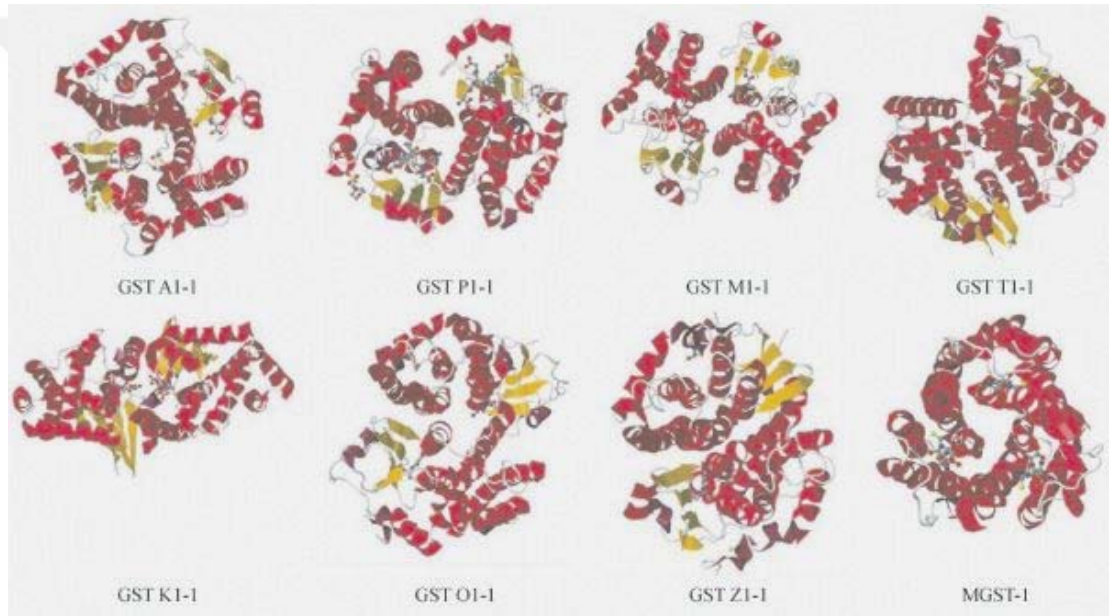
Farklı GST enzimlerinin dokuya spesifik ekspresyonları görülmüştür. Substratla ilgili spesifikliği ve fiziksel karakteristikliğine göre sınıflandırılmıştır. İnsanlarda birçok dokuda ekspresyonu vardır. Bununla birlikte karaciğer ve akciğerde yüksek düzeyde ekspresyon tespit edilmiştir ve de toplam solübl proteinlerin %4'ünden daha fazlasını oluşturur(128).

GST genleri tarafından kodlanan glutasyon-s-transferaz enzimleri, çevresel kaynaklı kimyasallar ve doğal olarak oluşan birçok metabolitin detoksifikasyonundan sorumludurlar (97,105,107).

GST'lar membrana bağlı ve sitosolik olmak üzere iki grupta incelenmektedirler (107,108). Vertabralılarda yedi sınıf sitosolik GST tespit edilmiştir: alfa, mü, kappa, pi, sigma, theta ve zeta. Bu sınıf ayrımları yapısal

farklılıklara dayanılarak yapılmaktadır. Bir sınıf içinde farklı GST'lar en az % 40, sınıflar arası ise en az % 30 aminoasit benzerlikleri gösterirler. Türler'e göre özel sınıflara dayandırılarak yapılan insanlar ve diğer memeliler için sınıflandırma belirtilmiştir (107,108).

GST'lar (sitoplazmik GST) iki aynı alt üniteden homodimerler veya farklı alt üniteden heterodimerlerden oluşmuşlardır. Sınıflandırma olarak Mannervik ve ark.'nın önerdikleri sınıflandırma kullanılmaktadır. Bu sınıflandırmada türlerin belirtilmesi için bir ön ek (örneğin, insan için h) kullanılırken, A, P, M, S veya T harfleri sırasıyla alfa, pi, mü, sigma ve thetayı işaret etmektedir (109).



**Şekil 2.5.** GST Enzimlerinin Yapısı

Bir GST'nin üç boyutlu yapısı domuz akciğerinden pi sınıf enzimi için 1991'de belirlenmiştir. İnsandaki GSTP1-1'in yapısı 1992'de plasentadan purifiye edilmiştir. Daha sonra da insan GSTA1-1 ve GSTM2-2 enzimlerinin yapıları tanımlanmıştır.

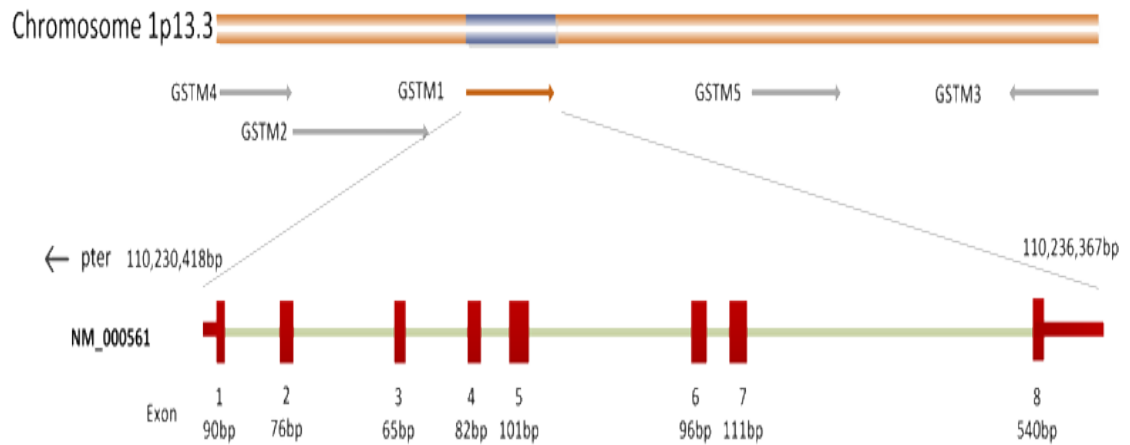
GST'lar herbir altbirim için katalitik bölgeye sahip globular dimerik proteinlerdir. 23.000- 29.000 dalton moleküler ağırlığındadır. Her bir alt birim 200-240 aminoasitten oluşur. Herbir GST altbiriminin polipeptid zinciri kısa bağlayıcı bölgelerce birleştirilen iki domainden oluşur. N-terminal domain bir beta-sheet ve üç

alfa-heliks yapısında düzenlenmiş 80 aminoasitten oluşan GSH'nun bağlanma bölgesi (G bölgesi) ve hidrofobik elektrofillerin bağlanmaları için olan H bölgesinden oluşmaktadır. C-terminal domain kalan 5 veya 6 alfa-heliks yapısındaki aminoasidi içerir (107).

GST M1  $\mu$  sınıfındadır. Kromozom 1p13,3 de yer alır. Karaciğer, akciğer, beyin adrenal, böbrekte ekspresse edilir. Katekolaminlerin quinon metabolitleri (nochrone,dopachron,noradrenochrome), aflatoksin-B8-9-epoksid, oksipoliaromatik hidrokarbon detoksifikasyonunda rol alır (113-117).

GST M1 benzo( $\alpha$ )-piren metabolitlerinin hidroksilasyonu ve epoksidleri gibi sigara ile ilişkili karsinojenlerin detoksifikasyonlarında etkindir(128).

GST M1 homozigot delesyonundan dolayı insanların %20-50' sinde ekspresyonu yoktur. GST M1 enziminin ekspresyonunun olmadığı insanların oranı Beyaz ırkta ve Asyalılarda Afrikalılardan daha fazladır(128). GST M1'in yabancıl ve null tip olmak üzere iki genotipi vardır. Null tipinde gen delesyonu olması nedeniyle bu tipe sahip allel protein ürünü vermez (116). Genotipi çeşitli popülasyonlarda %50-74 sıklıkta görülürken ülkemizde %55-61 oranda rapor edilmiştir (113-117).



Şekil 2.6. GSTM1 gen bölgesi



GSTT1 theta sınıfındadır ve 22q11.23 de lokalizedir. Böbrek, karaciğer, ince bağırsak, beyin, prostat ve akciğerde ekspresse olur. GSTT1 oksidize lipid, DNA ve etilen oksiti substrat olarak kullanır (119).

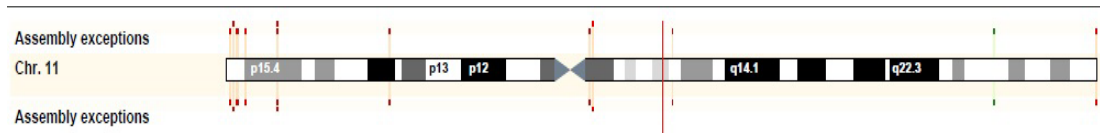
GST T1 sigara tütününün içerdiği butadin, etilen oksid gibi ağır halojenik toksinlerin düşük moleküllere biyotransformasyonunda rol alır(128). GST T1'in de yabani ve null tip alleleri vardır. Null genotip popülasyonda %25-47'dir (124,125). Null tipinde gen delesyonu söz konusu olup protein ürünü yoktur.

Yaklaşık olarak Asyalıların % 60'ında, Afrikalıların % 40'ında ve Beyaz ırkın % 20'sinde GST T1 ekspresyonu yoktur(128).

GST P1 pi sınıfındadır ve kromozom 11q13,3 de lokalizedir(104). Beyin, kalp, akciğer, testis ve pankreasta bulunur (122).

DNA oksidasyonundan oluşan bazı profenoller (adenin, timin, profenol), benzoprin, benzofenantren, lipid ve DNA oksidasyon ürünlerini detoksifiye eder (122).

GST P1'in dört alleli vardır ve bu alleller 105 ve 114 deki aminoasit farklılıklarına göre adlandırılır (120,121). 114. aminoasitte sitozin yerine timin olduğunda ürün alaninin yerine valin olur, ancak bu 114. aminoasit katalitik bölgede olmadığı için detoksifikasyonda önemi yoktur (123). 105. aminoasit ise katalitik bölgede yer alır (118). 105.aminoasiti kodlayan adeninin guanin olması durumunda ürün izoleusin yerine valin olur (124). Bu değişim enzim fonksiyonu üzerine çeşitli etkilere sahiptir (116,117).



**Şekil 2.7.** GSTP1 Gen Bölgesi

GST aktivitesi insanda tüm dokularda bulunmaktadır. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda cGST'ların birçok dokuda bulunmamasıyla birlikte en yüksek konsantrasyonları testislerde ve karaciğerde tespit edilmiştir. cGST'ların seviyeleri

üzerinde birçok enzim indükleyicisinin küçük artırıcı etkileri bulunmaktadır. Örneğin benzo(a)piren, etanol ve fenobarbitol gibi. Herbir dokuda spesifik GST izoenzim grubu mevcuttur. Buna ek olarak, çeşitli izoenzimler farklı miktarlarda ifade edilmektedir. Bir dokudaki hücre tiplerinde GST alt ünite profilleri özellikle gelişme döneminde değişebilmektedir, örneğin, insan ve sıçanların fetal hepatositlerinde GSTP1-1 oldukça yüksek seviyede ifade edilirken yetişkin hepatositlerinde normal olarak dahi ifade edilmemektedir (129).

Tüm GST'lar 1-kloro-2,4-dinitrobenzenden substrat olarak faydalanırlar ve GST'ların karakterizasyonunda bir araç görevi yaparlar. 2-kloro-5 nitrobenzonitrilin de GST'lar için substrat görevi yaptığı bulunmuştur. GSTT1 için diğer spesifik substrat p-nitrobenzil klorid, diklorometan, etilen oksid ve metilbromiddir. Diklorometan boyalarda çözücü, temizlik maddelerinde, soğutucularda, kahve dekafeinizasyonunda kullanılan önemli bir endüstriyel bileşiktir. Bu bileşiğin toksisitesinde geniş türsel farklılıklar bulunur. Farelerde bu bileşiğin GSH konjugasyonu ile aktive edilerek akciğer ve karaciğer kanserlerine neden olduğu belirtilmiştir (108).

### **2.6.3 GST Polimorfizminin Kaynağı**

Polimorfik yapıda olan ve çok sayıda maddeyi metabolize edebilme kabiliyetlerinden dolayı oldukça fazla ilgi çeken üç gen ailesi bilinmektedir: Sitokrom P450, N-asetiltransferaz ve glutatyon-s- transferaz (103).

Kimyasal karsinogenlerin aktivasyonu ya da detoksifikasyonunda yer alan enzimler biyotransformasyon enzimleri olarak adlandırılır(126).

İnsanlarda GSTM1'in polimorfik olduğu ve bireylerin % 35-60'ında bulunmadığı gösterilmiştir. Bu enzim beyaz popülasyonun % 50-60'ında bulunmazken, Kuzey Amerikalı siyahların % 28'inde ve Nijeryalılarda ise % 22 gibi daha düşük yüzdelerde bulunur. Benzer şekilde GSTT1 de polimorfiktir ve insan popülasyonlarının % 10-65'inde bulunmamaktadır. Amerikalı beyazların % 17'si, Nijeryalıların % 39'u, Hindistan'da yaşayan İngilizlerin % 3.2'si GSTT1-1 enzim aktivitesi bulundurmazlar. GSTM1 ve GSTT1 aktivitesinin yokluğu (null genotip) bu genlerin homozigot olarak delesyona uğramasından kaynaklanmaktadır (112).

Organizmanın antioksidan kapasitesinin korunması, canlılığın devamı açısından çok önemlidir. Glutasyon eksikliğine bağlı olarak birçok dokuda çeşitli mitokondriyal dejenerasyonla bağlantılı olarak hücre hasarı meydana gelmektedir. Normal bir hücrede, spesifik olarak hücresel kompartmanlara yerleştirilmiş olan oksidan-antioksidan sistemler dengesindeki herhangi bir bozukluk bir çok patofizyolojik durumun (nörodejeneratif hastalıklar, yaşlanma, kanser, immün hastalıklar gibi) ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Birçok hastalığın patofizyolojisinde yer alan glutasyonun eksikliğini, GSH veya GSH öncülleri verilerek önlenildiği veya geriye döndürülebildiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir.



### 3.İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmanın verileri SPSS 22.0 programına yüklenerek verilerin değerlendirilmesinde 2x2 düzenlerde khi-kare testi, çok gözlü düzenlerde khi-kare , iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi kullanılmış ve yanılma düzeyi 0,05 olarak alınmıştır.



## 4.MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmamız kapsamında GST T1 ve M1 genlerinde tüm geni içine alan delesyon mutasyonları ve GST P1 geninde ekzon 5 Ile105Val polimorfizmlerinin frekansları araştırıldı.

Çalışmamızda 01.01.2014-01.01.2015 tarihleri arasında polikliniğimize başvuran 107 TKG hastası ile düşük öyküsü olmayan ve sağlıklı doğum yapmış 107 kişi kontrol grubuna dahil edilmiştir.

Çalışma EDTA'lı tüp ortamına alınmış periferik tam kan kullanılarak yapıldı. Hasta ve kontrol kanları çalışma anına kadar -20oC'de muhafaza edildi. Mutasyon analizi yapılmadan önce her bir kan örneğinden total genomik DNA izole edildi. Bu DNA'lardan önce multipleks PCR yöntemi kullanılarak GST T1 ve M1 delesyonları saptandı. GST P1 ekzon 5 Ile105Val polimorfizmleri ise PCR-RFLP yöntemi kullanılarak araştırıldı.

### 4.1. Kullanılan Cihaz ve Aletler

- Buzdolabı (+4 °C arçelik)
- Derin Dondurucu (-20 °C Regal)
- Mikropipet seti (0,5-10 µ l, 10-100 µ l, 100-1000 µ l)
- Mikro Santrifüj (MİKRO120)
- Vorteks (VELP SCIENTIFICA)
- Distile su cihazı (Ultrapure (type1) Water)
- PCR cihazı (Thermal cycler) (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler)
- Spektrofotometre (MaestroGen nano)
- Blok ısıtıcı (Mixing Block MB-102)
- Mikrodalga fırın (arnica)
- Güç kaynağı (cleaver scintific Ltd CS-300 V )
- Elektroforez tankı
- UV Transillüminatör (SYNGENE)

Kullanılan yöntemlerin protokolü aşağıdaki gibidir.

#### **4.2. Periferik Kandan Total Genomik DNA İzolasyonu**

Total genomik DNA periferik kandan UltraClean BloodSpin DNA (MO,BIO,Carslbard,Kanada) kiti kullanılarak izole edildi

##### **DNA İzolasyon protokolü**

1. 200 µl kan 2 ml ependorf tüpe alındı ve 10 µl proteinaz K pipetlendi.
2. 200 µl B1 solüsyonu eklendi ve 15 sn vortekslendi . B1 solüsyonu katatrotfik tuz ve deterjan içeren lizis ajanıdır.
3. Tüpler 65°C de 10 dk inkübe edildi.
4. 200 µl B2 solüsyonu eklendi ve 15 sn vortekslendi. B2 solüsyonu DNA'nın bağlanması için optimal şartları sağlar ve % 100 etanol içerir.
5. Lizat spin filtreli tüplere transfer edildi ve 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
6. Filtreli tüpler 2 ml'lik yeni ependorf tüplere transfer edildi.
7. 500 ml'lik B3 solüsyonu filtreli tüplere eklendi. 13.000 rpm' de 30 sn santrifüj edildi. B3 solüsyonu filtreli tüpe bağlanan DNA'yı temizleyen tuz bazlı yıkama solüsyonudur.
8. Filtreli tüp kaldırılıp altta kalan içerik döküldü. Filtreli tüp aynı 2 ml'lik ependorf tüpe yerleştirildi.
9. Filtreli tüpe 500 ml B4 solüsyonu eklenir. 13.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. B4 solüsyonu DNA'yı temizleyen etanollü yıkama solüsyonudur.
10. Filtreli tüp kaldırıldı ve altta kalan içerik atıldı. Filtreli tüpler aynı ependorf tüpe yerleştirildi.
11. Filtreli tüpün membranını kurutmak için 13.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi.

12. Filtreli tüpler çıkartıldı ve yeni 2ml'lik ependorf tüplere transfer edildi.
13. 200 µl B5 solüsyonu eklendi. 65°C de 5 dk bekletildi. B5 solüsyonu 10 mM Tris 1 mM EDTA içerir.
14. 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
15. Filtreli tüp çıkartıldı. Genomik DNA izolasyon işlemi tamamlandı.
16. DNA konsantrasyonunun ve saflığının tespit edilmesi için MaestroGen nano spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boyunda ışığın soğurma (OD) ölçümü yapıldı. Konsantrasyonu düşük örneklerden tekrar DNA izolasyonu yapıldı.
17. Genomik DNA çalışılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

#### **4.3 GST T1 ve M1 Genotiplerinin Multipleks PCR Yöntemi İle Saptanması**

GST T ve GST M genlerindeki tüm genin yok olması ile sonuçlanan delesyonlar albümin geninin pozitif kontrol olarak kullanıldığı multipleks PCR yöntemi ile saptandı.

**Tablo 4.1.** GSTT1, GSTM1 ve Albümin primer dizileri(130)

<b>GSTT1</b>	Forward	5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3'
	Reverse	5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'
<b>GSTM1</b>	Forward	5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'
	Reverse	5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'
<b>Albümin</b>	Forward	5'-GCCCTCTGCTAACAAGTCCTAC-3'
	Reverse	5'-GCCCTAAAAAGAAAATCCCCAATC-3'

GST T1 geni için forward 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' ve reverse 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'; primerleri; GST M1 geni için forward 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' ve reverse 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3' primerleri ve pozitif kontrol olan albumin geni için ise forward 5'-GCCCTCTGCTAACAAGTCCTAC-3' ve reverse 5'-GCCCTAAAAAGAAAATCCCCAATC-3' primerleri kullanıldı. GSTT1, GSTM1 ve albümin için elde edilen PCR ürünlerinin büyüklükleri sırası ile 459 bp, 219 bp ve 350 bp idi. PCR karışımı 25 µl'lik toplam hacimde 100 ng DNA, 2.5 mmol/ L dNTP, 0.8 µmol/l GSTT1 primeri, 0.4 µmol/L GSTM1 primeri, 0.8 µmol/L albumin primeri, 5 µl 10× buffer, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub> ve 5 U DNA Taq polimeraz (New England Biolabs) şeklinde hazırlandı.

PCR koşulları aşağıdaki gibi ayarlandı:

- 95°C'de 15 dk ilk denatürasyon
- 94°C'de 1dk (denatürasyon),



- 58°C'de 1 dk (bağlanma)
- 68°C'de 1 dk (uzama)
- 68 °C'de 10dk (son uzama), 35 döngü.
- PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülendi.

#### 4.4 Agaroz Jel Elektroforezi

1 gr agaroz (**Agarose-Basica LE, Prona**, İspanya) 50ml TAE (Sigma-Aldrich) tamponuna eklendi. Mikrodalga fırında 4 dk kaynatıldı. Düz bir zeminde kalıba döküldü uygun büyüklüklerde tarak takılarak oda sıcaklığında donduruldu. Donmuş Agaroz jele 2µl yükleme tamponu ile karıştırılmış 5µl PCR ürünü yüklenildi. 100 volt'da yarım saat elektroforeze tabi tutuldu. Jel etidyumbromid solüsyonunda bir süre bekletilip UV ışık altında incelendi.

Her bir örnek için öncelikle albümin bandının oluşup oluşmadığına bakıldı. Albümin bandının var olduğu hastalarda GST T1 ve GST M1 bantlarının olması genin mevcut olduğunu ve olmaması ise genin delesif olduğunu gösterdi.

#### 4.5 GST P1 ekzon 5 ile105Val Polimorfizminin PCR-RFLP Yöntemi ileTayini

PCR 25 µl'lik toplam hacimdeki PCR karışımı 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5 µl of 10× buffer 2,5 mmol/L dNTP, 10 U Taq polymerase (New England Biolabs) için 0.3 µM GSTP1-5F (5'-GTA-GTT-TGC-CCA-AGGTCA-AG-3') ve GSTP1-5R (5'-AGC-CAC-CTGAGG- GGT-AAG-3') primerleri kullanarak hazırlandı.

**Tablo 4.2.** GSTP1 Primer Dizileri(130)

<b>GSTP1</b>	<b>Forward</b>	<b>5'-GTA-GTT-TGC-CCA-AGGTCA-AG-3'</b>
	<b>Reverse</b>	<b>5'-AGC-CAC-CTGAGG- GGT-AAG-3'</b>

PCR koşulları

- 94°C'de 5 dk
- İlk 5 döngü aşağıdaki gibi başlatıldı ve her döngüde bağlanma ısı 1°C düşürüldü.
- 94°C'de 30 sn
- 64°C'de 30 sn
- 72°C'de 30 sn

Daha sonra aşağıdaki döngü 25 kez tekrarlandı.

- 94°C'de 30 sn
- 59°C'de 30 sn
- 72°C'de 30 sn

Polimeraz zincir reaksiyonu 433 bp uzunluğunda PCR ürünleri oluşturdu. PCR ürünü 5 ünite BsmAI (Fermentas, Litvanya) restriksiyon endonükleaz ile 37°C'de 16 saat boyunca kesime tabi tutuldu.

Restriksiyon kesim sonrası oluşan fragmanlar %3'lük agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez sonrası ekzon 5 kesim ürünleri yabanıl tip (AA) 328 ve 105 bp olmak üzere 2 bant oluştururken, heterozigot genotip (AG) 328,

222, 106 and 105 bp büyüklüklerinde 4 bant ve homozigot mutant genotip ise 222, 106 and 105 bp büyüklüklerinde 3 bant oluşturdu.



## 5.BULGULAR

Bu çalışmada, TGK ve GST gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmak için, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na başvuran hiç çocuk sahibi olamamış iki ve üzerinde abortus öyküsü olan 107 kadın TGK hastası alınarak hasta grubu oluşturuldu. Abortus öyküsü olmayan çocuk sahibi olmuş 107 sağlıklı kadın kontrol grubuna dahil edildi. Hasta grubunda yaş ortalaması 26,54+-6,67 olarak, kontrol grubunda yaş ortalaması 38,32+- 9,23 olarak belirlendi.

Çalışmaya alınan hasta ve kontrol grubundaki bireyler GST polimorfizmleri açısından değerlendirildi.

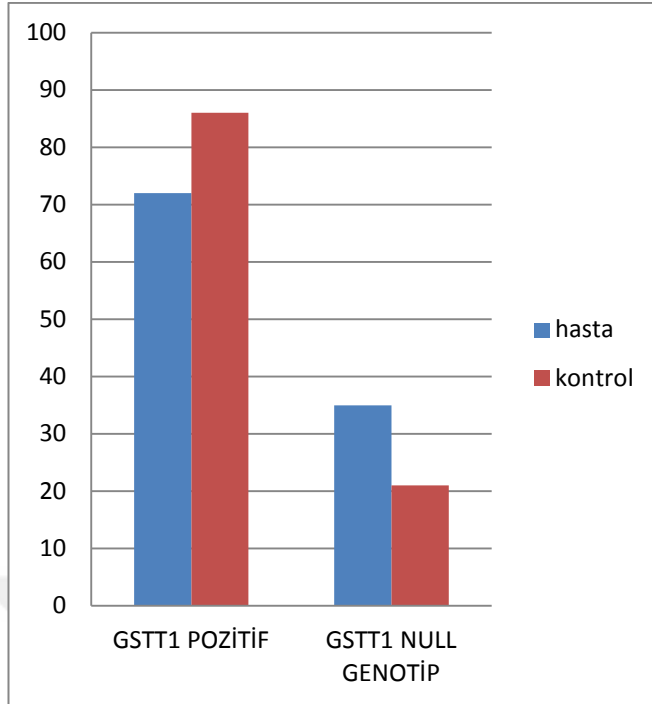
Çalışma kapsamında değerlendirilmeye alınan hasta ve kontrol grubu sigara ve alkol kullanımı açısından sorgulandı ancak sigara ve alkol tüketimi gözlemlenmedi.

GSTT1 null genotipli hasta sayısı 35(%32,7), kontrol grubundaki null genotipli birey sayısı 21(%19,6) , GSTT1 pozitif genotipli hasta sayısı 72(%67,3), kontrol grubundaki GSTT1 pozitif olan birey sayısı 86(%80,4) olarak bulunmuştur. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu( $X^2=4,74;P=0,029$  ; $P<0,05$ )(Tablo5.1)

**Tablo 5.1.** Hasta ve kontrol gruplarında GSTT1 genotipi

	Hasta (107)	Kontrol (107)	P	OR	%95 CI En Düşük	%95CI En Yüksek
GSTT1 Pozitif	<b>72(%67,3)</b>	<b>86(%80,4)</b>	<b>0,029</b>	<b>1,99</b>	<b>1,06</b>	<b>3,71</b>
GSTT1 Null Genotip	<b>35(%32,7)</b>	<b>21(%19,6)</b>				

**$X^2=4,74$**



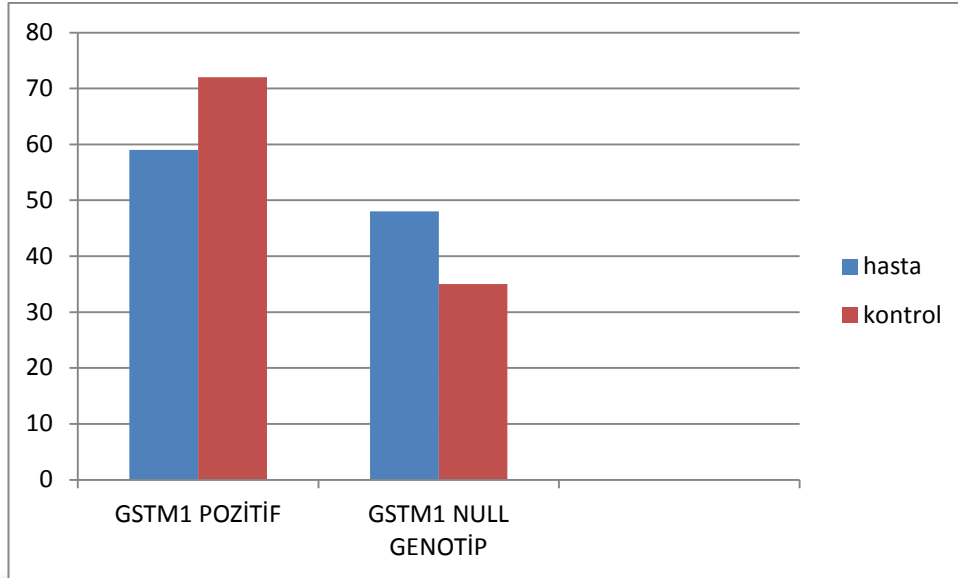
**Şekil 5.1.** Hasta ve kontrol gruplarında GSTT1 genotipi

GSTM1 null genotipli hasta sayısı 48(%44,9), kontrol grubundaki null genotipli birey sayısı 35(%32,7) , GSTM1 pozitif genotipli hasta sayısı 59(%55,1), kontrol grubundaki pozitif genotipli birey sayısı 72(%67,3) olarak bulunmuştur. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu( $X^2=3,326$ ;  $P=0,068$ ;  $P<0,05$ )(Tablo5.2).

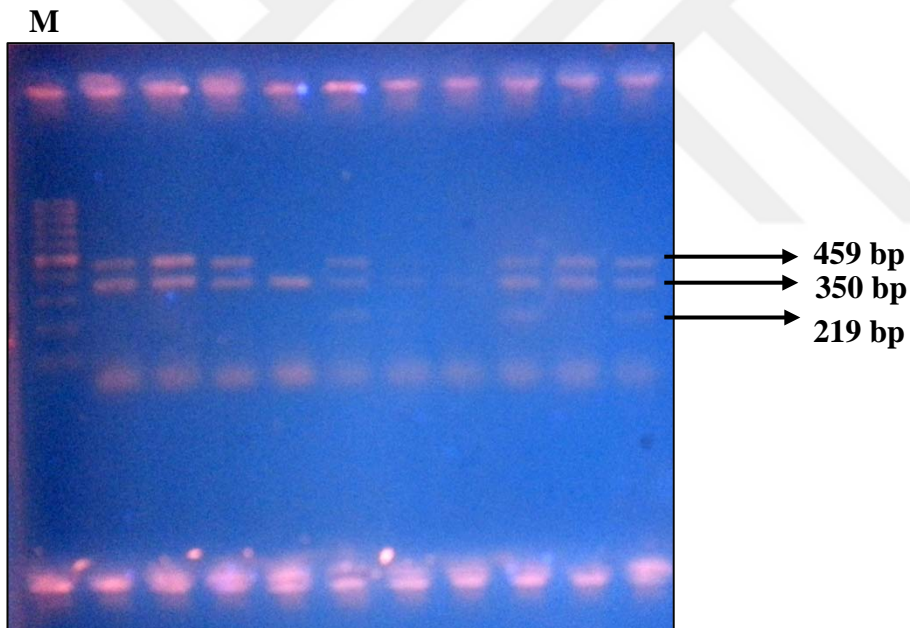
**Tablo 5.2.** Hasta ve kontrol gruplarında GSTM1 genotipi

DEĞİŞKEN	HASTA (107)	Kontrol (107)	P	OR	%95 CI EN DÜŞÜK	%95 CI EN YÜKSEK
GSTM1 Pozitif	<b>59(%55,1)</b>	<b>72(67,3)</b>	<b>0,068</b>	<b>1,67</b>	<b>0,96</b>	<b>2,91</b>
GSTM1 Null genotip	<b>48(%44,9)</b>	<b>35(%32,7)</b>				

$X^2=3,326$



Şekil 5.2. Hasta ve kontrol gruplarında GSTM1 genotipi



Şekil 5.3. GSTT1, GSTM1 ve Albümin Agaroz Jel Elektroforez Görünümü

M sütünü 100 bp'lik DNA markırıdır. Görüntüye göre 2. 3. 4. ve 10. sütunlarda GSTT1 ve albumin bandı görüldü, GSTM1 delesyonu saptandı. 5. 7. ve 8. sütunlarda sadece albumin bandı görüldü, GSTT1 ve GSTM1 delesyonu saptandı. 6. 9. ve 11. sütunlarda her üç bantta görülmekte delesyon saptanmadı.

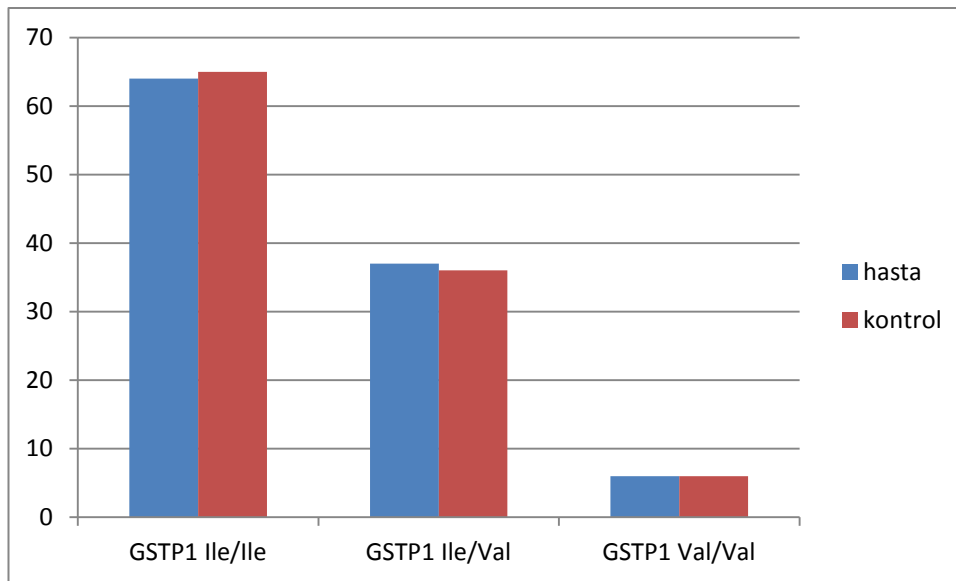
GSTP1 ekson 5 I105V polimorfizminde genotip sıklığı hasta grupta I alleli 165, V alleli 49, kontrol grubunda I alleli 166, V alleli 48 olarak bulundu( $X^2=0,013$ ;  $P>0,90$ ;  $P<0,05$ ).

GSTP1 yabanıl genotipi hasta grubunda 64(%59,5), kontrol grubunda 65(%60,7), heterozigot genotipli hasta 37(%34,6), kontrol 36(%33,6), homozigot genotipli hasta 6(%5,6), kontrol 6(%5,6) olarak bulunmuştur( $X^2=0,021$ ;  $P=0,989$ ;  $P>0,05$ )(Tablo5.3). Gen polimorfizmleri açısından gruplar arasındaki fark önemsiz bulundu.

**Tablo 5.3.** Hasta ve kontrol gruplarında GSTP1 gen polimorfizmi

DEĞİŞKEN	HASTA (107)	Kontrol (107)
GSTP1 Ile/Ile	64(%59,5)	65(%60,7)
GSTP1 Ile/Val	37(%34,6)	36(%33,6)
GSTP1 Val/Val	6(%5,6)	6(%5,6)

$X^2=0,021$   $P:0,989$



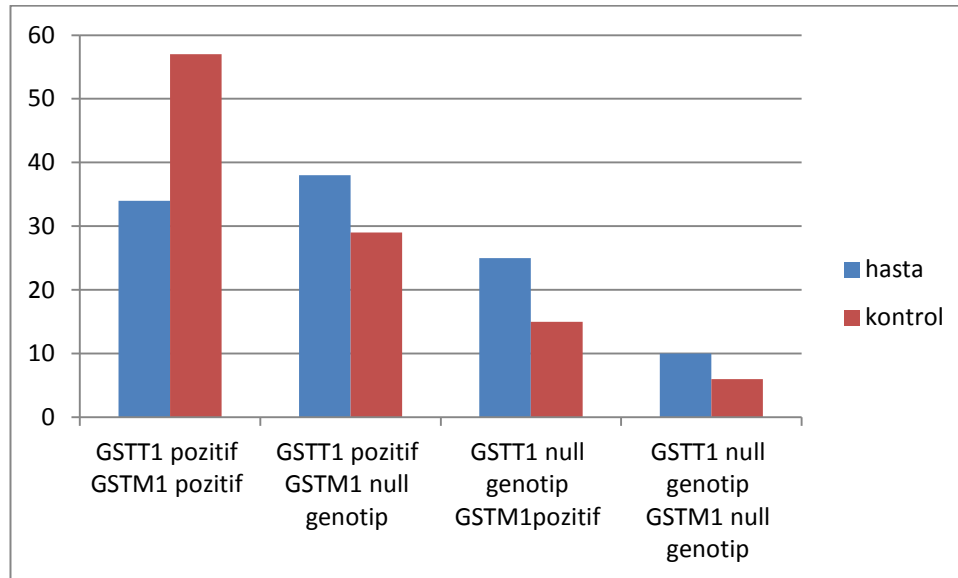
**Şekil 5.4.** Hasta ve kontrol gruplarında GSTP1 gen polimorfizmi

GSTT1 ve GSTM1 pozitif ve null genotipi kombine edildiğinde null genotipler hasta grupta anlamlı bir şekilde yüksek bulundu( $X^2=5,57$ ;  $P=0,018$ ;  $P<0,05$ )(Tablo5.4)

**Tablo 5.4.** Hasta ve kontrol gruplarında GSTT1 ve GSTM1 genotipinin birlikte değerlendirilmesi

DEĞİŞKEN	HASTA (107)	Kontrol (107)
GSTT1 pozitif GSTM1 pozitif	<b>34(%31,8)</b>	<b>57(53,3)</b>
GSTT1 pozitif GSTM1 null genotip	<b>38(35,5)</b>	<b>29(27,1)</b>
GSTT1 null genotip GSTM1pozitif	<b>25(23,4)</b>	<b>15(14)</b>
GSTT1 null genotip GSTM1 null genotip	<b>10(%9,3)</b>	<b>6(%5,6)</b>

**P:0,047**



**Şekil 5.5.** Hasta ve kontrol gruplarında GSTT1 ve GSTM1 genotipinin birlikte değerlendirilmesi



GSTM1 ve GSTP1 gen polimorfizmleri birlikte karşılaştırıldığında gen polimorfizmleri açısından gruplar arasındaki fark önemsiz bulundu( $X^2=4,07, P=0,131; P<0,05$ )(tablo5.5).

**Tablo 5.5.** Hasta ve kontrol gruplarında GSTM1 ve GSTP1 genotipinin birlikte değerlendirilmesi

DEĞİŞKEN	HASTA	KONTROL
GSTM1 pozitif GSTP1 normal	<b>38(%35,5)</b>	<b>48(%44,9)</b>
GSTM1 pozitif GSTP1 heterozigot	<b>20(%18,7)</b>	<b>21(%19,6)</b>
GSTM1 pozitif GSTP1 homozigot	<b>1(%0,9)</b>	<b>3(%2,8)</b>
GSTM1 null genotip GSTP1 normal	<b>26(%24,3)</b>	<b>17(%15,9)</b>
GSTM1 null genotip GSTP1 heterozigot	<b>17(%15,9)</b>	<b>15(%14)</b>
GSTM1 null genotip GSTP1 homozigot	<b>5(%4,7)</b>	<b>3(%2,8)</b>

**$X^2=4,07 P:0,131$**

GSTT1 ve GSTP1 gen polimorfizmleri birlikte karşılaştırıldığında gen polimorfizmleri açısından gruplar arasındaki fark önemsiz bulundu( $X^2=5,02, P=0,081; P<0,05$ )(tablo5.6).

**Tablo 5.6.** Hasta ve kontrol gruplarında GSTT1 ve GSTP1 genotipinin birlikte değerlendirilmesi

DEĞİŞKEN	HASTA	KONTROL
GSTT1 pozitif GSTP1 normal	<b>38(%35,5)</b>	<b>52(%48,6)</b>
GSTT1 pozitif GSTP1 heterozigot	<b>30(%28)</b>	<b>29(%27,1)</b>
GSTT1 pozitif GSTP1 homozigot	<b>4(%3,7)</b>	<b>5(%4,7)</b>
GSTT1 null genotip GSTP1 normal	<b>26(%24,3)</b>	<b>13(%12,1)</b>
GSTT1 null genotip GSTP1 heterozigot	<b>7(%6,5)</b>	<b>7(%6,5)</b>
GSTT1 null genotip GSTP1 homozigot	<b>2(%1,9)</b>	<b>1(%0,9)</b>

## 6.TARTIŞMA

TGK; kimyasal maruziyet, alkol ve kahve tüketimi, genital enfeksiyonlar, sigara içimi, maternal ileri yaş, DM, uterusun yapısal anomalileri ve genetik mutasyonların neden olduğu olası epidemiyolojik risk faktörleriyle karakterize bir multifaktöriyel hastalıktır.(18)

TGK sıklığı toplumda %1-3'tür. Fetal kromozomal anomalileri sporadik gebelik kayıplarının %70'inden sorumludur(2,3). Klinik pratikte TGK riskini arttıran birkaç potansiyel faktörü inceleyen testler; parental kromozom anomaliler, maternal trombofili, anatomik, endokrin ve immünolojik hastalıklardır(131). TGK'nın en az % 50'sinin nedeni tespit edilememektedir. Klinik, çevresel ve yaşamsal risk faktörlerine ek olarak TGK da genetik hassasiyet de önemli bir nedendir. 1996 yılında Christiansen ve ark.'nın yaptığı çalışmada birinci derece kan bağı olan akrabalar arasında TGK prevalansının 2 ile 7 kat arttığı gözlemlenmiştir(5). En son yapılan ortak genom bağlantı analizi çalışmalarında idiyopatik TGK olan kardeşlerde genetik faktörlerin katkısının heterojenitesi doğrulanmaktadır(6).

Gebelik kaybı riskini alkol, sigara, kahve tüketimi, stres gibi yaşamsal ve çevresel faktörler arttırır (132).

GST, detoksifikasyon sistemleri faz II izoenzim ailesindedir ve hücreleri oksidatif stres ürünlerinin yol açtığı hasara karşı korumada önemli bir rol oynarlar. GST enzimlerinin primer fonksiyonu faz II metabolik reaksiyonunda redükte glutatyonun elektrofilik bileşikler ile konjugasyonu aracılığıyla detoksifikasyonudur. Merkapturik asit gibi ilaçların, toksinlerin ve karsinojenlerin atılımını konjugasyon sağlamaktadır(128). Faz I enzimleri aracılığı ile bu toksinlerin oksidatif stres etkisi artar ve faz II glutatyon detoksifikasyon sistemi enzimleriyle ise elimine edilir. Oksidatif stresin abortus etiopatogenezinde de etkili olduğu öne sürülmektedir.(7).

Hücrelerin oksidatif durumu, anjiyogenezisi indükleyerek embriyonik büyüme ve endometriyal farklılaşmada kritik rol oynar. Oksidatif stres idiyopatik TGK ile ilgili fonksiyonel değişikliklere neden olur. Bu durum hücrel ve endometriyal zarar oluşturarak plasental vaskülarizasyonu tahrip eder (26).

TGK yaygın bir gebelik komplikasyonudur ve epidemiyolojik çalışmalara göre genetik predispozisyona sahip multifaktöriyel bir hastalıktır (133).

TGK olgularının sadece % 30-50 'sinde neden tespit edilmiştir(134). TGK'nın altta yatan nedeni tartışmalıdır, patofizyolojik ve etiyolojik mekanizma tam olarak açık değildir. TGK için potansiyel bir risk faktörü oksidatif strestir. Gebelik boyunca embriyonik farklılaşma ve gelişmeyi kolaylaştıran plasentadaki artmış oksidatif yüküdür. Antioksidan ve oksidan dengedeki bir değişiklik aşırı oksidatif yükün oluşmasına veya oksidatif yükü temizlemekte yetersiz bir antioksidan savunmaya neden olabilir(135). Bir hücrenin oksidatif stresini yönetim kapasitesi öncelikle oksidatif stresin yıkıcı ajanlarını uzaklaştıran metabolizmanın fazI ve fazII enzimleri aracılığıyla. Antioksidan enzimlerin genetik polimorfizmi ile ilgili birçok çalışma oksidatif stresle ilişkili hastalıkların riskinde artışla ilgilidir(136,137). Yapılan çalışmalarda metabolik enzimlerin genetik polimorfizmi ve TGK arasındaki olası risk öne sürülmüştür(17,138). Bu çalışmaların çoğu GST genleri üzerinedir. GST faz II detoksifikasyon sisteminin bir enzimidir. Glutatyon ve GST sistemi karsinogenler, ksenobiyotikler ve reaktif oksijen ürünlerinin detoksifikasyon ve metabolizmasında en önemli mekanizmalardan biridir(139).

GST; sitozolik, mikrozomal ve mitokondriyal olmak üzere 3 aileden oluşur. Sitozolik GST genlerindeki fonksiyonel genetik varyantlarının aydınlatılması için yapılan birçok çalışmalardan çıkan sonuçlar, farklı multifaktöriyel hastalıkların riskinde bir artışla ve oksidatif strese hassasiyetin sağlığa olası etkisi ile ilişkilendirilmektedir(140-142). Fakat , GST varyantı ve hastalık riski arasındaki genetik ilişki çalışılan toplumun etnik kökeni ve çevresel faktörler tarafından güçlü bir şekilde etkilenmektedir. TGK da GST gen polimorfizmi bizim toplumumuzda ilk defa araştırılmıştır(143).

TGK'nın patolojisinde GST genlerinin rolünü araştıran çalışmalarda, üç farklı fonksiyonel GST varyantı analiz edilmiştir. GSTM1'in pozitif/null genotipi, GSTT1 genotipi ve null genotipli bireylerden GSTM1/GSTT1 pozitif genotipli bireylerin ayrımı ve aynı olmayan taşıyıcılığın ayrımı için GSTP1 genindeki I105V yer değişimi incelenmiştir. Bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar çalışılan toplumların etnik kökenine göre önemli farklılıklar göstermektedir. Özellikle Japonlarda yapılan

iki çalışmada GSTM1 null genotipinin TGK için risk oluşturabileceği ileri sürülmüştür(139-144). Diğer taraftan Hintlilerde yapılan iki çalışmanın birinde GSTT1 null genotipinin TGK ile ilişkili olabileceği bulunmuştur(138-145). Hollandalılarla yapılan bir çalışmada TGK riski ile GSTP1 I105V polimorfizmi arasında önemli bir ilişki olduğu göze çarpmaktadır(146). Bu sonuçlara göre gebelik sürecinde GST enzimleri antioksidan savunmada anahtar enzim olarak rol oynamaktadır. Enzimlerin aktivitelerindeki ve ekspresyonlarındaki azalmanın oksidatif strese hassasiyeti arttırarak TGK riskini artırabildiği gösterilmiştir. GST genleri TGK genetiğine yeni bir bakış açısı olabilir. Fakat bu hipotezi doğrulamak için yeni çalışmalar gerekmektedir(133).

Gebeliğin başarıyla sonuçlanmasında detoksifikasyon mekanizmasının önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Desidual veya plasental detoksifikasyon sistemindeki bir eksiklik embriyonun endojen veya eksojen toksinlere maruziyetini arttırmakta bu da erken gebelik kaybına neden olmaktadır(138).

GST'nin allellik varyasyonları detoksifikasyon fonksiyonunu bozarak genetik zarar oranını arttırır ve reproduktif toksisiteye hassasiyeti arttırır. Bunun sonucunda endometriyozis, TGK veya başarısız gebeliklerle sonuçlanır. TGK çeşitli çevresel toksinlerle ve iyonizan radyasyon, ağır metaller, alkol, organik solventler gibi teratojenlerden etkilenmektedir(144).

Bunun yanında genetik çeşitlilik ve epigenetik faktörler gametogenezden doğuma tüm fertilitate ve üreme yeteneğini etkilemektedir. Son yıllarda yapılan birçok genetik çalışmada metabolik enzimler, sitokinler, koagülasyon faktörleri, MTHFR, histakompabilite antijenleri ve NK reseptörleri ile ilgili genetik polimorfizm ve TGK arasında ilişki araştırılmıştır (138).

Plasenta aracılığıyla maternal sirkülasyon ilk trimesterin sonlarına doğru gestasyonun 10-12 haftalarında hızlı bir şekilde yükselmesine rağmen ilk birkaç haftada çok sınırlıdır(7). Bu dönemde plasentada embriyonik farklılaşma ve gelişme gibi olayları kolaylaştıran oksidatif yük artar. Gebelik boyunca plasentadaki oksidatif stresin en önemli kaynağı oksidasyon ve antioksidasyon arasındaki dengenin bozulması olabileceği öne sürülmektedir(135). Plasental oksidatif stresin aşırı

oksidatif yükü ve yetersiz antioksidan savunması sonucunda embriyo gelişimine letal etkisi olduğu düşünülmektedir. Metabolik detoksifikasyon aktivitesindeki bireysel genetik varyasyonların modifikasyonu bu durumu etkilemektedir(138).

2013 yılında Nair ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ; TGK ve EGK(erken gebelik kaybı) olan grupta GSTT1 null genotipli grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında gebelik kaybı olan grupta GSTT1 null genotip önemli oranda yüksek saptanmıştır (%10.92, P=0.004; %10.77, P=0,006). GSTM1 null allel sıklığı EGK'da % 37.36 ve TGK'da % 36.15 ve kontrol grubunda % 28.89 bulunmuştur. Fakat GSTM1 null genotipi ile EGK ve TGK arasında önemli bir ilişki tespit edilmemiştir. GSTM1 ve GSTT1 birlikte analiz edildiğinde GSTT1 ve GSTM1'in bileşik null genotipinin EGK için 4,74 kat, TGK için ise 5,67 kat yüksek riske sahip olduğunu göstermişlerdir(147).

TGK ve GSTT1, GSTM1 null polimorfizmi arasındaki ilişkiyi kesinleştirme konusunda bu şekilde nisbeten dar ölçekli çalışmalar yeterli değildir. Yapılan çalışmalarda büyük heterojenite görülmektedir. Bu çalışmalar bütün toplumlar için genellenemez. Özellikle toplumdaki etnik farklılıklar klinik olarak önemli farklılıklar oluşturmaktadır(3). Bu bulgular kesin sonuçlar değildir fakat TGK riski ile polimorfizmlerin arasında bir ilişki olduğunun yeterli bir göstergesidir. Dünya genelinde yapılacak çalışmalarla daha fazla kanıt elde edilmelidir. TGK ile gen-çevre etkileşimini araştıran çalışmalara ihtiyaç vardır(147).

Polimantini ve ark. 2012 yılında İtalyan toplumunda yaptıkları çalışmada TGK riski ile GSTA1 geni arasında önemli bir ilişki saptamışlardır. TGK riski konusunda ilk defa saptanan bir sonuçtur(133). GSTA1 enzimi en sık karaciğerden sentezlenen GST izoformudur ve birçok toksik bileşiğin detoksifikasyonunda önemli bir rol oynar. GSTA1 alkilleyici ajanlar, sigaradaki polisiklik aromatik hidrokarbon diolepoksidler, çevresel toksik metabolitlerin GSH bağımlı detoksifikasyonunu katalizler(148). Bazı araştırmalarda kahve tüketimi ve maternal sigaranın toksik bileşiklerinin etkisi fetal GSTA1 genindeki varyasyonun önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Araştırmanın diğer bir sonucu da GSTA1 ve GSTM1 varyasyonları arasında önemli bir etkileşim olduğudur(133). GSTA1 69C/T varyantı GSTA1 enziminin ekspresyonunda eksikliğe neden olur. Özellikle GSTA1'deki -69T

allelden en az birine sahip olanlar ile GSTM1'in bir kopyasına sahip olanlar da TKG riski 4.61 kat arttığı saptanmıştır(133). Benzer bir çalışmada Hint toplumunda raporlandırılmıştır: GSTT1, GSTM1 ve GSTP1 varyasyonlarının en az bir kopyası olan kadınlarda TKG'nın 3.4 kat artığı tespit edilmiştir(149).

Parveen ve ark. 2010 yılında kuzey Hindistanlı kadınlar arasında yaptıkları bir çalışmada GSTT1 null genotipinin kontrol(%15) grubuyla karşılaştırıldığında TKG (%26) olan grupta anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğunu saptamışlardır( $p=0.0034$ ,  $OR=1.99$ ,  $CI=1.27-3.12$ ). Faz II genlerinin birlikte analizi yapıldığında kuzey Hindistanlı kadınlar arasında GSTP1 varyant allelleri veya GSTM1 null genotipi ile kombinasyonlarında hastalık riskinin 4 kat arttığı gözlemlenmiştir. GSTT1 ve GSTM1 null genotipi ile GSTP1 varyant allellerinin kombinasyonunda da riskin 7 kat arttığı görülmüştür, TKG ile çok güçlü bir ilişkinin olduğunu göstermektedir(149).

Sata ve ark. 2003 yılında Japon toplumunda yaptıkları çalışmada GSTM1 null genotipini TKG olan grupta kontrol grubundan daha yüksek oranda saptamışlardır (%65.2, %45.6;  $OR=2.23$ , %95  $CI=1.36-3.66$ ). Primer ve sekonder TKG olan her iki grupta GSTM1 null genotip sıklığı kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Üç veya daha fazla TKG olan kadınlar arasında GSTM1 null genotipinde TKG riskinde önemli bir artış saptanmıştır( $OR=2.90$ , %95  $CI=1.58-5.34$ ). GSEC (International Project on Genetic Susceptibility to Environmental Carcinogens) verilerine göre Japon toplumunda GSTM1 null genotip sıklığı %47.5dir, bu oran Beyaz ırkta daha yüksek bulunmuştur; Amerika'da %54.3 ve Hollanda'da %50.4 olduğu tespit edilmiştir. Japon toplumunda GSTM1 null genotip sıklığının daha düşük olması TKG riskini istatistiksel olarak daha da anlamlandırmaktadır(144).

2011 yılında, Nonaka ve ark. yaptıkları çalışmada, her gün kahve tüketen hastalarda GSTM1 null genotipi sıklığı kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (%61;  $OR 2.25$ ; %95  $CI 1.13-4.49$ ;  $P=0.025$ ). Desidual ve plasental detoksifikasyon sistemindeki eksiklikte embriyonun endojen veya eksojen toksinlere maruziyetinin artması TKG patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı tahmin edilmektedir(17). GST glutatyonun sülfidril grubuna çok çeşitli elektrofilik

bileşikleri bağlayarak birçok zararlı maddenin transportu ve bağlanması ve de oksijen radikallerinin detoksifikasyonunu katalizler(12). Dahası plasental GST'nin fetal ve maternal detoksifikasyonda önemli bir rol oynadığı görülmektedir(150). Japon toplumunda TGK olan bireylerde, kafein detoksifikasyonunun azalması ile GSTM1 enzimi null genotipinin ilişkili olduğu görülmüştür(17).

GSTM1 null genotipine sahip olan bireylerde akciğer kanseri, mesane kanseri, deri tümörleri, kronik bronşit endometriyozis daha yüksek oranda görüldüğü bildirilmiştir (151).

GSTT1 ve GSTM1 delesyon polimorfizmi olan insanların aynı çevresel şartlarda yaşayan insanlara oranla kanser ve diğer hastalıklara daha hassas oldukları bulunmuştur(152). GST enzim ekspresyonunun olmadığı, kromozomun 1p13 bölgesinde GSTM1 geninin null genotipine sahip bireylerin dünya ortalaması %20-50 oranında saptanmıştır(153). Benzer şekilde farklı coğrafik bölgelerdeki bireylerin %20-60'ında 22. kromozoma lokalize GSTT1 homozigot delesyonundan dolayı GSTT1 enzim ekspresyonu yoktur(154). Yapılan çalışmalarda görüldüğü gibi farklı etnik toplumlarda GST gen delesyon polimorfizminin GST geninde ekspresyon farklılığına neden olduğu tespit edilmektedir(155). GST genlerindeki bu delesyonların polimorfizminin kanser gelişmesinde de hayati rol oynadığı görülmektedir(156).

GST lar ilaçlara karşı hücresel dirençte ve hücre korunmasında önemli rolü olan faz II detoksifikasyon sisteminin bir üyesidir(157). Son zamanlarda çevresel etkenlerin karsinojenik etkilerini belirlemede polimorfik genlerin rolünü anlamaya yönelilmiştir(158). Faz I ve faz II enzimlerinin ve farklı genlerin polimorfizmi toksik kimyasallara yanıtta bireysel farklılığı genetik yapıdaki çeşitlilik açıklamaktadır(159). Piacentini ve ark. yaptığı çalışmada GSTT1 null genotip sıklığı İtalyanlar'da %14.5-29.5, Avrupa ve Akdenizliler'deki %10.4-42.5 bilinen aralıkla uyumlu olarak %28.3 bulunmuştur. İspanyollar'da %27.7 olarak tespit edilmiştir. Afrikalılarda GSTT1 null genotip sıklığı Kamerun da %46.8, Etiyopya da %37.3 olarak belirlenmiştir. GSTM1 null genotip sıklığı İtalyanlar da %49.2, İspanyollar da %55.3, Kamerun da %27.8, Etiyopya da %43.8 bulunmuştur. GSTT1 ve GSTM1



null genotip sıklığı farklı toplumlarda çok geniş farklılıklar gösterdiği görülmüştür(160).

2004 yılında, Ada ve ark. Türk toplumunda yaptıkları çalışmada GSTM1 null genotip sıklığı %51.9, GSTT1 null genotip sıklığı %17.3 olarak bulunmuştur(161). 2001 yılında Toruner ve ark. Türk toplumunda GSTM1 null genotip sıklığı %45.5, GSTT1 null genotip sıklığı %17.4 olarak bulmuşlardır(162). Aktaş ve ark. yaptıkları çalışmada GSTM1 null genotip sıklığı %34.7(163), Pınarbaşı ve ark. yaptıkları çalışmada GSTM1 null genotip sıklığı %16 olarak tespit edilmiştir(164).

Karaca ve ark 2014 yılında yaptıkları araştırmada GSTM1 null genotipi %52 ve GSTT1 null genotipi %23 olarak bulunmuştur(165).

Toplumlar arasındaki genetik heterojenite bazı hastalıklara karşı hassasiyetteki farklılık, toksinlere maruziyette farklılık, farklı yaşam şekilleri temelindeki seleksiyon, her toplumun evrimsel tarihindeki farklılık gibi faktörlerin etkileşimi GSTT1 ve GSTM1 null fenotip sıklığındaki dağılım farklılığını açıklamaktadır(160).

DM antioksidan savunmadaki yetersizlik ve reaktif oksijen radikallerinin artışı ile ilişkilidir. Oksidatif stres DM de önemli bir patojenik faktördür(166,167). Çalışmalar antioksidan kapasitesi azalan bireylerde DM riskinin arttığını göstermektedir(168,169). Genetik olarak belirlenebilen detoksifikasyondaki yetersizlik DM gelişimi için bir risk faktörü olabilir(170). Özellikle GSTT1 ve GSTM1 null mutasyonu, GSTP1 polimorfizmini belirlemek klinik olarak önemli olabileceği düşünülmektedir. Yalın ve ark. Mersin bölgesinde DM hastalarda yaptığı çalışmada GSTM1 null genotipinin hasta ve kontrol grubu arasında önemli oranda farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir(%64.3 ve %32.7). GSTT1 null genotipi ve GSTP1 polimorfizmi ile DM arasında önemli bir ilişki saptanmamıştır(130).

Tamer ve ark. 2004 yılında yaptığı çalışmada astımlı hastalarda GSTM1 null genotipi prevalansını (%63.4) kontrol grubundan%40.8 daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (OR=2.34; CI=%95, 1.31-4.20). GSTP1 Val/Val homozigot genotipi hastalarda daha yüksek %22.8, kontrol grubunda %7.8 olarak tespit etmişlerdir. Buna

göre GSTP1 Val/Val homozigot genotipi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hastalık riskini 3.68 kat arttırmaktadır(OR=3.68; CI=%95,1.44-9.38)(171).

GST enzimleri glutatyon ile hem endojen hem de ekzojen kaynaklı kimyasal bileşiklerin konjugasyon reaksiyonunu katalizler(172,173). GST enzimleri heterosiklik aromatik aminler gibi çevresel kanserojenler, kemoterapotikler, prostaglandinler, lipid peroksidasyon ürünlerini detoksifiye eder(173). GST enzimleri glutatyon ile reaktif elektrofilik ürünlerinin konjugasyonu proteinler veya nükleik asitler gibi hayati önemi olan hücresel komponentlere güçlü reaktif bileşiklerin olası zararlı etkilerini önler(174). Diğer birçok etkisiyle birlikte GST enzimlerinin rolü oksidatif zarara karşı DNA'yı koruyarak kanser sebebi olabilecek mutasyon oluşumunu da önler. Gastrointestinal kanser gelişiminde GST gen polimorfizmini araştıran birçok çalışma vardır. Son yıllarda Çin toplumunda yapılan bir meta-analiz çalışmasında GSTT1/GSTM1 null genotipi ile hepatosellüler kanser gelişim riskinin arttığı görülmüştür(175).

Hindistan'da 300 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada GSTM1 null genotipinde rektal kanser ve GSTT1 null genotipinde de kolon kanseri riskinin arttığı tespit edilmiştir. GSTT1, GSTM1 ve GSTP1 polimorfizminin Hint toplumunda kolorektal kanser gelişiminde önemli bir predispozan faktör olduğu görülmüştür(176). İran'da yapılan bir çalışmada 60 yaşın üzerindeki bireylerde GSTM1 null genotipinin kolorektal kanser gelişiminde predispozan bir faktör olduğu görülmüştür(177). Lübnan'da yapılan bir çalışmada GSTM1 null genotipli bireylerde gastrik kanser ve kolorektal kanser de önemli bir artış görülmüştür(178).

Sonuç olarak; çalışmamızda TGK'nda ve sağlıklı bireylerde GSTM1, GSTT1, GSTP1 biyotransformasyon enzimlerinin genotipleme yapılmıştır. GSTT1 null genotipi hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Çalışmamıza göre Türk toplumunda da GSTM1 ve GSTT1 null genotipinde TGK riskinde önemli bir artış saptanmıştır. GSTM1 ve GSTP1 gen polimorfizmi ile TGK arasında istatistiksel bir ilişki saptanmamıştır. GSTM1 ve GSTP1 birlikte değerlendirildiğinde de istatistiksel olarak anlam tespit edilmedi.

Çalışmamız TGK ile GSTM1, GSTT1, GSTP1 biyotransformasyon enzimlerinin genotiplendirilmesi açısından ülkemizde yapılan ilk çalışmadır. Biyotransformasyon enzimleri ile ilgili yapılacak genetik polimorfizm çalışmaları ile TGK patogeneğine ışık tutabileceği dünya genelinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.



## 7. SONUÇLAR

1. GSTT1 gen polimorfizmi TGK ve kontrol grubunda değerlendirildi. TGK olan grupta GSTT1 null genotipi TGK olan grupta istatistiksel olarak anlamlı bulundu( $p<0,05$ ).
2. GSTM1 gen polimorfizmi TGK ve kontrol grubunda değerlendirildi. TGK olan grupta GSTM1 null genotipi TGK olan grupta istatistiksel bir anlam tespit edilmedi.
3. GSTP1 gen polimorfizmi TGK ve kontrol grubunda değerlendirildi. GSTP1 gen polimorfizmi açısından gruplar arasındaki fark anlamsız bulundu.
4. Hasta ve kontrol grubunda GSTT1 ve GSTM1 gen polimorfizmi birlikte değerlendirildi. TGK olan grupta GSTT1 ve GSTM1 null genotipi istatistiksel olarak anlamlı bulundu( $p<0,05$ ).
5. Hasta ve kontrol grubunda GSTM1 ve GSTP1 gen polimorfizmi birlikte değerlendirildi ve istatistiksel olarak bir anlam tespit edilmedi.
6. Hasta ve kontrol grubunda GSTM1 ve GSTP1 gen polimorfizmi birlikte değerlendirildi. Gruplar arasındaki fark anlamsız bulundu.

Tekrarlayan gebelik kaybı etyopatogenezinde araştırılması ve açıklığa kavuşturulması gereken birçok nokta mevcuttur. GST gen polimorfizmide bunlardan birisidir. Literatürle uyumlu olarak bizim çalışma grubumuzda da GST null genotip oranları hastalarda istatistiksel olarak anlamlı biçimde yüksek tespit edilmiştir. Sivas popülasyonunda GSTT1 ile GSTT1 ve GSTM1 null genotipinin gebelik kaybında risk faktörü olarak tespit edilmiştir. GSTP1, GSTM1 gen polimorfizmleri, GSTM1 ve GSTP1 gen polimorfizmi birlikte değerlendirildiğinde ve GSTT1 ve GSTP1 gen polimorfizmleri birlikte değerlendirildiğinde TGK ile arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. GST gen polimorfizminin TGK etyolojisindeki yerinin aydınlatılması için daha geniş kapsamlı hasta ve kontrol grubu ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Rull K, Nagirnaja L, Laan M. Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future direction. *Frontiers in Genetics*. March 19;3;2012
2. Ogasawara M, Aoki K, Okada S, and Suzumori K. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil. Steril.* 73, 300–304;2000
3. Rull K, Nagirnaja L and Laan M. Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions. March, Volume 3; 2012
4. Christiansen O.B. A fresh look at the causes and treatments of recurrent miscarriage, especially its immunological aspects. *Hum. Reprod. Update* 2, 271–293; 1996
5. Nybo Andersen A.M, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, and Mel M. Maternal age and fetal loss population based register linkage study. *BMJ* 320, 1708–1712; 2000
6. Kolte A.M, Nielsen H.S, Moltke I, Degn B, Pedersen B, Sunde L, Nielsen F.C., and Christiansen O.B. A genome-wide scan in affected sibling pairs with idiopathic recurrent miscarriages suggests genetic linkage. *Mol. Hum. Reprod.* 17, 379–385; 2011
7. Jauniaux E, Farquharson R.G., Christiansen O.B., and Exalto N.). Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum. Reprod.* 21, 2216–2222; 2006
8. Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet* ,368: 601–611; 2006
9. Quenby S. Recurrent miscarriage. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine*; 17: 296–300; 2007
10. Hirvonen A. Genetic factors in individual responses to environmental exposures. *J Occup Environ Med*; 37: 37–43; 2007

11. Wang X, Wang M, Niu T, Chen C, Xu X. Microsomal epoxide hydrolase polymorphism and risk of spontaneous abortion. *Epidemiology*; 9: 540–544;1998
12. Zusterzeel PLM, Nelen WLDM, Roelofs HMJ, Peters WHM, Blom HJ, Steegers EAP. Polymorphism in biotransformation enzymes and the risk for recurrent early pregnancy loss. *MolHum Reprod*; 6: 474–478; 2000
13. Suryanarayana V, Deenadayal M, Singh L. Association of CYP1A1 gene polymorphism with recurrent pregnancy loss in the South India population. *Hum Reprod*; 19: 2648– 2652; 2004
14. Conney AH. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G.H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res*; 4875–4917; 1982
15. Beckett GJ, Hayes JD. Glutathione S-transferases: Biomedical applications. *Adv Clin Chem*; 30: 281–380; 1993
16. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*; 30: 445–600; 1995
17. Nonaka T, Takakuwa K, Tonaka K. Analysis of the polymorphisms of genes coding biotransformation enzymes in recurrent miscarriage in the Japanese population. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. October ; 37, 1352-1358; 2011
18. Parazzini F, Bocciolone L, Fedele L, Negri E, La Vecchia C, Acaia B. Risk factors for spontaneous abortion. *Int. J.Epidemiol*; 20, 157–161; 1991
19. Sokol R.J, Miller S.I, Reed G. Alcohol abuse during pregnancy: an epidemiologic study. *Alcohol Clin. Exp. Res*; 4, 135–145; 1980

20. Jauniaux E, Watson A.L, Hempstock J, Bao Y.P, Skepper J.N, Burton G.J. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am. J. Pathol*; 157, 2111–2122; 2000
21. Harlow G.M, Quinn P. Foetal and placental growth in the mouse after pre-implantation development in vitro under oxygen concentrations of 5 and 20%. *Aust. J. Biol. Sci*; 32, 363–369; 1979
22. Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update*; 7, 175–189; 2001
23. Burton G.J, Hempstock J, Jauniaux E, Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reprod. Biomed. Online*. 6, 84–96; 2003
24. Strange R.C, Spiteri M.A, Ramachandran S, Fryer A.A. Glutathione-S transferase family of enzymes. *Mutat. Res* ; 482, 21–26; 2001
25. Hayes J.D, Strange R.C. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*; 61, 154–166; 2000
26. Nair R R, Khanna A, Singh K. Association of GSTT1 and GSTM1 polymorphisms with early pregnancy loss in an Indian population and a meta-analysis. *Reproductive BioMedicine*. April ;26;313-322; 2013
27. Ray JG, Kearon CK, Yi Q, et al. Homocysteine-lowering therapy and risk for venous thromboembolism. *Ann Intern Med*; 146;761-767; 2007
28. James David K. Steer Philip J. Weiner Carl P.Gonik Bernard. High Risk Pregnancy: Management Options ;105-124; 2008
29. Leon S, Marc A F. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*;7; 1069-1101; 2007

30. Frosst P, Blomm HJ, Milos R et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*; 10: 111–113; 1995
31. Brenner B, Sarig G, Weiner Z, Younis Y, Blumenfeld Z, Lanir N. Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause. *Thromb Haemost* ; 82: 6–9; 1999
32. D' Angelo A, Fermo I, D' Angelo SV. Thrombophilia, homocystinuria and mutation of the Factor V gene. *N Engl J Med* ; 335:289; 1996
33. Nelen WLDM, Steegers EAP, Eskes TKAB, Blom HJ. Genetic risk factor for unexplained recurrent early pregnancy loss. *Lancet* ; 350:861; 1997
34. Nelen WLDM, von der Molen EF, Blom HJ, Heil SG, Steegers EAP, Eskes TKAB. Recurrent early pregnancy loss and genetic related disturbances in folate and homocysteine metabolism. *B J Hosp Med* ; 58: 511–513; 1997
35. Foka ZJ, Lambropoulos AF et. al. Factor V leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* ; 15(2):458–62; 2000
36. Propst AM, Hill JA. 3rd. Anatomic factors associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med*; 18:341-50; 2000
37. Lotgering FK, Gaugler-Senden IPM, Lotgering SF, Wallenburg HCS: Outcome after transabdominal cervicoisthmic cerclage. *Obstet Gynecol*, 107:779-784; 2006
38. Arredondo F, Noble LS. Endocrinology of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med*; 24:33-39; 2006
39. Pritts E.A, Atwood A.K. Luteal phase support in infertile treatment: a meta-analysis of the randomized trials. *Humon Reproduction*; 17:2287-2299; 2002



40. Jakubowicz DJ, Seppala M, Jakubowicz S, et al. Insulin reduction with metformin increases luteal phase serum glycodelin and insulin-like growth factor-binding protein 1 concentrations and enhances uterine vascularity and blood flow in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*; 86:1126-33; 2001
41. Hassold T, Chiu D: Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy, *Hum Genet*; 70:11. 51; 1985
42. Warburton D, Kline J, Stein Z, Strobino B: Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conceptions, In: Porter IH, ed. *Perinatal Genetics: Diagnosis and Treatment*, Academic Pres, New York, 133; 1986
43. De Braekeleer M and Dao TN: Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses, *Hum Reprod*; 5(5): p. 519-28; 1990
44. Byrne JL and Ward K: Genetic factors in recurrent abortions, *Clin Obstet Gynecol*; 37(3): p. 693-704; 1994
45. Ford HB, Schust DJ. *Recurrent Pregnancy Loss: Etiology, Diagnosis, and Therapy*. *Rev Obstet Gynecol*; 2(2):76-83; 2009
46. Phillipp T, Phillipp 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: 1724-32; 2003
47. Bolor H, Mori T, Nishiyama S, Ito Y, Hosoba E, Inagaki H, Kogo H, Ohye T, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Nishizawa H, Pryor-Koishi K, Kitaoka E, Sawada T, Nishiyama Y, Udagawa Y, Kurashashi H. Mutations of the SYCP3 gene in women with recurrent pregnancy loss. *Am J Hum Genet*; 84:14-20; 2009
48. Kaare M, Götz A, Ulander VM, Ariansen S, Kaaja R, Suomalainen A, Aittomäki K. Do mitochondrial mutations cause recurrent miscarriage? *Mol Hum Reprod*; May; 15(5):295-300. Epub Mar 18; 2009

49. Pfeiffer KA, Flimmers R, Engels G, van der Ven H, van der Ven K: The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod*; 7:373-378; 2001
50. Jessica Berman, Guilermina Girardi, Jane E. Salmon. TNF- $\alpha$  Is a Critical Effector and a Target for Therapy in Antiphospholipid Antibody-Induced Pregnancy Loss. *J.Immunol* ; 174:485-490; 2005
51. Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related of implantation. *Hum Reprod.*; 11:613-630; 2005
52. Inagaki N, Stern C, McBain J, Lopata A, Kornman L, Wilkinson D. Analysis of intrauterine cytokine concentration and matrix-metalloproteinase activity in women with recurrent failed embryo transfer. *Hum Reprod* ;18:608-615; 2003
53. Jokimaa V, Oksjoki S, Kujari H, Vuorio E, Antilla L. Altered expression of genes involved in the production and degradation of endometrial extracellular matrix in patients with unexplained infertility and recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod*; 8:1111-1116; 2002
54. Van der Ven K, Pfeiffer K, Skrablin S: HLA-G polymorphism and molecule function questions and more questions-a review. *Plasenta*; 21(Suppl. A):S86-S92; 2000
55. Aldrish CL, Stephenson MD, Karrison T, Odem RR, Branch DW, Scott JR, Schreiber JR, Ober C: HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod*; 7:1167-1172; 2001
56. Bogdanava N, Horst J, Chlystun M, Croucher P J, Nebel A, Todorova A, Schreiber S, Gerke V, Krawczak M, Markoff A. A common haplotype of the annexin A5 (ANXA5) gene promoter is associated with recurrent pregnancy loss. *Hum Mol Genet*;16:573-578; 2007

57. Shu F, Sugimura M, Kanayama N, Kobayashi H, Kobayaskhi T. And Terao, t. Immunohistochemical study of annexin V expression in placentae of preeclamsia. *Gynecol. Obstet. Invest.* 49:17-23.
58. Hakan C, Özcan Y: Antifosfolipid Antikor Sendromu: Düzce Tıp Fakültesi Dergisi: 2:39-47; 2004
59. Vinatier D, Dufour P, Cosson M, Houpeau JL: Antiphospholipid syndrome and recurrent miscarriages. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*; 9 6:37-50; 2001
60. Sebire NJ, Fox H, Backos M, Rai R, Paterson C, Regan L: Defective endovascular trophoblast invasion in primary antiphospholipid antibody syndrome-associated early pregnancy failure. *Hum Reprod*; 17:1067-1071; 2002
61. Quenby S, Mountfield S, Cartwright JE, Whitley GS, Chamley L, Vince G: Antiphospholipid antibodies prevent extravillous trophoblast differentiation. *Fertil Steril*; 83:691-698.73; 2005
62. Porter TF, Scott JR. Evidence-based care of recurrent miscarriage. *Best Pract Res ClinObstet Gynaecol*; 19:85-101; 2005
63. Todorova M, Baleva M: Some recent insights into the prothrombogenic mechanisms of antiphospholid antibodies. *Curr Med Chem*;14:811-826; 2007
64. Oliver-Minarro D, Sanchez-Ramon S, Rodriguez-Mahou M, Alvarez S, Fernandez-Cruz E: Isolated type 5 antimitochondrial autoantibodies are associated with a history of thrombocytopenia and fetal loss. *Fertil Steril*; 87: 976 e17-18; 2007
65. Stricker R, Echenard M, Eberhart R, Chevailler MC, Perez V, Quinn FA, Stricker R: Evaluation of maternal thyroid function during pregnancy: the importance of using gestational age-specific reference intervals. *Eur J Endocrinol*;157:509-514; 2007

66. Poppe K, Gliouer D, Tournaye H, et al, Assisted reproduction and thyroid autoimmunity: an unfortunate combination? *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4149-4152; 2003
67. Gliouer D, Editorial: Miscarriage in women with positive anti-TPO antibodies. Is thyroxine the answer? *J Clin Endocrinol Mrtab* 91:2500-2502; 2006
68. Poppe K, Glinoyer D, Thyroid autoimmunity and hypothyroidism before and during pregnancy. *Hum Reprod Update* 9:149-161; 2003
69. Negro R, Greco G, Mangieri T, Pezzarossa A, Dazzi D, Hassan H: The influence of selenium supplementation on postpartum thyroid status in pregnant women with thyroid peroxidase autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1263-1268; 2007
70. Peter V, Marc F H. Hemostasis and inflammation: two of a kind? *Thrombosis Journal*; 7-25; 2009
71. Annemarie E. Forgety and Jean M. Connors. Management of Inherited thrombophilia in pregnancy. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*, 16:464-469; 2009
72. Juul K, Tybjaerg- Hansen A, Schnohr P , Nordestgaard B.G. Factor V Leiden and the risk for venous thromboembolism in teh adult Danish populatian, *Ann. Intern. Med*; 140:330-337; 2004
73. Robertson L, Wu O, Langhorne P, et al. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol*; 132(2):171-196; 2006
74. Kwak-Kim et al. Haemostasis and Thrombosis Task Force British Committee for Standards in Haemathology. Investigation and management of heritable thrombophilia. *Br J Haematol* ;114:512-528; 2001
75. Lockwood CJ. Inherited thrombophilias in pregnant patients: detection and treatment paradigm. *Obstet Gynecol*; 99:333-341; 2002

76. Jordi S, Manel C, Jaume A, Eduardo A.R, Luis C. Inherited antithrombin deficiency and pregnancy: Maternal and fetal outcomes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* Mar:149(1):47-51; 2010
77. Reyhan D, Müge K, Trombofii Genetiği. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı. Türk Hematoloji Derneği Moleküler Hematoloji Kursu, Kasım 2006.
78. 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* ; 42:1309-1311; 1999
79. Ray JG, Kearon CK, Yi Q, et al. Homocysteine-lowering therapy and risk for venous thromboembolism. *Ann Intern Med* ; 146:761-767.74; 2007
80. Van der Molen EF, Verbruggen B, Novakova I, Eskes TK, Monnens LA, Blom HJ. Hyperhomocysteinemia and other thrombotic risk factors in women with placental vasculopathy. *Bjog* ; 107:785-91; 2000
81. Pandey MK, Rani R, Agrawal S: An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet* ; 272:95-108; 2005
82. Varla-Leftherioti M, Spyropoulou-Vlachou M, Keramitsoglou T et al. Lack of the appropriate natural killer cell inhibitory receptors in women with spontaneous abortion. *Hum Immunol* ; 66: 65–71; 2005
83. Van den Heuvel MJ, Peralta CG, Hatta K, Han VK, Clark DA. Decline in number of elevated blood CD3(+) CD56(+) NKT cells in response to intravenous immunoglobulin treatment correlates with successful pregnancy. *Am J Reprod Immunol* ; 58: 447–459; 2007
84. Emmer PM, Steegers EA, Kersten HM, Bulten J, Nelen WL, Boer K, Joosten I: Altered phenotype of HLA-G expressing trophoblast and decidual natural killer cells in pathological pregnancies. *Hum Reprod* ; 17:1072-1080; 2002

85. Chaouat G, Menu E, Clark DA, Dy M, Minkowski M, Wegmann TG. Control of fetal survival in CBA X DBA/2 mice-trophoblast interactions. *J Soc Gynecol Investig* ;13:196-202; 2006
86. Arruvito L, Sanz M, Banham AH, Fainboim L. Expansion of CD4+CD25+ and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J Immunol* ; 178: 2572–2578; 2007
87. Inagaki J, Kondo A, Lopez L. R. Shoenfeld Y, Matsuura E, Anti-laminin-1 autoantibodies, pregnancy loss and endometriosis. *Clinical & Developmental Immunology*, September/December , Vol. 11 (3/4), pp. 261–266; 2004
88. Elsebeth Staun-Ram, Eliezer Shalev. Human trophoblast function during the implantation process. *Reproductive Biology and Endocrinology*,3: 56; 2005
89. The Confidential Enquiry into Maternal and Child Health (CEMACH), Saving mothers' lives: reviewing maternal deaths to make motherhood safer 2003-2005: the seventh report on confidential enquires into maternal deaths in the United Kingdom, London: CEMACH; 2007
90. Nardo LG, Bartoloni G, Di Mercurio S, Nardo F. Expression of alpha(v)beta3 and alpha4beta1 integrins throughout the putative window of implantation in a cohort of healthy fertile women. *Acta Obstet Gynecol Scand*. Aug;81(8):753-758; 2002
91. Decherney Allan H, Goodwin T. M, Nathan L, Laufer N. *Current Diagnosis & Treatment Obstetrics & Gynecology* : 259-272; 2010
92. Ian A. Greer, MD, FRCP (Glas), FRCPE, FRCP, FRCOG. Venous Thromboembolism and Anticoagulant Therapy in Pregnancy. *Gender Medicine/Vol. 2, Supplement A*;2005
93. Pal S, Ma S O, Norhasimah M, Suhaida M A, Siti Mariam I, Ankathil R, Zilfalil BA. Chromosomal abnormalities and reproductive outcome in Malaysian couples with miscarriages. *Singapore Med J*; 50(10) : 1008; 2009

94. Elsebeth Staun-Ram and Eliezer Shalev. Human trophoblast function during the implantation process. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3:56 ;2005
95. Kramer MS, Kahn SR, Rozen R, Evans R, Platt RW, Chen MF, Goulet L, Séguin L, Dassa C, Lydon J, McNamara H, Dahhou M, Genest Vasculopathic and thrombophilic risk factors for spontaneous preterm birth. *Int J Epidemiol*, Jun;38(3):715-723; 2009
96. Grimbizis GF, Camus M, Tarlatzis BC, et al: Clinical implication of uterine malformations and hysteroscopic treatment results. *Hum Reprod Update*; 7:161-174; 2001
97. Board P, Coggan M, Johnston P, et al. Genetic Heterogeneity Of The Human Glutathione Transferases: A Complex of Gene Families. *Phar Ther*, Vol.48, 357-369; 1990
98. Jordaan Dorothy-Jo MBChB, BScHons P, Schoon Martinus Gerhardus MMed (OBG), PhD, Nel Badenhorst, Philip MMed(Anat Path), MD, FCPATH. Thrombophilia Screening in Pregnancy. *Obstetrical & Gynecological Survey*: June- Volume 60 - Issue 6 - pp 394-404; 2005
99. InternationalHapMapProject (internette)Erişim: 10.08.2008  
<http://www.hapmap.org/abouthapmap.html>
100. Turnpenny P, Ellard S.2005. *Emery's Elements of Medical Genetics*, 12th. ed. Elsevier, London
101. Minisatelliterepeats internette erişim: 04.03.2009  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> National Library of Medicine – Medical Subject Headings 2009 MeSH
102. M Knapen, P Zusterzeel, W Peters, E Steegers, Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction, *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 99;82; 171-184
103. Sinnet D, Krajcinovic M, Labuda D; Genetic Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leuk Lym*, Vol.38(5-6),447-462; 2000

104. Zengin U E, Gümüştas MK, Belce A, Altuğ T, Kökoğlu E. The relationship between endogenous glutathione depletion and energy metabolism in stress-induced gastric mucosal injury. *Cerrahpaşa J Med* ; 29 (3): 127-131; 1998
105. Sipes I.G, Mcquuen, Ganddfi A.J, Bond J.A; *Comprehensive Toxicology*,13-Volume Set: General Principles; 1997
106. Commandeur J.N.M, Stijntjes G.J, Vermeulen N.P.E; Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. *Phar Rev*, 47, 271-330 ;1995
107. Whalen R, Boyer T.D; Human Glutathione S-Transferases. *Sem Liver Dis*,Vol.18, No.4; 1998
108. Hayes J.D, Pulford D.J; The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance.' *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 30(6):445-600; 1995
109. Ketterer B, Harris J.M, Talaska G,et al ; The Human Glutathione S-Transferase Supergene Family, Its Polymorphism, and Its Effects on Susceptibility to Lung Cancer. *Env Health Persp*, Vol.98, 87-94; 1992
110. Katoh T, Inatomi H, Kim H, et al ; Effects of Glutathione S-Transferase (GST) M1 and GSTT1 genotypes on urothelial cancer risk. *Cancer Lett*, 132,147-152; 1998
111. Stroombergen M.C. M.J, Waring R.H; Determination of glutathione S transferases and 0 polymorphisms in neurological disease. *Hum Exp Toxicol*,18,141-145; 1999
112. Whalen R, Boyer T.D; Human Glutathione S-Transferases. *Sem Liver Dis*, Vol.18, No.4; 1998
113. Hayes JD. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*; 61:154-66; 2000



114. Fosberg L. Genetic variation and regulation of oxidative stress related genes. Doktora tezi: Karolinska Institutet, University of Stockholm, Sweden; 2000
115. Bogaards JJP, Venekamp JC, van Bladeren PJ. Stereoselective conjugation of prostoglandin A2 and prostoglandin J2 with glutathione, catalysed by the human glutathione S-transferases A1-1, A2-2, M1a-a and P1-1. *Chem Res Toxicol* ;19:310-37 ; 1997
116. Fryer AA, Bianco A, Heple M, et al. Polymorphism at the glutathione S-transferase GST P1 locus. *Am J Respir Crit Care Med* ; 161:1437-42 ; 2000
117. Gilliland FD, Li YF, Saxon A et al. Effect of glutathione S-transferase M1 and P1 genotypes on xenobiotic enhancement of allergic responses : randomised placebocontrolled crossover study. *Lancet* ; 363: 119-125; 2004
118. Balta G, Yuksek N, Ozyurek E et al. Characterization of MTHFR, GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 genotypes in childhood acute leukemia. *Am J Hematology* ;73 :154-60; 2003
119. Strange RC, Fryer AA. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci Publ* ; 148: 231-49 ; 1999
120. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G. Molecular cloning, characterisation and expression in *Escherichia coli* of fulllength cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. *J Biol Chem* ;272:100004-12 ; 1997
121. Henderson CJ, Smith AG, Ure J, et al. Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class human glutathione S-transferases. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 95:5275-5280 ; 1998
122. Hayes JD, Strange RC. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to response to oxidative stress. *Free Radic Res* ; 22: 193-207; 1995
123. Ji X, Blaszczyk J, Xiao B, et al. Structure and function of residue 104 and water molecules in the xenobiotic substrate-binding site in human glutathione S-transferase P1-1. *Biochemistry*; 38:10231-38 ; 1999

124. Hemmingsen A, Fryer AA, Heple M, et al. Simultaneous identification of GSTP1 Ile 105—Val 105 and Ala 114—Val 114 substitutions using an amplification refractory mutation system polymerase chain reaction assay: studies in patients with asthma. *Respir Res* ;2:255-260 ; 2001
125. Wormhoudt L.W, Commandeur J.N.M, Vermeulen P.E; Genetic Polymorphisms on Human N-Acetyltransferase, Cytochrome P450, Glutathione-S-Transferase, Epoxide Hydrolase Enzymes: Relevance to Xenobiotic; 1999
126. Zemer D, Livneh A, Danon YL, et al. Long-term colchicine treatment in children with familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum*; Aug;34(8):973-7; 1991
127. Coşan F, Ustek D, Oku B, et al. Association of familial Mediterranean fever-related MEFV variations with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*; Nov;62(11):3232-6; 2010
128. Satyender S, Vivek K, Thakur V, Basu D B, Grover S S, Rawat D S, Pashac S T, Jaind S K, Lal S, Rai A, Genetic polymorphism of glutathione S-transferase M1 and T1 in Delhi population of Northern India. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28; 25–29; 2009
129. Joanne Kwak- Kim, Kwang Moon Yang and Alice Gilman-Sachs: Recurrent pregnancy loss: A disease of inflammation and coagulation. *J. Obstet. Gynaecol. Res*; 35:609-622; 2009
130. Yalın S, Hatungil R, Tamer L, Glutathione S-transferase gene polymorphisms in Turkish patients with diabetes mellitus, *Cell Biochemistry and Function*; 25:509-513; 2007
131. Bricker L and Farquharson R. G. Types of pregnancy loss in recurrent miscarriage: implications for research and clinical practice. *Hum. Reprod*; 17, 1345–1350; 2002

132. Sokol R.J, Miller S.I, Reed G, Alcohol abuse during pregnancy: an epidemiologic study. *Alcohol Clin. Exp. Res*; 4, 135–145; 1980
133. Polimanti R, Piacentini S, Lazzarin N, Vaquero E, Antonietta M, Manfellotto D, Fuciarelli M, Glutathione S-transferase genes and the risk of recurrent miscarriage in Italian women, *Fertility and Sterility*, August; 98; 2012
134. Frassen MTM, Korevaar JC, Van derVeen F, Boer K, Leschot NJ, Goddijn M. Management of recurrent miscarriage: the impact of a guideline. *Hum Reprod* ;22:1298–303; 2007
135. Gitto E, Reiter RJ, Karbownik M, Tan DX, Gitto P, Barberi S, et al. Causes of oxidative stress in the pre- and perinatal period. *Biol Neonate* ;81:146–57; 2002
136. Bolt HM, Thier R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. *Curr Drug Metab* ;7:613–28; 2006
137. Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism and toxicology with emphasis on cytochrome p450. *Toxicol Sci* ;120:1–13; 2011
138. F Parveen, R.M. Faridi, V Das, G Tripathil, S Agrawall, Genetic association of phase I and phase II detoxification genes with recurrent miscarriages among North Indian women, *Molecular Human Reproduction* ; 16; 207-214; 2010
139. Polimanti R, Piacentini S, Fuciarelli M. HapMap-based study of human soluble glutathione S-transferase enzymes: the role of natural selection in shaping the single nucleotide polymorphism diversity of xenobiotic-metabolizing genes. *Pharmacogenet Genomics* ;21:665–72; 2011
140. Piacentini S, Verrotti A, Polimanti R, Giannini C, Saccucci P, Manfellotto D, et al. Functional polymorphisms of GSTA1 and GSTO2 genes associated with asthma in Italian children. *Clin Chem Lab Med* ;50:311–5; 2012

141. Piacentini S, Polimanti R, Squitti R, Mariani S, Migliore S, Vernieri F, et al. GSTO1\*E155del polymorphism associated with increased risk for lateonset Alzheimer's disease: association hypothesis for an uncommon genetic variant. *Neurosci Lett*;506:203–7; 2012
142. Polimanti R, Piacentini S, Lazzarin N, Re MA, Manfellotto D, Fuciarelli M. Lack of association between essential hypertension and gsto1 uncommon genetic variants in Italian patients. *Genet Test Mol Biomarkers*. DOI: 10.1089/gtmb.2011.0310; 2012
143. Piacentini S, Polimanti R, Squitti R, Ventriglia C, Cassetta E, Vernieri F, et al. GSTM1 null genotype as risk factor for late-onset Alzheimer's disease in Italian patients. *J Neurol Sci*; 317:137–40; 2012
144. Sata F, Yamada H, Kondo T, Gong Y, Tozaki S, Kobashi G, E H Kato, Fujimoto S, Kishi R, Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and the risk of recurrent pregnancy loss, *Molecular Human Reproduction*; 9; 165-169; 2003
145. Suryanarayana V, Deenadayal M, Singh L. Association of CYP1A1 gene polymorphism with recurrent pregnancy loss in the South Indian population. *Hum Reprod*; 19: 2648–52; 2004
146. Zusterzeel PL, Nelen WL, Roelofs HM, Peters WH, Blom HJ, Steegers EA. Polymorphisms in biotransformation enzymes and the risk for recurrent early pregnancy loss. *Mol Hum Reprod*; 6: 474–8; 2000
147. Nair R R, Khanna A, Singh K. Association of GSTT1 and GSTM1 polymorphisms with early pregnancy loss in an Indian population and a meta-analysis. *Reproductive BioMedicine*. April; 26;313-322; 2013
148. Coles BF, Morel F, Rauch C, Huber WW, Yang M, Teitel CH, et al. Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2 expression. *Pharmacogenetics*; 11:663–9; 2001

149. F Parveen, R.M. Faridi, V Das, G Tripathil, S Agrawall, Genetic association of phase I and phase II detoxification genes with recurrent miscarriages among North Indian women, *Molecular Human Reproduction*; 16; 207-214; 2010
150. Pacifici GM, Franchi M, Colizzi C, Giuliani L, Rane A. Glutathione S-transferase in humans: Development and tissue distribution. *Arch Toxicol*; 61: 265–269; 1988
151. Baranova H, Bothorishvilli R, Canis M, Albuissou E, Perriot S, Glowaczower E, Bruhat M.A, Baranov V. and Malet P. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis in a French population. *Mol. Hum. Reprod*; 3, 775±780; 1997
152. Naveen A.T, Adithan C, Padmaja N, Shashindran C.H, Abraham B.K, Satyanarayanamoorthy K, et al, 2004. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotype distribution in South Indians. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 60, 403–406.
153. Zhong S, Wolf C.R, Spurr N.K. Chromosomal assignment and linkage analysis of the human glutathione S-transferase gene (GSTM1) using intron specific polymerase chain reaction. *Hum. Genet*; 90 (4), 435–439; 1992
154. Pemble S, Schroeder K.R, Spencer S.R, Meyer D.J, Hallier E, Bolt H.M, et al. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and characterization of a genetic polymorphism. *Biochem. J*; 300, 271–276; 1994
155. Hiroven A, Combinations of susceptible genotypes and individual responses to toxicants. *Environ. Health Perspect*; 105, 4755–4758; 1997
156. Strange R.C, Jones P.W, Fryer A.A. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol. Lett*; 112 (113), 357–363; 2000
157. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR; Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 45:51–88; 2005
158. Perera FP Environment and cancer: who are susceptible? *Science*; 278:1068–107;

159. Oliveira E, Marsh S, van Booven, Amorim A, Prata MJ, McLeod HL, Pharmacogenetically relevant polymorphisms in Portugal. *Pharmacogenomics* 8: 703–712; 2007
160. Piacentini S, Polimantini R, Porreca F, GSTT1 and GSTM1 gene polymorphisms in European and African populations, *Molecular Biology Reports*, February; 38;1225-1230; 2011
161. Ada A, Süzen S, Iscan M, Polymorphisms of cytochrome P450 1A1, glutathione S-transferases M1 and T1 in a Turkish population, *Toxicology Letters*; 151;311-315; 2004
162. Toruner G.A, Akyerli C, Ucar A, Aki T, Atsu N, Ozen H, Tez M, Cetinkaya, M, Ozcelik T. Polymorphisms of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and bladder cancer susceptibility in the Turkish population, *Arch. Toxicol*; 75; 459–464; 2001
163. Aktas D, Ozen H, Atsu N, Glutathione S-transferases M1 gene polymorphism in bladder cancer patients: a marker or invasive bladder cancer?, *Cancer Genet. Cytogenet*; 125;1-4; 2001
164. Pinarbasi H, Silig Y, Seyfikli Z, Celik V.K, Pinarbasi E. Genetic polymorphism of GSTM1 in Turkish lung cancer patients, *Toxicol. Letters*;123;115; 2001
165. Karaca S, Karaca M, Cesuroğlu T, GSTM1, GSTP1, and GSTT1 Genetic Variability in Turkish and Worldwide Populations, *American Journal of Human Biology*, 16 Aralık 2014
166. Ha H, Kim KH. Role of oxidative stress in the development of diabetic nephropathy. *Kidney Int*; 48(Suppl. 51):S18–S21; 1995
167. Lehmann R, Schleicher ED. Molecular mechanisms of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta*; 297: 135–144; 2000

168. Gallou G, Ruelland A, Legras B, Maugendre D, Allanic H, Cloarec L. Plasma malondialdehyde in type 1 and type 2 diabetic patients. *Clin Chim Acta*; 214: 227–234; 1993
169. Bayness JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications (A new perspective to an old paradigm). *Diabetes*; 48: 1–9; 1999
170. Strange RC, Fryer AA. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci Publ*; 148: 231–249; 1999
171. L Tamer, M Çalıkoğlu, N A Ates, Glutathione-S-transferase gene polymorphisms (GSTT1, GSTM1, GSTP1) as increased risk factors for asthma, *Respirology*; 9;493–498; 2004
172. Kazubek M, Długosz A, Pawlik K. Zastosowanie technik PCR w toksykologii. *Postepy Hig Med Dosw*; 64: 482-9; 2010
173. Drobná Z, Del Razo LM, Garcia-Vargas G, Sánchez-Ramírez B, González-Horta C, Ballinas-Casarrubias L, Loomis D, Stýblo M. Identification of the GST-T1 and GST-M1 null genotypes using high resolution melting analysis. *Chem Res Toxicol*; 25: 216-24; 2012
174. Gong M, Dong W, Shi Z, Xu Y, Ni W, An R. Genetic polymorphism of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 with prostate cancer risk: a meta-analysis of 57 studies. *PLoS One*; 7: e50587; 2012
175. Yu L, Wang CY, Xi B, Sun L, Wang RQ, Yan YK, Zhu LY. GST polymorphisms are associated with hepatocellular carcinoma risk in Chinese population. *World J Gastroenterol*; 27: 3248-56; 2011
176. Wang J, Jiang J, Zhao Y, et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes and susceptibility to colorectal cancer: a case-control study in an Indian population. *Cancer Epidemiol*; 35: 66-72; 2011
177. Aghajany-Nasab M, Panjehpour M, Samiee SM, Rahimi F, Movahedian A. Glutathione S-transferase mu gene variants and colorectal cancer development – use of sequence-specific probes for an Iranian population. *Asian Pac J Cancer Prev*; 12: 1511-5; 2011

- 178.** Darazy M, Balbaa M, Mugharbil A, Saeed H, Sidani H, Abdel-Razzak Z. CYP1A1, CYP2E1, and GSTM1 gene polymorphisms and susceptibility to colorectal and gastrin cancer among Lebanese. *GenetTest Mol Biomarkers*; 15: 423-9; 2011

