

T.C.

HARRAN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

AÇIKLANAMAYAN TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI
OLGULARINDA M30, M65 DÜZEYLERİNİN SİTOKİN
VE OKSİDATİF STRES MARKIRLARI İLE
KORELASYONU

UZMANLIK TEZİ

Dr. Fatih PİRİNÇÇİ

DANIŞMAN

Yrd.Doç.Dr. Neşe Gül HİLALİ

ŞANLIURFA

2014

T.C.

HARRAN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

AÇIKLANAMAYAN TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI
OLGULARINDA M30, M65 DÜZEYLERİNİN SİTOKİN
VE OKSİDATİF STRES MARKIRLARI İLE
KORELASYONU

UZMANLIK TEZİ

Dr. Fatih PİRİNÇÇİ

DANIŞMAN

Yrd.Doç.Dr. Neşe Gül HİLALİ

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü tarafından 26.12.2013 tarih ve 13146 protokol numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA

2014

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek yetişme ve gelişmeye katkıda bulunan tez danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Neşe Gül HİLALİ'ye; uzmanlık eğitimim boyunca bilgi, deneyim ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Hakan CAMUZCUOĞLU, Doç. Dr. Mehmet VURAL, Yrd. Doç. Dr. Aysun CAMUZCUOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Adnan İNCEBIYIK'a; tezimin her aşamasında destek ve katkılarından dolayı Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Nurten AKSOY ve Öğretim Görevlisi Abdullah TAŞKIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım Kadın Hastalıkları ve Doğum Servisindeki asistan, hemşire ve diğer personel arkadaşlarıma; diğer kliniklerdeki tüm öğretim üyesi, asistan, hemşire ve personele; asistanlığım boyunca resmi yazışmalar ve daha birçok konuda,engin bilgi birikimi ve tecrübeleriyle bizlere yardımcı olan, başta Murat ALKAN ve Tevrat ZERAY olmak üzere tüm idari personele teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca hep yanımda olan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme; uzmanlık eğitimim süresince fedakarlığı, anlayışı ve sabrı için sevgili eşim Derya PİRİNÇÇİ'ye minnet ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Fatih PİRİNÇÇİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
TABLO LİSTESİ	IV
ŞEKİL LİSTESİ.....	V
KISALTMA LİSTESİ.....	VI
ÖZET.....	VIII
İNGİLİZCE ÖZET	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Etyoloji.....	4
2.1.1. Genetik Faktörler	4
2.1.2. Anatomik Faktörler	5
2.1.3. Endokrin Faktörler	8
2.1.4. Enfeksiyöz Faktörler	10
2.1.5. Çevresel Faktörler	11
2.1.6. Koagülasyon Sistemine Ait Patolojiler	12
2.1.7. İmmunolojik Faktörler	17
2.2. Sitokinler	17
2.3. Gebelik ve Oksidatif Stres	21
2.4. Apoptoz	22

2.4.1. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	23
2.4.2. ELISA.....	25
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. M30 Düzeyinin Ölçümü	27
3.2. M65 Düzeyinin Ölçümü	27
3.3. Omentin Düzeyinin Ölçümü	27
3.4. Apelin Düzeyinin Ölçümü	27
3.5. IL-6 Düzeyinin Ölçümü	27
3.6. Toplam Oksidan Status (TOS) Düzeyi Ölçümü	28
3.7. Toplam Antioksidan Status (TAS) Düzeyi Ölçümü	28
3.8. Oksidatif Stres İndeksi Ölçümü	28
3.9. İstatistiksel Analiz	29
4. BULGULAR.....	30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	36
6. KAYNAKLAR.....	38

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Tekrarlayan gebelik kayıplarının yaş ile ilişkisi.

Tablo 2: Konjenital uterin anomalili hastalardaki reproduktif sonuçlar

Tablo 3: Gebelikte koagülasyon sisteminde değişiklikler

Tablo 4: TGK ve Kontrol gruplarının Demografik bilgilerinin karşılaştırılması

Tablo 5: TGK ve kontrol grubunda M30,M65, sitokinler ve oksidatif stres markerları değerlerinin karşılaştırılması

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil-1: Müllerial anomalilerin klasifikasyonu

Şekil-2: Hasta ve kontrol gruplarının M30 düzeyleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

Şekil-3: Hasta ve kontrol gruplarının M65 düzeyleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

Şekil-4: Hasta ve kontrol gruplarının omentin düzeyleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

Şekil-5: Hasta ve kontrol gruplarının apelin düzeyleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

Şekil-6: Hasta ve kontrol gruplarının IL-6 düzeyleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

Şekil-7: Hasta ve kontrol gruplarının total antioksidan status düzeyleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

Şekil-8: Hasta ve kontrol gruplarının total oksidan status düzeyleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

Şekil-9: Hasta ve kontrol gruplarının oksidatif stres indeksi düzeyleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

KISALTMA LİSTESİ

1. TGK: Tekrarlayan gebelik kaybı
2. ASRM : Amerikan Üreme Tıbbı Derneği
3. DES: Dietilstilbestrole
4. DM: Diyabetes Mellitus
5. PCOS: Polikistik Over Sendromu
6. LH: Lüteinizan Hormon
7. FSH: Follikül Stimülan Hormon
8. HCG: Human Choryonic Gonadotropin
9. LFD: Luteal Faz Defekti
10. CMV: Citomegalovirus
11. HSV: Herpes Simplex Virusu
12. ADP: Adenozin Difosfat
13. PA: Protrombin Aktivatörü
14. F: Faktör
15. TFPI: Tissue Factor Pathway Inhibitor
16. APC: Aktive Protein C
17. MTHFR: Metilen TetraHidro Folat Redüktaz
18. IL: İnterlökin
19. TNF: Tümör Nektozis Faktör
20. IFN: İnterferon

21. ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

22. İUGR: İntrauterin gelişme geriliği

23. TOS: Toplam Oksidan Status

24. TAS: Toplam Antioksidan Status

25. OSİ: Oksidatif Stres İndeksi

ÖZET

Açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı olgularında M30, M65 düzeylerinin sitokin ve oksidatif stres markırları ile korelasyonu

Dr. Fatih PİRİNÇÇİ

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

Tekrarlayan gebelik kaybı; birbirini izleyen iki ya da daha fazla, 20. gebelik haftasından önce ve ya 500 gramdan daha az fetal ağırlıkta gebeliğin spontan olarak kaybıdır ve tüm kadınların %1-3'ünü etkiler. Tekrarlayan gebelik kaybı jinekoloji ve obstetride önemli bir sorun yaratmaktadır çünkü etyolojisi, değerlendirilmesi ve yönetimi konusunda çözülmemiş birçok soru vardır. Tekrarlayan gebelik kaybı olgularında sadece %50 hastada neden ortaya koyulmuştur.

Çalışmada etyolojisi henüz aydınlatılmayan ve tekrarlayan gebelik kayıplarının yarısını oluşturan açıklanamayan tekrarlayan gebelik kayıplarında apoptotik sürecin, sitokinlerin ve oksidatif stresin rolünü araştırma amaçlanmıştır. Çalışmaya Haziran 2012-Şubat 2014 tarihleri arasında Harran Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na başvuran 32 açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan ilk trimesterında gebe hasta grubu ve 31 abortus öyküsü olmayan sağlıklı ilk trimester gebe kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Hasta ve kontrol grubuna dahil edilen gebelerde M30, M65, omentin, apelin, IL-6, toplam oksidan status (TOS), toplam antioksidan status (TAS), oksidatif stres indeksi (OSİ) düzeyleri Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda çalışılarak tespit edildi ve iki grup arasında karşılaştırıldı.

Çalışma sonucunda, TKG grubunda apoptoz markırları olan M30, M65, proinflamatuvar sitokin IL-6 ve total antioksidan durum kontrol grubuna oranla daha düşük saptanırken, adipositokinler apelin ve omentin ile total oksidan durum ve oksidatif stres indeksi TKG grubunda daha yüksek saptandı.

Anahtar kelimeler: Tekrarlayan gebelik kaybı, Apoptoz, Sitokin, Oksidatif stres

SUMMARY

Correlation M30, M65 levels with cytokines and oxidative stress markers in patients with unexplained recurrent pregnancy loss

Fatih PİRİNÇÇİ, M.D

Department of Obstetric and Gynecology

Recurrent pregnancy loss is defined as loss of two or more consecutive pregnancies before 20 gestation age or at a fetal weight less than 500 grams and effects 1 to 3 percent of all women. Recurrent pregnancy loss is an important problem in women's health. There are many unsolved questions regarding etiology, evaluation and management. Unfortunately, the cause of recurrent pregnancy loss can be determined in only 50 percent of patients.

The study intends to bring up the role of apoptotic process, cytokines and oxidative stress in women who had recurrent pregnancy loss with unknown etiology. 32 first trimester pregnant patients with unexplained recurrent pregnancy loss history and 31 control first trimester healthy pregnant involved in the study, who applied to Harran University Faculty Obstetrics and Gynecology Department between June 2012 and February 2014. M30, M65, omentin, apelin, IL-6, total oxidant status (TOS), total antioxidant status (TAS), oxidative stress index (OSI) parameters have been studied in pregnant of the case and control groups in Harran University Biochemistry Laboratory, and they have been compared between the two groups.

As the conclusion of the study, we found apoptosis markers M30 and M65, proinflammatory cytokine IL-6 and total antioxidant status low in recurrent pregnancy loss group. Adipocytokines apelin and omentin, total oxidant status and oxidative stress index were significantly higher in recurrent pregnancy loss group.

Key words: Recurrent pregnancy loss, Apoptosis, Cytokine, Oxidative stress

1. GİRİŞ

Erken dönem gebelik kaybı, gebeliğin en sık görülen komplikasyonudur ve çocuk sahibi olmak isteyen çiftlerin önemli emosyonel sıkıntılarında sorumludur. Bütün konsepsiyonların klinik olarak tanı konulmadan önce yaklaşık %30'u implantasyondaki bozukluk ve yaklaşık %30'u biyokimyasal prelinik kayıp olarak kaybedilmektedir. Klinik tanı konulduktan sonra, gebeliklerin yaklaşık olarak %10'u birinci trimesterin sonuna kadar kaybedilmektedir ve yaklaşık %30'u canlı doğum olarak sonuçlanmaktadır(1). Tekrarlayan gebelik kayıpları, tüm kadınların %1-3'ünü etkileyen endişe verici bir durum olmakla beraber getirdiği psişik, fizik ve ekonomik yönlerle hastaları; etyolojiyi aramada ve tedavide ortaya çıkan sorunlarla da hekimleri zaman zaman güçlüklerle karşı karşıya bırakabilmektedir (2).

Altta yatan pek çok neden bulunmakla birlikte tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan, mevcut tetkiklerle değerlendirilen olguların %50'sinde belirgin bir neden bulunamamaktadır ve hiçbir tedavi uygulanmamasına rağmen bu olguların % 60-70'i daha sonra başarılı bir gebelik elde edebilmektedirler (3).

Tekrarlayan gebelik kayıplarının nedeni multifaktöriyeldir. Ancak sebepler kabaca embriyonik (en sık anormal embriyonik karyotip) ve maternal olarak (endometrium ve/veya plasental gelişim etkilenmesi) ikiye ayrılabilir. Maternal defektlerin bilinen nedenleri, koagülasyon bozuklukları, anatomik bozukluklar, otoimmün defektler, endokrin bozukluklar ve endometrial defektlerdir. Tekrarlayan gebelik kaybı vakalarının %50'sinde etyoloji bilinmemektedir, ancak bu tekrarlayan kayıpların immün sebeplere bağlı olabileceği varsayılmaktadır(4). Maternal immün sistem tarafından paternal antijenlerin tanınması ve buna bağlı fetusun immünolojik rejeksiyonu anormal immün hücrelere ve sitokin oluşumuna neden olur. Bunun sonucunda da immün hücreler ve sitokinler açıklanamayan düşüklere neden olarak görülebilmektedir. İmmünolojik abortuslar konusunda kemirgenlerde birçok kanıt olmasına rağmen, insanlarda ise az miktarda kanıt bulunmaktadır.(5)

Apoptoz, hücre çoğalması ve farklılaşması ile birlikte normal embriyogenezis sırasında önemli roller oynamaktadır. Ayrıca apoptoz gebelik boyunca plasental gelişim ve

remodelling için hücre proliferasyonu ile beraber denge halindedir(7). Embriyonik ve ekstra embriyonik dokularda apoptoz ile ilgili farklılıklar, gebelik kaybı ve doğuştan yapısal anomalilerin oluşumu ile sonuçlanabilmektedir(6). İmplantasyon sırasında apoptoz ile desidual hücrelerin regresyonu trofoblastların maternal kompartmana kısıtlanmış ve koordine edilmiş invazyonunu sağlar. Bu invazyon gebelik progresyonu için son derece önemli bir süreci temsil eder. Dolayısıyla apoptoz ve hücre proliferasyonu arasındaki dengenin bozulması gebelik komplikasyonları ile ilişkilidir.

Normal koşullarda insan metabolizmasında oluşan lipid peroksidasyonunda devreye giren antioksidan sistem, gebelikte de aynı şekilde rol almaktadır. Yapılan çalışmalarda gebelikte serum antioksidan aktivitesinin lipid peroksidasyonundaki artış oranında arttığı tespit edilmiştir. Oksidatif stres kompleks bir sistemdir ve kompleks bir yolla kadın fertilitesi ve gebelik sonuçlarını etkilemektedir. Oksidan ajanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik infertilite, tekrarlayan gebelik kayıpları ve birçok gebelik komplikasyonu ile ilişkili bulunmuştur(7).

Bu çalışmanın amacı; etyolojisi henüz bilinmeyen ve tekrarlayan gebelik kayıplarının yaklaşık yarısını oluşturan sebebi açıklanamayan olgulalarda apoptotizisin, sitokinlerin ve oksidatif stresin etyolojideki rolünü araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Spontan abortus, 20. gebelik haftasından önce veya fetal ağırlık 500 gr.'ın altında iken gebeliğin istemsiz sonlanması olarak tanımlanır. Spontan ardarda 2 veya daha fazla gebelik kaybı olarak tanımlanan tekrarlayan düşükler gebeliklerin %1-3'ünde görülür (9). Bazı kaynaklarda tekrarlayan gebelik kaybı veya habituel abortus arka arkaya 3 veya daha fazla spontan gebelik kaybı olarak tanımlanır (10). Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (ASRM) tarafından yapılan yeni tanımlamalara göre ise bu sayı en az 2 veya daha fazla düşük olarak değerlendirilmiştir ve hastaların 2 düşüktan sonra tekrar yeni bir travma yaşamamaları için araştırma yapılmasını önermiştir (11).

Maternal veya paternal yaş ve daha önceki gebeliklerdeki başarı tekrarlayan gebelik kayıplarında 2 bağımsız risk faktörünü oluşturmaktadır (Tablo 1). Yaşlı annelerin genç annelere oranla kaliteli oosit sayısı daha azdır bu yüzden gebelik kayıplarına neden olan kromozomal anomali yatkınlığı artmaktadır (12). Önceki gebeliklerin öyküsü, beklenen bir gebeliğin geleceğini tek başına etkiler. sonraki düşüklerdeki risk, arka arkaya 3 gebelik kaybı sonrasında yaklaşık %40'lara ulaşacak şekilde her düşük sonrasında yükselir (13).

Tablo-1: Tekrarlayan gebelik kayıplarının yaş ile ilişkisi.

Maternal yaş	Abortus oranı (%)
<20	13.3
20-24	11.1
25-29	11.9
30-34	15
35-39	24.6
40-44	51

2.1.ETYOLOJİ

Tekrarlayan gebelik kayıpları heterojen komponentler içeren bir durumdur ve zemininde birden fazla neden bulunabilir. Tekrarlayan gebelik kayıplarının etyolojisine ışık tutması açısından birçok çalışma yapılmasına rağmen günümüzde halen çoğunun nedeni bilinmemektedir.

Etyolojide yer alan başlıca faktörler:

- 1) Genetik faktörler
- 2) Anatomik faktörler
- 3) Endokrin faktörler
- 4) Enfeksiyöz faktörler
- 5) Çevresel faktörler
- 6) Koagülasyon sistemine ait patolojiler
- 7) İmmunolojik Faktörler

2.1.1.GENETİK 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 (14).

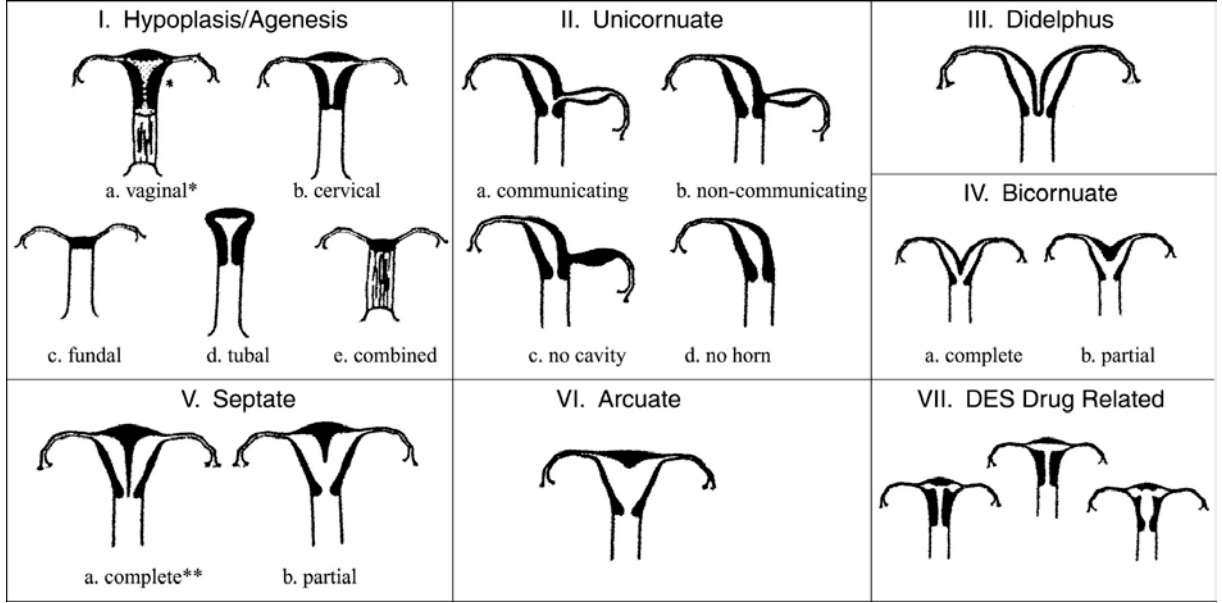
Abort materyallerinde saptanan kromozom anormalilerinin %90'ından fazlası sayısal anomalilerdir (anöploidi, poliploidi). Kalan kısmı ise yapısal anormallikler (translokasyon, inversiyon) ve mosaizm oluşturmaktadır(15). Anöploidiler arasında en sık görüleni trizomiler olup tüm anöploidilerin %52 kadarını oluşturur. En sık olarak trizomi 16 görülmekte olup

bunu sırasıyla 13,18 ve 21 numaralı kromozomların trizomileri izlemektedir (16). Maternal ve gestasyonel yaşa göre sınıflandırıldığında tekrarlayan gebelik kayıplarındaki kromozom anormallik dağılımı genel popülasyonda görülenden farklı değildir (17). Fetusta anöploidi riskini artıran faktörler: ileri maternal yaş, erken yaşta düşük over rezervi, sperm kaynaklı anöploidi, seçici X kromozom inaktivasyonu ve parental kromozom anomalisi taşıyıcılığıdır. Rekürren gebelik kaybı olanların %4-8'inde çiftlerden birinde veya her ikisinde fetusta kromozomal dengesizliğe neden olabilecek kromozomal anormallikleri mevcuttur(18). Çiftlerden herhangi birinde dengeli kromozomal translokasyon bulunabilir ve olasılığı belirlemek için her iki çifte de karyotipleme yapılmalıdır.

2.1.2.ANATOMİK FAKTÖRLER

Tekrarlayan gebelik kaybı için değerlendirilen kadınların %15' nin anatomik uterin kusurları mevcuttur(19). Bu anatomik anormallikler konjenital ve kazanılmış olarak sınıflandırılabilir. Genel olarak bakıldığında anatomik uterin bozukluklar tekrarlayan gebelik kayıplarının yanında; infertilite, erken doğum, anormal prezentasyon gibi kötü reproduktif sonuçlar doğurmakla birlikte anormal vajinal kanama gibi jinekolojik bozukluklara da yol açmaktadır.

Sırasıyla en sık görülen konjenital malformasyonlar uterin septum, bikornuat ve didelfis uterusdur(20). Mevcut veriler major konjenital uterin anomali sıklığının toplumda yaklaşık %2, buna karşın tekrarlayan gebelik kaybı olanlarda 3 kat fazla (%6-7) olduğunu göstermektedir (21). Bu durum konjenital uterin malformasyonların, tekrarlayan gebelik kayıpları üzerinde küçük de olsa bir payının olduğuna işaret eder (22). Kazanılmış uterin anomaliler arasında leiomyomlar, submüköz polipler ve intrauterin adezyonlardır.



Şekil-1: Müllerian anomali klasifikasyonu

Konjenital uterin malformasyonlarda gebelik kayıplarının patogenezi net değildir fakat genellikle azalmış intrauterin volüm ve vasküler yetersizlikle ilgili bulunmuştur (23). Unikornuat uterusu olan kadınlarda gebelik sonuçları genellikle kötüdür; tanı konulan gebelerin yaklaşık yarısında gebelik kayıpla sonuçlanmaktadır. Uterus didelphiste reproduktif sonuçlar, birleşmiş iki kornu arası kollateral kan dolaşımı daha iyi olduğundan, unikornuat uterustan daha iyidir. Bununla birlikte uterin didelphisli kadınların gebeliklerinin %40'ı spontan kayıpla sonuçlanmaktadır. Bikornuat uterusu olan kadınlardan elde edilen verilerde erken gebelik kaybı oranı %30, tüm gebelik süresince fetal kayıp oranı ise % 40 olarak bulunmuştur (24).

Uterin septum en sık görülen uterin gelişim anomalisidir ve tekrarlayan gebelik kaybı olanlarda ve genel popülasyonda tüm major malformasyonların %80-90'ını oluşturmaktadır (25). Uterin septum aynı zamanda kötü gebelik sonuçlarıyla ilişkili olan en sık anomalidir (26) ve en kolay şekilde düzeltilebilen bir patolojidir. Tekrarlayan gebelik kaybı olan ve septat uterusu olanlarda histeroskopik septoplasti endikedir. Birçok çalışmadan elde edilen veriler, uterin septumu olan kadınlarda gebelik kayıp oranının %65 olduğunu göstermektedir (25).

Tablo-2:Konjenital uterin anomalili hastalardaki reproduktif sonuçlar

Uterin anomali	Çalışma sayısı	Hasta sayısı	Toplam gebelik sayısı	Abortus oranı	Erken doğum oranı	Term doğum oranı	Canlı doğum oranı
Unikornuat	11	151	260	36.5	16.2	44.6	54.2
Dedelfis	8	114	152	32.2	28.3	36.2	55.9
Bikornuat	4	261	627	36	23	40.6	55.2
Septate	4	198	499	44.3	22.4	33.1	50.1
Arkuat	3	102	241	25.7	7.5	62.7	66

Uterus içi dietilstilbestrole (DES) maruz kalan kadınların yaklaşık %69'unda uterin anomaliler görülmektedir(27). DES'e bağlı en sık gözlenen uterin anomali ise T şeklinde uterin kavitedir. bunun yanında hipoplastik uterus, fundal kontraksiyon halkası, intrauterin dolma defekti ve endometrial adezyonlar gözlenebilir. DES'e bağlı uterin anomalili hastalarda reproduktif prognoz kötü olup; spontan gebelik kayıp oranı 3 kat ve ektopik gebelik oranı 9 kat artmaktadır (28).

Servikal kollojen içeriğindeki yapısal değişiklikler, etkilenen kadınlarda servikal yetmezliğe neden olabilir. The Medical Research Council / Royal college of obstetricians and gynaecologists elektif serklaj çalışması sonucunda preterm doğum ve düşük doğum ağırlıklı çocukların doğum oranında küçük bir azalma olduğunu, özellikle 2. trimesterde üç veya daha fazla düşük yapan kadınlardan daha iyi sonuçlar alındığını göstermiştir ancak perinatal sürvide önemli bir artış görülemediği . Cerrahi risklerinden dolayı serklaj sadece daha önceden 2. trimester gebelik kaybı olan seçilmiş kadınlara yapılmasının uygun olduğu vurgulanmıştır (29) .

Uterin myomların tekrarlayan gebelik kaybı nedeni olduğunu gösteren kesinleşmiş kanıtlar yoktur. Myomların tekrarlayan gebelik kayıplarındaki mekanizmaların tümü bölgesel kan akım yetersizliğine bağlanmıştır (30). Myomlar uterin kaviteyi doldurmadığı veya kavitede şekil bozukluğu yapmadığı sürece myoma bağlı spesifik semptomlar yoksa cerrahi

gereklilik yoktur. Bununla beraber submüköz myomların alınmasının düşük oranlarını azalttığına dair bulgular mevcuttur (31).

Gebelik kayıplarının en sık görülen küretaj nedeni olduğu düşünülürse, intrauterin adezyonlar önce gebelik kayıpları sonrası oluşurken, daha sonra tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olmaktadır. İntrauterin adezyonlardaki tekrarlayan gebelik kayıplarının mekanizması azalmış fonksiyonel uterin hacim ve endometrial fibrozis ile plasental yetersizliğe neden olabilecek inflamasyondur (32). Bu hastalardaki gebelik sonuçları genellikle kötüdür (%40-80 spontan gebelik kaybı, %25 preterm doğum) ve adezyolizis sonrası düzelme olmaktadır (%50-90 term doğum, % 7-23 gebelik kaybı) (33).

2.1.3. ENDOKRİN FAKTÖRLER

Diabetes Mellitus : Diabetik hastalarda normal veya normale yakın glisemik kontrol sağlandığında abortus oranlarının artmadığı genel olarak kabul edilen görüştür. Prekonsepsiyonel ve ilk trimesterde HbA1c ve glukoz seviyeleri ile abortus ve anomali oranları arasında doğrudan bir korelasyon mevcuttur. 303 diabetli hastanın incelendiği bir çalışmada (34) HbA1c seviyeleri <9.3 olduğunda ilk trimester abortus oranları %12.4 iken, HbA1c seviyeleri >14.4 olduğunda bu oranın %37.5 olduğu gösterilmiştir. Major malformasyon oranları ise sırasıyla %3 ve %40 olarak bulunmuştur. Kontrol altında olmayan diabetik hastalarda neden abortus oranlarının arttığı tam olarak bilinmemektedir. DM bağlı vasküler değişikliklerin uteroplental yetmezlik yoluyla veya mevcut immunolojik bozuklukların buna neden olabileceği sanılmaktadır (35). Hayvan çalışmaları hipergliseminin embriyo gelişimini etkileyebileceğini (36) veya hiperglisemiye maruz kalındığında apoptotik bazı proteinlerin artabileceğini ortaya koymuştur(37).

Tiroid Fonksiyon Bozuklukları :Hipertiroidizm infertilite veya tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkili olduğu genel olarak kabul edilmemektedir(38). Hipertiroidizm; preterm doğum, ablasyo plasenta, intrauterin gelişme geriliği, ölü doğum ve maternal kalp yetmezliği gibi kötü obstetrik sonuçlarla ilişkili olmakla birlikte (39) tekrarlayan gebelik kaybının tek nedeni olma olasılığı azdır.

Hipotiroidizmin TGK ile olan ilişkisini tiroid otoimmunitesinden bağımsız olarak incelemek oldukça zordur. Çünkü üreme çağındaki kadınlardaki en sık hipotiroidi nedeni otoimmun tiroidit hastalığıdır. Tiroid hormonunun granüloza ve teka hücre seviyesinde oositlere direkt etkisi olduğu bilinmektedir ve bu yolla ovulasyonu etkileyebilir(40). Ciddi hipotiroidi kliniğine anovulasyon ve infertilite eşlik ettiğinden dolayı abortustan bahsetmek zordur. Ancak hafif formlarda gebelik görülebilir ve bu durum artmış abortus oranlarıyla ilişkilidir. Bunun olası nedeni ise düşük tiroid hormon seviyelerine bağlı oluşan luteal faz defektleri olduğu iddia edilmiştir(41).

Hipotiroidinin infertilite ve artmış abortus oranları ile ilişkili olduğu bilinmektedir(42). Yapılmış olan bir çalışmada hipotiroidik kadınlarda abortus oranları %31.4 iken, T4 verilen ve eutiroid olan kadınlarda bu oran %4 olarak bulunmuştur(43).

Polikistik Over Sendromu (PCOS):PCOS ve gebelik kayıpları arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik teorilerin başında bu hastalarda sıklıkla karşılaşılan LH hipersekresyonu gelmektedir. Artmış LH sekresyonunun erken gebelik kayıplarına nasıl yol açtığını açıklamaya yönelik iki mekanizma öne sürülmüştür. Bunlardan bir tanesi oositin erken yaşlanması ve buna bağlı viable embriyonun oluşmamasıdır(44,45). Alternatif hipotez ise yüksek LH seviyelerinin endometrium üzerine olası kötü etkileridir(46). Bu hipotezi destekleyen en önemli kanıt endometriumda HCG/LH reseptörlerinin olduğunun gösterilmiş olmasıdır. Bu olası hipotezlere rağmen daha sonra yapılmış olan çalışmalar TGK ile LH hipersekresyonu arasındaki ilişkiyi göstermede başarılı olamamışlardır.

TGK ile PCOS arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik çalışan teorilerden bir tanesi de hiperandrojenemi üzerinden yürütülen çalışmalardır. Yapılmış çalışmalarda (47) folliküler faz total testosteron, androstenodione ve serbest androjen indeksi değerlerinin TGK olan PCOS'lu ve PCOS'suz kadınlarda normal kadınlara göre daha yüksek bulunması hiperandrojeneminin PCOS 'dan bağımsız olarak abortusla ilişkisini ortaya koymaktadır.

Luteal Faz Defektleri : TGK olan hastaların %35 kadarında luteal faz anormallikleri olduğu bildirilmektedir (48). Luteal faz yemezliğinin stres, egzersiz, kilo kaybı ve hiperprolaktinemi ile ilgili olabileceği bilinmektedir. Mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen progesteron üretiminin azalması, folliküler fazda azalmış FSH seviyeleri, anormal LH salınımı ve progesterona endometriumun yetersiz yanıtı gibi nedenler hipotez edilmiştir.

Çalışmaların çoğu luteal faz yetmezliğinin periovulatar kökenli olduğu, kötü oosit kalitesine bağlı anormal follüküler formasyonu ve bunun sonucunda anormal korpus luteum oluşmasının altta yatan en önemli etken olduğu fikrini desteklemektedir (49-50)

Luteal faz defektinin (LFD) tanısı için kullanılan yöntemler arasında bazal vücut ısı ölçümü, progesteron düzeyi ölçümü ve endometrial biyopsi örneklerinin histolojik zamanlaması kullanılmaktadır. Standart olan tanı yöntemi luteal fazda yapılan endometrial biyopsidir. Asıl amaçlanan biyopsi gününde ovulasyonun üzerinden kaç gün geçtiğinin biyopsi ile saptanmasıdır. LH zirvesinin olduğu güne göre hesaplandığında geçen günle endometrial olgunlaşma arasında 2 günden fazla uyumsuzluk varsa tanı koydurur (51).

Hiperprolaktinemi : Kadınlarda prolaktin ovarian steroidogenezisin regülasyonunda rol oynayabilir ve patolojik durumlarda korpus luteum fonksiyonlarını etkileyebilir. Yapılmış in vitro çalışmalarda yüksek prolaktin seviyelerinin (>100 ng/ml) kültüre edilmiş granüloza hücrelerinde progesteron salınımını inhibe ettiğini göstermiştir (52). Bu da erken follüküler fazda aşırı prolaktin salınımının luteal faz yetmezliği tablosu oluşturabilme olasılığını ortaya çıkarmaktadır.

2.1.4.ENFEKSİYÖZ FAKTÖRLER

Tekrarlayan gebelik kayıplarında enfeksiyonun rolü net değildir. Bakteri, virus ya da parazit enfeksiyonları sporadik olgularda erken gebelik sürecini olumsuz etkileyebilmekle birlikte, günümüze kadar pek çok ajanın süreçten sorumlu olduğu ortaya atılmış olsa da, tekrarlayan gebelik kayıplarında hiçbir ajan için kesin rol oynadığını gösteren deliller mevcut değildir. Birinci trimester sporadik spontan gebelik kayıplarında enfeksiyonun rolünün araştırıldığı prospektif çalışmalarda enfeksiyonun önemli bir rol oynamadığı gösterilmiştir(53,54).

Kanıtı dayalı tıp açısından tekrarlayan gebelik kayıplarında enfeksiyonun rolü pek görülme de gebelik kaybına neden olmakla suçlanan mikroorganizmalar şunlardır;

Bakteriler; Listeria monositogenez, Chlamidya Trachomatis, Ureoplasma urealiticum, M.hominins, G.vajinalis

Viruslar; Rubella, CMV, HSV, HIV, Parvovirus

Parazitler; Toxoplasma gondii, Plasmodium falciparum

Spiroketler; trepanema pallidum

Enfeksiyöz ajanların abortusa yol açma mekanizmaları ile ilgili öne sürülen teoriler şu şekildedir;

1. Toksik metabolik ürünler, endotoksin, ekzotoksin ya da sitokinler uterus ve fetoplasental yapıyı etkileyebilir.
2. Fetusun enfeksiyonu organ hasarı ya da fetal ölüme yol açarak gebelik sonlanabilir.
3. Plasentanın enfeksiyonu plasental yetmezlik ve fetal ölümle sonuçlanabilir.
4. Enfeksiyon ajanlarının asendan yolla endometriuma ulaşması ve endometriumun kronik enfeksiyonu implantasyonu bozabilir.

2.1.5. ÇEVRESEL FAKTÖRLER

Sigara, alkol ve aşırı kahve tüketimi gebelik kayıplarına neden olan çevresel faktörler olarak bilinmektedir. Sigaranın yan etkilerinin doza bağımlı olarak gebelik kaybı riskini arttırdığı tespit edilmiştir. Mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte nikotin, karbondioksit ve siyanid gibi komponentlerinin vazokonstriktif ve antimetabolik etkileriyle plasental yetersizliğe yol açtığı şeklinde değerlendirilmektedir. Alkol, doza bağımlı yan etkileri olduğu bilinen bir teratojendir. Günde 2 kadehin üzerinde alkol tüketimi spontan gebelik kayıp riskini ikiye katlamaktadır. Alkole bağlı yan etkiler sigara tüketimiyle artabilmektedir. Kafein kullanımının aşırı olması (300 mg/gün'den fazla veya 3 bardak kahve) spontan gebelik kaybını hafif oranda artırdığı gösterilmiştir (55). Kokain kullanımı düşük riski için bağımsız risk faktörüdür(56).

2.1.6. KOAGÜLASYON SİSTEMİNE AİT PATOLOJİLER

Hemostaz Mekanizması

Hemostaz, kan kaybının önlenmesi anlamına gelir. Bir damar zedelendiğinde ya da yırtıldığında birbirini izleyen bir seri mekanizma ile hemostaz sağlanır. Bu mekanizmalar; damar spazmı, trombosit tıkaç oluşumu, kanın koagülasyonu sonucu kan pıhtısının oluşumu ve fibröz dokunun pıhtının içine doğru büyümesiyle damardaki hasarın kalıcı olarak kapatılmasıdır (57)

Hemostazın sağlanması için kan damarlarının, trombositlerin, koagülasyon faktörlerinin ve fibrinolitik sistemin etkin ve koordineli bir şekilde çalışması gerekmektedir. Küçük çaptaki kan damarlarının arteriolar vazokontraksiyonu, zedelenme esnasındaki lokal kan akışını azaltacak primer etkidir. Daha sonra zedelenmiş damar duvarında açığa çıkan subendotel tabakasına trombositler adheze olur. Trombositlerin gerek plazma membranlarından gerekse granüllerinden salgılanan çeşitli trombosit faktörleri, tromboksan A2 ve ADP (adenozin difosfat) daha fazla trombositin hasarlı bölgeye çekilmesini sağlayarak trombosit agregasyonuna yol açar. Bu trombosit tıkaçı gevşektir (primer tıkaç) ve hemen fibrin ile stabilize edilmelidir. Trombin oluşumuna neden olan vasküler bir zedelenme, ayrıca birbiri ile etkileşen koagülasyon faktörlerini de aktive eder. Trombin de çözülen bir plazma proteini olan fibrinojeni çözülmeyen fibrine dönüştürür. Böylece kan akışına ve fibrinolyze nispeten dirençli olan sekonder hemostatik tıkaç oluşur (58).

Bundan sonraki koagülasyon yolu 3 ana basamakta meydana gelmektedir.

1. Kandaki bir seri pıhtılaşma faktörünün rol aldığı kimyasal reaksiyonlar sonucu “protrombin aktivatörü”nün (PA) oluşması
2. Protrombin aktivatörünün protrombini trombine çevirmesi
3. Trombinin fibrinojeni fibrin iplikçiklerine dönüştürmesi

Fibrinolizis

Hemostaz sağlandıktan sonra “fibrinoliz” yani fibrinin plazmin tarafından yıkılması gerekir. Plazmin “plazminojen aktivatörleri” tarafından plazminojenden oluşturulmaktadır. Bir pıhtı oluşturulduğunda çok miktarda plazminojen de diğer plazma proteinleri ile birlikte pıhtının içinde tutulur, fakat aktive olana kadar plazmine dönüşmez. Yaralanan dokular ve damar endoteli, çok yavaş olarak doku plazminojen aktivatörü (tPA) adı verilen güçlü bir aktivatör salgırlar ve bu madde, pıhtı kanamayı durdurduktan bir gün ya da daha sonra, plazminojeni plazmine çevirir ve pıhtıyı ortadan kaldırır(59). Plazmin, fibrin iplikçiklerinin yanı sıra fibrinogen, FV, FVIII, protrombin, FXII gibi maddeleri de sindiren bir proteolitik enzim görevi yapar. Az miktarlarda plazmin kanda sürekli olarak yapılır ve pıhtılaşma sisteminin aktivasyonunu ciddi olarak engelleyebilir. Fakat kanda bulunan diğer bir faktör “alfa 2 antiplazmin”, plazmini bağlayarak inhibe eder. Bu nedenle plazminin etkili olabilmesi için plazmin oluşum hızının kritik bir düzeyi aşması gerekmektedir.

Antikoagülan Sistem

Pıhtılaşma sisteminin etkin olabilmesi için reaksiyonun sadece hasar bölgesinde meydana gelmesi gereklidir, bunu ise antikoagülan sistem sağlar ve fibrin oluşumunu hasar bölgesinde sınırlandırılır. Görev alan bazı antikoagülan proteinler arasında doku faktör yolu inhibitörü (TFPI-Tissue factor pathway inhibitor), antitrombin, protein C, intrinsik sistem inhibitörleri yer alır. TFPI sürekli olarak endotelial hücrelerden salgınır. TFPI, faktör Xa'ya bağlandıktan sonra TF-VIIa kompleksine bağlanabilme özelliği kazanır, böylece ekstrinsek yol hızlıca inhibe edilmiş olur(60).

Antitrombin ise bir serin proteaz inhibitörüdür. Koagülasyon yolağı üzerindeki önemli noktalarda görev alan faktör Xa, faktör IXa, faktör VIIa, faktör IIa'ya (faktör II=Protrombin) bağlanır ve nötralize eder. Antitrombin daha çok serbest haldeki trombin ve faktör Xa'ya bağlanır, yani dolaşımdaki fazla trombin ve faktör Xa'yı nötralize etmektedir. Oluşan trombin-antitrombin (TAT) kompleksi dolaşımdan hemen temizlenir (61,62).

Protein C, pıhtılaşmanın önlenmesinde büyük rol oynamaktadır. Protein C aktivasyonu için iki şey gereklidir, bunlar trombin ve protein C'nin membrana bağlanmasıdır. Aktivasyon

için protein C, önce endotel üzerinde eksprese olan protein C reseptörüne (PCRec) bağlanır. Trombinin, protein C'yi aktif hale getirebilmesi için yine endotel yüzeyinde bulunan trombomodulin'e bağlanması gereklidir. PCRec'ü, protein C'yi trombomoduline bağlanan trombine sunma görevini yapmaktadır. Aktive Protein C'nin (APC), antikoagülan görevini yerine getirebilmesi için ise PCRec'ünden ayrılması gereklidir. Bunu sağlamak için protein S kofaktörü devreye girer, bu proteinin enzimatik aktivitesi yoktur (63). Protein S/APC kompleksi faktör Va ve faktör VIIIa'yı inaktive eder. Böylece protrombinase aktivitesi sonlandırılmış olur ve trombin kendi kendisinin üretimini sınırlandırır. İşte tam bu noktada faktör V mutasyonları önemli rol oynamaktadır (64).

Normal damar sisteminde pıhtılaşmayı önleyen en önemli faktörler şunlardır:

- a. Endotelin düzgünlüğü (intrensek yol aktivasyonunu engeller)
- b. Glikokaliks tabakası (pıhtılaşma faktörlerini ve trombositlerin endotele yapışmasını engeller)
- c. Trombomodulin (hem trombini bağlayarak onu ortamdan uzaklaştırır hem de protein C yolunu aktive eder)
- d. Fibrin iplikçikleri (trombinin çoğunu içine hapsederek ortamdan uzaklaştırır)
- e. Antitrombin III (trombini bağlayarak fibrinojen üzerine etki etmesini engeller)
- f. Heparin (Antitrombin III ile birleştiğinde antitrombin III'ün trombini uzaklaştırma yeteneğini 10 kat artırır. Ayrıca heparin-antitrombin III kompleksi F XIIa, XIa ve Xa'yıda ortamdan uzaklaştırır)
- g. Alfa 2 makroglobulin (pek çok pıhtılaşma faktörünü bağlayarak proteolitik etkilerini önler)

Tüm bu antikoagülan mekanizmaların herhangi birinde görülecek aksaklık, potansiyel olarak trombofiliye, dolayısıyla plasental yetmezliğe ve fetal kayba yol açabilir.

Gebelikte Gözlenen Hematolojik Değişiklikler

Gebelik hiperkoaguabile (koagülasyon artışı) bir durum olarak kabul edilmektedir ve gebelikte bu hiperkoaguabile durumu meydana getirecek bir çok fizyolojik değişiklik olmaktadır(65). Gebelikte birçok prokoagulan faktör artarken, koagülasyonun doğal inhibitörlerinde de değişiklik olmaktadır. Ayrıca gebelikte, dolaşımdaki plazminojen aktivatörlerinin seviyesi azalmakta ve fibrinolitik sistem yavaşlamaktadır. Bu fizyolojik değişiklikler, peripartum kanamalara karşı savunma mekanizmalarından birini oluşturmaktadır.

Prokoagulan faktörlerden Faktör I, VII, VIII, IX ve X artmaktadır. Faktör II, V ve XII değişmez veya hafif artar. Faktör XI ve XIII seviyeleri azalır. Plazma fibrinojen (faktör I) seviyesi ilk trimesterde artmaya başlar ve üçüncü trimesterde tepe noktaya ulaşır ve bu değer gebelik öncesi değer % 50 fazlasıdır. Fibrinojendeki bu artış, eritrosit sedimentasyon hızında artışa neden olur. Artan prokoagulanların aksine aynı oranda artış antikoagulanlarda izlenmez; Protein S %40-50 oranında düşerken, Antitrombin III ve Protein C düzeyleri sabit kalır. Gebelik süresince fibrinolitik aktivite de değişir ve plazminojen aktivatör inhibitörü 1 (PAI-1) ve plazminojen aktivatör inhibitörü 2 (PAI-2) düzeyleri gebelik boyunca sürekli artar(66). PAI-1 endotelial hücreler tarafından salgınır ve plazminojen aktivatörünü inhibe eder. PAI-2 ise trofoblastlar tarafından üretilir ve plasental gelişimi kontrol eder. Trombosit aktivasyonunda da belirgin bir artış görülür. Tromboksan üretimindeki artış, prostosiklinin antiagregasyon etkisine karşı trombosit sensitivitesindeki azalma, gebeliğin protrombotik durumuna katkıda bulunur.

Protrombin zamanı (PT), aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) ve trombin zamanı hafif azalır, ancak gebe olmayanlardaki normal limitler arasında kalır. Gebelikte, kanama zamanı ve pıhtılaşma zamanı değişmez. Koagülasyon faktörleri postpartum 2.haftada normal düzeylerine döner(67)

Tablo-3: Gebelikte koagülasyon sisteminde değişiklikler

ARTAN	DEĞİŞMEYEN	AZALAN
Fibrinojen	FII (veya artar)	FXI
FVII	FV (veya artar)	FXIII
FVIII	FXII(veya artar)	Trombosit
FIX	Antitrombin III	Protein S
FX	Protein C	
Fibrinopeptid A		
PAI 1 ve 2		
Tromboksan		
Trombosit aktivitesi		

Trombofil

Trombofil kişilerde tromboz oluşumunun artmasına neden olan hemostatik bir bozukluktur. trombofil terimi tromboza olan yatkınlığı anlatmak için kullanılan bir terimdir. "trombo" -pıhtı, "philia" -sevmek,yatkınlık

Hereditör ve edinilmiş (akkiz) trombofil olarak 2 gruba ayrılmaktadır (Tablo-). Tedavi edilebilir tekrarlayan gebelik kaybı nedenlerindedir ve her iki trombofilinin patofizyolojileri benzerdir. Tekrarlayan gebelik kaybı olan bazı kadınlarda gebeliğin tetiklediği trombojenik değişiklikler, kişide var olan pıhtılaşmaya yatkınlığı arttırmaktadır ve böylece uteroplasental kan akımında azalma, plasental tromboz ve gebelik kaybı olmaktadır (68).

Preston ve ark. 1996 yılında kalıtsal trombofililerin fetal kayıp ile ilişkisi üzerine ilk prospektif kohort çalışmasını yapmışlardır. Bu çalışmada, 1384 kadında 28 haftasında veya önce düşük ve ölü doğum sıklığını araştırmışlardır. trombofilisi olan kadınlarda fetal kayıp riskinin arttığı gözlenmektedir. (168/571 vs 93/395; odds oranı 1.35). Kombine trombofilisi olan hastalarda ölü doğum odds oranının en yüksek olduğu saptanmıştır(69)

Tekrarlayan gebelik kayıplarında antifosfolipit sendromunun neden olduğu gösterilmiştir ve plsaental tromboz ile birlikte olduğu düşünülmektedir(70,71). Son çalışmalar tekrarlayan gebelik kayıplarının aynı zamanda diğer edinsel trombofili ve kalıtsal trombofililer ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Trombofilik patolojiler gebelik komplikasyonu gelişen kadınların %49-%65'inde, normal gebeliği olan kadınların ise %22'sinde görülmektedir(72).

İki veya daha fazla ilk trimester düşüğü veya bir veya daha fazla geç gebelik kayıpları olan hastalar MTHFR C677T gen polimorfism, FVL gen polimorfismi PTHRA20210G gen polimorfism, protein C eksikliği, protein S eksikliği, antithrombin III eksikliği, lupus antikoagulantı ve antikardiyolipin Ig G ve Ig m antikorları için test edilmiştir. Sık rastlanan düşük nedenleri ekarte edildikten sonra bu hastaların %78 oranında kombine olarak edinsel ve/veya kalıtsal koagülasyon bozuklukları saptanmıştır(73).

2.1.7. İMMUNOLOJİK FAKTÖRLER

Maternal immun sistem tarafından paternal antijenlerin tanınması ve buna bağlı fetusun immunolojik rejeksiyonu anormal immun hücrelere ve sitokin oluşumuna neden olur(74). Bunun sonucunda immun hücreler ve sitokinler açıklanamayan düşüklerin bir nedeni olarak görülmektedir. İmmunolojik abortuslar konusunda kemirgenlerde birçok kanıt olmasına rağmen, insanlar da ise daha az kanıt bulunmaktadır. Çalışmalarda tam bir görüş birliği olmamasına rağmen, bazı immun hücre ve moleküllerin tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan kadınlarda daha fazla eksprese edildiği gösterilmiştir.

2.2.SİTOKİNLER

Çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen ve salgılanan polipeptidler olan sitokinler, enflamasyon, hücre büyümesi, iyileşmesi ve yaralanmaya karşı sistemik yanıtı da içine alan bağışıklık ve enflamatuvar olayları düzenlenler.

Sitokinler genel olarak, immun hücre orijinleri ve immunolojik etkilerine bağlı olarak gruplara ayrılır. CD4+ T-helper hücreleri sitokin üretimindeki major hücrelerdir. CD4+ T-helper hücreleri; sitokin üretimindeki 3 major kümeye ayrılabilir. İlk grupta bulunan Th-1 hücreleri interferon gamma (IFN γ), IL-2, TNF- β üretir. Bunlar bilindiği üzere hücre aracılı immun cevabın ana efektörleridir. Th-2 hücreleri antikor aracılı hümoral cevabın ana efektörleri olan IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-10 üretir. Üçüncü T-helper popülasyonu ise Th-0 hücreleridir ve bunlar Th-1 ve Th-2'ye dönüşebilen prekürsör hücrelerdir. TNF- γ ve GM-CSF'nin yanında Th-1 ve Th-2'nin sitokinlerini de üretebilirler. Bütün bu sitokinler, immun hücreler dışında, endometrium ve desiduanın stromal ve epitelyal hücrelerinde ve plasentanin sinsityotrofoblast hücrelerinde de üretilir(74).

Gebelikte Th1 bağımlı proinflamatuvar sitokinlere (TNF α , IFN γ , IL-2, IL12, IL-18) kıyasla Th2 bağımlı antiinflamatuvar sitokinlerin (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL- 10, IL-13) ekspresyonunda artış olmaktadır(75). Normal gebelikte Th2 bağımlı sitokin üretimi daha baskın olurken, Th1 bağımlı sitokinlerin daha çok üretildiği gebeliklerin anormal plasenta-embriyo gelişimi ve fetal kayıp ile sonuçlanma olasılığının arttığı öne sürülmüştür (76-78). TGK veya tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan hastalarda Th1 sitokin cevabının arttığı gözlemlenmiştir(79). Th1 bağımlı sitokinlerin hiperkoagülabilité oluşturarak gebeliği tehlike altına soktuğu düşünülmektedir.

Embriyonik antijenlere karşı endometriumdaki maternal immün hücrelerde intrasellüler progesteron reseptörlerinin (PR) sayısı artmaktadır(80). Progesteron varlığında aktive olmuş maternal lenfositler progesterone-induced blocking factor (PIBF) adlı bir protein üretmektedir(81,82). PIBF Th1/Th2 oranını Th2 lehine değiştirerek, IL-4, IL-6 ve IL-10 üretimini arttırır (83,84). IL-4 ve IL-6 trofoblastlardan hCG salınımını, hCG progesteron salınımını ve progesteron da Th2 sitokinlerin salınımını uyararak pozitif feed-back mekanizmasını oluşturur.

İlk trimesterde normal reproduktüf dönemdeki kadınlarla TGK öyküsü olan kadınların karşılaştırılmasında monosit stimülasyonu ile IL-+, IL-5,IL-6 ve IL-10 üretiminin azaldığı, IFN- γ , IL-2, TNF- α , TNF- β üretiminin arttığı bulunmuştur(85). Düşük öncesi erken hamilelik döneminde TGK öykülü kadınların periferal kan hücrelerinin sitokin üretimleri üzerine yapılan çalışmada da TGK öykülü kadınlarda IL-4, IL-10 seviyelerinin artması ve IFN- γ azalması bildirilmiştir(86). Düşük dönemindeki TGK öykülü kadınlarda desidual CD4+

klonları ile normal kadınların desiduasından izole edilmiş CD4+ klonları karşılaştırılmış; IL-4 ve IL-10'un önemli derece düşük olduğu görülmüştür(87).

Çalışmalar TKG öykülü kadınlarda bazı immün hücre ve moleküllerin yapımında farklılıklar meydana geldiğini akla getiriyor. Ayrıca desidual CD+ hücre klonları tarafından üretilen Th1 ve Th2 sitokinlerinin oranındaki değişiklikler saptanmıştır. Endometrial sitokin üretiminde farklılıklar için bazı kanıtlar vardır ve özellikle IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin üretiminde düşmeler gözlenmiştir. Bu hücreler ve moleküllerin anormal ekspresyonun düşükle sonuçlandığı insanlarda kesin ispatlanmasa da, farelerdeki deneyler koagülasyonun başlatılması ve HLA molekülleri ile NK hücreleri arasındaki anormal ilişkiler olabileceğini akla getirmiştir. Sonuç olarak anormal sitokin üretim farklılıkları abnormal plasental büyüme ve fonksiyonlarına neden olarak tekrarlayan düşüklere neden olmaktadır(88).

Adipokinler

Son yıllarda, önceden beri enerji deposu olarak görülen yağ dokusunun vücudun önemli bir endokrin organı da olduğu gösterilmiştir. Yağ dokusu enerji metabolizması, nöroendokrin fonksiyon ve immün fonksiyonlarla ilgili biyolojik aktivitelere sahiptir. Yağ dokusunun hem eksikliği hem de fazlalığının önemli metabolik ve endokrinolojik sonuçları olmaktadır. Tüm dünyada obezite sıklığının ve eşlik eden metabolik sendrom sıklığının epidemik olarak artıyor olması, bir metabolik ve endokrin organ olan yağ dokusuna olan ilgiyi arttırmıştır. Yağ dokusunda üretilen adipositokinler arasındaki dengenin korunması glukoz ve lipid metabolizmalarının homeostazı açısından önemli rol oynamaktadır. (89). Bu yönleriyle adipositokinler enerji dengesinin korunmasıyla ilişkili olup obezite ve beraberinde görülen rahatsızlıkların tedavileri açısından potansiyel hedef moleküllerdir. (90)

Yağ dokusundan salgılanan başlıca sitokinler: Leptin, TNF- α , Omentin, Apelin, IL-6, Makrofaj ve monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1), Angiotensinojen, Plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1), Adiponektin, İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I), prostaglandin I₂ (PG I₂), prostaglandin F₂ α (PG F₂ α), Adipsin ve asilasyon uyarıcı protein (ASP), Rezistin, Renin anjiyotensin sistemi (RAS) gibi proteinlerdir(91).

Apelin vücudun çeşitli bölümlerinde endotelial hücrelerinden üretilen bu peptid, adipoz dokunun yeni bir üyesidir. Yapılan çalışmalar, apelinin kardiyovasküler fonksiyonlar, ön hipofiz fonksiyonları ve sıvı homeostazisinin düzenlenmesi üzerinde rolünün olduğunu(93), ayrıca apoptozun ve insülin salınımını baskılanmasında (94) görev aldığını ortaya koymuştur. Yakın zamanda apelinin bir adipokin olduğu ve adipoz dokudaki apelin gen ekspresyonunun insülin ve TNF- α tarafından arttırıldığı tanımlanmıştır. Normal gebelik seyri boyunca gebe olmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ilk trimesterden itibaren seviyelerinde düşüş izlenmektedir(95).

Omentin ilk olarak intestinal paneth hücrelerinden izole edilmiştir. Ardından kalp, akciğer, ovaryum ve plasentada eksprese edilen omentinin daha sonra yağ dokusunda da eksprese edildiği saptanmıştır(96). Ayrıca omentin molekülünün subkutan yağ dokusuna kıyasla viseral yağ dokusunda daha fazla ve selektif olarak eksprese edildiği görülmüştür(97). Umbilikal kord kanında yüksek omentin seviyeleri saptanmıştır. Fetal yağ ve kas dokularının glukoz uptake'inde insülin önemli bir yere sahiptir. Omentinin insülin duyarlılığını artırıcı etkisi olması ve kord kanındaki yüksek omentin seviyeleri nedeniyle omentinin fetal büyümeyi uyarıcı etkisi olduğu iddia edilmektedir(98). Gebelikte özellikle ilk trimesterde gebe olmayanlara göre daha yüksek seviyelerde bulunur(99).

İnterlökin-6 mononükleer fagositler, damar endotel hücreleri, fibroblastlar ve epitel hücreleri, bazı aktive T hücreleri ve yağ dokusu tarafından da sentez edilir. İnsülin direncini arttırmaktadır. Tip 2 DM hastalarında yüksek bulunmuştur. Embriyonun implantasyonu, plasentanın gelişimi ve gebelik tolerasyonu için immun adaptasyonda rol oynar. Normal gebelikte IL-6 düzeylerinde düşme gözlenmektedir. Artmış düzeyleri açıklanamayan infertilite, tekrarlayan gebelik kayıpları, pre-eklampsi ve preterm doğum ile ilişkilidir(100).

2.3. GEBELİK VE OKSİDATİF STRES

Fizyolojik koşullarda serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma sistemi bir denge halindedir. Bu dengenin serbest radikal tarafına kayması lipid peroksidasyonuna yol açmaktadır. Hücre organelleri ve membrandaki lipid ve protein yapısı bozulur, hücre içi enzimler inaktifleşir, DNA hasarı oluşur, mitokondrilerdeki aerobik solunum bozulur, litik enzimler aktive olur, hücreden K⁺ kaybı artar, damar geçirgenliği bozulur, ekstraselüler kollajen doku komponentleri yıkılır, trombosit agregasyonu ve dokulara fagositlerin göçü artar. Organizmadaki tüm bu fonksiyonel ve yapısal değişikliklere oksidatif stres denilir(101).

Lipid peroksidasyonu-antioksidan dengesi hayatın her evresinde olduğu gibi hamilelik döneminde de hem annenin hem de fetüsün fizyolojik fonksiyonlarını sürdürebilmesi için önem taşımaktadır. Normal hücre ve dokularda düşük seviyede oluşan lipid peroksidasyonunun hamilelik sürecinde artmış olduğu görülmüştür. Bunun sebebinin plasentadaki lipoperoksidatif aktiviteye, total serum lipid ve lipoproteinlerdeki artışa ve uterus ve içeriğinin kütleli olarak artışı sonucunda meydana gelen oksijen ihtiyacındaki artışa bağlı olduğu düşünölmektedir(102). Genelde lipid peroksidasyonunun fetal doku gibi genç hücrelerde ve kanser hücreleri gibi sürekli mitozu uğrayan hücrelerde daha az, fakat matür hücrelerde daha kuvvetli olduğu bilinmektedir(103). Dolayısıyla hamilelikte lipid peroksidasyonunun esas kaynağının fetal doku olmayıp plasenta olduğu anlaşılmaktadır(104). Yapılan bazı çalışmalarda özellikle hamileliğin erken dönemlerinde plasental dokunun lipid peroksidasyonundaki artışın hamileliğin ileriki dönemlerindeki artışa göre daha az olduğu rapor edilmiştir. Fakat bazı araştırmacılara göre de plasental lipid peroksidasyonunun en fazla artışı ilk trimestirde gösterdiği, ikinci trimestirde yavaşça azaldığı ve üçüncü trimestirde ise tamamen azalarak doğumla birlikte minimal seviyeye düştüğü saptanmıştır. Plasental dokudaki lipid peroksidasyonunun erken yada geç dönemde oluşmasına dair ikilemlerin sebebi, plasentadan maternal dolaşıma geçen serbest radikallerin yeteri kadar detoksifikasyona uğrayıp uğramamasından kaynaklanmaktadır(105). Diğer bir deyişle plasental dokudaki serbest radikallerin miktarı bir anlamda maternal dokuların detoksifikasyon aktivitesine bağlıdır(106).

Normal koşullarda oluşan lipid peroksidasyonunda devreye giren antioksidan sistem, hamilelikte de aynı şekilde rol almaktadır. Yapılan çoğu çalışmalarda serum antioksidan aktivitesinin lipid peroksidasyonundaki artış oranında arttığı tespit edilmiştir. Hamilelikte antioksidan düzeyinin, hamileliğin ilk trimestirinde yaklaşık % 50, son trimestirinde ise % 80-90 oranında arttığı ve gestasyonel periodun sona ermesiyle birlikte tekrar dşe geçtiği grlmştir.

Oksidatif stresin indüklediği hasarın spontan abortus, açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı, mol hidatiform, defektif embriyogenez ve ilaca bağlı teratojenitede rol oynadığı dşnlmektedir. Bazı çalışmalarda sistemik ve plasental oksidatif stresin abortus ve tekrarlayan gebelik kaybı patofizyolojisi ile ilişkili olduğunu öne sürmektedir(107).

2.4. APOPTOZ

Apoptoz programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı ve fizyolojik hücre ölümü ile eř anlamda da kullanılmaktadır. Çok hücreli canlılarda asıl amaç hem yeni hücre üretmek hem de hücreler yaşlandığında veya aşırı çoğalmaya başladığında bu hücrelerin apoptoza gitmesini sağlayarak organizmanın dengesini korumaktır(108).

Apoptozis ekstrinsik (death reseptors) ve intrinsik (mitochondrial pathway) yol olmak üzere iki ana sinyal yolağı tarafından tetiklenir(109). Ekstresek yolda tumor necrosis factor alfa, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (CD95L) gibi moleküllerin ölüm reseptörlere bağlanması ölüm uyaran sinyalizasyon kompleks formasyonu yol açar ve kaspazların aktivasyonu başlar. İnrinsik yol hücrenel stres ile tetiklenir. Hcrenel stres sonucunda mitekondrial proapoptotik mediatörler salınır ve bu mediatrlerde kaspazların aktivasyonu sağlar. Kaspazlar inaktif prekürsör olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozda rol almaktadır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir yolağa neden olurlar. Bazıları başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken bazıları da efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör

kaspazlar ise ilgili parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. Kaspazların aktivasyonu sonrasında hücre ölümü nedeniyle birçok hücrel substratlar ortaya çıkar. Bu substratlar yapısal protein olan sitokeratin ailesi gibi birçok biyolojik öneme sahip proteinlerdir. (110)

Sitokeratin-18 hepatosit, plasental trofoblast gibi epitelyal hücrelerden salgılanır(110,111). Son yıllarda kaspazlar tarafından oluşturulan sitokeratin-18 gibi proteinlerin apoptotik epitelyal hücreler tarafından salgılandığı ve bunların düzeylerinin hepatik yetmezlik ve gebelik komplikasyonları gibi epitel disfonksiyonu sonucu gelişen hastaların kan örneklerinde tespit edilebileceği gösterilmiştir(112). Apoptotik epitel hücrelerinden sitokeratin-18 salınımının moleküler mekanizmalar hala bilinmemektedir.

2.4.1. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Apoptozu saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptoz terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa, günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanısıra apoptoza özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir.

İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptoz, 80'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlandı. 90'ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulundu. Böylece, kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik yöntemler ile saptanabilen apoptoz, 90'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlandı.

Apoptozun belirlenmesine yönelik geliştirilen tüm yöntemleri, 2000'li yılların başlarında, sadece apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan sitokeratin-18'in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikörlerin kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etti(113).

Apoptozun belirlenmesinde kullanılan başlıca yöntemler şunlardır:

A. Morfolojik görüntüleme yöntemleri

1. Işık Mikroskobu
2. Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop
3. Elektron Mikroskobu
4. Faz Kontrast Mikroskobu

B. İmmunohistokimyasal yöntemler

1. Anneksin V Yöntemi
2. TUNEL Yöntemi
3. M30 Yöntemi
4. Kaspaz-3 Yöntemi

C. Biyokimyasal yöntemler

1. Agaroz Jel Elektroforezi
2. “Western Blotting”
3. “Flow” Sitometri

D. İmmunolojik yöntemler

1. ELISA
2. Fluorimetrik Yöntem

E. Moleküler biyoloji yöntemleri

2.4.2. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ve M30-M65

ELISA testi, viral, bakteriyel ve paraziter enfeksiyonların tanısında ve apoptozun belirlenmesinde kullanılan, serolojik tanı yöntemlerinden biridir. ELISA yönteminde, antijen-antikor kompleksine bir enzimle işaretli antiglobulinin ilave edilmesi ve sonra substratın eklenmesi ile eğer antijen veya antikor var ise renk oluşumunun gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Duyarlı spesifik ve çabuk sonuç veren bir testtir.

Apoptozda görülen ilk olay, sitoplazma içine nükleozomların salınmasını takip eden DNA fragmentasyonudur. ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre popülasyonlarında, gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür.

M30 ve M65 plazma veya serumdan apoptotik epiteltal hücreler tarafından salgılanan sitokeratin-18'in değişik formlarını tespit etmede kullanılan nispeten yeni tanımlanmış ELISA testleridir(114). M30 sadece kaspazların aktivasyonu ile parçalanmış sitokeratin-18 fragmanlarını ölçer ve apoptotik hücre ölümünün seçici bir belirteci olarak kabul edilmektedir(115). M30 imünoreaktivitesi apoptotik epitel hücrelerinin sitoplazması ile sınırlıdır ve erken apoptoz sırasında ifade edilir(116). M65 ise total sitokeratin-18 düzeyini gösteren ve apoptozun belirlenmesinde kullanılan bir testtir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Haziran 2012 ile Şubat 2014 tarihleri arasında Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğine gebelik takibi için başvuran kişilerde Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı tarafından yerel etik kurulu kararı ile onay alınarak yapıldı.

Çalışma grubu ilk trimester gebeliği olan ve açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan 32 hasta dahil edildi. Kontrol grubu olarak da ilk trimester gebeliği olan ve daha önce abortus öyküsü olmayan 31 gebe çalışmaya dahil edildi.

Çalışmaya dahil edilen ve tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan hastalar etyolojiye yönelik parental kromozom analizi, uterin anomali varlığı, sistemik hastalık varlığı, trombofili paneli açısından değerlendirildi. Yapılan değerlendirme sonrasında hastalarda tekrarlayan gebelik kaybı etjolojisini açıklayacak bir neden olmamasına dikkat edildi.

Çalışmaya dahil edilen hastaların değerlendirilmesine anamnez ile başlandı. Hastaların yaşı, gebelik ve parite sayıları, abortus sayıları, jinekolojik öyküsü, sistemik hastalık varlığı ve eşlerinin yaşı sorgulandı. Tüm hastaların boy ve kiloları ölçüldü. Vücut ağırlığı (kg) / boy² (m) formülü ile body mass indexi (BMI)=vücut kitle indexi (VKİ) hesaplandı.

Çalışma ve kontrol grubundaki tüm gebelerden separatör jel içeren tüplere venöz kan alındı. Kanlar santrifüje edilerek plazma örnekleri alındı. Örnekler -20°C'de saklandı. M30, M65, omentin, apelin, IL-6, toplam oksidan status (TOS), toplam antioksidan status (TAS), oksidatif stres indeksi (OSİ) düzeyleri Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda çalışıldı.

3.1. M30 Düzeyinin Ölçümü

Örneklerin omentin düzeyleri, Peviva marka (Lot No: PE-RS1158) ELİSA kiti ile çalışılmıştır. Sonuçlar kit prospektüsünde belirtildiği gibi hesaplanmıştır, birimler U/L olarak ifade edilmiştir.

3.2. M65 Düzeyinin Ölçümü

Örneklerin omentin düzeyleri, Peviva marka (Lot No: PE-RS1177) ELİSA kiti ile çalışılmıştır. Sonuçlar kit prospektüsünde belirtildiği gibi hesaplanmıştır, birimler U/L olarak ifade edilmiştir.

3.3. Omentin Düzeyinin Ölçümü

Örneklerin omentin düzeyleri, BioVendor marka (Cat. No:RD191100200R) ELİSA kiti ile çalışılmıştır. Sonuçlar kit prospektüsünde belirtildiği gibi hesaplanmıştır, birimler ng/ml olarak ifade edilmiştir.

3.4. Apelin Düzeyinin Ölçümü

Örneklerin omentin düzeyleri, USCN Life Science Inc. marka (Lot No:L140206038) ELİSA kiti ile çalışılmıştır. Sonuçlar kit prospektüsünde belirtildiği gibi hesaplanmıştır, birimler pg/ml olarak ifade edilmiştir.

3.5. IL-6 Düzeyinin Ölçümü

Örneklerin omentin düzeyleri, DIAsource marka (Lot No: 13A19/4) ELİSA kiti ile çalışılmıştır. Sonuçlar kit prospektüsünde belirtildiği gibi hesaplanmıştır, birimler pg/ml olarak ifade edilmiştir.

3.6. Toplam Oksidan Status (TOS) Düzeyi Ölçümü

Örneklerin toplam oksidan status (TOS) düzeyi, Rel Assay marka ticari kitleler kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm testin çalışma prensibinde ifade edildiği üzere örneklerin içerdiği oksidan moleküllerin ferroz iyonu ferrik iyonla kümülatif olarak oksitlemesine dayanan, kolorimetrik yöntem kullanıldı. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/ L olarak ifade edildi (117)

3.7. Toplam Antioksidan Status (TAS) Düzeyi Ölçümü

Örneklerin total antioksidan seviye (TAS) düzeyi, Rel Assay marka ticari kitleler kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm yöntemi örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikal antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edildi (118).

3.8. Oksidatif Stres İndeksi Ölçümü

Oksidatif Stresin bir göstergesi olarak gösterilen Oksidatif Stres İndeksi (OSI), Toplam Oksidan Status/Seviye (TOS) düzeylerinin Toplam Antioksidan Status/Seviye (TAS) düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilir. Örneklerin Oksidatif Stres İndeksi (OSI) hesaplanırken TAS düzeyleri 10 ile çarpılarak TOS düzeyleri ile birimler eşitlenir (119). Sonuçlar Arbitrary Units (AU) olarak ifade edildi.

TOS, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv. / L.

$$\text{OSI} = \frac{\text{TOS}}{\text{TAS}} \times 100$$

TAS, $\mu\text{mol trolox Equiv. / L.}$

3.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS Versiyon 11.5 (SPSS Inc. Chicago USA) bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Grupların ortalamaları arasındaki farkın önemi Student's t testi ile karşılaştırılmıştır. Parametreler arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile araştırılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışma grubu ilk trimester gebeliği olan ve açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan 32 hasta dahil edildi. Kontrol grubu olarak da ilk trimester gebeliği olan ve daha önce abortus öyküsü olmayan 31 gebe çalışmaya dahil edildi.

Hastaların demografik özellikleri ve gebelik haftası Tablo-4'te verilmektedir. Çalışma ve kontrol gruplarında yaş, paternal yaş, BMI ve gebelik haftası ortalamalarına göre anlamlı fark yoktu.

Tablo-4: TGK ve kontrol gruplarının demografik bilgilerinin karşılaştırılması

	TGK (n: 32) Ortalama ± S.D	Kontrol (n:31) Ortalama ± S.D	p
Yaş (Yıl)	30,66 ± 3,24	28,94 ± 4,71	0,096
Paternal Yaş (Yıl)	33,69 ± 4,23	31,81 ± 5,55	0,072
BMI (Kg/m²)	26,44 ± 1,74	25,52 ± 2,19	0,135
Gebelik Haftası (Hafta)	8,34 ± 1,31	8,77 ± 1,33	0,201

Tablo-5'te açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan gebeleri içeren çalışma grubu ile sağlıklı gebelerin oluşturduğu kontrol grubuna ait M30, M65, omentin, apelin, IL-6, toplam oksidan status (TOS), toplam antioksidan status (TAS), oksidatif stres indeksi (OSİ) düzeyleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

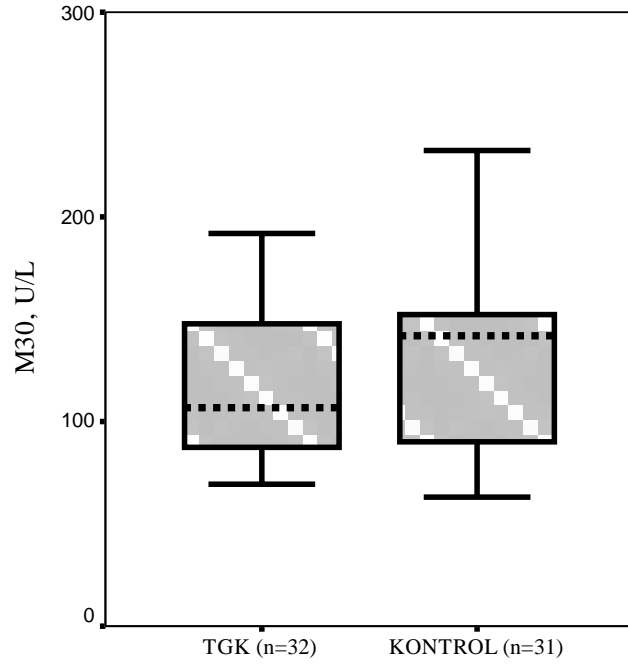
Tablo-5: TGK ve kontrol grubunda M30,M65, sitokinler ve oksidatif stres markerları değerlerinin karşılaştırılması

	TGK (n: 32) Ortalama ± S.D	Kontrol (n:31) Ortalama ± S.D	p
M30 (U/L)	117,72 ± 36,79	131,57 ± 41,98	0,172
M65 (U/L)	341,50 ± 93,92	434,68 ± 106,88	<0,001
Omentin (ng/ml)	24,92 ± 5,48	21,75 ± 5,71	0,028
Apelin (pg/ml)	1309,47 ± 398,26	1280,35 ± 315,55	0,749
IL-6 (pg/ml)	72,22 ± 17,65	101,18 ± 29,20	<0,001
TAS (mmol troloks Equi./L)	0,80 ± 0,11	0,89 ± 0,18	0,030
TOS (µmol H₂O₂ Equi./L)	25,09 ± 7,69	17,32 ± 4,25	<0,001
OSİ (AU)	3,11 ± 0,90	1,99 ± 0,51	<0,001

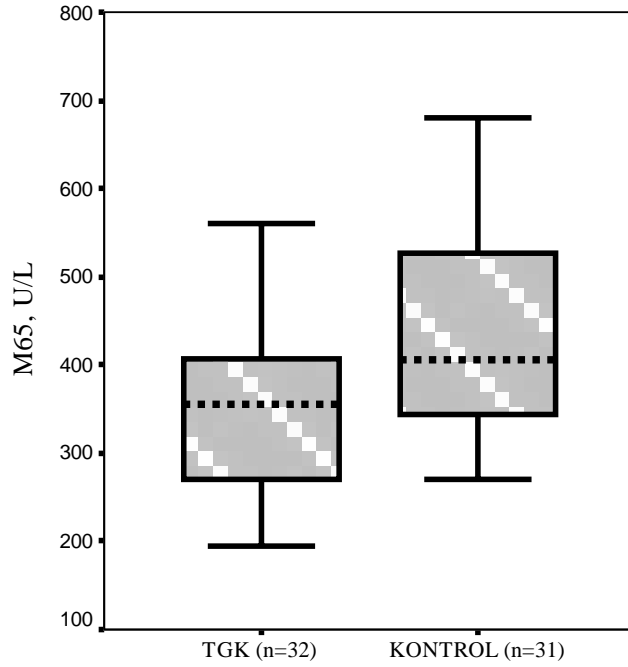
İki grup karşılaştırıldığında apoptozis markırı olan M30 ve M65 düzeyleri TGK öyküsü olan hasta grubunda kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur. M30 düzeyindeki düşüklük anlamlı olarak kabul edilmezken (p=0,172), M65 düzeyindeki düşüklük istatistiksel olarak anlamlı saptandı (p<0,001).

Sitokinlerden omentin TGK grubunda yüksek olarak saptandı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı kabul bulundu (p=0,028). Apelin TGK grubunda kontrol grubuna kıyasla yüksek bulundu ancak bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi (p=0,749). İki grup karşılaştırıldığında IL-6 düzeyleri TGK grubunda daha düşük saptandı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (p<0,001).

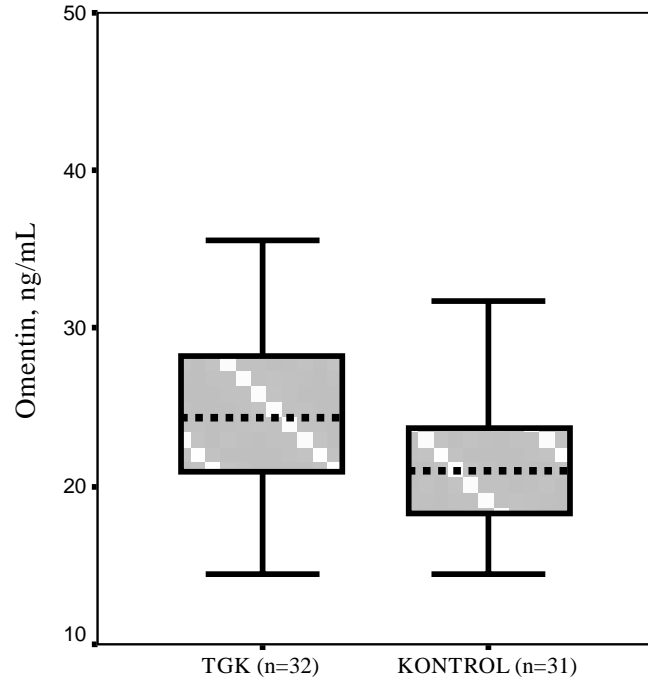
Her iki grup karşılaştırıldığında toplam oksidan status (TOS) ve toplam oksidan statusun, toplam antioksidan statusa oranının yüzde ifadesi olarak hesaplanan oksidatif stres indeksi (OSİ) TGK grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksekti (p<0,001). Toplam antioksidan status (TAS) ise TGK grubunda istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu (p=0,030).



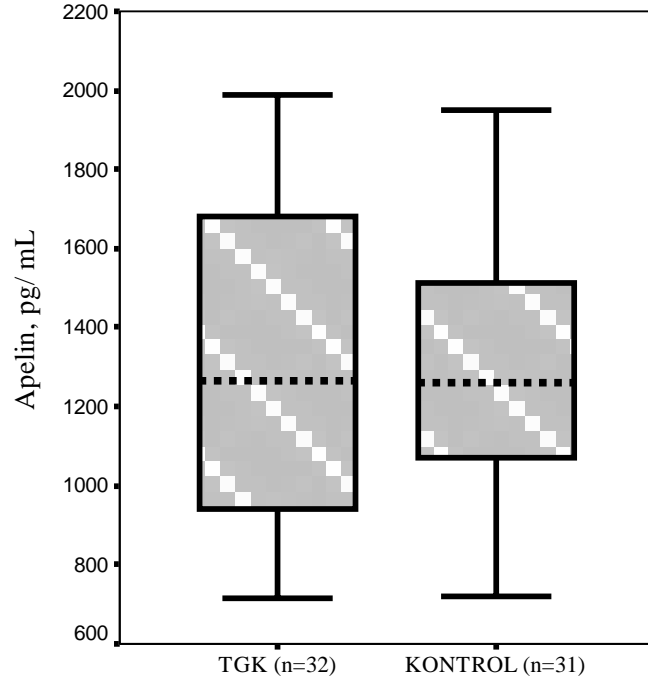
Şekil-2: Hasta ve kontrol gruplarının M30 düzeyleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



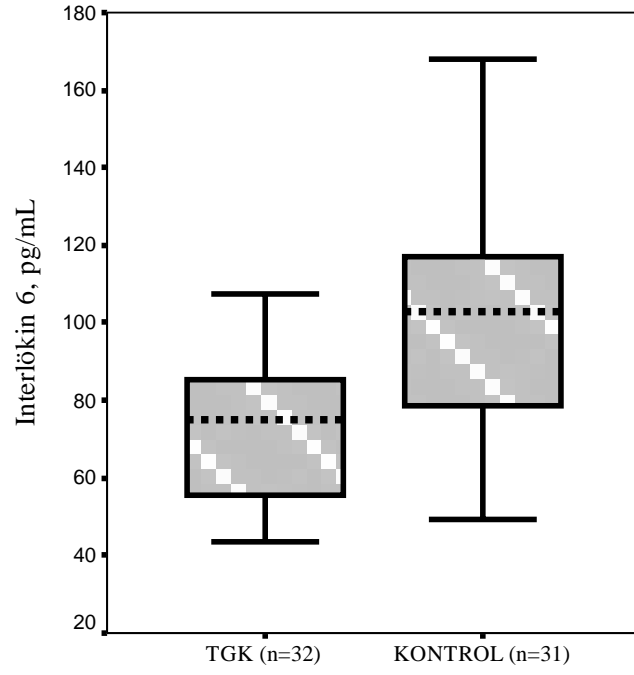
Şekil-3: Hasta ve kontrol gruplarının M65 düzeyleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



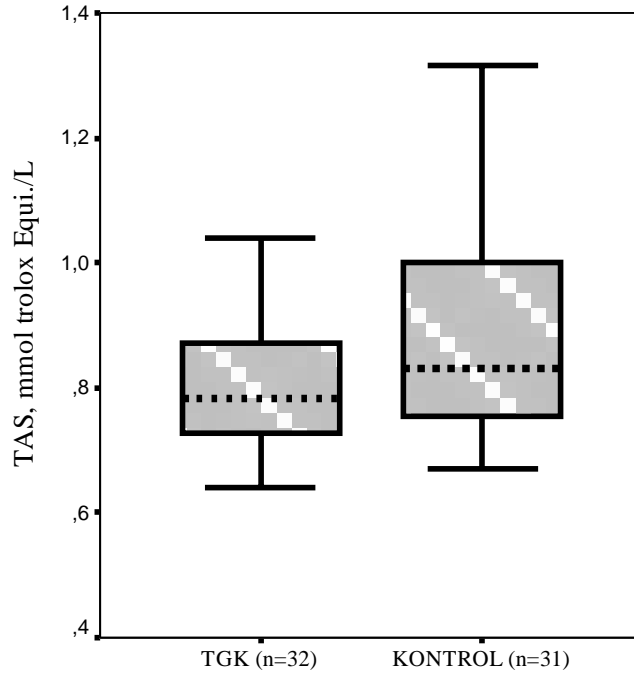
Şekil-4: Hasta ve kontrol gruplarının omentin düzeyleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



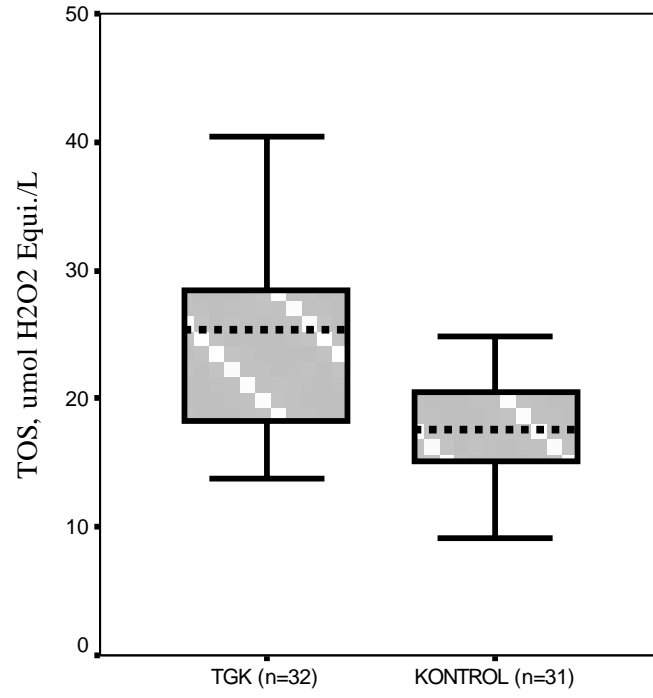
Şekil-5: Hasta ve kontrol gruplarının apelin düzeyleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



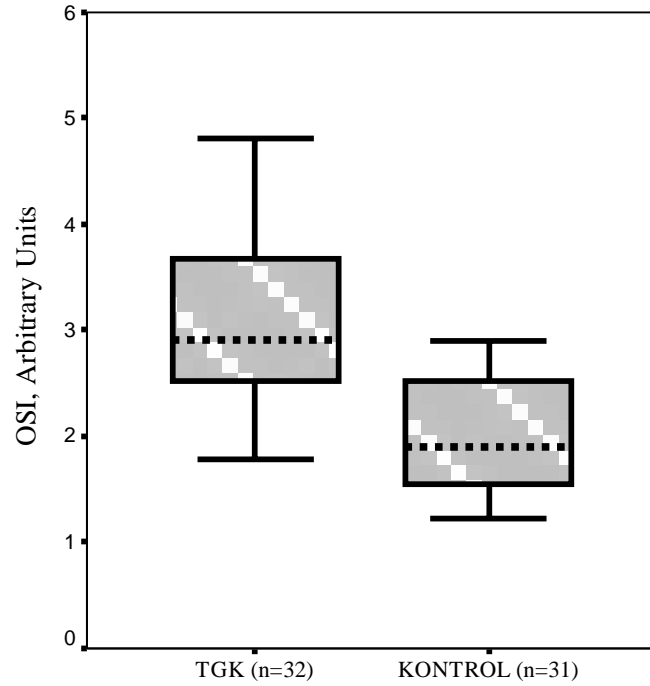
Şekil-6: Hasta ve kontrol gruplarının IL-6 düzeyleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



Şekil-7: Hasta ve kontrol gruplarının total antioksidan status düzeyleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



Şekil-8: Hasta ve kontrol gruplarının total oksidan status düzeyleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



Şekil-9: Hasta ve kontrol gruplarının Oksidatif Stres İndeksi düzeyleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

TGK etyopatolojisinin önemli bir bölümünü genetik, anatomik, endokrin ve koagülasyon sistemine ait patolojiler oluşturmaya rağmen olguların yaklaşık yarısında gebelik kayıplarının nedeni açıklanamamaktadır(120). Açıklanamayan TGK olgularında immünolojik nedenlerin yol açtığı anormal sitokin yanıtın, aşırı apoptotik sürecin ve oksidatif stresin rol oynayabileceği düşünülmektedir ve çalışmaya açık bir alan olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmamızla söz konusu alana katkıda bulunmayı planladık, ve çalışmamızda yer yer literatürden farklı sonuçlar bulduk.

Mevcut çalışmada açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan ve ilk trimesterde bulunan 32 gebe çalışma grubu ve ilk trimester sağlıklı gebelerden oluşan 31 gebe kontrol grubu olarak değerlendirildi. Çalışma ve kontrol grubu yaş ortalaması, eşlerinin yaş ortalaması ve BMI açısından değerlendirildi, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Her iki gruptaki gebelik haftaları ortalaması birbirine yakın olarak bulundu. Her iki grupta apoptoz markırları olan M30, M65, sitokinlerden IL-6, omentin ve apelin ve de oksidatif stresi değerlendirmek için TAS, TOS ve OSI değerlendirildi. Çalışmamızda apoptoz markırlarından M65 ve M30 çalışma grubunda kontrol grubuna göre daha düşük bulundu. Aradaki fark M65 açısından istatistiksel olarak anlamlı idi, ancak M30 açısından aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı. Proinflamatuvar sitokin olan IL-6 değerlendirmesinde TGK grubunda IL-6 seviyeleri kontrol grubuna oranla düşük bulundu ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi. Adipositokinler olan omentin ve apelin değerlendirildiğinde her ikisinin de TGK grubunda kontrol grubuna oranla yüksek olduğu görüldü. Ancak aradaki fark omentin açısından istatistiksel olarak anlamlı iken apelin açısından aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Oksidatif stres parametrelerinin değerlendirilmesinde ise total antioksidan durum TGK grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunurken, total oksidatif durum ve oksidatif stres indeksi TGK grubunda istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek bulundu.

Straszewski ve arkadaşları normal gebelik seyri esnasında trofoblast hücre apoptozunun regülasyonunu değerlendirmişler ve artmış trofoblast apoptozunu iugr,

preeklampsi ve abortus gibi gebelik komplikasyonları ile ilişkili bulmuşlar(121). John ve arkadaşlarının da HELLP'li hastalarda yaptığı çalışmada M30 ve M65 düzeylerini normal gebelerle karşılaştırıldığında anlamlı şekilde yüksek bulmuşlardır ve bu parametrelerin TGK, preeklampsi ve iugr gibi diğer gebelik komplikasyonları ile de ilişkili olabileceğini vurgulamışlardır(122). Bizim çalışmamızda mevcut yayınlardan farklı olarak apoptozis markırları olan m30 ve m65 düzeylerinin TGK grubunda kontrol grubuna göre düşük olduğunu tespit ettik. Aradaki fark M65 açısından istatistiksel olarak anlamlı iken, M30 açısından aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Bates ve arkadaşlarının 46 idiopatik tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan gebe ve 25 herhangi bir öyküsü olmayan kontrol grubu gebe ile yaptığı bir çalışmada anormal sitokin üretimini araştırmışlar. Başarılı bir gebelik için Th-2 (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL- 10, IL-13) tipi sitokin yanıtının baskınlığının gerektiğini , Th-1 (TNF α , IFN γ , IL-2, IL12, IL-18) tipi sitokin yanıtının ise gebelik esnasında komplikasyonlara yol açtığını tespit etmişler(123). Makhseed ve arkadaşlarının da açıklanamayan tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan gebe ve normal sağlıklı gebeleri karşılaştırdığı bir çalışmada özellikle IL-6 ve IL-10 gibi Th-2 tip sitokinlerin sağlıklı gebelerde açıklanamayan TGK'lı hastalarla karşılaştırdığında anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır(124). Ancak bizim çalışmamızda, literatürden farklı olarak, proinflamatuvar sitokin olan IL-6 değerlendirmesinde TGK grubunda IL-6 seviyeleri kontrol grubuna oranla daha düşük bulundu ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi.

Despine ve arkadaşlarının yaptığı ve adipositokinlerin gebelik üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada anormal adipositokin üretiminin gebelik komplikasyonları ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir(125). Biz de çalışmamızda, literatürle uyumlu olarak adipositokinlerden omentin ve apelin değerlendirilmesinde her ikisinin de TGK grubunda kontrol grubuna oranla yüksek olduğu bulduk. Ancak aradaki fark omentin açısından istatistiksel olarak anlamlı iken apelin açısından aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Oksidatif stres ve gebelik komplikasyonlarının ele alındığı Yiyenoğlu ve arkadaşlarının yaptığı TGK'lı ve sağlıklı gebeleri karşılaştıran bir çalışmada tekrarlayan gebelik kaybı olan hastalarda total oksidatif stress düzeyinin ve oksidatif stres indeksinin arttığı ve total antioksidan kapasitenin ise azaldığını göstermişlerdir(126). Agarwal ve arkadaşları da oksidatif stresin kadın üreme sağlığı üzerine etkilerinin araştırdıkları

çalışmalarında spontan abortus, tekrarlayan gebelik kaybı, preeklampsi, endometriozis, PCOS ve açıklanamayan infertilite gibi gebelik komplikasyonlarında oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir(127). Gao ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada da desidual hücrelerdeki endoplasmik retikulum kaynaklı oksidatif stresin erken gebelik kayıplarına yol açtığı gösterilmiştir (128). Çalışmamızda toplam oksidan status (TOS), toplam antioksidan status (TAS), oksidatif stres indeksi (OSİ) düzeylerini TGK öyküsü olan gebeler ve normal sağlıklı gebelerde karşılaştırmalı olarak değerlendirdik. TAS düzeyleri TGK grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulundu. TOS ve OSİ ise çalışma grubunda sağlıklı gebelere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış bulundu. Çalışmamızdaki oksidatif stres parametreleri sonuçları mevcut literatür ile uyumlu bulundu.

Sonuç olarak çalışmamızda TGK grubunda apoptoz markırları olan M30, M65, proinflamatuvar sitokin IL-6 ve total antioksidan durum kontrol grubuna oranla daha düşük saptanırken, adipositokinler apelin ve omentin ile total oksidan durum ve oksidatif stres indeksi TGK grubunda daha yüksek saptandı. Mevcut veriler, sebebi açıklanamayan düşüklerde bakılması gereken alanlara adipoz doku ve adipositokinlerin eklenebileceğini işaret etmektedir. Çalışmamızda adipoz dokudan da üretilebilen IL-6 düzeyinin TGK grubunda düşük olması, literatürle uyumlu olmamakla beraber adipositokin yüksekliği ile de çelişmektedir. Ancak yayınlarda IL-6 genellikle proinflamatuvar olarak işaret edilmekle beraber bazı kaynaklar IL-6'nın hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar etkilerinin olduğunu belirtmektedir(129,130). IL-6 düzey yüksekliğinin beraberinde antiinflamasyon ve proinflamasyon ile ilgili yapılacak ek değerlendirmeler hastalardaki mevcut duruma ve IL-6 yükseklik veya düşüklüğünü açıklamaya yardımcı olabilecektir. Çalışmamızda bu ek parametrelerin dahil edilmemiş olması çalışmamızın kısıtlayıcı faktörlerindedir. Yayımlanmış çalışmalar(121,122) TGK olgularında artmış apoptozu da işaret etmektedir. Ancak bizim çalışmamızda TGK grubunda apoptozu azalmış olarak saptadık. Bu durum bize apoptozda artmanın yanısıra azalmanın da, farklı bir takım hastalıklarda (131,132) olduğu gibi, TGK etyopatogenezinden de sorumlu olabileceğini düşündürmüştür. Literatürle uyumlu olarak bizim çalışma grubumuzda da oksidatif stres yüksek bulunmuştur. Mevcut veriler bize, sebebi açıklanamayan düşükler de apoptoz, adipositokinler ve oksidatif stresin mutlaka göz önünde bulundurulması gerekebileceğini düşündürmüştür. Söz konusu alanda yapılacak daha detaylı ek klinik ve moleküler çalışmaların etyopatogenezi aydınlatmada yardımcı olacağı kanaatindeyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Fertil Steril_2008;90:S60. 2008 by American Society for Reproductive Medicine
2. American College of Obstetricians and Gynecologists. Management of recurrent early pregnancy loss. ACOG Practice Bulletin 2001;24:1-8.
3. Bick RL. Recurrent miscarriage syndrome due to blood coagulation protein/platelet defects: prevalence, treatment and outcome results. DRW Metroplex Recurrent Miscarriage Syndrome Cooperative Group. Clin Appl Thromb Hemost 2000;6:115-25.
4. Laird SM, Tuckerman EM, Cork BA, Linjawi S, Blakemore AI, Li TC A review of immun cells and molecules in women with recuurent miscarriage. Hum Reprod Update. 2003;9(2):163-74
5. Kadanalı S. Tekrarlayan Gebelik Kayıpları. Nobel Tıp Kitabevi. 2012; 167-80
6. Toder V, Carp H, Fein A and Torchinsky A. The role of pro- and antiapoptotic molecular interaction in embryonic maldevelopment. Am J Reprod Immunol 2002; 48(4): 235-44.
7. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. Reprod Biol Endocrinol. 2012;10:49. doi: 10.1186/1477-7827-10-49.
8. Smith SC, Baker PN, Symonds MD. Placental apoptosis in normal human pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1997;177(1): 57-65.
9. Betina T, Udo J, Nina R, Christoph S, Wolfgang W, Christian J. Reccurent miscarirriage: current concepts in diagnosis and treatment. J Reprod Immunol 2010;85:25-32.
10. Alberman E. The epidemiology of repeated abortion. In: Beard RW, Sharp F (eds). Early Pregnancy loss: Mechanisms and treatment . London, UK: RCOG Press; 1988. 9-17.

11. Carp H, Salomon O, Seidman D, Dardik R, Rosenberg N, Inbal Aida. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2002; 17: 1633
12. Carp HJA. Recurrent Miscarriage: genetic factors and assessment of the embryo. *IMAJ* 2008; 10:229-3
13. Regan L, Braude PR, Trembath PL: Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *BMJ* 1989;299:541
14. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod* 2002;17: 446
15. Ogasawara M, Aoki K, Okada S, Suzumori K: Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertility and sterility* 2000, 73(2):300
16. Ward KJ. Genetic factors in recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2000;18:425-31
17. Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum Genet* 2003;112:195-8.
18. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2001;2:280-5.
19. Wold ASD, Pham N, Arici A. Anatomic Factors in Recurrent Pregnancy Loss. *Semin Reprod Med* 2006; 24(1): 25-32
20. Porcu, G., et al., Hysteroscopic metroplasty for septate uterus and repetitive abortions: reproductive outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2000. 88 (1): p. 81-4.
21. Makino, T., et al., Survey of 1120 Japanese women with a history of recurrent spontaneous abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1992. 44 (2): p. 123- 30.
22. Propst AM, Hill JA 3rd. Anatomic factors associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2000;18:341-5.

23. Leible S, Munoz H, Walton R, Sabaj V, Cumsille F, Sepulveda W. Uterine artery blood flow velocity waveforms in pregnant women with mullerian duct anomaly: a biologic model for uteroplacental insufficiency. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:1048-53.
24. Saravelos SH, Cocksedge KA, Li TC. The pattern of pregnancy loss in women with congenital uterine anomalies and recurrent miscarriage. *Reprod Biomed Online* 2010;20:416-7
25. Homer HA, Li TC, Cooke ID. The septate uterus: a review of management and reproductive outcome. *Fertil Steril* 2000;73:1-5.
26. Grimbizis GF, Camus M, Tarlatzis BC, Bontis JN, Devroey P. Clinical implications of uterin malformations and hysteroscopic treatment results. *Hum Reprod Update* 2001;7:161-8.
27. Kaufman RH, Adam E, Binder GL, Gerthoffer E. Upper genital tract changes and pregnancy outcome in offspring exposed in utero to diethylstilbesterol. *Am J Obstet Gynecol* 1980;137:299-308
28. Goldberg JM, Falcone T. Effect of diethylstilbestrol on reproductive function. *Fertil Steril* 1999;72:1-7.
29. MRC/RCOG Working Party on Cervical Cerlage. Final report of the Medical Research Council/Royal College of Obstetricians and Gynaecologists multicentre randomised trial of cervical cerclage. *Br J Obstet Gynaecol* 1993; 100: 516-23.
30. Vollenhoven BJ, Lawrence AS, Healy DL. Uterine fibroids: a clinical review. *Br J Obstet Gynaecol* 1990;97:825-31.
31. Jun SH, Ginsburg ES, Racowsky C, Wisw LA, Hornstein ND. Uterine leiomyomas and their effect on in vitro fertilization outcome: a retrospective study. *J Asist Reprod Genet* 2001;18:139-47.
32. Al-Inany H. Intrauterin adhesions. An update. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;80:986-9.
- 33 . Salim R, Regan L, Woelfer B, Backos M, Jurkovic D. A comparative study of the morphology of congenital uterin anomalies in women with and without a history of recurrent first trimester miscarriage. *Hum Reprod* 2003; 18:162-71.

34. Greene, M.F., et al., First-trimester hemoglobin A1 and risk for major malformation and spontaneous abortion in diabetic pregnancy. *Teratology*, 1989. 39(3): 225-31.
35. Kitzmiller, J.L., N. Watt, and S.G. Driscoll, Decidual arteriopathy in hypertension and diabetes in pregnancy: immunofluorescent studies. *Am J Obstet Gynecol*, 1981. 141(7):773-9.
36. Lea, R.G. , et. al., Disturbed development of the preimplantation embryo in the insulin-dependent diabetic. *BB/Erat. Diabetes*, 1996. 45(11): 1463-70.
37. Keim A.L., M.M. Chi, and K.H. Moley, hyperglycemia-induced apoptotic cell death in the mouse blastocyst is dependent on expression of p53. *Mol Reprod Dev*, 2001. 60(2): 214-24
38. Arredondo, F. and L.S. Noble, Endocrinology of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med*, 2006. 24(1): 33-9
39. Kriplani, A., et. al., Maternal and perinatal outcome in thyrotoxicosis complicating pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1994. 54(3): 159-63.
40. Wakim, A.N., et. al., Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. *Fertil Steril*, 1993. 59(6): 198-200
41. Bohnet, H.G., K. Fiedler, and F.A. Leidenberger, subclinical hypothyroidism and infertility. *Lancet*, 1981. 2(8258): 108-12
42. Roberts, C.P., and A.A. Murphy, Endocrinopathies associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med*, 2000. 18(4): 357-62
43. Abalovich, M., et al, Overt and subclinical hypothyroidism complicating pregnancy. *Thyroid*, 2002. 12(1): 63-8
44. Poppe, K., et al., Assisted reproduction and thyroid autoimmunity: an unfortunate combination? *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. 88(9): 4149-52
45. Wilson, R., et al., Thyroid antibody titer and avidity in patients with recurrent miscarriage. *Fertil Steril*, 1999. 71(3): 558-61
46. Regan, L., Recurrent early pregnancy failure. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 1992. 4(2): 220-8

47. Müller, A.F., et al., Thyroid autoimmunity and abortion: a prospective study in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1999. 71(1): 30-4
48. Insler, V., Corpus luteum defects. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 1992. 4(2): 203-11
49. Tuckerman, E., et al., Markers of endometrial function in women with unexplained recurrent pregnancy loss: a comparison between morphologically normal and retarded endometrium. *Hum Reprod*, 2004. 19(1): 196-205
50. Jacobs, M.H., et al., Endometrial cytosolic and nuclear progesterone receptors in the luteal phase defect. *J Clin Endocrinol Metab*, 1987. 64(3): 472-5
51. Ginsburg KA. Luteal phase defect: Etiology, diagnosis, and management. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1992;21:85-104.
52. Baird, D.T., et al., Relationship between the secretion of the corpus luteum and the length of the follicular phase of the ovarian cycle. *J Reprod Fertil*. 1975. 45(3): p. 611-9
53. Simpson JL, Mills JL, Lee J, Holmes JB, Kim H, Metzger B, Knoop R, Jovanovic-Peterson L, Aarons J and Conley M. Infectious processes: an infrequent cause of first trimester spontaneous abortions. *Hum Reprod*. 1996;11, 668-672
54. Simpson JL, Gray RH, Queenan JT, Barbato M, Perez A, Mena P, Kambic RT, Pardo F, Stevenson W, Li C, Jennigs V. Further evidence that infection is an infrequent cause of first trimester spontaneous abortion. *Hum Reprod*. 1996; 11(9): 2058-60
55. Armstrong BG, McDonald AD, Sloan M. Cigarette, alcohol, and coffee consumption and spontaneous abortion. *Am J Public Health* 1992;49:82
56. Rasch, V., Cigarette, alcohol, and caffeine consumption: risk factors for spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2003. 82 (2): 182-8
57. Greer JP , Foerster J , Lukens JN , Rods GM , Paraski F (eds). *Wintrobe's Clinical Hematology*. 11th edition. In: Lippincott Williams; 2004. 677-715.
58. Kasthuri RS, Glover SL, Boles J, Mackman N. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor as key regulators of global hemostasis: measurement of their levels in coagulation assays. *Semin Thromb Hemost* 2010;36:764-71

59. Kotschy M, Kotschy D, Witkiewicz W. The role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in blood coagulation and in thrombotic complications. *Kardiol Pol* 2010;68:1158-62.
60. Ozsoy S. Tekrarlayan gebelik kaybı ve trombofili ilişkisini tromboelastogram ile değerlendirilmesi. Uludağ Ü. Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D, Uzmanlık Tezi, Bursa 2011; 15-30
61. Muszbek L, Berczky Z, Kovács B, Komáromi I. Antithrombin deficiency and its laboratory diagnosis. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:67-78.
62. Olson ST, Richard B, Izaguirre G, Schedin-Weiss S, Gettins PG. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases: A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. *Biochimie* 2010;92:1587-96.
63. Berczky Z, Kovács KB, Muszbek L. Protein C and protein S deficiencies: similarities and differences between two brothers playing in the same game. *Clin Chem Lab Med* 2010;48: 53-66.
64. Castoldi E, Rosing J. APC resistance: biological basis and acquired influences. *J Thromb Haemost* 2010;8:445-53
65. O'Riordan MN, Higgins JR. Haemostasis in normal and abnormal pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003;17: 385-96.
66. Kruithof EK, Tran-Thang C, Gudinchet A, et al., Fibrinolysis in normal pregnancy: a study of plasminogen activator and inhibitors. *Blood* 1987; 69(2):460-6
67. Stirling AM, Tait RC, Fildes S, et al., Development of resistance to activated protein C during pregnancy. *Thromb Haemost* 1984; 52(2): 176-82
68. Robertson L, Wu O, Langhorne P, et al. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br Jhaematol* 2006; 132: 171–96.
69. Preston FE, Rosendall FR, Walker ID, Brijet E, Berntrop E, Conard J, et al., Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet* 1996;348:913-6

70. Khare M, Nelson-Piercy C. Acquired thrombophilias and pregnancy. *Best Pract REs Clin Obstet Gynaecol* 2003; 17:491-507
71. Gharavi AE, Pierangeli SS, Levy RA, Harris EN. Mechanism of pregnancy loss in antiphospholipid syndrome. *Clin Obstet Gynecol* 2001; 44:11-9
72. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, et al., Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340:9-13
73. D2Uva M, Micco P, Strina I, et al., 2008. Etiology of hypercoagulable state in women with recurrent fetal loss without other causes of miscarriage from southern Italy: new clinical target for antithrombotic therapy. *Biologics: Targets & Therapy* 2008;2(4). 35-42
74. Laird SM, Tuckerman EM, Cork BA, Linjawi S, Blackmore AI, Li TC. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update*. 2003; 9(2): 163-74
75. Szekeres-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol* 2002; 21: 471- 95.
76. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, and Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14: 353- 6.
77. Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, Omu A, Al-Shamali E, and Ashkanani L. Th1 and Th2 cytokine profiles in recurrent aborters with successful pregnancy and with subsequent abortions. *Hum Reprod* 2001; 16: 2219- 26.
78. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 1997; 18: 478- 82.
79. Kwak-Kim JY, Chung-Bang HS, Ng SC, Ntrivalas EI, Mangubat CP, Beaman KD, et al. Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failures after IVF. *Hum Reprod* 2003; 18: 767- 73.

80. Szekeres-Bartho J, Weill BJ, Mike G, Houssin D, and Chaouat G. Progesterone receptors in lymphocytes of liver-transplanted and transfused patients. *Immunol Lett* 1989; 22: 259- 61
81. Szekeres-Bartho J, Varga P, and Pejtsik B. ELISA test for the detection of an immunological blocking factor in human pregnancy serum. *J Reprod Immunol* 1989; 16:19-29.
82. Druckmann R and Druckmann MA. Progesterone and the immunology of pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97: 389- 96.
83. Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, et al. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol* 1995; 155: 128- 33.
84. Choi BC, Polgar K, Xiao L, and Hill JA. Progesterone inhibits in-vitro embryotoxic Th1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 1: 46- 59.
85. Bates M.D, Quenby S, Takakuwa K, Johnson P.M, and Vince G.S. Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss. *Human Reprod.*,2002; 17,2439-44
86. Piccinni M, Scaletti C, Vultaggio A, Maggi E. and Romagnani S. Defective production of LIF, M-CSF and Th2-type cytokines by T cells at fetomaternal interface is associated with pregnancy loss. *J.Reprod. Immunol.*, 2001; 52, 35-43
87. Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M and Farhat R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum. Reprod.*, 2001; 15, 713-718
88. Yamada H, Kata H.E, Kobashi G,Ebina Y, Shimada S, Morikawa M, Sakuragi N, Fujimoto S. High NK cell activity in early pregnancy correlates with subsequent abortion with normal chromosomes in women with recurrent abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2001; 46, 132-36

89. Valsamakis G, McTernan PG, Chetty R, et al. Modest weight loss and reduction in waist circumference after medical treatment are associated with favorable changes in serum adipocytokines. *Metabolism* 2004;53:430-4.
90. Polson DA, Thompson MP. Macronutrient composition of the diet differentially affects leptin and adiponutrin mRNA expression in response to meal feeding. *J Nutr Biochem* 2004;15:242-6.
91. Tsuruga H, Kumagai H, Kojima T, Kitamura T. Identification of novel membrane and secreted proteins upregulated during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:293-7
92. Katugampola S, Davenport A. Emerging roles for orphan G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Trends in Pharmacological Sciences* 2003; 24(1): 30-5.
93. Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, Lenkei Z, El Messari S, Gallatz K, Corvol P, Palkovits M, Llorens-Cortes C. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *Journal of Neurochemistry* 2001; 77(4): 1085-96.
94. Tang SY, Xie H, Yuan LQ, Luo XH, Huang J, Cui RR, Zhou HD, Wu XP, Liao EY. Apelin stimulates proliferation and suppresses apoptosis of mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1 via JNK and PI3- K/Akt signaling pathways. *Peptides* 2007; 28(3): 708-18.
95. Kourtis A, Gkiomisi A, Mouzaki M, Makedou K, Anastasilakis AD, Toulis KA, Gerou S, Gavana E, Agorastos T. Apelin levels in normal pregnancy. *Clinical Endocrinology* 2011; 75(3): 367-71.
96. Yang RZ, Lee MJ, Hu H, Pray J, Wu HB, Hansen BC, Shuldiner AR, Fried SK, McLenithan JC, Gong DW. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol-Endoc M.* 2006;290(6): 1253-61.
97. Schaffler A, Neumeier A, Herfarth H, Furst A, Scholmerich J, Buchler C. Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue. *Bba-Gene Struct Expr.* 2005;1732(1-3):96-102.
98. Briana DD, Boutsikou M, Baka S, Gourgiotis D, Marmarinos A, Liosi S, Hassiakos D, Malamitsi-Puchner A. Omentin-1 and vaspin are present in the fetus and neonate, and

perinatal concentrations are similar in normal and growth-restricted pregnancies. *Metabolism*. 2011;60(4):486-90.

99. Gillian Barker, Ratana Lim, Harry M. Georgiou, Martha Lappas. Omentin-1 Is Decreased in Maternal Plasma, Placenta and Adipose Tissue of Women with Pre-Existing Obesity

100. Jelmer R. P. Prins, Nardhy Gomez-Lopez, Sarah A. Robertson. Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders. *Journal of Reprod Immun*: 2012; 95: 1-14

101. Jacob RA, Burr BJ. Oxidative damage and defence. *Am J Clin Nutr* 1996;63:985-90.

102. Myatt L, Cui XL. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 2004;122:369-82.

103. Little RE, Gladen BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reprod Toxicol* 1999;13:347-52.

104. Wang J, Mimuro S, Lahoud R, Trudinger B, Wang XL. Elevated levels of lipoprotein(a) in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:146-9.

105. Poranen AK, Ekblad U, Uotila P, et al. Lipid peroxidation and antioxidants in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Placenta* 1996;17:401-5.

106. Pentieva K, Ivanova L, Petrova S, Ovcharova D, Vatalova K, Angelova K. Changes in the level of lipid peroxidation in healthy pregnant women. *Akush Ginekol* 1995;34:19-21.

107. Gupta S, Agarwal A, Banerjee J, Alvarez JG. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: *Obstet Gynecol Surv*. 2007 May;62(5):335-47;

108. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI, *Apoptosis Histology For Pathologists*. 2.th ed. Philadelphia, 1997; chapter 1: 3-21.

109. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998; 254: 439–59

110. Bantel H, Ruck P, Gregor M, Schulze-Osthoff K. Detection of elevated caspase activation and early apoptosis in liver diseases. *Eur J Cell Biol* 2001; 80: 230–39.

111. Hefler LA, Tempfer CB, Bancher-Todesca D, Schatten C, Husslein P, Heinze G et al. Placental expression and serum levels of cytokeratin-18 are increased in women with preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 2001; 8: 169–73
112. Hamad RR, Bremme K, Kallner A, Sten-Linder M. Increased levels of an apoptotic product in the sera from women with pre-eclampsia. *Scand J Clin Lab Invest* 2009; 69: 204–8
113. Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biology*. 2001; 2(7): 3009.1-3009.10
114. Kramer G, Erdal H, Mertens HJ, et al. Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18. *Cancer Res* 2004;64:1751-2
115. Leers MP, Kolgen W, Bjorklund V, et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol* 1999;187:567–72
116. Schutte B, Henfling M, Kolgen W, et al. Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp Cell Res* 2004;297:11–26.
117. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 38(12):1103-11, (2005).
118. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*. 2004; 277–285
119. Aycicek A, Erel O, Kocyigit A. Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. *Eur J Pediatr*. 2005; 164:775–778
120. Şahin F, Ataç B, Yılmaz Z, Zeyneloğlu HB. Tekrarlayan gebelik kayıplarında trombofili mutasyon sıklıkları. *Erciyes Tıp Derg*. 2009;31:104-9
121. Straszewski Chavez SL, Abrahams VM, Mor G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocr Rev*. 2005; 877-97

122. John K, Wielgosz S, Schulze-Osthoff K, Bantel H, Hass R. Increased plasma levels of CK-18 as potential cell death biomarker in patients with HELLP syndrome. *Cell Death*. 2013
123. Bates MD, Quenby S, Takakuwa K, Johnson PM, Vince GS. Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss?. *Hum Reprod*. 2002 2439-44.
124. Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, Omu A, Al-Shamali E, Ashkanani L. Th1 and Th2 cytokine profiles in recurrent aborters with successful pregnancy and with subsequent abortions. *Hum Reprod*. 2001;2219-26.
125. Briana DD, Malamitsi-Puchner A. Intrauterine growth restriction and adult disease: The role of adipocytokines. *Eur J Endocrinol*. 2009;160(3):337-47
126. Yiyenoğlu OB, Uğur MG, Ozcan HC, Can G, Oztürk E, Balat O, Erel O. Assessment of oxidative stress markers in recurrent pregnancy loss: a prospective study. *Arch Gynecol Obstet*. 2013
127. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012;49.
128. Gao HJ, Zhu YM, He WH, Liu AX, Dong MY, Jin M, Sheng JZ, Huang HF. Endoplasmic reticulum stress induced by oxidative stress in decidual cells: a possible mechanism of early pregnancy loss. *Mol Biol Rep*. 2012;39(9):9179-86
129. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118: 503-508.
130. Dinarello CA. Anti-cytokine therapies in response to systemic infection. *J Investig Dermatol Symp Proc* 200; 6: 244-250.
131. Hou W, Jin YH, Kang HS, Kim BS. IL-6 and IL-17 synergistically promote viral persistence by inhibiting cellular apoptosis and cytotoxic T cell function. *J Virol*. 2014;724-14
132. Panzan MQ, Mattar R, Maganhin CC, Simões Rdos S, Rossi AG, Motta EL, Baracat EC, Soares JM Jr. Evaluation of FAS and caspase-3 in the endometrial tissue of patients with idiopathic infertility and recurrent pregnancy loss. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013; 167(1):47-52