

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MULTİPLE ABORTUSLU KADINLARDA
TROMBORİSK PANELİ İLE CVD PANELİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Uğur ŞAHİN

Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetmeliğinin Tıbbi Biyoloji ve Genetik Programı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Fatma SILAN

DÜZCE
2008

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MULTİPLE ABORTUSLU KADINLARDA
TROMBORİSK PANELİ İLE CVD PANELİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Uğur ŞAHİN

Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetmeliğinin Tıbbi Biyoloji ve Genetik Programı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Fatma SILAN

DÜZCE
2008

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne,

Bu alışma j¼rimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Programında
Y¼ksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Fatma SILAN
(D¼zce niversitesi)

ye

Yrd. Doç. Dr. Selma D¼ZENLİ GEPEĞREMEN
(Abant İzzet Baysal niversitesi)

ye

Yrd. Doç. Dr. Coşkun SILAN
(D¼zce niversitesi)

ONAY:

Bu tez, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Y¼netim Kurulu'na belirlenen
yukarıdaki j¼ri yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Y¼netim
Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Özlem YAVUZ
Enstit¼ M¼d¼r¼

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanmasında ve laboratuvar çalışmalarının yapılmasında benden sonsuz yardımlarını esirgemeyen tez danışmanı hocam Doç. Dr. Fatma SILAN'a, tez çalışmamın laboratuvar aşamasında desteğini aldığım Uzm. Bio. Cansu ZAFER'e, hiçbir zaman benden desteklerini esirgemeyen, bu günlere ulaşmamdaki en büyük yardımcım olan annem Gülşen ŞAHİN ve babam Mehmet ŞAHİN'e, tezimin istatistiklerini yapan ve her zaman bilgilerine başvurduğum ablam Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU ve eniştem Mustafa CALAPOĞLU'na, tezde yer alan hastalarla bağlantı kurmamda ve klinik bilgilerini edinmemde sonsuz yardımları olan Dr. Emel BİLİCİ'ye ve Bio. Uğur ÖZ'e ve aslında her zaman tüm uğraşılarımın tek sebebi olan nişanlım Arş. Görv. Bio. Gönül Zişan ÖNCEL 'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

ÖZET

Trombofili, tekrarlayan gebelik kaybı etiyolojisinde önemli bir yer tutmaktadır. Bu güne kadar yapılan çalışmalar, Factor V Leiden, Protrombin ve Metilen Tetra Hidrafolat Redüktaz ın tekrarlayan gebelik kayıplarında oynadığı rolü ortaya koymuştur.

Bu çalışmamız, tekrarlayan gebelik kaybı etiyolojisinde, bu üç mutasyonun dışında trombofiliye sebep olan farklı mutasyon veya polimorfizmlerin de etkisi olabilir mi sorusundan hareketle planlandı. Bu çalışma ayrıca tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda farklı trombofili etkenlerinin görülme sıklığını ortaya koyması açısından da önemliydi.

Çalışmamızda hasta grubu olarak 3 veya daha fazla gebelik kaybı olan, sitogenetik incelemelerinde herhangi bir sitogenetik değişikliğe rastlanmamış hastalar seçildi. Kontrol grubu olarak ise en az 3 tane sağlıklı doğumu olan ve hiç düşük hikayesi olmamış kadınlar seçildi.

Hasta ve kontrol grubuna Vienne Lab'a ait CVD paneli, DNA izolasyonu sonrası Multiplex PCR ve daha sonra PCR ürününe Western blot tekniğine dayalı hibridizasyon yöntemi uygulandı. Böylelikle Faktör V G1691A (Leiden), Faktör V H1299R, Protrombin G20210A, Faktör XIII V34L, β -Fibrinojen -455G>A, Metilen Tetra Hidrofolat Redüktaz C677T, Metilen Tetra Hidrafolat Redüktaz A1298C, Apo B R3500Q mutasyonları ile PAI-1 (4G/5G), HPA-1 (a/b), ACE (I/D), Apo E (E2, E3, E4) genotipi açısından normal ve mutant alleller inceledi.

Eylül 2006-Haziran 2007 tarihleri arasında Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Kadın Doğum Polikliniğine baş vuran tekrarlayan gebelik kaybı hikayesi olan 52 hastada ve kontrol grubuna ait 52 kadında yapılan bu testte şu sonuçlar elde edildi.

İstatistiksel değerlendirme SPSS 12.0 paket programı ile yapıldı. İki örneklemedeki yaş değişkeni T-Testi ile değerlendirildi. Elde edilen değerler aritmetik ortalama (X) ve standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. Her iki grup arasında ilişki bulunup bulunmadığı Ki-kare bağımsızlık testiyle ortaya koyuldu. Beklenen frekansların 5'den küçük olduğu durumlarda Fisher Kesin Ki-Kare testi

uygulandı. $p<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Bu sonuçlara göre Faktör V G1691A (Leiden), Metilen Tetra Hidrofolat Redüktaz C677T, Metilen Tetra Hidrafolat Redüktaz A1298C, ACE (I/D) tekrarlayan düşüklerle ilişkili bulunmuştur.

Bu sonuçlar ışığında, tekrarlayan gebelik kayıplarının sebeplerinin anlaşılmasında ve tedaviye yönelik girişimlerin daha da başarılı olabilmesi açısından tromborisk paneli dediğimiz Faktör V Leiden, protrombin ve MTHFR nin yanı sıra diğer faktörlerinde incelenmesinin de anlamlı olacağı sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu çalışmanın ileride daha büyük hasta gruplarında uygulanmasının diğer parametreler için de bağlantının anlaşılması açısından manidar olacağı açıktır.

ABSTRACT

Thrombophilia plays an important role in multiple abortus ethiology. The studies showed that Factor V Leiden, Prothrombin and Methylen Tethra Hydrofolate Reductase are linked with abortus.

Our this study planned to show if any other thrombophilia mutation or polymorphism takes role in multiple abortus ethiology. This study is also to see the rate of these thrombophilia factors in multiple abortus.

We have taken the women whom have 3 or more abortus to this study and whose cytogenetics analysis is normal. The control group was chosen from women whom has 3 healthy children and has not abortus story.

We have used Vienna Lab. CVD Strip Assay to analys the mutations and polymorphisms. After DNA isolation and multiplex PCR we hybridised the product with strips by technic of western blot. By this way we analysed normal and mutant alleles for Factor V G1691A (Leiden), Factor V H1299R, Prothrombin G20210A, Factor XIII V34L, β -Fibrinogen -455G>A, Methylen Tethra Hydrofolate Reductase C677T, Methylen Tethra Hydrofolate Reductase A1298C, Apo B R3500Q mutations and PAI-1 (4G/5G), HPA-1 (a/b), ACE (I/D), Apo E (E2, E3, E4) genotyps.

We analysed 52 women as patient group, who apply to Düzce Universty Medical Faculty Hospital obstetric and gynocology polyclinic, have multiple abortus story and 52 women as control group between september 2006 and june 2007.

The statistics of the study is counted by SPSS 12.0 packet programme. The age variable of control and patient group is analysed by T-Test. The results observed by Chi-square test and we have found linkage to Factor V G1691A (Leiden), Methylen Tethra Hydrofolate Reductase C677T, Methylen Tethra Hydrofolate Reductase A1298C, ACE (I/D) between multiple abortus.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
TABLolar	xii
GİRİŞ	1
1. Tek Gen Mutasyonları	2
1.1. Nokta Mutasyonları	2
1.1.1. Sessiz Mutasyonlar	2
1.1.2. Yanlış Anlamlı Mutasyonlar	3
1.1.3. Anlamsız Mutasyonlar	3
1.1.4. RNA İşlenmesi Mutasyonları	3
1.2. Delesyonlar ve İnsersiyonlar	3
1.2.1. Çerçeve Kayması Mutasyonları	3
1.2.2. Büyük Delesyon ve İnsersiyonlar	4
1.2.3. Trinükleotid Tekrar Artışları	4
2. Mutasyonların Adlandırılması	4
2.1. Aminoasit Substitusyonları	4
2.2. Nükleotid Substitusyonları	5
2.3. Delesyon ve İnsersiyonlar	5
3. Genetik Hastalıklar	5
3.1.1. Tek Gen Hastalıkları	6
3.1.2. Kromozomal Hastalıklar	6
3.1.3. Çok Gen Hastalıkları	6
4. Tek Gen Kalıtım Kalıpları (Mendeliyen Kalıtım)	7
4.1. Otozomal Dominant Kalıtım	8
4.2. Otozomal Resesif Kalıtım	8

4.3. X'e Bağlı Resesif Kalıtım	8
4.4. X'e Bağlı Dominant Kalıtım	8
5. Gebelik Kayıplarında Genetik Yaklaşım	9
6. Gebelik Kayıplarına Neden Olan Genetik Etkenler	10
GENEL BİLGİLER	12
Mutasyonlar Hakkında Kısa Bilgi	12
1. Faktör V G1691A (Leiden)	12
2. Faktör V H1299R (R2)	13
3. Protrombin G20210A	13
4. Faktör XIII V34L	14
5. β -Fibrinojen -455 G-A	15
6. PAI 1 (Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1(4G-5G)	16
7. GPIIIa L33P (HPA-1) (=integrin)	16
8. MTHFR C677T	17
8.1. Folat	19
9. MTHFR A1298C	19
10. ACE I/D	20
11. APO B R3500 Q	22
12. APO E	23
GEREÇ VE YÖNTEM	25
1. Materyal	25
1.1. Çalışma Grubu	25
1.2. Gereçler	25
1.3. Solüsyonlar	26
2. Metod	27
2.1. DNA İzolasyonu	27
2.2. In Vitro Amplifikasyon (PCR)	28
2.3. Hibridizasyon	29
BULGULAR	30
TARTIŞMA	38
KAYNAKLAR	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

A:	Adenin
ABD:	Amerika Birleşik Devletleri
ACE:	Anjiotensin dönüştürücü enzim
AD:	Anabilim dalı
Apo B:	Apolipoprotein B
Apo E:	Apolipoprotein E
ARDS:	Akut solunum sıkıntısı sendromu
Arg:	Arginin aminoasidi
APC:	Aktive protein C
C:	Sitozin
cBS:	sistasyonin-B-sentaz
D:	Delesyon
DEN:	Denaturation solution
dk:	Dakika
DNA:	Deoksiribonukleik asit
FGA:	Fibrinojenin α alt ünitesi
FGB:	Fibrinojenin β alt ünitesi
FGG:	Fibrinojenin γ alt ünitesi
FSF:	Fibrin stabilize edici faktör
G:	Guanin
Gly:	glisin aminoasidi
GPIIIa:	Glikoprotein IIIa
H:	Histidin
HDL:	High density lipoprotein
His:	Histidin aminoasidi
hn RNA:	Heteronuklear ribonukleik asit
HYB:	Hybridization buffer
I:	İnseriyon
IDDM:	Insulin-dependent diabetes mellitus
ins:	İnseriyon

KC: Karaciğer
kDa: Kilodalton
K3EDTA: Potasyum-3-etilendiamin tetraasetikası
L: Lösin aminoasidi
LDL: Low density lipoprotein
M: Molar
mA: Molekül ağırlığı
MI: Miyokard infarktüsü
mL: Mililitre
mRNA: Messenger ribonukleik asit
MTHFR: Metilentetrahidrofolat redüktaz
NIDDM: Non insulin-dependent diabetes mellitus
p: Anlamlılık
PA: Plazminojen aktivatör
PAI: Plazminojen aktivatör inhibitör
PCR: Polimerase chain reaction
PGM: Protrombin gen mutasyonu
R: Arginin
RNA: Ribonukleik asit
rpm: Revolution per minute
SAM: S-adenozil metiyonin
SD: Standart sapma
sn: Saniye
ŞM: Şilomikron
Taq: Thermophilus aquaticus
THF: Tetrahidrofolat
T: Timin
V: Valin aminoasidi
VLDL: Very low density lipoprotein
X: Aritmetik ortalama
µL: Mikrolitre

TABLÖLAR

Tablo 1: Genetik hastalıkların görülme sıklıkları

Tablo 2: Erken gebeliklerde abortusun tekrarlama sıklığı

Tablo 3: Hasta ve kontrol grubunda yaş değişkenine ait istatistiksel değerlendirme

Tablo 4: FV G1691A (Leiden) mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 5: FV H1299R mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 6: Protrombin G20210A mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 7: FXIII Val34Leu mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 8: β -Fibrinojen -455G>A mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 9: PAI-1 4G/5G mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 10: HPA1 a/b mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 11: MTHFR C677T mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 12: MTHFR A1298C mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 13: ACE I/D mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 14: APO B genotipinin düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 15: APO E genotiplerinin düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tablo 16: Çeşitli toplumlarda ve bu çalışmadaki apolipoprotein E fenotipleri ve frekansları (%)

ŞEKİLLER ve RESİMLER

Şekil 1: İntrensek ve Extrensek Yollar

Resim 1: İzolasyonda kullanılan kimyasallar

Resim 2: DNA izolasyonu ve mutasyon analiz kitleri

Resim 3: Hibridizasyonda kullanılan Twincubator

Resim 4: Çalışılmış striplerin görüntüsü

GİRİŞ

Kalıtım materyali olan DNA'nın görevi, hücresel fonksiyonel RNA ve proteinlerin sentezi için gerekli olan bilgiyi taşımaktır. DNA, orijinal genetik bilgiyi koruma eğiliminde olan bir birim olmasına rağmen mutasyonlara da maruz kalabilmektedir. *Mutasyon* terimi genetik materyaldeki daimi değişiklikleri ifade etmektedir. Bu, nükleotid dizisindeki bir değişiklik veya genomik DNA'daki yeni bir yapılanma anlamına gelmektedir. Mutasyonla DNA'nın yapısı daimi olarak değişir ve bu değişiklik hücre bölünmesi ile anne hücreden yavru hücrelere aktarılır.

Mutasyonlar germ-line hücrelerde ve somatik hücrelerde gerçekleşebilirler. Sadece gametleri oluşturan germ-line hücrelerde gerçekleşen mutasyonlar bir jenerasyondan diğerine aktarılır ve kalıtsal bir hastalığın veya özelliğin temelini oluşturabilir. Germ-line mutasyonların yanı sıra somatik hücrelerde oluşan mutasyonlar da tıbben önemlidirler. Tek bir zigottan 10^{14} hücrenin oluşması tamamıyla somatik bölünmenin sonucudur ve mutasyonların çoğunluğu bu esnada gerçekleşebilir.

Mutasyonların hem yararlı hem de zararlı etkileri vardır. Mutasyonlar hayatın devamlılığı için, türlerin değişerek çevrelerine uyum sağlamalarına imkan veren varyasyonları oluştururlar. Diğer taraftan birçok kalıtsal insan hastalığı mutasyona uğramış genlerin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Deri kanseri ve akciğer kanseri gibi hastalıklar da DNA mutasyonlarına sebep oldukları bilinen çevresel faktörlerce oluşturulmaktadır.

Mutasyonlar üç gruba ayrılmaktadırlar:

1. *Kromozom mutasyonları*: Kromozom yapısındaki değişiklikleri içermektedir.
2. *Genom mutasyonları*: Kromozom sayısındaki değişiklikleri kapsamaktadır.
3. *Tek gen mutasyonları*: Tek bir gen içerisindeki DNA'nın yapısında meydana gelen küçük değişiklikleri ifade etmektedir.

Kromozom mutasyonları ve genom mutasyonları ışık mikroskobu ile görülebilecek kadar büyük değişikliklerdir.

1. Tek Gen Mutasyonları:

Tek gen mutasyonu, bir gen içerisindeki DNA sekansının daimi değişimi ile oluşmaktadır ve bu değişiklik bir veya birden fazla nükleotidin bu sekansa ilave edilmesi veya çıkarılması olayı ile gerçekleşmektedir. *Nokta mutasyonu (point mutation)*, DNA'da tek bir baz çiftinin değişmesi ile oluşan mutasyondur. Bunun yanı sıra mutasyonlar bir veya daha fazla baz çiftinin artması ve azalması yani *insersiyon* ve *delesyon* olayları ile de gerçekleşir. *Trinükleotid tekrar artışları* da yine genetik hastalıklara sebebiyet verebilen değişikliklerdir.

1.1. Nokta Mutasyonları:

Nokta mutasyonları aynı zamanda *baz substitüsyonu* olarak da adlandırılmaktadır. Yer değiştirme olayına katılan bazlar dikkate alındığında, bir pirimidin bazının diğer bir pirimidinle ($C \leftrightarrow T$) veya pürin bazının diğer bir pürinle ($A \leftrightarrow G$) yer değiştirmesi olayı *transisyon* olarak ifade edilmektedir. Bu tip mutasyonlar *transversiyon* olarak adlandırılan ve bir pürin bazı ile bir pirimidinin bazının yer değiştirmesini ifade eden mutasyonlardan daha yaygın görülmektedirler.

Bir yapısal genin kodlama bölgesinde oluşan herhangi bir mutasyon bu gen tarafından kodlanan polipeptid zincirindeki aminoasit sekansı üzerinde değişik etkiler meydana getirir. Nokta mutasyonları, genlerin fonksiyonlarını engelleme veya ürünün fonksiyonunu bozma mekanizmalarına göre tiplere ayrılmaktadır:

1.1.1. Sessiz Mutasyonlar (silent mutation):

Baz dizisindeki her nükleotid değişimi kodlanan protein üzerinde bir aminoasit değişimine neden olmaz. Bu tip mutasyonlarda değişikliğe uğrayan baz çifti yine aynı aminoaside karşılık gelen farklı bir kodonun oluşmasına neden olur ve sonuçta aminoasit sekansı değişmeden kalır. Sessiz mutasyonlar kodlama bölgelerindeki mutasyonların %23'üne karşılık gelmektedir.

1.1.2. Yanlış Anlamlı Mutasyonlar (missense mutation):

DNA dizisindeki tek bir nükleotid değişikliği bazların triplet yapısındaki kodu değiştirerek gen ürününde bir aminoasidin yerini başka bir tanesinin almasına neden olur. Bu tip mutasyonlar genin kodlanan bölümünde anlam değişikliğine yol açarak farklı bir aminoasidin polipeptid zincirinde yer almasına neden olurlar. Yanlış anlamlı mutasyonlar kodlama bölgelerindeki mutasyonların %73’ünü oluşturur.

1.1.3. Anlamsız Mutasyonlar (nonsense, chain termination mutation):

Normalde mRNA’nın translasyonu bir terminasyon kodonuna (UAG, UGA ve UAA) rastlandığında biter. Bir terminasyon kodonu oluşturan mutasyonlar translasyonun prematüre olarak tamamlanmasına, bir terminasyon kodonunu ortadan kaldıran mutasyonlar ise translasyonun bir sonraki terminasyon kodonuna kadar devam etmesine neden olurlar. Eğer bir mutasyon üç “stop” kodonundan herhangi birinin oluşmasına neden oluyorsa anlamsız mutasyon olarak ifade edilir. Genelde bu mutasyonların transkripsiyon üzerine etkisi yoktur fakat kesilmiş translasyon ürünü şekil ve fonksiyonel olarak anormal ve aynı zamanda da dayanıksız olurlar. Anlamsız mutasyonlar kodlama bölgelerindeki mutasyonların %4’ünü teşkil ederler.

1.1.4. RNA İşlenmesi Mutasyonları (RNA splicing mutation):

Transkripsiyon sonucunda sentezlenen işlenmemiş RNA’ya “heterojen nuklear RNA (hnRNA)” denilmektedir. RNA splicing mekanizması, hnRNA’dan intronların çıkarılarak ekzonların bir araya gelip bağlanmasıyla mRNA’nın oluşturulması şeklinde gerçekleşir. Bu olayda intron/ekzon (akseptör tarafı) ve ekzon/intron (donor tarafı) sınırında spesifik nükleotid dizileri görev alır. RNA işlenmesi mutasyonları sonucunda ya mevcut donör-akseptör bölgeler fonksiyonlarını kaybederler ve splicing gerçekleşmez ya da alternatif donör-akseptör taraflar ortaya çıkarlar ve bunlar RNA’nın işlenmesi olayı esnasında normal taraflarla yarışırlar.

1.2. Delesyonlar ve İnsersiyonlar:

1.2.1. ereve Kayması Mutasyonları (frameshift mutation):

İnsersiyonla DNA zincirine katılan veya delesyonla zincirden ayrılan bazların sayısı 3’ün katları

olmadığında kodlama dizisindeki mutasyon, translasyondaki okuma çerçevesini mutasyonun olduğu noktadan itibaren karboksil terminaline kadar değiştirir. Bu tip mutasyonlar *çerçeve kayması mutasyonları* olarak adlandırılır. Bu mutasyonlar peptit zincirinin aminoasit dizisini büyük ölçüde değiştirmekle birlikte zincirin erken aşamada sonlanmasına da neden olabilirler. Üç veya üçün katları şeklinde olan delesyon ve insersiyonlar ise yalnızca mutasyonun olduğu bölgede aminoasit kaybına veya ilavesine neden olarak peptit zincirinin bir kısmını etkilerler. Özellikle insersiyonlar önemli frameshift mutasyonlara neden olmaktadır.

1.2.2. Büyük Delesyon ve İnsersiyonlar: Bir genin tamamını veya ardışık olan bir grup geni etkileyen delesyon veya insersiyonlardır. Büyük delesyonlar bir genin kodlayan kısmının tamamını ortadan kaldırabilir ve iki genin birleşerek füzyon protein oluşturmaya neden olabilir.

1.2.3. Trinükleotid Tekrar Artışları: Trinükleotid tekrar dizilerindeki tekrar sayılarının artması yeni bir mutasyon mekanizmasıdır. Bu tür mutasyonların hastalığa neden olma mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte transkripsiyonu engellediği veya fonksiyonunu kaybetmiş ya da anormal fonksiyonlu hücreye toksik proteinlerin sentezlenmesine neden olduğu ifade edilmiştir. Bu tip mutasyonlara Fragile-X Sendromu, Kennedy Hastalığı ve Huntigton Hastalığı gibi kalıtsal hastalıkların oluşumunda rastlanılmaktadır.

2. Mutasyonların Adlandırılması:

2.1. Aminoasit Substitusyonları;

Eğer isimlendirme yapılan olgunun bir protein olduğuna işaret etmek istenirse 'p' ile başlanmalıdır.

Tek harflik kodlar kullanılmalıdır. Alanin:A, Sistin:C, Aspartik Asit:D, Glutamik Asit:E, Fenilalanin:F, Glisin:G, Histidin:H, İzolösin:I, Lisin:K, Metionin:M, Asparajin:N, Prolin:P, Glutamin:Q, Arginin:R, Serin:S, Treonin:T, Valin:V, Triptofan:W, Tirosin:Y

X stop kodon manasına gelmektedir.

Örneğin;

p.R117H veya Arg117His 117. sıradaki aminoasit olan histidinin arginine dönüştüğünü anlatır.

p.G542X veya Gly542Stop 542. sıradaki aminoasit olan glisinin bir stop kodonuna dönüştüğünü anlatır.

2.2. Nükleotid Substitusyonları;

Genomik DNA için 'g', C DNA için 'c' ile başlanmalıdır.

ATG dizisini ele alacak olursak burada A nükleotidi +1. kodonda yer alır. Başlangıçtaki ilk nükleotid +1. dir.

İntronlardaki değişimleri anlatırken sadece cDNA sekansı tam olarak biliniyorsa intron numarası IVSn den veya en yakın pozisyonundaki introna göre adlandırılır.

Örneğin;

g.1162G→A 1162. pozisyonundaki Guaninin Adenine değiştiğini anlatır.

g.621+1G→T veya IVS4+1G→T intron 4 ilk bazında Guaninin Timin e değiştiğini; egzon 4 ün 621. nükleotidde bittiğini anlatır.

2.3. Delesyon ve İnsersiyonlar:

Delesyonları belirtmek için 'del' ve insersiyonlar için de 'ins' kullanılır.

Örneğin;

p.F508del 508. pozisyonundaki fenilalaninin delesyonunu anlatır.

c.6232_6236del veya c.6232_6236delATAAG cDNA nın 6232. nükleotidinden itibaren 5 nükleotidin delesyona uğradığını anlatır. İstenirse bu nükleotidlerin isimleride verilebilir.

g.409_410insC Genomik DNA da 409 ve 410. bazlar arasına Sitozin girdiğini anlatır.

3. Genetik Hastalıklar

Bir çok hastalığın oluşumu, hasta kişinin bireysel genetik yapısı ile çevresel faktörlerin etkilerinin bir sonucudur. Bir hastalık, başlıca veya özellikle hücre ve

dokuların genetik programındaki hatalar nedeni ile oluşuyorsa, *genetik hastalık* olarak ifade edilmektedir. Genetik hastalıklar, mutasyonların ve çevresel faktörlerin genetik materyal üzerindeki etkilerine bağlı olarak tek gen hastalıkları, kromozomal hastalıklar ve multifaktöriyel hastalıklar olmak üzere gruplandırılmaktadır.

3.1.1. Tek Gen (monogenik) Hastalıkları: Tek gen hastalıkları bir tek genin mutasyona uğraması sonucu ortaya çıkarlar ve genellikle Mendel kanunlarına uygun olarak kalıtılmaları nedeniyle Mendeliyen hastalıklar olarak ta adlandırılırlar. McKusick kataloğuna göre Mendeliyen kalıtılan hastalık ve fenotiplerin sayısı altıbine, dizisi bilinen genlerin sayısı onikibine ulaşmıştır (OMİM). Bunlar, ilgili genlerdeki genetik bilgi kadar değişkendirler ve hemen tüm yaş gruplarında ve organ sistemlerinde görülebilirler.

Tek gen hastalıkları homolog kromozomlar üzerinde yer alan allellerden birisinde veya her ikisinde birden meydana gelen mutasyonların sonucunda ortaya çıkarlar ve her 1000 canlı doğumdan 10'unda görülen tek gen hastalıkları aynı zamanda çocukluk dönemi ölümlerinin %5-10 kadarına da neden olmaktadır

3.1.2. Kromozomal Hastalıklar: Kromozomlardaki kırılma, yer değiştirme, parça değişimi gibi yapısal değişiklikler ve sayısal değişiklikler ile oluşan hastalık grubudur. Bu tip hastalıklarda tek bir genden ziyade birden fazla gen etkilenmekte ve sonuçta multisistem anomalileri ile giden sendromlar ortaya çıkmaktadır. Canlı doğan çocukların yaklaşık %0.7'sinde ve ilk üç ay içinde gerçekleşen düşüklerin yaklaşık %50'sinde kromozomal bozukluklar görülmektedir.

3.1.3. Çok Gen (poligenik multifaktöriyel) Hastalıkları: Hastalıkların önemli bir grubu, çevresel faktörlerle etkileşen genetik yatkınlık sonucu ortaya çıkmaktadır. Yüksek tansiyon, hiperlipidemi, diabetes mellitus, gut, psikiyatrik hastalıklar, kanser ve nöral tüp defektleri gibi nispeten yaygın birçok hastalık bu kapsamdadır. Multifaktöriyel hastalıklar aile içerisinde tekrarlama eğilimi göstermelerine karşın bilinen tek gen kalıtım kalıplarına uymamaktadırlar.

Genetik Hastalığın Tipi	Görülme Sıklığı (1/1000)
1. Tek gen hastalıkları (Toplam)	4.5-15.0
Otozomal dominant	2-9.5
Otozomal resesif	2-3.5
X'e bağlı	0.5-2
2. Kromozomal hastalıklar	5-7
3. Multifaktöriyel hastalıklar	7-10
Toplam	16-32

Tablo 1: Genetik Hastalıkların Görülme Sıklıkları

4. Tek Gen Kalıtım Kalıpları (Mendeliyen Kalıtım)

Mendel ilkeleri, iki ya da daha fazla özelliğin oluşumunu sağlayan iki yada daha çok gen çiftinin ayrı ayrı kromozomlarda yerleşmiş olmaları fikrini öngörmektedir. Mendel'in ayrışım ve bağımsız düzenlenme ilkelerine göre davranış gösteren özelliklere “*Mendeliyen özellik*”, ve bunların kalıtımına da “*Mendeliyen kalıtım*” denilmektedir. Tek bir mutant gene bağlı olarak ortaya çıkan hastalıklar, genellikle Mendel kurallarına uyar şekilde davranırlar ve belirli kalıtım kalıpları gösterirler.

Bir birey birbirinin tıpkısı bir çift allele sahip ise *homozigot*, birbirinden farklı yani bir tanesi normal diğeri mutant olan iki allele sahip ise *heterozigot*, iki farklı mutant allele sahip ise *compound heterozigot* ve eğer birey erkek ise yalnızca bir adet X kromozomu taşıması nedeni ile X kromozomu genleri bakımından *hemizigot* olarak nitelendirilir.

Bireylerin fenotipik yapıları üzerinde etkili olan genlerden hem heterozigot hem de homozigot durumda aynı fenotipi veren genler *dominant*, sadece homozigot olarak bulunduğu durumlarda fenotipte kendisini gösterebilen genler ise *resesif* olarak ifade edilmektedir.

4.1. Otozomal Dominant Kalıtım: Kişinin hasta anne ya da babasından tek kopya hastalık genini alması hastalığın ortaya çıkması için yeterlidir. Hastalık her kuşakta görülür. Hasta olanların çocuklarında hastalık %50 oranında ortaya çıkar. Kız ve erkekler eşit olarak etkilenirler. Bazı bireyler geni taşıdıkları halde hastalığı ortaya çıkartmazlar fakat sonraki kuşaklara kalıtırlar. Bu duruma *penetrans eksikliği* denir. Hasta bireylerde klinik açıdan farklılıklar görülebilir (expressivitede değişiklik).

4.2.Otozomal Resesif Kalıtım: Kişide hastalığın ortaya çıkması için hem anne hem de babasından hastalıklı geni almış olması gerekir. Tek kopya halinde hastalık genini taşıyan bireyler *taşıyıcı* olarak nitelendirilirler ve hastalığı göstermezler. Akraba evlilikleri taşıyıcı bireylerin karşı karşıya gelmesi ihtimalini arttırdığı için hastalığın ortaya çıkması ihtimalini de arttırır. Hastalık kızlarda ve erkeklerde eşit olarak görülür. Taşıyıcı bir anne ve taşıyıcı bir babanın çocuklarında hastalık görülmesi olasılığı %25'tir. Ebeveynler arasında akrabalığın oluşu ve tek bir kuşakta birden fazla hasta bireyin görülmesi otozomal resesif kalıtımı destekleyen verilerdir.

4.3. X'e Bağlı Resesif Kalıtım: Hastalığın ortaya çıkması açısından kızlar ve erkekler arasında fark vardır. Kızlar iki adet X kromozomu taşıdığı için tek bir X kromozomunda hastalık genini taşımaları hasta olmaları için yetmez ancak taşıyıcı olurlar. Erkekler ise bir X ve bir Y kromozomu taşımaktadırlar. X kromozomunda hastalık geni bulunduğu zaman bunu dengeleyecek ikinci bir X kromozomu olmadığı için hastalık ortaya çıkar. Böylelikle bu kalıtım kalıbında genellikle erkekler hasta kızlar ise normal fakat taşıyıcıdır. Aile içerisinde tipik "dayı-yeğen" kalıtımı görülür. Taşıyıcı bir annenin erkek çocuklarının %50'si hastadır. Klasik olarak hastalık babadan erkek çocuğa geçmez. Kızların ise hepsi normal fakat *zorunlu taşıyıcı*dır. Bu kızların erkek çocuklarında da yine %50 oranında hastalık ortaya çıkar.

4.4. X'e Bağlı Dominant Kalıtım: Bu kalıtım kalıbında kızlar ve erkekler eşit olarak etkilenir. Tek bir X kromozomunda hastalık geninin bulunması hastalığın ortaya çıkması için yeterli olduğundan X'e bağlı resesif kalıttan farklı olarak

kızlar da hastalığı göstermeye başlar. Ailedeki kalıtım tamamıyla otozomal dominant kalıtıma benzer. Tek fark, babadan oğula kalıtımın olmayışdır. Hasta erkekler niteliği oğullarına geçiremezler.

5. Gebelik Kayıplarında Genetik Yaklaşım

Gebelik kayıplarının tıbbi önemini anlamak için şu bilgileri incelememiz yerinde olacaktır. Dünyada her 10 gebelikten birinde gebelik kaybı görülür. Tüm ailelerin %20'si en az bir kez spontan abortus ile tanışır. Toplumda rekürren gebelik kaybı sıklığı %5'dir

Tekrarlayan gebelik kayıpları getirdiği psişik, fiziksel ve ekonomik zorlukların yanı sıra etiyoloji arama ve tedavideki zorluklarla da problem oluşturan bir durumdur. Zigot kaybının insidansı bilinmemekle beraber serum human koryonik gonadotropin düzeylerinin belirlenmesi ile yapılan çalışmalarda fertilize ovumların %50-70'inin, klinik olarak tanımlanmış gebeliklerin %10'unun abortusla sonuçlandığı bildirilmiştir.

Gebelik kayıplarının önemli bir kısmı (%60) genetik kökenlidir ve sonraki gebeliklerin prognozunu etkiler. Genetik hastalıklar açısından bakıldığında rekürren diyebilmek için kayıpların arka arkaya olması gereği yoktur. Bunun nedeni genetik hastalıklarda rekürrens riskinin her gebelik için söz konusu olması ve %0-100 arası değişmesidir.

	DÜŞÜK SAYISI	RİSK %
CANLI DOĞUM VAR	0	12
	1	24
	2	26
	3	32
CANLI DOĞUM YOK	2 ve ÜSTÜ	40-45

Tablo 2: Erken gebeliklerde abortusun tekrarlama sıklığı

6. Gebelik Kayıplarına Neden Olan Genetik Etkenler

Gebelik kayıplarına neden olan genetik etkenleri başlıca şu şekilde gruplandırabiliriz.

1. Sitogenetik Düzensizlikler

- öploid (triploidi tetraploidi)
- anöploid
- yapısal düzensizlikler
- plasental mozaizm

2. Moleküler Düzensizlikler

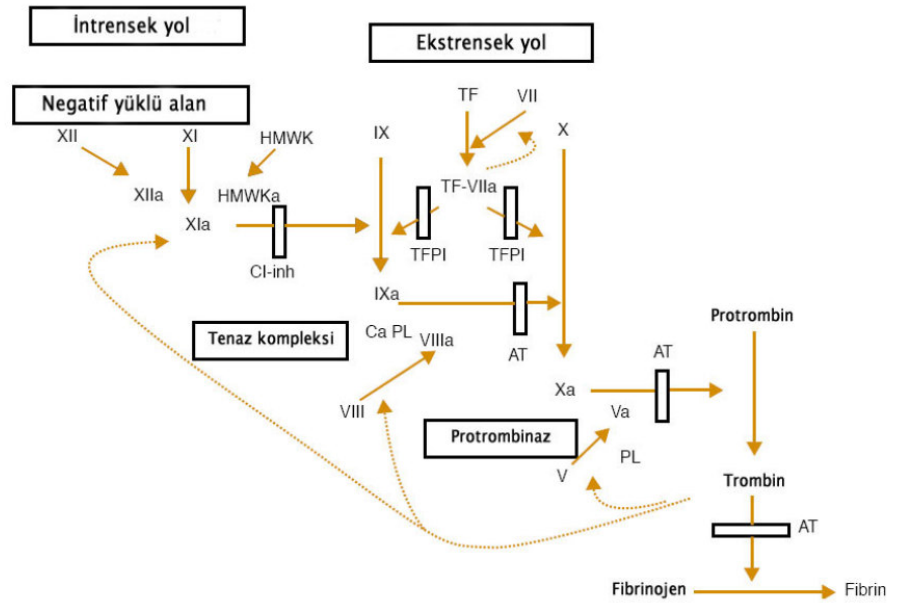
- tek gen defektleri
- trombotik hastalıklar
- otoimmünite ve HLA
- X kromozomal hastalıklar
- genomik imprinting

Tek gebelik kayıplarında ve tekrarlayan gebelik kayıplarında en büyük etken sitogenetik düzensizliklerdir (%50). Tekrarlayan gebelik kaybı ailelerinde ebeveynlerde kromozom düzensizliği sıklığı % 2.5-4'dür. Bu kromozomal düzensizliğin kadında görülme ihtimali ise 2-3 kat fazladır. En sık rastlanan kromozom düzensizliği translokasyonlardır. Eşlerde gözlenen kromozom değişikliğine bağlı sonraki gebeliklerde dengesiz kromozom değişikliği görülme oranı, etkilenen kromozom ve değişikliğin tipine göre %1-100 arasında değişir. Sonraki gebeliklerin takibi açısından önem taşıdığından sebebi saptanamayan tüm tekrarlayan gebelik kaybı ailelerinde kromozomal mutasyonlar araştırılmalıdır.

Moleküler düzensizlikler gruplandığında trombofilik hastalıkların da abortusla sonuçlanan düzensizliklere neden olduğu görünür. Bu trombofilik hastalıkları başlıca şu gruplara ayırabiliriz.

1. Faktör V Leiden mutasyonu
2. Protrombin III (20210 mutasyonu)
3. Protein S defekti
4. Protein C defekti
5. Antitrombin III defekti
6. Active protein C resistance Factor

Bu trombofilik hastalıkları taşıyan ebeveynlerde ise klinik tablo olarak genelde venöz tromboz (özellikle oral kontraseptif kullananlarda), derin ven trombozu, gebelik kaybı, pulmoner emboli, safra kesesi disfonksiyonu, preeklapsi ve/veya eklampsi, inme ve miyokard infarktüsü gözlemlenebilir.



Şekil 1. İntrensek ve ekstrinsek yollar (40)

GENEL BİLGİLER

Mutasyonlar Hakkında Kısa Bilgi

1. Faktör V G1691A (Leiden)

Faktör V Leiden'in oluşumuna neden olan G1619A mutasyonunun bulunduğu bölge, Aktive Protein C (APC)'nin Faktör Va'yı yıktığı üç kesim noktasından birisidir. Tüm tromboz olaylarının %20'sini, ailevi tromboz olgularının da %80'ini oluşturmaktadır (Güneş A.M. ve ark. 2001).

Protein C 62 kilodalton ağırlığında, karaciğerde sentez edilen ve K vitaminine bağımlı bir plazma proteindir. Aktive protin C koagulasyon sisteminde nonproteolitik düzenleyici proteinlerden Faktör Va ve Faktör VIII a yı inhibe etme özelliğindedir. APC ile Faktör Va da ilk olarak Arginin 506 bölgesinden parçalanmaya başlar. Faktör V geni 1. kromozom üzerinde yer alır 25 ekzona sahiptir. Faktör V gen bölgesinde 1691. sıradaki guaninin yerine adenin bazının geçmesi sonucu 506. sıradaki arginin glutamine dönüşür ve mutant allel, FVQ506 veya Faktör V Leiden (FVL) molekülü oluşur (Paidas MJ. ve ark. 2005).

G1691A mutasyonu sonucu Faktör V'in aktive protein C tarafından yıkımı gerçekleşmemiş olur ve Faktör V'in inaktivasyonu normale göre 10 kat daha yavaş gerçekleşir. Sonuç olarak trombinin prokoagulant aktivitesinde artma yani hiperkoaguable konum ortaya çıkar (Güneş A.M. ve ark. 2001). APC direncinin %85'ini Factor V Leiden mutasyonu oluşturmaktadır (Güneş A.M. ve ark. 2001). Otozomal dominant olarak kalıtılır. FVL mutasyonunun tromboemboli riskini homozigotlarda 80, heterozigotlarda ise 7 kez arttırdığı bildirilmiştir (Güneş A.M. ve ark. 2001). Ayrıca preeklampitik ve eklampitik gebelerde FVL mutasyonu sıklığı sağlıklı topluma göre daha sık bulunmuştur (Güneş A.M. ve ark. 2001). FVL mutasyonunun prevalansı büyük coğrafik ve etnik farklılıklar gösterebilir (Güneş A.M. ve ark. 2001). A.B.D.'de yapılan çalışmada Asya kökenli Amerikalılarda mutasyon sıklığı %3.4 iken, Afrika kökenli Amerikalılarda %0.7 saptanmıştır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise ; Özbek ve ark. %6.4, Akar ve ark. %9,4, Güneş ve ark. %10,4 bulmuşlardır (Güneş A.M. ve ark. 2001).

2. Faktör V H1299R (R2)

Bu mutasyon sonucu Faktör V Leiden de olduğu gibi APC direnci oluşur. Fakat H1299R mutasyonu sonucu oluşan APC direncinin Faktör V Leiden'e göre daha hafif olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda H1299R mutasyonunun da tromboza yatkınlığı arttırdığı ve preeklampitik ve eklampatik gebelerde sağlıklı topluma göre anlamlı şekilde daha sık rastlandığı belirtilmiştir (Castoldi E. ve ark. 2003).

3. Protrombin G20210A

Protrombin karaciğerden sentez edilen tek zincirli bir glikoproteindir. Trombin öncülüdür. Faktör V, faktör VIII, trombosit aktivasyonu ve fibrinojenin fibrine dönüşümü gibi kritik olaylarda rol oynar. 11. kromozomda lokalize olmuş protrombin geninin 20210 pozisyonundaki guaninden adenine baz değişimi protrombin düzeyinde yükselme ile sonuçlanır (Paidas MJ. ve ark. 2005). . Trombozlu hastalarda FVL mutasyonundan sonra en sık karşılaşılan genetik bozukluklardandır. Toplumda %2-3, trombozlularda ise %6 oranında saptanır. Ancak FVL'e göre daha az (yaklaşık 3 kat) trombotik risk oluşturur (Güneş A.M. ve ark. 2001). Faktör V Leiden ile kombineliği daha büyük trombotik risk oluşturur. Ayrıca serebral tromboz açısından da ciddi bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (Güneş A.M. ve ark. 2001). Mutant allel için fonksiyonel bir ölçüm yoktur. Plazma protrombin aktivitesinin ölçümü tarama testi olarak yarar sağlamaz. Mutasyona uğramış allelin tanınması için moleküler genetik analiz yapılmalıdır. Heterozigot mutasyon taşıyanlarda tromboza yatkınlık konusundaki sonuçlar tartışmalı olsa da, mutasyonu homozigot olarak taşıyanlarda arteriyel ve venöz tromboz için artmış risk vardır. Mutasyonun fetal kayıplarla ilişkisi de gösterilmiştir. Çok büyük bir hasta grubunda yapılan bir çalışmada hamilelikteki tromboembolilerin %17'sinden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bir başka çalışmada da hamilelik döneminde homozigot PGM taşıyıcılığının Faktör V Leiden homozigotluğu kadar riskli olduğu gösterilmiştir (Paidas MJ. ve ark. 2005).

4. Faktör XIII V34L

FXIII ilk defa Robbins tarafından 1944'te keşfedilmiş ve “fibrin stabilize edici faktör” ya da “FSF” olarak adlandırılmıştır (Dossenbach Glaninger A ve ark. 2003). Faktör XIII, koagülasyon kaskatının son basamağında fibrin stabilizasyonundan sorumlu bir transglutaminaz enzimidir. A ve B olarak adlandırılan iki alt üiteden oluşmuş, trombin aktivitesinde rol oynayan ve A alt biriminde birçok polimorfizmin tanımlanmış olduğu bir proteindir. Faktör XIII'ün serumdaki normal değeri (%5) kadardır. %3-4 seviyeleri düşük değerler olmasına rağmen kanama komplikasyonlarını oluşturmaz. In vitro ve in vivo çalışmalar B alt-grubu sentezinin çoğunlukla hepatositte, A alt-grubunun ise kemik iliğindeki trombosit ve monosit prekürsör hücrelerinden sentezlendiği bildirilmiştir (Dossenbach Glaninger A ve ark. 2003).

Faktör XIII eksikliği, yaklaşık 1/2.000.000 görülen, ender kanama bozukluklarından biridir ve plazmadaki fibrin monomerlerinin çapraz bağlanmasında yetersizlikle sonuçlanmaktadır (OMIM 11.12.2008).

FSF yokluğunda oluşan fibrin unstabildir, zayıf asit, zayıf baz ve 5 M ürede çözünür. Faktör XIII aktivitesi olmayan hastanın pıhtısı, sadece iyonik bağlarla kuşatılmış basit bir fibrin polimerinden ibarettir.

A alt biriminde meydana gelen polimorfizmlerden en önemlisi V34L polimorfizmidir ve artmış Faktör XIII aktivitesine neden olur. Bu polimorfizmin miyokard infarktüsü açısından koruyucu rol oynadığı çalışmalarla gösterilse de serebral hemoraji için artmış risk oluşturduğu da ayrıca belirtilmiştir (Kohler HP ve ark. 1998).

Mikkota ve arkadaşları 1994'te F13A1 genindeki lösinin valine substitüsyonuyla sonuçlanan G→T dönüşümünü göstermiştir. Bu aminoasit substitüsyonu bir trombin aktivasyon bölgesine çok yakında lokalizedir. Bu mutasyonu homozigot olarak taşıyanlar wild genotipekilere göre aşırı derecede artmış enzim aktivitesine sahiptirler. V34L mutasyonun venöz tromboza karşı güçlü bir koruyucu faktör olduğu 1999'da Franco ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. 1500 gramın altında doğan 531 çocuk ve 301 sağlıklı kontrolde yapılan V34L polimorfizmi araştırmasında iki grup allel frekansları arasında fark bulunmamıştır.

Fakat ventriküler hemoraj açısından V34L polimorfizmini homozigot ve heterezigot taşıyanların avantajlı olduğu görülmüştür (OMIM 12.12.2007).

Reiner ve arkadaşları 2003 'te östrojenin protrombik etkilerini ve dolayısı ile postmenapozal dönemdeki arteriyal trombik olayların replasman terapisinde V34L polimorfizminin hastaya avantaj sağladığını göstermiştir. (Dossenbach Glaninger A ve ark. 2003).

5. β -Fibrinojen -455 G-A

Bu promotor bölge mutasyonunu heterezigot olarak taşıyanlarda fibrinojen düzeyi artmıştır. Homozigot olarak taşıyanlarda artış daha belirgindir. Bu durumun plazma fibrinojen miktarını %20 kadar etkilediği ortaya koyulmuştur. Mutasyonu taşıyanlarda özellikle iskemik stroke için artmış risk vardır. Bu polimorfizmi taşıyanların ayrıca MI için de artmış bir riske sahip olduğu bildirilmiştir (Kessler C. ve ark.1997).

Fibrinojen karaciğerde sentezlenen bir plazma glikoproteinidir. Yapısal olarak α (FGA), β (FGB) ve γ (FGG) olmak üzere 3 farklı alt ünitelerden oluşur. Fu ve arkadaşları 1992'de bu alt birimlerden FGA'nın FGB ve FGG gibi 6 egzonunun olduğunu göstermiştir. Bu 3 alt birim de plazma fibrinojeninin fibrine dönüşünde rol oynadığı görülmüştür. Bu rol trombin zamanı protrombin zamanı ve reptilaz üzerinedir. Bu mutasyonu taşıyanlarda biyokimyasal ve immünolojik testler genellikle normaldir fakat varyantlar asemptomatik anormal kanama anormal pıhtılaşma gösterebilirler. Disfibrinojeneminin ve hipofibrinojeneminin birçok soy ağacında dominant kalıtıldığı görülmüştür. Kalıtım şekli olarak otozomal kodominant kalıtım kalıbına uyarlar. Bu mutasyon sonucunda anstabil agregat bir molekül oluşur. Homozigotlarda pıhtılaşmaya yatkınlık çok daha fazladır. Bu mutasyonu taşıyanlarda venöz ve arteriyel tromboz görülme riski taşımayanlara göre artmıştır. Metz ve Bethesda 1987'de tekrarlayan düşükleri olan kadınlarda anlamlı bir şekilde plazma fibrinojen düzeylerinde artma olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu mutasyonla birlikte sigara kullanımı ve şişmanlığın pıhtılaşmaya yatkınlık oluşturmada arttırıcı bir rolü olduğu gösterilmiştir. Derin ven trombozu geçiren 122 ve pulmoner embolili 99 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada FGA genindeki 4266

A→G mutasyonunun pulmoner emboli ile bağlantılı olduğu bulunmuştur. Fakat bu çalışmalarda venöz trombozla ilişki saptanamamıştır (OMIM 11.12.2007).

6. PAI-1 (Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1 (4G-5G))

Plazminojen, serin proteazların etkisi ile plazmin haline dönüşür ve fibrini parçalayarak aşırı pıhtı oluşumuna engel olur. Yeterli fibrinoliz sağlandıktan sonra etkisini kaybetmelidir. Fibrinolitik aktiviteyi sınırlama görevini ise plazminojen aktivatör inhibitörleri (PAI) sağlar (Dossenbach Glaninger A ve ark. 2003). PAI-1 doku ve ürokinaz kaynaklı plazminojeni en hızlı ve güçlü şekilde inaktive eden proteindir. Eksikliği oldukça nadirdir. Düzeyinin arttığı durumlarda ise plazminojen aktifleşemeyeceği için tromboza eğilim olur. Genotip analizlerinde promoter bölgede –675. pozisyondaki G nükleotid delesyonu PAI-1 düzeyini arttırarak plazminojen düzeyini düşürür ve fibrinolitik aktiviteyi azaltır (Dossenbach Glaninger A ve ark. 2003).

Birçok çalışma PAI-1 genotipi homozigot 4G olan bireylerin PAI-1 5G/5G olan bireylerden PAI-1 seviyesinin yaklaşık %25 daha fazla olduğunu göstermiştir. Populasyonda yaygın olarak bulunan (wild) allelde 5 Guanin bulunurken; 4G/4G homozigot ve 4G/5G heterozigot variantlarının diğer kalıtsal trombofili nedenleri kadar etkili olmasa da trombozlu olgularda diğer trombofili sebeplerinden daha sık saptandığı gösterilmiştir. Edinsel PA eksikliklerine kalıtsal PAI-1 mutasyonlu olgulardan daha sık rastlanılır (akut miyokard enfartüsü, diabetes mellitus, ülseratif kolit, crohn hastalığı vb). Amerikada Gardeman ve arkadaşları tarafından 1999 yılında 2565 koroner anjiyografi geçirmiş hasta üzerinde yapılan bir çalışmada 4G allelinin koroner arter hastalıklarıyla anlamlı bir ilişki gösterdiği belirtilmiştir (OMIM 11.12.2007).

7. GPIIIa L33P (HPA-1) (=İntegrin)

Glikoprotein IIIa (GPIIIa) trombosit membranı üzerinde bulunan fibrinojen reseptörüdür. Bu proteini kodlayan gen 17q21.32 de yer alır. α ve β olmak üzere iki alt üniteden oluşur. α alt ünitesi GP2b, ITGA2B geni tarafından kodlanır. Normal allel A1(a) olarak ifade edilir. A2(b) alleli erken yaşta akut koroner olaylara, myokard infarktüsüne, stroke'a yatkınlıklık oluşturur. Yapılan çalışmalar erken

yaştaki MI vakalarının çoğunda HPA-1 mutasyon taşıyıcılığı saptamıştır (Slovik A. Ve ark. 1997). Weiss ve arkadaşları 1995'te A2 alleli için homozigot olanların erken koroner olaylarda yüksek prevalans gösterdiğini gözlemlenmişlerdir. Myokard enfaktüslü 71 hasta üzerinde yapılan çalışmada A2 allelinin normal topluma göre 2.1 kat fazla olduğu gözlemlenmiştir. 60 yaşın altındaki MI'lı hastalarda bu oranın 3.6 olduğu saptanmıştır. Ardissino ve arkadaşlarının 1999 yılında 200 MI geçirmiş hasta üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada 45 yaş altında MI geçirmiş hastalarda bu polimorfizm taşıyıcısı ve aynı zamanda sigara içmekte olan hastaların içmeyenlere göre yaklaşık iki kat riske sahip olduğunu hesaplamıştır (Ridker PM ve ark 1997). Bu çalışmalar sigara kullanımı ve HPA-1 taşıyıcılığının birlikteliğinin MI için bir risk faktörü oluşturduğunu göstermiştir.

8. MTHFR C677T

Son zamanlarda, total homosistein düzeyindeki artış, tromboz risk faktörü olarak belirtilmektedir. Hiperhomosisteinemi ile gebelik kaybı arasındaki ilişkinin tam mekanizması henüz bilinmemekte, fetusta yapısal ve nörolojik etkiler ya da etkilenmiş kadınlarda trombojenik potansiyelin artması ve tromboz oluşması gibi farklı mekanizmalar ortaya atılmaktadır.

Hiperhomosisteinemi, methionin-homosistein yolağındaki kalıtsal bir defektten ya da Vitamin B12 ve folat(Bg)'tan eksik beslenmeden kaynaklanabilir. Homozigot sistathionin-B-sentaz (cBS) ya da metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) eksikliği şiddetli hiperhomosisteinemi nedenidir ve mental retardasyon, iskelet anomalileri, prematür vasküler hastalık ya da tromboz ile sonuçlanabilir. Kanda homosistein düzeyinin yükselmesi nöral tüp defekti, fetal kayıp, plasental abrupsiyon ve plasental enfarkt riskini arttırır. MTHFR, homosistein metabolizması için gereklidir (Miriş Dikmen, 2004).

5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi (MTHFR), bir flavoprotein olup MTHFR familyasının (EC 1.5.2.20) bir üyesidir. Memelilerde MTHFR'nin yapısı hakkındaki ilk bilgiler, domuz karaciğerinin saflaştırılması ile elde edilmiştir. Enzim sitoplazmik bir protein olup, iki alt birimden oluşan homodimer yapıdadır. İnsanlarda yapılan Western analizler sonucu 2 izoformunun olduğu açıklanmıştır. Bu izoformlar dokulara öz olup, 70 kDa'luk küçük alt birimlere sahip izoform karaciğerden, 77 kDa'luk büyük alt birimlere sahip izoform ise diğer dokulardan pürifiye

edilmiştir. Enzim, tripsinle proteolizise uğratıldığında, 77 kDa’luk alt birim 40 kDa ve 37 kDa’luk kısımlara ayrılmaktadır. Bu ayrılma sonucunda S-adenozil metiyonin (SAM) inhibisyonu ortadan kalkar, ancak enzimin katalitik aktivitesi değişmez (Miriş Dikmen, 2004).

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi, folat metabolizmasında rol oynayan önemli bir enzimdir. MTHFR geni 1p36.3 de lokalize olmuştur ve 656 aminoasitten oluşan MTHFR enzimini kodlar. MTHFR enzimi, homosisteinin remetilasyon döngüsünde (homosistein, transsülfürasyon ve remetilasyon yollarını kullanarak metabolize olur) görev yapar. MTHFR, 5,10 metilentetrahidrofolatı (5,10-metilen THF) dönüşümsüz olarak 5-metil tetrahidrofolata (5-metil THF) dönüştürür. 5-metil THF; DNA metilasyonu ve metiyonin sentezi için metil grubu sağlar. 5,10-metilen THF ise deoksiüridilatın timidilata dönüşümünde kullanılırken bir taraftan da pürin sentezi için 10-formil THF a okside olmaktadır (Miriş Dikmen, 2004).

MTHFR geninde meydana gelen C677T polimorfizmi enzim aktivitesini azaltmaktadır. Bu başkalaşım, enzimi termolabil hale getirir ve in vitro koşullarda MTHFR aktivitesi homozigot ve heterozigotlarda sırasıyla %70 ve % 35 oranında azalır. C677T alleleline homozigot formda sahip olan bireylerde plazma homosistein düzeyi orta şiddette artar ki bu özellikle folat yetersizliği dönemlerinde dikkat çekicidir. Azalan MTHFR aktivitesi sonucunda 5-metil THF düzeyi azalmakta 5,10-metilen THF miktarı ile plazma homosistein düzeyi artmaktadır (Miriş Dikmen, 2004).

MTHFR enziminin eksikliği durumunda klinik semptomların geniş bir dağılım gösterdiği anlaşılmıştır. Hiperhomosisteinemi ve homosisteinüriinin ortaya çıktığı ciddi MTHFR eksikliğinde, periferik nöropati, gelişme geriliği, hipotoni, strok, tromboz, gibi klinik özellikler görülür. MTHFR eksikliğinin hafif olduğu durumlara popülasyon genelinde oldukça sık rastlanır, bu durum da arterial hastalıkların oluşumunda bir risk faktörüdür (Miriş Dikmen, 2004).

C677T polimorfizmi, MTHFR proteininin N-terminal katalitik bölgesini etkileyen 4. ekzonda meydana gelir. MTHFR C677T polimorfizminde, MTHFR enzimini kodlayan gende 677. nükleotid olan C (sitozin)’in T (timin)’e değişimi sonucu ortaya çıkan bir nokta mutasyonu vardır. Bu mutasyon, genin ürünü olan proteinin 226. pozisyonunda Alanin’in yerine Valin’in geçmesine neden olur. Bunun

sonucu olarak MTHFR aktivitesi azalır. Azalan MTHFR aktivitesi, 5-metil tetrahidrofolat seviyesinde azalmaya ve bunun sonucu olarak da homosisteinin metionine dönüşmemesi nedeniyle plazma homosistein seviyesinde artmaya neden olur.

MTHFR nin C677T polimorfizminde, CC (Alanin-Alanin) homozigot normal, CT (Alanin-Valin) heterozigot ve TT (Valin-Valin) homozigot mutant genotipler görülmektedir.

MTHFR nin C677T polimorfizminin, kardiyovasküler hastalıklar, nöral tüp kusurları, stroke, down sendromu, meme ve endometrial kanser gibi hastalıklarda bir risk faktörü olduğu açıklanmıştır. Ayrıca bu alleli heterozigot formda taşıyan bireylerde plazma homosistein düzeyi intermediyer aralıklardadır.

Bu mutasyonun prevelansı etnik gruba göre büyük değişkenlikler gösterir. Türk populasyonunda heterozigot ve homozigot sıklığı yaklaşık % 47,4 ve % 9,6'dır (Miriş Dikmen, 2004).

8.1. Folat

Folat nükleik asid sentezinde önemli bir role sahip olup, eritrosit volümünü arttırmada, büyüyen uterus, plasenta ve fetusun ihtiyaçlarını karşılamada önemli bir rol oynamaktadır. Diyetle yetersiz alım ve maternal genetik faktörler düşük folat düzeylerine yol açar. Kötü gebelik sonuçlarına sahip toplumlarda folat gibi mikro besinlerin az tüketildiği görülmüştür. Sigara içimi, alkol kullanımı ve uzun süreli oral kontraseptif kullanımı da maternal folat düzeylerini azaltır. Düşük serum folat düzeyleri, artmış preterm doğum riski ve fetal büyüme kısıtlanması ile ilişkilendirilmiştir. Çilek, brokoli ve yapraklı sebzeler folattan zengin gıdalardır.

9. MTHFR A1298C

İkinci sık görülen MTHFR polimorfizmi, 1298A>C başkalaşımıdır ve MTHFR'nin regülatör bölgesinde yer alan Glutamat'ın Alanin'e dönüşümüne sebep olur. Bu başkalaşım enzim aktivitesini azaltır ama 677T allel değişimi kadar belirgin değildir. In-vitro koşullarda 1298C alleli homozigot olan bireylerde enzim aktivitesi düşüktür ancak plazma homosistein düzeyleri kontrollere göre yüksek değildir.

Bununla beraber, kombine MTHFR C677T ve A1298C mutasyonlarının birlikte bulunması MTHFR aktivitesinin %40-50 oranında azalmasına buna bağılı olarak da hiperhomosisteinemi gelişimine ve plazma folat düzeylerinin azalmasına neden olduğu rapor edilmiştir. Dünya üzerindeki genel populasyonun %15-20 kadarı MTHFR varyantlarının biri açısından heterozigottur (Miriş Dikmen, 2004).

İdiyopatik gebelik kayıplarının patogeneğinde MTHFR mutasyonları risk faktörlerinden biri olarak ifade edilmektedir. Bazı çalışmalarda üç ve daha fazla tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlar arasında homozigot varyantların frekansının yüksek olduğu ifade edilirken, diğerlerinde MTHFR mutasyonları ile gebelik kayıpları arasında herhangi bir ilişki saptanamamış, idiyopatik gebelik kayıpları olan olgularda kontrollere benzer ya da daha düşük MTHFR mutasyon prevalansları saptanmıştır (Miriş Dikmen, 2004).

10. ACE I/D

ACE (Anjiotensin Converting-Dönüştürücü- Enzim) tek bir genin ürünüdür ve polimorfiktir. Cambien ve ark. 1988'de ile Rigat ve ark. 1992'de ACE kodlayan genin 17. kromozomun uzun kolunda (17q23) bulunduğunu ve 16. intronda bulunan 287 baz çiftlik Alu tekrar dizisinin insersiyon/delesyon (I/D) polimorfizmini göstermiştir. Yine yapılan çalışmalar ACE geninin 16. intronunda 287 baz çiftinin varlığının 'insersiyon', yokluğunun ise 'delesyon' olarak iki farklı allele yol açtığını belirtmektedir. ACE geni insanda insersiyon/insersiyon (I/I), insersiyon/delesyon (I/D) ve delesyon/delesyon (D/D) şeklinde üç genotiple bulunmakta ve plazma ACE seviyesi I/I genotipine sahip kişilerde en düşük oranda saptanırken, D/D genotipine sahip kişilerde en yüksek bulunmaktadır. Kişiler arası plazma ACE seviyesindeki değişikliklerden büyük oranda ACE geni sorumludur. Böylece farklı bireylerde ACE seviyesinin farklı olması, bu enzimin aynı genin farklı genotipleri tarafından oluşturulduğunu, yani polimorfizm gösterdiğini kanıtlamıştır.

Bir dipeptidil karboksipeptidaz olan ACE, bradikininini degrade eder ve anjiotensin-II sentezindeki son aktivasyon aşamasını katalizler. ACE anjiotensin-I in karboksi terminalindeki histidin-lösin aminoasitlerini koparır ve anjiotensin-II oluşumunu sağlar. Anjiotensin-II, vazopressör bir hormondur. Bununla beraber, vazodilatör bir hormon olan bradikinininden arka arkaya iki tane karboksil uç peptidini

ayrıştırarak bu hormonun aktivitesini kaybetmesini sağlar. Tek başına anlamlı değişiklikler yapmak için yeterli olmasa bile, anjiotensin-I vazokonstriktör özelliğe sahiptir; ancak fizyolojik rolü yoktur. Oluşan anjiotensin-II ise güçlü bir vazokonstriktördür. Dolaşımda 1-2 dakika kalan anjiotensin-II, daha sonra kanda ve dokularda bulunan anjiotensinazlar tarafından yıkılır.

Kalp kasları üzerinde yapıcı bir etkisi bulunmasından ve arteriyel konstriksiyona neden olup kalp basıncını da etkilemesinden dolayı, anjiotensin-II hormonu kardiyovasküler sistem için çok önemlidir. Kalp dokusundaki ACE aktivitesinin daha fazla olması, daha yüksek anjiotensin-II seviyesine neden olur. Bu da daha fazla koroner arter hastalıklarına yol açar. Bazı çalışmalarda bu durumun ACE inhibitörlerinin antihipertansif etkilerinin yanında, plazmadaki ACE inhibisyonundan bağımsız olarak proliferasyonu önleyici ve kalbi koruyucu etkisini sağladığı gösterilmiştir.

Anjiotensin-II nin etkileri D/D genotipine sahip kişilerde diğer fenotiplere oranla daha belirgindir. Yani D/D genotipine sahip kişilerde dolaşımdaki ve dokulardaki ACE seviyesi (dolayısıyla anjiotensin-II seviyesi) diğer genotip ve allellere oranla daha yüksek olacağından, DD genotipi ve D alleli kardiyovasküler hastalıkları arttırmada bir risk faktörüdür.

ACE D alleli hem genç hemde yaşlı popülasyonda yüksek ACE aktivitesinden sorumlu tutulur. ACE aktivitesi D/D genotipine sahip kişilerde I/I genotipine sahip kişilere oranla iki kat kadar daha yüksek olabilmektedir. Bu durumun ise; erken başlangıçlı hipertansiyon, Alzheimer hastalığı, hem non diabetik, hemde diabetik renal hastalıkta ilerleyici fonksiyon kaybı için risk faktörü olduğu bilinmektedir. IDDM'li hastalarda D genotipi hem hipertansiyon hemde kardiyovasküler risk artışı ile ilişkilidir. NIDDM'li kadınlarda periferik nöropati riskini arttırdığı bildirilmektedir. D genotipinin ARDS'nda mortaliteyi artırıcı bağımsız bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Siffert W 2006). Gayagay ve ark. Avustralyalı sporcularda II genotipinin genel popülasyondan daha sık olduğunu bildirmiş ve daha sağlıklı kardiyovasküler sistemle ilişkili olduğunu öne sürmüştür.

11. APO B R3500 Q

ŞM,VLDL, IDL ile LDL lipoproteinlerin apoproteinidir. VLDL ve LDL’de bulunan apo B; 4536 amino asitlik, 512 kDa molekül ağırlığında olan ve KC’de sentezlenen apo B-100 şeklinde, ŞM’larda bulunan ise 2152 amino asitlik, 244 kDa molekül ağırlığında barsakta sentezlene Apo B-48 şeklindedir. Sinir sistemleri ve kan hücreleri hariç bütün dokular Apo B-100 taşır. Apo B-100 ligand olarak iş görür ve reseptör aracılığıyla KC’e alınarak hücre içindeki lizozomal enzimlerce katabolize edilirler (Soria LF ve ark. 1989).

Weisgraber ve arkadaşları 1988’de APO B’nin 3350 ve 3506 residüleri arasında anormal LDL’yi normal LDL’den farklı olarak algılayan izotop yapısında bir antikör buldular. MB47 anormal LDL’ye daha yüksek afinite ile bağlandı. Bu sayede büyük populasyonlar üzerinde çalışmayı sağlayacak bir protokol geliştirildi. Illingworth ve arkadaşları 1992’de bu metodla 12 hiperkolestoremik hastada LDL kolesterolün APO B ARG3500GLN mutasyonu sonucu yükselmiş olduğunu gösterdi (OMIM 11.12.2007).

APO B’ye ait bu iki allelin sekans analizi sonucunda heterozigot durumda apolipoprotein üzerine yıkıcı etkisi olduğu ve 3500’üncü amino asitin glutaminden arginine substitusyonuyla meydana geldiği gösterilmiştir. Yüksek kolesterol seviyeli bir ailenin 3 probant ve 4 etkilenmiş bireyinde yapılan sekans analizinde restriksiyon enziminin farklı yerde kesim yaptığı gösterilmiştir. Buna göre 3500 üncü aminoasit kodonundaki CGG’nin CAG’ye dönüştüğü mutasyon APO B alleli işlevini azaltmakta ve böylece lipoproteinlerin azalması ve sonuçta hiperkolestrolemiyle klinikte kendisini göstermektedir. Farklı bir grupta yapılan çalışma ise APO B geninin 26’ncı egzonundaki 10708 ‘inci guaninin adenine transisyonunu göstermiştir (OMIM 11.12.2007).

Loux ve arkadaşları allel spesifik oligonükleotidlerle APO B 3500 mutasyonunu PCR amplifikasyonu ve hibridizasyon yöntemleri ile 101 ailesel hiperkolestrolemlili fransız hastada yaptıkları deneyde sadece 1 vakada mutasyon saptamışlardır. Bu vakanın 45 yaşındaki oğlu da aynı mutasyonu taşımaktadır. Bu çalışmalardan da görüleceği gibi bu mutasyonun görülme sıklığı oldukça düşüktür.

Rauh ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ise Kuzey Amerika ve Avrupa'daki Kafkas ırkında yaklaşık 1/500 ila 1/700 oranında APO B ARG3500GLN mutasyon taşıyıcılığı göstermiştir (OMIM 11.12.2007).

Humphries 1992'de ailesel hiperkolesterolomi hastalarının heterozigotlarından erkeklerin %40 'ının kadınlarınsa %20 'sinin ilerde koroner arter hastalığı gösterdiğini bildirmiştir (OMIM 11.12.2007).

Horvath ve arkadaşları 2001 'de Bulgaristan 'da 130 hiperkolesterol hastasında yaptıkları çalışmada bunların %8.17 'sinin ailesel APO B mutasyonu taşıdığını gösterdi. Bu oran Polonyada %2.5 bulunmuştur (OMIM 11.12.2007).

12. APO E

Apo E (Apolipoprotein E) KC'de ve vücutun değişik bölgelerinde (beyin, deri, testis, dalak) sentezlenen, kandaki lipoproteinlerde bulunan belli başlı apolipoproteinlerden biridir. Apo E, VLDL, LDL ile HDL yapısında bulunur. Karboksil ucunda alanin bulunan Apo E, doku ve plazma arasında kolesterolün reseptör aracılı aktarılmasını sağlar. Yüksek trigliserit içerikli lipoproteinlerin (Şilomikronlar, VLDL, LDL, ve bazı HDL alt gruplarının) normal katabolizması için gereklidir. Bu bağlamda Apo E 'nin işlevi, lipoproteinlerin karaciğer ve diğer organlara alımından sorumlu olan, LDL ve Apo E reseptörleri için ligand olmaktır. Apolipoprotein E, ilk olarak lipid metabolizması ve kalp hastalıklarında oynadığı rolden dolayı önem kazanmıştır. Daha yakın zamanlarda lipoprotein metabolizmasıyla doğrudan ilgili görülmeyen, Alzheimer Hastalığı, immün (bağışksal) regülasyon ve biliş (*cognition*) gibi biyolojik süreçlerle olan ilişkisi olduğu da gösterilmiştir. Apo E bozuklukları, şilomikron ve VLDL artıklarının yavaş atılmasına yol açtığından, bu durum kolesterol ve trigliserit düzeylerinin yüksek olduğu kalıtsal disbetalipoproteinemi veya tip 3 hiperproteinemide görülür.

299 amino asitden oluşan ve mA'lığı 34 kDa olan Apo E, polimorfik bir proteindir. Apo E geni, 19. Kromozom'da Apolipoprotein C1 ve Apolipoprotein C2'nin de dahil olduğu bir gen kümesinde bulunur. ApoE geni, dört ekson ve üç introndan oluşan 3597 nükleotit uzunluğunda bir RNA molekülü kodlar. Bu genin E2, E3 ve E4 diye adlandırılmış üç ana çeşidi (alleli) vardır. Bu alleller, Apo E proteinin yalnızca 112. ve 158. amino asitlerinde birbirlerinden farklı olan üç protein türünün

sentezlenmesine yol açar, ancak bu ufak farklılıklar çok önemli fizyolojik sonuçlar doğurur. Nüfusun büyük çoğunluğu en az bir E3 alleli taşır. E2 alleli, tip 3 hiperlipoproteinemi ile, ve diyabet ya da obezitenin de olması durumlarında, hiperlipidemi ile ilişkilidir. E4 alleli ile, ateroskleroz, Alzheimer Hastalığı, zayıf düşünsel yetenek ve sinir hücrelerinde yeni uzantıların (nörit) oluşmasında yavaşlama arasında bağlantı bulunmuştur. E2 veya E4 homozigot kişilerde bu bozuklukların görülme olasılığı, heterozigot olanlara göre daha yüksektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

1. Materyal

1.1. Çalışma Grubu

Bu tez çalışması, Eylül 2006-Haziran 2007 tarihleri arasında, Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD. ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.'na tekrarlayan düşükleri nedeni ile başvuran kadınların rızası alınarak, o hastalardan alınan kanlarla yürütülmüştür. Bu hastalar çalışmaya katılırken en az üç düşüklerinin olması, başka herhangi bir sistemik hastalıklarının veya kromozomal anomalilerinin bulunmaması açısından değerlendirilmiş ve bu tür bulgusu olmayan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak en az 2 sağlıklı çocuğu olan; düşük ya da gebelik komplikasyonu (preeklampsi, ablatio plasenta, plasenta previa, 2.-3. trimester kayıpları) olmayan gönüllülerden analiz yapılmıştır.

Adı geçen çalışmaya katılmayı kabul eden hastalardan, hastanemiz kan alma bölümünde, 3mL lik K3EDTA'lı (mor kapaklı) tüplere 2mL venöz kan alındı. Daha sonra bu kanlardan izole edilen DNA lardan bu kişilerin adı geçen polimorfizmler açısından genotiplerinin belirlenmesi amacıyla laboratuvarımızda mutasyon analizleri yapıldı.

1.2. Gereçler

Termocycler	Applied Biosystems	ABD
Yüksek devirli santrifüj	Eppendorf 5415R	Almanya
Laminair flow	Nüve	Türkiye
Hibridizatör	TwinCubato	Almanya
Su Banyosu	Poly science	ABD
Vortex	IKA	ABD
Buzdolabı	Vestel	Türkiye
Otomatik pipet seti	Eppendorf	ABD
Invisorb Spin Blood Mini Kit (DNA izolasyon Kiti)	Invitek	Almanya
CVD StripAssay	ViennaLAB Diag. GmbH	Avusturya
Thromborisk StripAssay	ViennaLAB Diag. GmbH	Avusturya

3mL EDTA lı tüp	greiner bio-one	Almanya
Ependorf tüpler	Axygene	ABD
2 mL lik receiver tüp	Invisorb Spin Blood Mini Kit İçeriği	
1.5 mL lik receiver tüp	Invisorb Spin Blood Mini Kit İçeriği	
DNA izolasyon filtresi	Invisorb Spin Blood Mini Kit İçeriği	

1.3. Solüsyonlar

Lysis Buffer	Invisorb spin blood mini kit içeriği
Proteinaz K	Invisorb spin blood mini kit içeriği
Wash Buffer I	Invisorb spin blood mini kit içeriği
Wash Buffer II	Invisorb spin blood mini kit içeriği
Ellution Buffer D	Invisorb spin blood mini kit içeriği
Amplifikasyon Mix A	CVD Strip Assay kit içeriği
Amplifikasyon Mix B	CVD Strip Assay kit içeriği
Taq Dilution Buffer	CVD Strip Assay kit içeriği
Taq DNA polimeraz	Fermentas (recombinant) 5u/μl
HYB (Hybridization Buffer)	CVD Strip Assay kit içeriği
Wash Solution A	CVD Strip Assay kit içeriği
DEN	CVD Strip Assay kit içeriği
Wash Solution B	CVD Strip Assay kit içeriği
Conjugate Solution	CVD Strip Assay kit içeriği
Color Developer	CVD Strip Assay kit içeriği



Resim 1: İzolasyonda kullanılan kimyasallar

2. Metod

2.1. DNA İzolasyonu:

DNA izolasyonu için Invitex (Berlin, Almanya) firmasının üretmiş olduğu Invisorb Spin Blood Mini Kit kullanıldı. DNA, 3 ml'lik EDTA'lı tüplere alınan periferik kandan izole edildi. Bu işlem için 1.5 mL lik ependorf tüpüne 200 µL tam kan, 200µL Lysis Buffer, 20 µL Proteinaz K konarak kısa bir süre vortexlendi. 56°C deki su banyosu içerisinde 10 dk inkübe edildi. İnkübe edilerek bekleyen karışıma 400µL Binding Buffer B6 konup kısa bir süre vortexlenerek karışması sağlandı. 2mL lik receiver tüpün içerisine filtre yerleştirildi. İnkübe edilen karışım filtre üzerine döküldü ve 1 dk bekletildikten sonra 12000 rpm de 2 dk santrifüj edildi. Filtre yeni bir 2 mL lik receiver tüpüne alındı ve alttaki süpernatant tüp ile birlikte atıldı. Filtre üzerine 500 µL Wash Buffer I eklenip 12000 rpm de 1 dk santrifüj edildi. Tüpün alt kısmındaki sıvı kısım boşaltılarak filtre tekrar yerleştirildi. 800 µL Wash Buffer II eklenen filtre 12000 rpm de 1 dk santrifüj edildi. Receiver tüp tekrar boşaltılıp filtre tekrar içerisine yerleştirildi. Bu aşamada filtre maksimum santrifüj devri olan 13200 rpm de 4 dk santrifüjlenerek etanolün tamamen uzaklaşması sağlandı. Filtre 1,5 mL lik yeni bir receiver tüpe kondu. Üzerine 200 µL 56°C ye ısıtılmış Ellution Buffer D eklendi ve 1 dk inkübe edildi. 10000 rpm de 1 dk santrifüj edilen tüpün alt kısmında saf halde DNA izole edilmiş oldu. Elde edilen DNA -20°C de saklandı.



Resim 2: DNA izolasyonu ve mutasyon analiz kitleri

2.2. In Vitro Amplifikasyon (PCR)

Çalışmanın amacı; daha önce üç veya daha fazla sayıda düşük yapmış kadınlarda daha önce adı geçen pıhtılaşma faktörlerini içeren genomik bölgeleri in vitro şartlarda birlikte çoğaltarak (multipleks PCR) bu bölgelerin özelliklerini ortaya koymaktır.

İzole edilmiş DNA lar PCR aşamasından önce 98°C de 10 dk inkübe edildi. Amplifikasyon 200µl'lik ependorf tüpler içinde 25 µL'lik toplam hacimde yapıldı. Reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlandı. Bir örnek için iki farklı PCR yapıldı. Bu PCR lar A ve B olmak üzere iki farklı tüpte gerçekleştirildi. Her bir tüp için farklı olan ise amplifikasyon mix (Primer karışımı) idi.

Master Mix:

<u>Reaktif</u>	<u>Miktar (bir örnek için)</u>
Amplifikasyon Mix A veya B	15 µL
Taq DNA polimeraz (1u)	0,2 µL
Taq Dilution Buffer	4,8 µL
DNA	5,0 µL

PCR Döngüleri:

94°C	2 dk	
94°C	15 sn	-----
58°C	30 sn	35 siklus
72°C	30 sn	-----
72°C	3 dk	

2.3. Hibridizasyon

Su banyosu 45°C'ye ayarlanır ve HYB ile Wash A burada 45°C'ye ısıtılır. 20µL DEN solüsyonu trayin kuyucuklarının köşelerine pipetlenir. Bu DEN solüsyonu içerisine PCR sonucu elde edilen üründen 10µL A ve 10µL B tüpünden olmak üzere toplam 20 µL karıştırılıp oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir. Trayin her bir kuyucuğuna 1mL daha önceden ısıtılmış HYB solüsyonu eklenir ve homojen renk elde edinceye kadar çalkalanır. Daha sonra stripler trayin kuyucuklarına yerleştirilir. Tray, twincubator de 45° C'de 30 dakika çalkalanarak inkübe edilir. Hibridizasyon solüsyonu kuyucuklardan tamamen boşaltılır. Her bir kuyucuğa 1 mL WASH A solüsyonu eklenir. 1 dakika çalkalanarak boşaltılır ve 1mL WASH A solüsyonu ile 15 dk 45°C'de çalkalanarak inkübe edilir. Bu işlem iki kez tekrarlanır. Daha sonra boşaltılan kuyucuklara Conjugate Solution eklenir. Oda sıcaklığında 15 dakika çalkalanarak inkübe edilir. Her bir kuyucuğa 1 mL WASH B eklenip çalkalandıktan sonra iki defa 1mL WASH B ile 5'er dk yıkama yapılır. Daha sonra her bir strip üzerine 1 mL Color Developer eklenerek renk kaybı olmaması için trayin üzeri alüminyum folyo ile kapatıldı. 15 dk çalkalanarak inkübe edilen stripler daha sonra iki kez distile su ile çalkalanıp durulandıktan sonra kurutma kağıdıyla kurutularak değerlendirmeye alındılar.



Resim 3: Hibridizasyonda kullanılan Twincubator

BULGULAR

İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme SPSS 12.0 paket programı ile yapıldı. İki örneklemedeki yaş değişkeni T-Testi ile değerlendirildi. Elde edilen değerler aritmetik ortalama ($\bar{X}$) ve standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. Her iki grup arasında ilişki bulunup bulunmadığı Ki-kare bağımsızlık testiyle ortaya koyuldu. Beklenen frekansların 5'den küçük olduğu durumlarda Fisher Kesin Ki-Kare testi uygulandı. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

GRUP	n	$\bar{X}$	SD	T-Testi Anlamlılık (p)
HASTA	52	27.78	3.75	$p < 0,05$
KONTROL	52	37.26	7.68	

Tablo 3: Hasta ve kontrol grubunda yaş değişkenine ait istatistiksel değerlendirme

Tabloda görüldüğü gibi kontrol grubunun yaş ortalaması hasta grubuna göre yüksek olup aradaki fark anlamlıdır.

GRUP	FVL GENOTİPLERİ						TOPLAM
	W		Het		Hom		
	N	f (%)	N	f (%)	N	f (%)	
HASTA	44	%42.3	8	%7.7	-	-	52
KONTROL	51	%49.0	1	%1.0	-	-	52
P <0.05							

Tablo 4: FV G1691A (Leiden) mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tabloda görüldüğü gibi istatistiksel değerlendirme sonucu elde edilen asymp. Sig. (2-sides) değeri ($p < 0.05$) anlamlı olduğu için heterozigot FVL genotipi düşüğe sebep olma ile ilişkilidir. Hasta ve kontrol grubunda homozigot vakamız olmadığından homozigot FVL'nin düşüklerle ilişkisi hakkında istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır.

GRUP	FV2 GENOTİPLERİ						
	W		Het		Hom		TOPLAM
	N	f (%)	N	f (%)	N	f (%)	
HASTA	46	%44.2	6	%5.8	-	-	52
KONTROL	50	%48.1	2	%1.9	-	-	52
	P >0.05						

Tablo 5: FV H1299R mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tabloda görüldüğü gibi istatistiksel değerlendirme sonucu elde edilen asymp. Sig. (2-sides) değeri ($p > 0.05$) anlamlı olmadığı için heterozigot FV2 genotipi düşüğe sebep olma ile ilişkili değildir.

GRUP	PTH GENOTİPLERİ						TOPLAM
	W		Het		Hom		
	N	f (%)	N	f (%)	N	f (%)	
HASTA	46	%44.2	6	%5.8	-	-	52
KONTROL	50	%48.1	2	%1.9	-	-	52
	P >0.05						

Tablo 6: Protrombin G20210A mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tabloda görüldüğü gibi istatistiksel değerlendirme sonucu elde edilen asymp. Sig. (2-sides) değeri ($p > 0.05$) anlamlı olmadığı için heterozigot PTH genotipi düşüğe sebep olma ile ilişkili değildir.

GRUP	FXIII GENOTİPLERİ						TOPLAM
	W		Het		Hom		
	N	f (%)	N	f (%)	N	F (%)	
HASTA	32	%30.8	18	%17.3	2	%1.9	52
KONTROL	32	%30.8	18	%17.3	2	%1.9	52
	P >0.05						

Tablo 7: FXIII Val34Leu mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tabloda görüldüğü gibi istatistiksel değerlendirme sonucu elde edilen “asymp. Sig. (2-sides) değeri ($p > 0.05$) anlamlı olmadığı için heterozigot ve homozigot FXIII genotipi düşüğe sebep olma ile ilişkili değildir.

GRUP	FGB GENOTİPLERİ						TOPLAM
	W		Het		Hom		
	N	f (%)	N	f (%)	N	f (%)	
HASTA	27	%26.0	23	%22.1	2	%1.9	52
KONTROL	31	%29.8	21	%20.2	-	-	52
	P >0.05						

Tablo 8: β -Fibrinojen -455G>A mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tabloda görüldüğü gibi istatistiksel değerlendirme sonucu elde edilen asymp. Sig. (2-sides) değeri ($p > 0.05$) anlamlı olmadığı için heterozigot *FGB* genotipi düşüğe sebep olma ile ilişkili değildir.

GRUP	PAI GENOTİPLERİ						TOPLAM
	W		Het		Hom		
	N	f (%)	N	f (%)	N	f (%)	
HASTA	12	%11.5	34	%32.7	6	%5.8	52
KONTROL	15	%14.4	30	%28.8	7	%6.7	52
	P >0.05						

Tablo 9: *PAI*-1 4G/5G mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tabloda görüldüğü gibi istatistiksel değerlendirme sonucu elde edilen asymp. Sig. (2-sides) değeri ($p>0.05$) anlamlı olmadığı için heterozigot ve homozigot PAI genotipi düşüğe sebep olma ile ilişkili değildir.

GRUP	HPA GENOTİPLERİ						TOPLAM
	W		Het		Hom		
	N	f (%)	N	f (%)	N	F (%)	
HASTA	37	%35.6	15	%14.4	-	%0.0	52
KONTROL	35	%33.7	16	%15.4	1	%1.0	52
	P >0.05						

Tablo 10: HPA1 a/b mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tabloda görüldüğü gibi istatistiksel değerlendirme sonucu elde edilen asymp. Sig. (2-sides) değeri ($p>0.05$) anlamlı olmadığı için heterozigot HPA genotipi düşüğe sebep olma ile ilişkili değildir.

GRUP	M677 GENOTİPLERİ						TOPLAM
	W		Het		Hom		
	N	f (%)	N	f (%)	N	F (%)	
HASTA	19	%18.3	28	%26.9	5	%4.8	52
KONTROL	37	%35.6	15	%14.4	0	%0.0	52
	P <0.05						

Tablo 11: MTHFR C677T mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tabloda görüldüğü gibi istatistiksel değerlendirme sonucu elde edilen asymp. Sig. (2-sides) değeri ($p < 0.05$) anlamlı olduğu için heterozigot ve homozigot MTHFR M677 genotipi düşüğe sebep olma ile ilişkilidir.

GRUP	M1298 GENOTİPLERİ						TOPLAM
	W		Het		Hom		
	N	f (%)	N	f (%)	N	F (%)	
HASTA	23	%22.1	26	%25.0	3	%2.9	52
KONTROL	34	%32.7	18	%17.3	0	%0.0	52
	P <0.05						

Tablo 12: MTHFR A1298C mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tabloda görüldüğü gibi istatistiksel değerlendirme sonucu elde edilen “asymp. Sig. (2-sides) değeri ($p < 0.05$) anlamlı olduğu için heterozigot MTHFR M1298 genotipi düşüğe sebep olma ile ilişkilidir.

GRUP	ACE GENOTİPLERİ						
	W		Het		Hom		TOPLAM
	N	f (%)	N	f (%)	N	f (%)	
HASTA	4	%3.8	26	%25.0	22	%21.2	52
KONTROL	14	%13.5	27	%26.3	11	%10.6	52
	P >0.05				P < 0.05		

Tablo 13: ACE I/D mutasyonunun düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tabloda görüldüğü gibi istatistiksel değerlendirme sonucu elde edilen asymp. Sig. (2-sides) değeri ($p < 0.05$) anlamlı olduğu için homozigot ACE genotipi düşüğe sebep olma ile ilişkilidir.

GRUP	ApoB GENOTİPLERİ						TOPLAM
	W		Het		Hom		
	N	f (%)	N	f (%)	N	f (%)	
HASTA	52	%50	-	-	-	-	52
KONTROL	52	%50	-	-	-	-	52
	P >0.05						

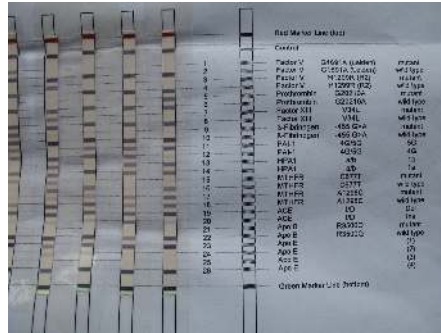
Tablo 14: APO B genotipinin düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tabloda görüldüğü gibi istatistiksel değerlendirme sonucu elde edilen asymp. Sig. (2-sides) değeri ($p > 0.05$) anlamlı olmadığı için heterozigot ve homozigot ApoB genotipi düşüğe sebep olma ile ilişkili değildir.

GRUP	ApoE GENOTİPLERİ						TOPLAM
	3*3		3*4		2*3		
	N	f (%)	N	f (%)	N	f (%)	
HASTA	39	%37.5	9	%8.7	4	%3.8	52
KONTROL	41	%39.4	7	%6.7	4	3.8%	52
	P >0.05						

Tablo 15: APO E genotiplerinin düşük yapan hastalar ve kontrol grubu açısından istatistiksel değerlendirmesi

Tabloda görüldüğü gibi istatistiksel değerlendirme sonucu elde edilen asymp. Sig. (2-sides) değeri ($p > 0.05$) anlamlı olmadığı için heterozigot ve homozigot ApoE genotipi düşüğe sebep olma ile ilişkili değildir.



Resim 4: Çalışılmış striplerin görüntüsü

TARTIŞMA

Tekrarlayan gebelik kayıplarının etiyolojisi ile ilgili olarak bugün için birçok mekanizma öne sürülmüş olmasına rağmen bu mekanizmalardan bazıları hala tam olarak açıklanamamıştır. Özellikle ilk trimestır tekrarlayan gebelik kayıplarında en önemli neden genetik nedenler olarak tanımlanmakta ve bu nedenler içerisinde de ilk sırayı kromozom anomalileri almaktadır. Bu nedenle, tekrarlayan gebelik kayıpları olan çiftlerde, dengeli yapısal anomali taşıyıcısı olup olmadıklarını belirlemek amacıyla ebeveynlerde kromozom analizlerinin yapılması gerekmektedir. Ancak tekrarlayan gebelik kaybı şikayetiyle başvuran hastaların öncelikli olarak beklentileri, gebelik kayıplarının nedenini öğrenmektir. Çiftlerin yaklaşık %3 ünde tekrarlayan düşüklere sebep olabilecek dengeli kromozom anomalisi saptanmaktadır. Kromozom analizi ile eşlerden birinde dengeli yapısal anomali saptanması gebelik kayıplarının nedenini açıklamakta ancak tedavi edilememektedir; yine de prenatal tanı olasılığı sunması önemlidir. Yapılan kromozom analizi neticesinde normal karyotip saptanan hastalara, durumlarının belirsizliğini korumasından ötürü tatmin edici bir genetik danışma verilememektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, idiyopatik tekrarlayan gebelik kayıplarının multifaktoriyel olabileceğini, genetik yatkınlık ve çevresel faktörlerin patogeneze etkili olabileceğini vurgulamaktadır. Genetik yatkınlığın belirlenebilmesi; bu bilgiler ışığında çevresel faktörlerin değiştirilebilecek olması nedeniyle, sonraki gebeliklerin sağlıklı sürme şansını arttırmak açısından faydalı olabilir.

Trombofilik ailelerde gözlemlenen trombozisin değişken görünüşleri ve klinik fenotiplerinin heterojenitesi venöz trombozise yatkınlığın çeşitli genetik defektlerin kombinasyonundan kaynaklandığı hipotezine götürmektedir. Faktor V (FV) R506Q (Leiden mutation) ve protrombin (PT) 20210G/A mutasyonu gibi popülasyondaki fonksiyonel polimorfizmler risk faktörleri olarak ana rolü oynamaktadırlar. FV R506Q APC-aracılıklı FVa inaktivasyonunu baskılar (APC direnci). PT 20210G/A mutasyonu ise dolaşan PT konsantrasyonunda artışa sebep olur. Bu iki polimorfizm kombinasyonları ve diğer trombofilik defektler trombofilik hastalarda belirlenmiştir (Prisco D, 1998. Cattaneo M1999 Wulf GM, 1999;. De Stefano V., 1999).

Diğer polimorfik FV alleli olarak (FV H1299R, R2 olarakta bilinir) 4072. pozisyonadaki A→G dönüşümü diğer bir çok FV gen polimorfizmine (HR2 haplotipi) bağlı olduğu bulunarak tanımlanmıştır. FV H1299R alleli taşıyıcılığı ılımlı APC direnci ve plazmada daha fazla trombojenik izoform fazlalığı ile ilişkilidir. FV H1299R mutasyonu FV R506Q mutasyonu taşıyıcılarında venoz tromboz riskinde artışa sebep olur ve kendi başına da ayrıca bir trombotik risk faktörüdür (Faioni EM, 1999; Alhenc-Gelas M, 1999).

Faktör V ve Faktör II protrombin insanlarda koagülasyon kaskatının ana unsurlarıdır. FV ve F2 genlerindeki yaygın polimorfizmler (F5 Leiden G1691A ve F2 G20210A) trombofili, kardiyovasküler hastalıklar ve gebelikle ilişkili komplikasyonlar ile ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur (Tempfer CB, 2004, Rey E, 2003).

Faktör V Leiden mutasyonu en yaygın kalıtsal trombofilik defektir. Venöz tromboembolizme sahip olan hastaların yaklaşık olarak %20'si bu mutasyonu taşır. Kafkas ırkında bu mutasyonun prevalansı %4-%7 iken Kafkas olmayanlarda ise %0-%1'dir (Rees DC, 1995; Ridker PM, 1997.). Pıhtılaşma faktörü V'in kodlama bölgesindeki bu nokta mutasyonu (G1691A) APC (activated protein C) için aktif bölgede yer alan argininin glutamine dönüşmesi sonucu oluşmuştur.

Protrombin 20210A mutasyonu protrombin geninin promotor bölgesindedir. Bu mutasyon wild tipe genotipine göre protrombinin ekspresyonunda artışa sebep olur. Kafkas ırkında Protrombin 20210A mutasyonunun prevalansı %2-%3, Kafkas olmayanlarda ise %0-%1dir. Venoz trombozlu hastalarda ise %6'dır (Dilley A, 1998, Rosendaal FR, 1998; Cumming AM, 1997;). Protrombin mutasyonu taşıyanlarda tekrarlayan düşük riskinde iki kat artma meydana gelmektedir (Michiel Coppens, MD 2006).

FV Leiden ve protrombindeki mutasyonlar bu mutasyonları taşıyanların taşımayanlara göre yaklaşık olarak geç fetal kayıp riskinde üç kat artışa (%6 - %16) sebep olmaktadır (Martinelli, I. et al. 2000). The European Prospective Cohort on Thrombophilia (EPCOT)'un kalıtsal trombofilili hastaların çok merkezli değerlendirmesi çalışmasında, birinci- ikinci-trimester gebelik kayıpları ile FVL'nin ilişkili olmadığını fakat gebeliğin 28. haftasından sonra gerçekleşen fetal kayıpların riskinde iki kat artma olduğunu ortaya koymuştur (Preston, F.E. ve ark. 1996) 128

FVL mutasyon taşıyıcısı ve 461 kontrolün bulunduğu diğer bir çalışmada ise en az 2 kez düşük yapma veya infertilite problemlerine sahip olma riski FVL mutasyonuna sahip olanlarda 2.5 kat daha yüksek bulunmuştur (Bare, S.N. et al. 2000) Bizim çalışmamızda FVL mutasyonu hasta gurubumuzda anlamlı olarak sık bulunurken Protrombin 20210A mutasyonu ile FV H1299R mutasyonu anlamlı olarak farklı bulunmamıştır. Bu mutasyonların prevalansı FVL e göre daha düşük olduğu için daha büyük guruplarda değerlendirilmeleri faydalı olabilir.

Plazminojen, doku plazminojen aktivatörü (t-PA), urokinaz tip plazminojen aktivatörü (u-PA) ve koagülasyonun kontakt aktivasyonu ile fibrinolitik yol başlatılır. Çeşitli aktivasyon mekanizmaları ile oluşan plazminin tripsin gibi belirli bir substrat spesifitesi yoktur. Fizyolojik şartlar altında plazminin fibrinolitik aktiviteleri fibrin tarafından sıkı bir şekilde sınırlandırılır. Dolaşan serbest plazmin ve aktivatörleri plazminojen aktivatör inhibitörleri (PAI-1, -2, -3), alfa2antiplazmin, alfa2makroglobülin tarafından inhibe edilirler. Plazma t-PA'nın inhibisyonundan PAI-1 sorumludur. PAI-2 ise orjinal olarak insan plasentasından saflaştırılan sepinlerdendir. PAI-2 sadece gebelik esnasında dolaşımda anlamlı konsantrasyonlarda bulunur (Michal G. Biochemical Pathways. A John wiley & Sons. Inc: and Spectrum Akademischer Verlag Co-Publication. Berlin, 1999, First edition. Chapter 20, Pp. 251-257).

PAI-1 geni için transkripsiyon başlangıç bölgesinin upstreaminin 675 baz çifti bilgesine lokalize bir biri ardı sıra gelen ya 4 ya da 5 G rezidüsü yaygın tek baz insersiyon/delesyonu poimorfizminin, transkripsiyon aktivitesindeki değişiklik ile ilgili olduğu bulunmuştur. 4G/5G polimorfizminin iki allelinin frekansı yaklaşık olarak birbirine eşittir ve in vitro çalışmalar anlamlı olarak daha yüksek transkripsiyonel aktivite ile ilişki olan allelin 4G alleli olduğunu belirlemiştir. 4G alleli için homozigot olan bireyler diğer genotiplerde olanlardan anlamlı olarak daha yüksek plazma PAI-1 seviyeleri sahiptirler. Epidomiolojik çalışmalar bu polimorfizmin arteriyel veya venoz tromboz ile olan ilişkisini tam olarak onaylamamıştır. Avrupada yapılan geniş kapsamlı çalışmalarda 4G allelinin artmış PAI-1 seviyesi arasında korelasyon olduğu fakat bu durumun MI için bir risk oluşturmadığı bildirilmiştir (Ye S ve ark1995).

Kusurlu fibrinoliz arteriyel ve venöz trombozun gelişiminde rol oynayabilir. Venöz trombozlu hastaların başlıca artmış PAI-1 seviyesinden dolayı bozulmuş fibrinolitik kapasitenin artmış prevalansına sahip oldukları bulunmuştur. Dolaşan plazmada, PAI-1 tPA'ya göre molar olarak daha fazladır ve bu fazla PAI-1'in sistemik fibrinolizin gelişimini engellediği ve sistemik kanama olmaksızın lokal pıhtı lizisini sağladığı dikkate alındığında, PAI-1 fibrinolitik olayların düzenlenmesinde en önemli belirleyici olarak görülmektedir. Çevresel ve genetik faktörler PAI-1'in sentezini etkilemektedirler. Glukokortikoidler, sitokinler, lipolisakkaritler ve insülin, transkripsiyonel bölgede PAI-1 sentezini düzenler. Bu modülatörlere ilaveten ACE kan-basıncı regülasyonun yanı sıra ilave bir fizyolojik fonksiyon olarak PAI-1 konsantrasyonunun düzenlenmesinde de rol oynar (Lijnen, H.R. 2005).

PAI-1 genindeki 4G/4G polimorfizminin neden olduğu. hipofibrinolizis preeklampsi, intrauterin gelişme geriliği, plasental abrupstion ve ölü doğumu içeren gebelik komplikasyonları için bir risk faktörü olarak görülmektedir. Fibrinolizin ana inhibitörü olan PAI-1'in bozulmuş ekspresyonu erken plasental dolaşımda fibrin birikimini artırarak ve trofoblast gelişimini sınırlayarak tekrarlayan gebelik kayıplarına sebep olabilir (Glueck, C.J. et al. (2000), (Buchholz, T. 2003) (Kwang-Hyun Baek 2007).

R3500Q mutasyonu coğrafik ve popülasyon dağılımı oldukça fazla değişim gösterir. R3500Q prevalansı Avrupada 1:1250 kadar düşük ve 1:71 kadar yüksek olabilir (Horvath A, Ganev V (2001). Çin, Belçika, İsviçre, Rusya, Türkiye' deki ailesel hiperkolesterolemik hastalardaki frekansları sırasıyla 1/373, 1/250, 1/209, 0, 0'dır (Teng YN ve ark. 2000) (Kotze ve ark. 1994) (Miserez ve ark. 1994) (Zakharova ve ark 2005) (Sozen MM, ve ark2005). R3500Q mutasyonu günümüz Avrupasının İsviçre-Alman bölgesinde ortaya çıkan founder effect den oluştuğu ve buradan diğer toplumlara dağıldığı ileri sürülmektedir (Rauh, G. Ve ark, 1993).

Türk popülasyonunda FH (familial hyperkolesterolemi) ve sağlıklı kişiler üzerinde yapılan çalışmalarda R3500Q mutasyonuna rastlanılmamıştır. Yapılan çalışmalar bu mutasyonun Türk toplumu için oldukça nadir olduğunu göstermektedir (Mahley RW, ve ark1995). 50. düşük HDL li ve 50 kontrol toplam 100 kişide yapılan R3500Q mutasyonu analizinde de bu mutasyona rastlanılmamıştır. Biz de çalışmamızda bu mutasyona her iki grubumuzda da rastlamadık ancak gerek

Mahley'in çalışmasında gerekse bizim çalışmamızda olgu sayısı çok fazla olmadığından bu konuda daha geniş çalışmalar faydalı olacaktır.

Metilentetrahidrofolat redüktaz, metilen-H4 folatı metil-H4 folata NHDPH-bağımlı redüksiyonunu katalizleyen sitoplazmik bir enzimdir. Vitamin B12 bu enzimi kofaktörüdür ve ayrıca bu reaksiyon folata bağımlıdır. Metil-H4 folat metiyonin sentaz tarafından katalizlenen reaksiyonda homosisteinin metilasyonu için metil vericisi olarak görev yapar. Bu iki enzim adenzil metiyonini kullanan metilasyon reaksiyonları için tek bir karbon birimi sağlayıcılarıdır. MTHFR enziminin aktivitesi adenzilmetiyonin seviyesiyle düzenlenir.

Yükselmiş plazma homosistein konsantrasyonu ya beslenme bozukluğuna ya da bu metabolik yoldaki moleküler defektlere bağlıdır. Her iki duruma bağlı olarak ortaya çıkan homosisteinemi ateroskleroz, venöz tromboz plasental abruption, preeklampsi ve nöral tüp defektleriyle ilişkilidir (Kluijtmans LA, 1996; Rees MM, 1993; Berry RJ, 1999; Steegers-Theunissen RP, 1992; Rajkovic A, 1997).

MTHFR genindeki 677C—T polimorfizmi enzimin termolabilitesinde artış ve aktivitesinde azalma ile ilişkilidir (Kang SS, 1998). En yaygın MTHFR polimorfizmi C677T varyantıdır. Fransız-Kanadalılarında ve diğer Kuzey Amerikalılarda T allelinin frekansı %35-40 civarındadır. Fakat bu polimorfizmin frekansı farklı etnik gruplarda değişebilir. MTHFR genindeki diğer bir mutasyon da 1298A---C'dir. Bu polimorfizm de enzim aktivitesinde azalmaya sebep olur. Yine aynı exonda sessiz genetik bir varyant olan 1317T—C Afrikalılarda yaygındır. Bu üç mutasyonun her ikisi homozigot formda bir arada bulunmamaktadır (Rosenblatt DS, Fenton WA. Inherited disorders of Folate and Cobalamin transport and metabolism. Chapter 155. 1897-3933).

Biz çalışmamızda 677C—T polimorfizminin allel frekanslarını abortuslu ve kontrol gurubunda anlamlı farklılıklar saptadık ve MTHFR C677T polimorfizminin genetik bir bileşen olarak abortusa neden olduğu sonucuna vardık. Sonucumuz literatür bilgileriyle uyumludur ancak hastalar değerlendirilirken abortus, multifaktöriyel bir hastalık olarak göz önüne alınmalı, MTHFR polimorfizmleri tek başına değil homosistein seviyeleri kofaktörlerle birlikte değerlendirilmelidir.

ACE ekspresyonu ACE geninin 16. intronundaki insersiyon (I)/delesyon (D) polimorfizmi ile ilişkilidir. PAI-1 4G aleli ile karşılaştırıldığında ACE D alleli PAL-

1 ekspresyonunda artışa sebep olur ve buna bağı olarak da fibrinolisiste azalma meydana gelir (Kim, D.K., 1997). ACE ve PAL-1 ekspresyon seviyeleri erken gebelik evrelerinde etkili olduklarından ACE D/I ve PAI-1 4G/5G polimorfizmleri tekrarlayan düşüklerdeki prevalansları son yıllarda değerlendirmeye alınmıştır. Buchholz ve arkadaşları ACE geninin D allelleri için homozigot olanlarda artmış PAI-1 konsantrasyonları ve hipofibrinolizisin artmış tekrarlayan düşük riskiyle ilişkili olduklarını bulmuşlardır. Buchholz ve arkadaşları aynı çalışmada ACE geninin D/D genotipi ile PAI-1 promotorunun iki 4G allelleri kombinasyonunun PAI-1 plazma seviyesinde daha fazla artışa sebep olduğunu ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tekrarlayan düşüklerdeki frekansı anlamlı olarak daha yüksek olduğunu da göstermişlerdir (Buchholz, T. (2003). Bizim çalışmamızda ise ACE geninin D/D genotipine sahip abortuslu grupta allel frekansları kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmasına rağmen PAI-1 genindeki 4G/5G allel frekansları kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gözlenmedi. Çalışmamızda PAI-1 4G alleli heterozigot olarak abortuslu gruptaki frekansı kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. ACE DD genotipi ile PAI1 heterozigotluğuna bakıldığında hasta gurubumuzda 52 hastadan 12 sinde saptanmışken (0.23) kontrol gurubumuzda sadece 4 hastada bu birliktelik saptanmıştır (0.07). Bu sonuç da poligenik hastalıklarda polimorfizmlerin tek başına değil mümkün olduğunca ilişkili diğer polimorfizmlerle birlikte değerlendirilmesinin önemine işaret etmektedir.

ApolipoproteinB 100 (ApoB-100) LDL'nin (low density lipoprotein) yegane integral protein bileşenidir. ApoB-100, LDL reseptörünün ligandıdır. ApoB'nin LDL-reseptör-bağlama domeninde meydana gelen mutasyonlar LDL partiküllerinin LDL reseptörüne bağlanmasını etkilemektedir. Dolayısıyla mutant LDL partiküllerinin LDL reseptörüne bağlanmasındaki fonksiyonel aktivite kaybı LDL partiküllerinin dolaşımdan temizlenmesinde gecikmeye neden olur. LDL'lerin plazmadan temizlenmesindeki yetersizliğe bağı olarak artan plazma LDL seviyeleri aterosklerotik kardiyovasküler hastalıkların önemli bir risk faktörüdür (Innerarity Tve ark.1990).

Maternal dolaşımdan sağlanan lipidler fetal büyümenin ve beyin gelişiminin sürdürülmesinde hayati bir öneme sahiptirler. Fare yolk sac hücrelerinde apoB ihtiva

eden lipoproteinlerin salınımına bağlı bozukluk sonucu embriyonik letalite gerçekleşmektedir. ApoB-100 karaciğerdeki sentezinin yanı sıra plasenta tarafından da sentezlenmektedir. Plasenta tarafından sentezlenen ApoB-100 anneden, gelişen bebeğe lipid transferinde önemli rol oynamaktadır (Eva M.ve ark. 2004).

Apo B-reseptör-bağlama bölgesindeki nokta mutasyonlarından biri Arg3500Gln'dir. Arg3500Gln mutasyonu ailesel ligand defektif bireylerin çoğunda bu allel bakımından heterozigottur. Bu mutasyon Avrupada yaygındır ve ailesel hiperkolesterolemik hastaların % 2-5'i defektif allel için heterozigottur (Soria LF ve ark. 1989). Danimarkada bu mutasyonun prevalansı 1/1000'dir (Tybjaerg-Hansen A ve ark. 1998 Apo B genindeki diğer bir mutasyon Arg3500Trp'dir. Bu mutasyon Avrupa popülasyonunda nadir olarak gözlenirken Çin toplumunda yaygın olarak bulunmaktadır (Gaffney D et al. 1995). Diğer üçüncü bir Apo B varyantı ise Arg3531Cys'dir. Arg3531Cys varyantı hiperkolesterolemik bireylerde bulunmasına rağmen daha sonra yapılan çalışmalar bu varyantın prevalansının genel popülasyon ile hiperkolesterolemik grup arasında önemli bir farklılık olmadığını göstermiştir (Tybjaerg-Hansen A ve ark. 1998).

Apo E, VLDL, IDL ile HDL yapısında bulunur ve doku ve plazma arasında kolesterolün reseptör aracılı aktarılmasını sağlar. Apo E lipid metabolizmasındaki fonksiyonlarına ek olarak plazminojenin, plazminojen reseptörlerine bağlanmasında onunla yarışarak trombolizi inhibe edebilmektedir. Apo E2, E3 ve E4 olmak üzere en az 3 polimorfik şekli vardır. Apo E geninin 3 allelinin E2/ E 2, E 2/ E 3, E 2/ E 4, E 3/ E 3, E 3/ E 4 ve E 4/ E 4. olmak üzere 6 farklı kombinasyonu vardır. Şilomikron kalıntılarının azalmış hepatik alınımı, plazma VLDL ve HDL dönüşümündeki azalma kalıntı lipoprotein kalıntılarının plazmada artışına sebep olur. Kalıntı partiküllerinin karaciğer tarafından alınımı apo E' ye bağlıdır. Apo E'nin yapısal bozuklukları bu kalıntıların plazmada birikimine yol açar.

Apo E'nin altı fenotipi üç homozigot (E4/E4, E3/E3 ve E2/E2) ve üç heterozigot fenotipten (E4/E3, E3/E2 ve E4/E2) oluşmaktadır. Apo-E izoformları iki bölgede tek bir amino asit değişimiyle ortaya çıkmaktadır. Apo E2 112 ve 158. bölgede sistein rezidüsü, Apo E3'ün 112. amino asidi sistein 158. amino asiti ise arginin, Apo E4 de ise 112 ve 158. amino asitler arginindir. Apo E proteinindeki dolayısıyla genindeki farklılıklar Apo E'nin reseptörlerine bağlanma affinitesini

etkilemektedir. Apo E3 wild, Apo E2 ise mutant olarak bilinmektedir. Apo E2 diğer fenotiplere göre hepatik reseptörlere en düşük affinite (%1) ile bağlanan formdur. E2/E2 fenotipi ailesel tip III hiperkolesterolemide görülen fenotiptir. Bu fenotipe sahip bireyler premature vasküler hastalıklar için risk grubunda yer almaktadırlar (N. V. Bhagavan., 2002.).

Apo E'nin üç temel izoformunu kodlayan allellerin (APOE E 2, E 3 ve E4) nöronal gelişim ve tamirinde önemli görevleri vardır. Apo E4 izoformu wild tip olan apo E-3 izoformundan daha farklı affinite ile hepatik reseptörüne bağlanır. Zetterberg ve arkadaşları insan embriyonik gelişimi üzerine Apo E E4 allelinin etkisini araştırmışlardır. Spontan abortuslu gruptaki frekansını normal gruba göre daha düşük bulmuşlardır ve Apo E E 4 allelinin embriyonik gelişimde koruyucu rolü olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Zetterberg H, ve ark 2002). Çalışmamızdaki ve çeşitli toplumlardaki Apo E fenotipleri ve frekansları Tablo 16 da verilmiştir. Düzce bölgesinde yaptığımız bu çalışmada abortuslu grubun E4/3 fenotipine sahip olanların frekansları Türk populasyonu ve kontrol grubumuza göre yüksek bulunmuştur. Fakat bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). Bu sonuçlar Zetterberg ve arkadaşların sonuçları ile uyumlu değildir. Türk toplumunda E3 alleli ile karşılaştırıldığında E2 alleli düşük total kolesterol seviyesi E4 alleli ise yüksek total kolesterol seviyesi ile ilişkilidir. E3 alleli ise Türk toplumunda en yaygın olan alleldir. E2 ve E4 allellerinin Türk toplumunda lipid seviyesi üzerine etkileri ve abortustaki rolü daha geniş örnekleme araştırılması gereken bir konudur.

	ABD	Almanya	Finlandiya	Sudan	Japonya	Türkiye	Türkiye		
							Abortus N: 52	Kontrol N: 52	Toplam N:104
<u>Fenotip</u>									
E4/4	3.0	2.8	5.9	8.7	1.3	1.1	-	-	-
E4/3	14.0	22.9	35.5	35.9	11.3	12.9	17.3	13.4	15.8
E3/3	58.0	59.8	46.8	39.8	72.1	74.2	75.0	78.84	76.92
E3/2	22.0	12.0	9.9	9.7	13.8	10.6	7.6	7.6	7,6
E2/2	1.3	1.0	0.5	1.0	0.6	0.4	-	-	-
E4/2	2.0	1.5	1.5	4.9	0.9	0.8	-	-	-
<u>Allel</u>									
E 4	11.0	15.0	24.4	29.1	7.4	7.9			
E 3	76.0	77.3	69.5	61.9	84.6	86.0			
E 2	13.0	7.7	6.2	8.1	8.0	6.1			
<u>Referans</u>	45	46	47	47	47	48			

Tablo16: Çeşitli toplumlarda ve bu çalışmadaki apolipoprotein E fenotipleri ve frekansları (%) Breslow, J. L. 1986. 46. Utermann, G., A. 1982, Hallman, D. 1991, Mahley RW, 1995

GPIIIa reseptörü trombosit yüzeyinde en fazla bulunan reseptörlerdir. Bu reseptör trombosit agregasyonu yolunda anahtar bir bileşendir. Trombosit agregasyonu ve fibrin oluşumu normal homeostazisin sürdürülmesinde önemlidir. Birçok çalışmada GP IIIa L33P polimorfizmin arteriyel tromboz riskini artırdığı vurgulanmaktadır (Beer JH, 2000). Trombofilik eğilim tekrarlayan spontan düşüklerin altta yatan sebeplerinden biri olarak kabul edilir. Phusch ve arkadaşları ile Lucac ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda GP IIIa L33P polimorfizminin tekrarlayan spontan abortuslu grup ile kontrol grubu arasında allel frekansları bakımından anlamlı farklılıkların olmadığını belirlemişlerdir (Pihusch R, 2001, Lukas Hefler, 2004). Bizim sonuçlarımız da önceki çalışmalar ile uyumludur ve GPIIIa L33P polimorfizmi tekrarlayan düşüklerle ilişkili değil gibi görünmektedir, ancak belirli alt gruplarında veya klinik durumların belirli bir tipinde risk faktörü olabilir.

Epidemiolojik çalışmalar fibrinojen seviyelerindeki artışın koroner arter hastalığı, serebral vasküler yaralanma ve periferik vasküler hastalık ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Fibrinojen karaciğerden sentezlenen bir akut faz reaktanıdır. Fibrinojenin trombojenik etkileri ateromatoz plak oluşumu, kan viskozitesinde artma, konsantre fibrin birikimi ve artmış trombosit agregasyonu mekanizmaları ile karakterizedir. Fibrinojen seviyeleri üzerinde hem genetik ve hem de çevresel/fizyolojik etkenler rol oynar.

Mature fibrinojenin ihtiva ettiği üç polipeptid zincir α , β ve γ olmak üzere üç ayrı gen tarafından kodlanır. β zinciri sentezi fibrinojen sentezinde hız-sınırlayıcı basamaktır. Dolayısıyla β fibrinojen genini veya transkripsiyonunu etkileyen herhangi bir mutasyon plazma fibrinojen seviyeleri üzerinde etkili olacaktır. Fibrinojen geninde çeşitli polimorfizmler tanımlanmasına rağmen bu polimorfizmlerden G→A dönüşümü fibrinojen seviyeleri ve kardiyovasküler risk ile ilişkilidir. Bu dönüşüm gen transkripsiyonunun başlangıcının upstreamında, fibrinojen β geni promotörü 455. nükleotitlerinde oluşmaktadır.

-455A alelinin fibrinojen seviyeleri üzerine olan etkilerini belirleme amacıyla yapılan bir çok çalışma bu allelin sağlıklı Kafkas populasyonlarında fibrinojen seviyesini %7-%10 oranında artırdığını ve bu artışın kardiyovasküler hastalıklar için bir risk oluşturduğunu göstermiştir. Bu çalışmaları yanı sıra G→A dönüşümünün bir herediter trombofilik faktör olarak obstetrik komplikasyonlar arasındaki ilişki açık değildir (Scarabin PY, 1993, Roy SN, 1990; Gardemann A, 1997).

Goodman ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, PAI-1 4G/5G (P =0.009), Faktör XIII V34L (P < 0.0001), ve homozigot MTHFR C667T (P < 0.0001) mutasyonlarının kontrol gurubuna göre anlamlı olarak tekrarlayan gebelik kayıplarıyla ilişkili olduğunu bulmuşlardır ve trombojenik gen mutasyonlarının (Faktör V G1691A, Faktör V H1299R (R2), Faktör II protrombin G20210A, Faktör XIII V34L, beta-fibrinojen -455G>A, PAI-1 4G/5G, HPA1 a/b(L33P), MTHFR C677T, ve MTHFR A1298C) tekrarlayan gebelik kayıpları için risk altında bireylerde tanımlanması gerektiğini vurgulamaktadırlar (Goodman CS, 2006). Biz çalışmamızda tekrarlayan düşükleri olan kadınlarda FVL, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, ACE I/D, fenotiplerinin tek başlarına, PAI nin ise ACE ile birlikte anlamlı olarak daha sık görüldüğünü saptadık. Diğer polimorfizmler bizim populasyonumuz için anlamsız görünmekle birlikte ancak belirli alt gruplarda veya klinik durumların belirli bir tipinde risk faktörü olabilirler. Polimorfizmlerin tek başlarına değil birlikte değerlendirilmeleri faydalı görünmektedir. Daha büyük gruplarla yapılacak daha kapsamlı çalışmalar bu önemli hasta gurubu için klinik önem taşıyacak sonuçlar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Alhenc-Gelas M, Nicaud V, Gandrille S, et al. The factor V gene A4070G mutation and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 1999;81: 193-197
- Bare, S.N. et al. (2000) Factor V Leiden as a risk factor for miscarriage and reduced fertility. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 40, 186–190
- Beer JH, Pederiva S, Pontiggia L.. Genetics of platelet receptor single-nucleotide polymorphisms: clinical implications in thrombosis. *Ann Med.* 2000 Dec;32 Suppl 1:10-4
- Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, et al. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. *N Engl J Med* 1999;341:1485–90
- Breslow, J. L. 1986. Genetics of the human apolipoproteins. In *Biochemistry and Biology of Plasma Lipoproteins*. A. M. Scanu, and A. A. Spector, editors. Marcel Dekker, New York. 85-143.
- Buchholz, T. (2003) Polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes are associated with recurrent spontaneous miscarriages. *Hum. Reprod.* 18, 2473–2477
- Castoldi E *et al.* *Blood* 2004; 103; 4173-4179
- Endler G *et al.* *Clinica Chimica Acta* 2003; 330; 31-55
- Cattaneo M, Chantarangkul V, Taioli E, Santos JH, Tagliabue L. The G20210A mutation of the prothrombin gene in patients with previous first episodes of deep-vein thrombosis: prevalence and association with factor V G1691A, methylenetetrahydrofolate reductase C677T and plasma prothrombin levels. *Thromb Res.* 1999; 93:1-8
- Cumming AM, Keeney S, Salden A, et al. The prothrombin gene G20210A variant: prevalence in a UK anticoagulant clinic population. *Br J Haematol* 1997;98:353–5
- David A. Lane, Peter J. Grant Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease *Blood*,. Volume 95, Number 5 (2000) 1517-1532
- De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, et al. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *N Engl J Med.* 1999;341:801-806

Dikmen M. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR)Enziminin Moleküler Biyolojisi ve Hastaİklarla İlişkisi. Kocatepe Tıp Dergisi Mayıs 2004

Dilley A, Austin H, Hooper WC, et al. Prevalence of the prothrombin 20210 G-to-A variant in blacks: infants, patients with venous thrombosis, patients with myocardial infarction, and control subjects. J Lab Clin Med 1998;132:452–5.

Dossenbach Glaninger A. Michael van Trotsenburg. Martin Dossenbach ve ark. Plasminogen Aktivator İnhibitor I 4G/5G Polymorphism and Coagulation Factor XIII Val34Leu Polymorphism: Impaired Fibrinolysis and early Pregnancy Loss Chilinal Chemistry 49;7 1081-1086,2003

Endler G., Mannhalter C. Polymorphisms in Coagulation Factor Genes and Their İmpact on Arterial and Venous Thrombosis. Clinica Chimica Acta 330 (2003) 31-55

Erişim: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=omim&dopt=112452>
11.12.2008

Erişim: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=173470> 11.12.2008

Erişim: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=134820> 11.12.2008

Erişim: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=173360> 11.12.2008

Erişim: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=173610> 11.12.2008

Eva M. Madsen, Marie L. S. Lindegaard, Claus B. Andersen, Peter Damm and Lars B. Nielsen. Human Placenta Secretes Apolipoprotein B-100-containing Lipoproteins The Jornal of Biological Chemistry. Vol. 279, No. 53, Issue of December 31, pp. 55271–55276, 2004

Faioni EM, Franchi F, Bucciarelli P, et al. Coinheritance of the HR2 haplotype in the factor V gene confers an increased risk of venous thromboembolism to carriers of factor V R506Q. Blood. 1999; 94:3062-3066

Familial hypercholesterolemia in St-Petersburg: the known and novel mutationsfound in the low density lipoprotein receptor gene in Russia. BMC Med Genet 8:6

Gaffney D et al. (1995) Independent mutations at codon 3500 of the apolipoprotein B gene are associated with hyperlipidemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15: 1025–1029

Gardemann A, Schwartz O, Haberbosch W, Katz N, Weiss T, TillmannsH, et al. Positive association of the beta fibrinogen H1/H2 gene variationto basal fibrinogen levels and to the increase in fibrinogen concentrationduring acute phase reaction but not to coronary artery disease andmyocardial infarction. Thromb Haemost 1997; 77:1120–1126

Glueck, C.J. et al. (2000)The 4G/4G polymorphismof the hypofibrinolytic plasminogen activator inhibitor type 1 gene: an independent risk factor for serious pregnancy complications. Metabolism

49, 845–852. Buchholz, T. (2003) Polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes are associated with recurrent spontaneous miscarriages. *Hum. Reprod.* 18, 2473–2477

Goodman CS, Coulam CB, Jeyendran RS, Acosta VA, Roussev R. Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? *Am J Reprod Immunol* 2006 56:230–236

Güneş A.M. Baytan B. Günay Ü. Çocukluk Çağında Kalıtsal Tromboz Uludağ Üniversitesi Tıp Dergisi 2001

Hallman, D. M., E. Boerwinkle, N. Saha, C. Sandholzer, H. J. Menzel, A. Cshir, and G. Utermann. 1991. The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 338-349

Henrik Zetterberg, Mona Palme´ r, Anne Ricksten, Judes Poirier, Lars Palmqvist, Lars Rymo, Alexander Zafirooulos, Demetrios A. Arvanitis, Demetrios A. Spandidos, Kaj Blennow. Influence of the apolipoprotein E E 4 allele on human embryonic development. *Neuroscience Letters* 324 (2002) 189–192

Horvath A, Ganey V (2001) The mutation APOB-100 R3500Q in Eastern Europe. *Atherosclerosis* 156:241–242

Innerarity T, Mahley R, Weisgraber K et al (1990) A mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 31:1337–1349.)

Kang SS, Wong PV, Zhou JM, Sora J, Lessicik M, Ruggie N, Greevich G. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in patient with coronary artery disease. *Metabolism*, 1998; 37: 611-3

Kessler C. et al. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* 1997; 17 : 2880-2884

Kim, D.K., Kim, J.W., Kim, S. et al. (1997) Polymorphism of angiotensin converting enzyme gene is associated with circulating levels of plasminogen activator inhibitor-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17, 3242-3247

Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, van Oost BA, et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk for cardiovascular disease. *Am J Hum Gen* 1996;58: 35–41

Kohler HP et al. *Thromb Haemost* 1999; 82: 8-13 Catto A et al. *Stroke* 1998; 29: 813-816

Kotze MJ, Peeters AV, Langenhoven E, Wauters JG, Van Gaal LF (1994) Phenotypic expression and frequency of familial defective apolipoprotein B-100 in Belgian hypercholesterolemics. *Atherosclerosis* 111:217–225

Kwang-Hyun Baek, Eung-Ji Lee and Yong-Soo Kim. Recurrent pregnancy loss: the key potential mechanisms *TRENDS in Molecular Medicine* 2007. Vol.13 No.7 310-317

Lijnen, H.R. (2005) Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J. Thromb. Haemost.* 3, 35–45

Lukas Hefler, Stefan Jirecek, Kurt Heim, Chnrstoph Gnmm, Gisella Antensteiner,Robert Zeillinger,Peter Husslein, Clemens Tempfer, Genetic Polymorphisms Associated

WithThrombophilia and Vascular Disease in WomenWith Unexplained Late Intrauterine Fetal Death:A Multicenter Study Journal of the Society for Gynecologic Investigation 2004; 11; 42,- 44

Mahley RW, Palaoglu KE, Atak Z, Dawson-Pepin J, Langlois AM, Cheung V, et al. Turkish Heart Study: lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. J Lipid Res 1995;36:839–59

Mahley RW, Palaoglu KE, Atak Z, Dawson-Pepin J, Langlois AM, Cheung V, et al. Turkish Heart Study: lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. J Lipid Res 1995;36:839–59

Martinelli, I. et al. (2000) Mutations in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss. N. Engl. J. Med. 343, 1015–1018

Michal G. Biochemical Pathways. A John Wiley & Sons, Inc. and Spectrum Akademischer Verlag Co-Publication. Berlin, 1999, First edition. Chapter 20, Pp. 251-257

Michiel Coppens, MD, Stef P. Kaandorp, Saskia Middeldorp. Inherited Thrombophilias. Obstet Gynecol Clin N Am 33 (2006) 357–374

Miserez AR, Laager R, Chiodetti N, Keller U (1994) High prevalence of familial defective apolipoprotein B-100 in Switzerland. J Lipid Res 35:574–583

N. V. Bhagavan. Plasma Lipoproteins In Medical Biochemistry. Chapter 20, fourth edition, Academic press, London, 2002, Pp. 429-451

Paidas MJ, De-Hui W, Ku, Langhoff-Roos J, Arkel YS. Inherited Thrombophilias and Adverse Pregnancy Outcome; Screening and Management Seminars in Perinatology (2005) 150-163

Pihusch R, Buchholz T, Lohse P, Rübsamen H, Rogenhofer N, Hasbargen U, Hiller E, Thaler CJ. Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. Am J Reprod Immunol. 2001 Aug;46(2):124-31

Preston, F.E. et al. (1996) Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. Lancet 348, 913–916

Prisco D, Gori AM, Pepe G, et al. Factor II 20210 G—Apolymorphism associated to factor V Leiden: a report of two thrombophilic families. Thromb Res. 1998;89:249-252

Rajkovic A, Catalano PM, Malinow MR. Elevated homocyst(e)ine levels with preeclampsia. Obstet Gynecol 1997; 90:168 –71

Rauh, G., H. Schuster, C. K. Schewe, G. Stratmann, C. Keller, G. Wolfram, and N. ZBllner. 1993. Independent mutation of arginine(,sw)~glutamine associated with familial defective apolipoprotein B-100. J. Lipid Res. 34: 799-805

Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. Lancet 1995;346:1133–4

Rees MM, Rodgers GM. Homocysteinemia: Association of a metabolic disorder with vascular disease and thrombosis. Thromb Res 1993;71:337–59

Ridker PM, Miletich JP, Hennekens CH, et al. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening. JAMA 1997;277: 1305–7

Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, et al. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998;79:706–8

Roy SN, Mukhopadhyay G, Redman CM. Regulation of fibrinogen assembly. Transfection of Hep G2 cells with B₂ cDNA specifically enhances synthesis of the three component chains of fibrinogen. *J Biol Chem* 1990; 265:6389–6393

Scarabin PY, Bara L, Ricard S, Poirier O, Cambou JP, Arveiler D, et al. Genetic variation at the beta-fibrinogen locus in relation to plasma fibrinogen concentrations and risk of myocardial infarction. The ECTIM Study. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:886–891

Slovik A. et al. *Stroke* 2004; 35: 1589-1593

Soria LF et al. (1989) Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 587–591

Sozen MM, Whittall R, Oner C, Tokatli A, Kalkanoglu HS, Dursun A, Coskun T, Oner R, Humphries SE (2005) The molecular basis of familial hypercholesterolaemia in Turkish patients. *Atherosclerosis* 180(1):63–71

Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Eskes TK. Hyperhomocysteinaemia and recurrent spontaneous abortion or abruptio placentae. *Lancet* 1992;339: 1122–3

Tempfer CB, Schneeberger C, Huber JC. Applications of polymorphisms and pharmacogenomics in obstetrics and gynecology. *Pharmacogenomics* 2004;5:57–

Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 2003;361:901-908

Teng YN, Pan JP, Chou SC, Tai DY, Lee-Chen GJ (2000) Familial defective apolipoprotein B-100: detection and haplotype analysis of the Arg(3500)–>Gln mutation in hyperlipidemic Chinese. *Atherosclerosis* 152(2):385–390

(The metabolic and molecular bases..) Rosenblatt DS, Fenton WA. Inherited disorders of Folate and Cobalamin transport and metabolism. Chapter 155. 1897-3933

Tybjaerg-Hansen A et al. (1998) Association of mutations in the apolipoprotein B gene with hypercholesterolemia and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 338: 1577–1584

Tybjaerg-Hansen A et al. (1998) Association of mutations in the apolipoprotein B gene with hypercholesterolemia and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 338: 1577–1584

Utermann, G., A. Steinmetz, and W. Weber. 1982. Genetic control of human apolipoprotein E polymorphism: comparison of one- and two-dimensional techniques of isoprotein analysis. *Hum. Genet.* 60 344-351

Wulf GM, Van Deerlin VM, Leonard DG, Bauer KA. Thrombosis in a patient with combined homozygosity for the factor V Leiden mutation and a mutation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1999; 2:107-110.

Ye S, Gren FR, Scarabin PY, et al. The 4G/5G genetic polymorphism in the promoter of the plasminogen activator protein-1 (PAI-1) gene is associated with differences in plasma PAI-1 activity but not with risk of myocardial infarction in the ECTIM study. *Tromb Haemost.* 74: 837,1995