



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

132344

**FAKTÖR V A4070G, METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ
A1298C VE PLAZMİNOJEN AKTİVATÖR İNHİBİTÖRÜ-1 4G/5G
MUTASYONLARININ, SEBEBİ AÇIKLANAMAYAN
GEBELİK KOMPLİKASYONLARINDAKİ SIKLIĞININ
SAPTANMASI VE YORUMLANMASI**

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

CAN ERZİK
DOKTORA TEZİ

132344

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Beyazıt ÇIRAKOĞLU

İSTANBUL - 2003

I. TEŞEKKÜR

Akademik çalışma hayatım boyunca, bana tüm hoşgörüsünü ve bilgisini sunarak, çalışmalarımı sürdürmeme olanak veren, Sayın Prof. Dr. Beyazıt Çırakoğlu'na,

Deneyimlerini ve bilgisini her zaman içtenlikle ve dostça paylaşan Sayın Prof. Dr. Ayşe Özer'e,

Desteğe gereksinim duyduğum her anda yanımda olan, Sayın Yard. Doç. Dr. İlter Güney'e,

Birlikte çalışma fırsatı bulduğum zaman esirgmeden öğreten, uzakta da olsalar, yardım elini uzatan arkadaşlarım Doç. Dr. Nedime Serakıncı ve Dr. Uluhan Sili'ye,

Dostluğuna hep değer verdiğim ve bu çalışmanın klinik aşamalarını titizlikle destekleyen, arkadaşım Uzm. Dr. Bülent Kars'a ve çalışmanın gerçekleşmesine olanak tanıyan Sayın Uzm. Dr. Birol Cengizoğlu'na, tez çalışmasına verdiği destekten dolayı Sayın Uzm. Dr. Aytaç Keskin'e

Çalıştığımız her anı ve uğraştığımız her sıkıntıyı paylaştığımız, değerli arkadaşlarım MSc. Bio. Rıfat Bircan, MSc. T. Bio. Mustafa Akkiprik ve Dr. Kaya Bilgüvar'a,

Bölümde bizimle ilgili herhangi bir işin aksamaması için, neşesini yitirmeden uğraşan Çiğdem Albayrak'a, deneylerimizde yardımını hiç esirgemeyen MSc. Bio. Serap Şahin'e,

Hep destekleyen ve bıkmadan hep yol gösteren canım anne ve babama,

Hep yanımda olan ve sevgisini karşılıksız veren canım karıma,

içtenlikle teşekkür ederim.

II. İÇİNDEKİLER

I. Teşekkür	I
II. İçindekiler	II
III. Kısaltmalar ve Simgeler	V
IV. Şekil, Resim ve Tabloların listesi	VI
1. Özet	1
2. Summary	2
3. Giriş ve Amaç	3
4. Genel Bilgiler	5
4.1 Plasenta	5
4.1.1 Plasenta Anatomisi	5
4.2 Hemostaz	6
4.3. Normal Gebelikte Hemostaz	11
4.3.1 Genel Değişiklikler	11
4.3.2 Trombositler	11
4.3.3 Pıhtılaşma	12
4.3.4 Fibrinoliz	13
4.4 Gebelik Komplikasyonları	13
4.4.1 Preeklampsi, Eklampsi	13
4.4.1.1 Tanı	14
4.4.1.2. Epidemiyoloji, Etiyoloji	15
4.4.2 HELLP sendromu	17
4.4.3 Plasenta Dekolmanı	18
4.4.4 İntrauterin Gelişme Geriliği	19
4.4.5 İntrauterin Fötüs Ölümü	20
4.4.6 Tekrarlayan Düşük	20
4.5 Kalıtsal Tromboz Yatkınlığı	21
4.5.1 Genel Bilgi	21
4.5.2. Sınıflandırma	22
4.5.3 Etiyoloji	23

4.5.3.1 Doğal Pıhtılaşma İnhibitörlerinin Eksikliği	23
4.5.3.2 Etkinleşmiş Protein C Direnci – Faktör V Leiden Mutasyonu	25
4.5.3.3 Homosisteinemi	27
4.5.3.4 MTHFR Geni ve Polimorfizmleri	31
4.5.3.5 Fibrin Yıkım Yetmezliği	32
4.6 Tromboz Yatkınlığı ve Gebelikteki Vasküler Komplikasyonlar	34
4.6.1 Gebelikte Venöz Tromboemboli	34
4.6.2 Preeklampsi	35
4.6.3 Plasenta Dekolmanı	37
4.6.4 İntrauterin Gelişme Geriliği	38
4.6.5 İntrauterin Fötüs Ölümü	38
4.6.6 Tekrarlayan Düşük	39
5. Gereç – Yöntem	40
5.1 Gereçler	40
5.1.1 Cihazlar	40
5.1.2 Kimyasal Maddeler	41
5.1.2.1 Tampon Çözeltiler	42
5.2 Yöntem	45
5.2.1 Hasta ve Kontrol Grubunun Belirlenmesi	45
5.2.2 Genetik İnceleme	46
5.2.2.1 Kan Örneklerinin Alınması	46
5.2.2.2 DNA Ayırıştırması	46
5.2.2.3 DNA Yoğunluğunun Belirlenmesi	48
5.2.2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	48
5.2.2.5 PZR Optimizasyonu	50
5.2.2.6 Alele Özgü PZR	54
5.2.2.7 PZR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimiyle Kesimi	55
5.2.2.8 PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezi	60
5.2.2.9 Restriksiyon Kesim Ürünlerinin Jel elektroforezi	61
5.2.2.10 Elektroforez Sonrası Örneklerin Görüntülenmesi	62
5.2.2.11 Homosistein Ölçümü	63

5.2.3 İstatistiksel İnceleme	63
6. Bulgular	64
6.1 DNA Ayrıştırması	64
6.2 Deneklerin Demografik ve Klinik Verileri	64
6.3 Deneklerin Genotip Verileri	68
6.3.1 Faktör V A4070G Mutasyonu	68
6.3.2 MTHFR A1298C Polimorfizmi	70
6.3.3. PAİ-1 4G/5G Polimorfizmi	71
6.4 Komplikeasyonlu Gebeliklerin Tanılarına Göre Genotip Dağılımı	72
7. Tartışma ve Sonuç	75
8. Kaynaklar	83
9. Özgeçmiş	96



III. KISALTMALAR ve SİMGELER

ACOG:	American College of Obstetricians and Gynecologists
ANOVA:	analysis of variance
AT-III:	antitrombin III
dATP:	deoksiadenozin trifosfat
dCTP:	deoksisitozin trifosfat,
dGTP:	deoksiguanozintrifosfat
DİK:	disemine intravasküler koagulasyon
DNA:	deoksiribo-nükleik asit
dNTP:	deoksinükleotidtrifosfat
dTTP:	deoksitimidintrifosfat
DVT:	derin ven trombozu
EDTA:	etilendiamintetra asetik asit
EPCOT:	European Prospective Cohort on Thrombophilia
ER-1:	östrojen reseptörü-1
fV:	Faktör V
fVL:	faktör V Leiden
HELLP:	hemoliz, karaciğer enzimlerinde artış, trombositopeni sendromu
İUGG:	intrauterin gelişme geriliği
İUMF:	intrauterin fetal ölüm
MTHF:	metiltetrahidrofolat
MTHFR:	metilentetrahidrofolat redüktaz
OY:	optik yoğunluk
PAİ:	plazminojen aktivatör inhibitörü
PZR:	polimeraz zincir reaksiyonu
RPUP:	restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
TB:	trofoblast
TEMED:	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
VTE:	venöz tromboemboli

IV. ŞEKİL, RESİM ve TABLOLARIN LİSTESİ

i.Şekillerin listesi

Şekil 4.1 – Hemostaz	8
Şekil 4.2 – Pıhtılaşma düzeneği	9
Şekil 4.3 – Fibrin yıkımı	10
Şekil 4.4 – Homosistein-metionin döngüsünde MTHFR enzimi	29
Şekil 5.1 - Faktör V A4070G PZR ürününün restriksiyon enzimi kesimi, ürün büyüklükleri	58
Şekil 5.2 - MTHFR A1298C PZR ürününün restriksiyon enzimi kesimi, genotip 1298AA, ürün büyüklükleri	59
Şekil 5.3 – MTHFR A1298C PZR ürününün restriksiyon enzim kesimi, genotip 1298CC, ürün büyüklükleri	60

ii.Resimlerin listesi

Resim 6.1 – Faktör V A4070G'nin PZR-RPUP yöntemiyle taranması	69
Resim 6.2 – MTHFR A1298C'nin PZR-RPUP yöntemiyle taranması	70
Resim 6.3 – PAİ-1 4G/5G'nin PZR-RPUP yöntemiyle taranması	71

iii.Tabloların listesi

Tablo 4.1 – Aşırı pıhtılaşma yatkınlığında kalıtsal kusurlar	23
Tablo 4.2 - Plasentada Tromboz Yatkınlığı ile ilişkili Vasküler Komplikasyonlar	40
Tablo 5.1 Primer dizileri, PZR ürün büyüklükleri	51
Tablo 5.2 Faktör V A4070G taraması için PZR	52
Tablo 5.3 – MTHFR A1298C taraması için PZR	53
Tablo 5.4 – PAİ 4G/5G taraması için PZR	54
Tablo 6.1 - Hasta ve kontrollerin genel ve klinik özellikleri	65
Tablo 6.2 - Olguların tanılarına göre dağılımı	66
Tablo 6.3 - Hasta ve kontrol gruplarının doğum şekilleri	66
Tablo 6.4 – Hasta ve kontrollerde sigara kullanımı ve folik asit uygulaması	67
Tablo 6.5 - Hasta ve kontrollerde plazma homosistein ölçümü	67

Tablo 6.6 - Faktör V A4070G alellerinin hasta ve kontrollerdeki dağılımı.	69
Tablo 6.7 - MTHFR A1298C polimorfizminin hasta ve kontrollerdeki dağılımı.	70
Tablo 6.8 - PAİ-1 4G/5G polimorfizminin hasta ve kontrollerdeki dağılımı.	72
Tablo 6.9 - Faktör V A4070G genotiplerinin olgulara göre dağılımı	72
Tablo 6.10 - MTHFR A1298C genotiplerinin olgulara göre dağılımı.	73
Tablo 6.11 - PAİ-1 4G/5G genotiplerinin olgulara göre dağılımı.	74



1. ÖZET

Tromboz yatkınlığı, kalıtımla ya da sonradan edinilen etkenlere bağlı olarak gelişen bir bozukluktur. Edinsel etkenlere maruz kalmanın önlenabilirliği ve patofizyolojinin açıklanmasında, çoğu zaman, tek bir grup etkenin yeterli olmaması, özellikle kalıtsal tromboz yatkınlığı ile araştırmaların ön plana çıkmasına neden olmuştur.

Gebeliğe bağlı, nedeni açıklanamayan hipertansiyon, preeklampsi, eklampsi, intrauterin gelişme geriliği, intrauterin fötüs ölümü, plasenta dekolmanı gibi gebelikle ilişkili komplikasyonlar, anne ve fötüs ölüm nedenlerinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Bu komplikasyonların gelişiminde endotel işlev bozukluğu, vazokonstriksiyon, plasenta iskemisi ve pıhtılaşma artışının rol oynadığı, bu etkenlerin uterusla plasenta arasındaki dolaşımın yetmezliğine yol açtığı gösterilmiştir.

Tromboza yol açan kalıtsal etkenlerden pıhtılaşma ve fibrin yıkım düzeneklerinde yer alan molekülere ait kusurlar, gebelikle ilişkili bu bozukluklarda araştırılmaktadır. Bu çalışmada, tromboza yatkınlığı arttırdığı düşünülen kalıtsal etkenlerden, pıhtılaşma düzeneği içinde yer alan faktör V, metionin-homosistein döngüsünde görev yapan metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi ve fibrin yıkımında düzenleyici görevi yapan plazminojen aktivatör inhibitörü-1 moleküllerine ilişkin kusurların, nedeni açıklanamayan komplikasyonlu ve sağlıklı gebelerdeki sıklığı, klinik ve demografik özelliklerle ilişkisi incelenmiştir.

İlerleyen yıllarda, riskli gebeliklerin erken dönemlerinde, kalıtsal tromboz yatkınlığı etkenlerine yönelik koruyucu tedaviler uygulanmasının rutin hale gelebileceği öne sürülmektedir. Bu tip çalışmaların, bu konuya katkı yapması beklenmektedir.

2. SUMMARY

The Incidence and Interpretation of Factor V A4070G, Methylenetetrahydrofolate Reductase A1298C, and Plasminogen Activator Inhibitor-1 4G/5G Mutation Rates In Women With Complicated Pregnancies of Unknown Etiology

Thrombophilia is a disorder, developing due to acquired or heritable factors. The preventable feature of acquired factors and the inefficiency of solely a group of etiologic causes, raise the importance of reserach on heritable factors of thrombophilia.

Pregnancy complications with an unknown cause like pregnancy-induced hypertension, pre-eclampsia / eclampsia, intrauterine foetal death, intrauterine growth retardation and abruptio placentae are the major causes of maternal and foetal morbidity and mortality. Endothelial dysfunction, vasoconstriction, plasental ischemia, and increased coagulation are shown to be associated with the development of these complications by leading to utero-placental insufficiency.

The association of defects in coagulation and fibrinolysis are currently being investigated in pregnancy complications with an unknown cause. In this study, in women with healthy and complicated pregnancies, the incidence of the defects of factor V of the coagulation cascade, methylenetetrahydrofolate reductase enzyme in methionine-homocysteine cycle, and plasminogen activator inhibitor-1 in fibrinolysis regulation and their relation to the clinical findins have been analysed.

Preventive measures against heritable thrombophilic causes can be applied in management of pregnancies under risk, in the future. Such studies are expected to have additive effect on the knowledge about the subject.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Preeklampsi, plasenta dekolmanı, intrauterin gelişme geriliği (İUGG) ve intrauterin fötüs ölümü anne ve fötusun morbidite ve mortalite risk oranını arttıran durumlardır (22,105). Nedenleri her zaman tam olarak bilinmemektedir; ancak her biri, plasenta damar yapısı ve hemostazdaki bozukluklardan kaynaklanan ve anne ile fötüs arasındaki alışverişi yetersiz kılan etkenlere bağlı olabilir (32,105). Preeklampsi üzerine yakın geçmişte yapılmış çalışmalarda endotel işlev bozukluğu, vazokonstriksiyon, plasenta iskemisi ve pıhtılaşma artışının anormal plasenta gelişimiyle ilişkili olabileceği ve bunun plasentadaki perfüzyonu bozabileceği öne sürülmüştür (105,108). Normal bir gebelikte trofoblast hücreleri uterus spiral arterlerinin duvarına göç eder. Bu şekilde damar kas duvarını yitirir ve daha gevşek bir duruma geçer ve plasentayı, olası en fazla miktardaki kanın beslemesine izin verir (131). Sorunlu gebeliklerde anneyle fötüs arasındaki trofoblast göçündeki yetersizlik arterlerin çapının dar kalmasına yol açar. Bunu izleyen, aşırı pıhtılaşmadan kaynaklanan tromboz, intervillöz aralığın yetersiz kanlanması, preeklampsi, plasentada enfarkt, İUGG dekolman ve intrauterin fötal ölümüne neden olabilir (32). Plasentanın vasküler lezyonlarının trombozla ilişkili olan nitelikleri ve trombofililerin yol açtığı tromboz riski artışı, yukarıda anılan ciddi gebelik komplikasyonlarıyla, edinilmiş ya da kalıtsal trombofililer arasında bir ilişki olabileceğine işaret etmektedir (105).

1999 yılında yayınlanan bir çalışmada, Kupferminc (66) ve arkadaşları tarafından preeklampsi, İUGG, nedeni açıklanamamış intrauterin fötüs ölümü ya da plasenta dekolmanı görülen gebeliklerde, taranan trombofilik mutasyonların (faktör V Leiden, metilentetrahidrofolat redüktaz [MTHFR] C677T ve protrombin G20210A) sağlıklı gebeliklerden daha yüksek oranda bulunduğu kaydedilmiştir. Bu ve benzeri çalışmaların, bazı klinisyenleri, trombofilik mutasyonların riskli gebeliklerde taranması yönünde davranmaya götürebileceği düşünülmektedir.

Bu bilgilere dayanılarak, tromboz yatkınlığını arttırdığına ilişkin bulgular bildirilmiş olan, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 geni 4G/5G polimorfizmi, faktör V A4070G nokta mutasyonu ve MTHFR enziminin etkinliğini düşürdüğü gösterilmiş olan A1298C

polimorfizmi sıklıklarının, sađlıklı ve komplikasyonlu gebelerde belirlenip karşılařtırılması, klinik gidiř ve biyokimyasal deđerlerle iliřkisinin incelenmesi planlanmıřtır. Uzun erimde ise, denek sayısının arttırılması ve kalıtsal tromboz yatkınlıđına yol ađtıđı bilinen ya da dűřűnűlen gen bűlgelerinin çođaltılmasıyla, çalıřmanın kapsamının geniřletilmesi hedeflenmektedir. Gelecekte, gebelikte de kalıtsal tromboz yatkınlıđı olan kiřilere, gebeliđi erken dűneminde koruyucu tedavi uygulamasının gűndeme gelebileceđi dűřűnűlebilir.



4. GENEL BİLGİLER

4.1 Plasenta

Plasenta ve fötus zarları, f tusu anneden ayıran, ancak bu ikisinin kan dolaşımları arasında madde alışverişine izin veren yapılardır. Plasenta aracılığıyla besinler ve oksijen fötusa aktarılırken, atık ürünler de f tustan uzaklaştırılır. Bu metabolik işlevin yanısıra, plasentanın önemli endokrin ve immunolojik işlevleri bulunmaktadır (113).

Fötusun sağlığı, uterus ve plasentadan oluşan sistemdeki kan akımının yeterliliğiyle doğrudan bağlantılıdır. F tus ile anne arasındaki bu birimin hemostatik dengesinin sağlanması için, embriyo kan damarı hücrelerinde gerçekleşen pıhtılaşmanın etkinleştirilmesinden ve engellenmesinden sorumlu düzenleyici moleküllerin etkileşimi gereklidir (113).

4.1.1 Plasenta Anatomisi

Anne ile f tusu birbirine bağlayan uteroplasental sistemde koryon, amniyon sıvısı ve amniyon zarından oluşan bir sistem bulunmaktadır. Parakrin sistem olarak bilinen bu yapıların büyük bölümünde damar oluşumu yoktur ve işlevi embriyonun fiziksel korunmasının ve f tusla anne arasındaki (makromoleküllerin aktarılması ve atık maddelerin uzaklaştırılması gibi) alışverişinin sağlanmasıdır (71).

Plasenta ise damardan oldukça zengindir. Hem anneden hem de f tustan kan akımı alma özelliğinin benzeri yoktur. F tus-anne bağlantısının plasenta ayağı anne ve f tustan kaynaklanan iki bileşenden oluşmaktadır. Plasentanın maternal yüzündeki bileşeni desidua tabakalarından biri olan desidua bazalis tarafından oluşturulur (71). Desidua gebe uterusunun işlevsel tabakasına verilen addır. Annenin dolaşımından gelen kan, endometriyum ve desiduada ki spiral arterler yoluyla plasenta villusları arasındaki boşluğa (intervillöz aralık) gelir. Maternal kan bu damarlardan çıkarak, intervillöz aralığa akar ve villusların yüzeyini kaplayan sinsityotrofoblast hücreleriyle temas eder. İkinci bileşen ise fötus kanıdır. F tus kanı plasenta villuslarının içinde bulunan kılcallar, arteriyoller ve venüllerin dışına çıkmaz; böylece anne kanı ve fötus kanı arasındaki madde alışverişi sırasında, bu ikisi birbiriyle asla temas etmez. Fötusta dolaşan,

oksijenden fakir kan iki umblikal arter yoluyla toplanıp plasentaya getirilirken, bir umblikal ven plasentadan topladığı kanı ve besinleri fötusa götürür (71,87).

Memeli embriyogenezi sırasında, blastosist evresinde ve implantasyon öncesinde görülen ilk farklılaşmada, özelleşmiş epitel hücreleri olan trofoblastlar (TB) oluşur. TB'ler daha sonra, feto-maternal arabirimin embriyo yüzünü oluşturarak ve implantasyon ile placent gelişimini sağlar (64). Bu işlemlerin gerçekleşmesi için desidua yönündeki TB'ler gelişip, birleşerek sinsityotrofoblastları (STB) oluşturur. Altta kalan sitotrofoblastlar embriyo ile sinsityum adı verilen tabaka arasında bir sınır oluşturur ve daha sonra placent villuları ve intervillöz aralıkların oluşmasını sağlar. STB'ler placent villuslarının yüzeyini kaplar; placent hormonlarının salgılanmasıyla besin, kan gazı, immunoglobulin alışverişinin yanısıra, kan damarı hücrelerinin işlevlerine de sahiptir (64).

Placent villuslarındaki farklılaşmayan sitotrofoblastlar gebeliğin sonuna kadar kalır ve daha sonraki farklılaşma için öncülük yapar. Placent oluşumu sırasında fötusun sitotrofoblastları hücre sütunları oluşturarak endometriyumu işgal etmeye başlar ve böylece fötusun endometriyuma tutunması ve plasentaya doğru kan akımının oluşmasını kolaylaştırır. TB'lerin bir kısmı da maternal spiral arterlerin endotel hücrelerinin yerini almaya başlar ve adhezyon reseptörlerini değiştirerek, yerini aldıkları endotele benzer hale gelir (131). Gebelikte görülen, preeklampsi, intra-uterin gelişme geriliği gibi komplikasyonların bir kısmında trofoblastların endotel yüzey işaretlerine (*marker*) sahip olmadıkları gösterilmiştir (39). Bu bulgu adhezyon reseptör fenotipindeki değişikliğin, plasentanın normal gelişimi için gerekli olabileceğini düşündürülebilir (68). Endometriyumun invazyonu ve hücrelerin farklılaşması embriyoya yarar sağlarken, desiduada kanama riskini ve buna bağlı olarak plasentanın erken ayrılması (abruptiyon placent) ve düşük (abortus) riskini artırır. Bu yüzden, plasentada hemostazın sağlanması için bölgesel pıhtılaşma kontrolünün sağlanması önemlidir (53,68).

4.2 Hemostaz

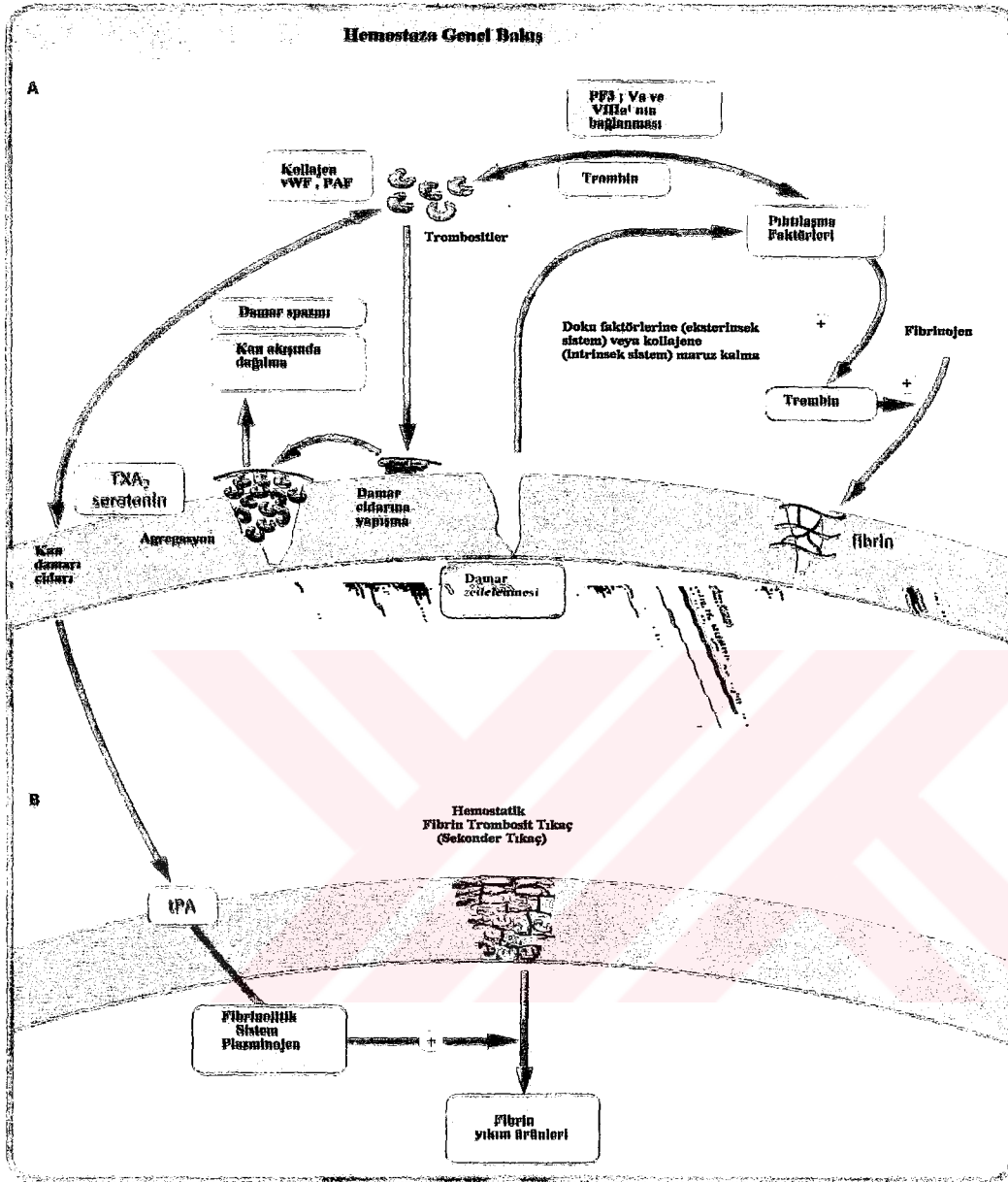
Küçük çaplı damarların yaralanması sonucunda dolaşımdaki kan ve damar duvarı arasında gelişen bir dizi olay, yaralanan damardan kan kaybını birkaç dakika içinde

sonlandırır. Bu duruma hemostaz adı verilir (77). Hemostaz, hasar gören damarların trombosit ve fibrinden oluşan bir tıkaç ile kapatılması sayesinde gerçekleşir. Fibrin plazma ve trombosit granüllerinde bulunan, dolaşımdaki fibrinojenden (340 kDa) sağlanır (104). Trombositlerce oluşturulan birincil tıkaç fibrinle kararlı duruma dönüştürülene dek, bölgedeki kan akımının basıncıyla yerinden sökülecek ve kanama sürecektir (şekil 4.1).

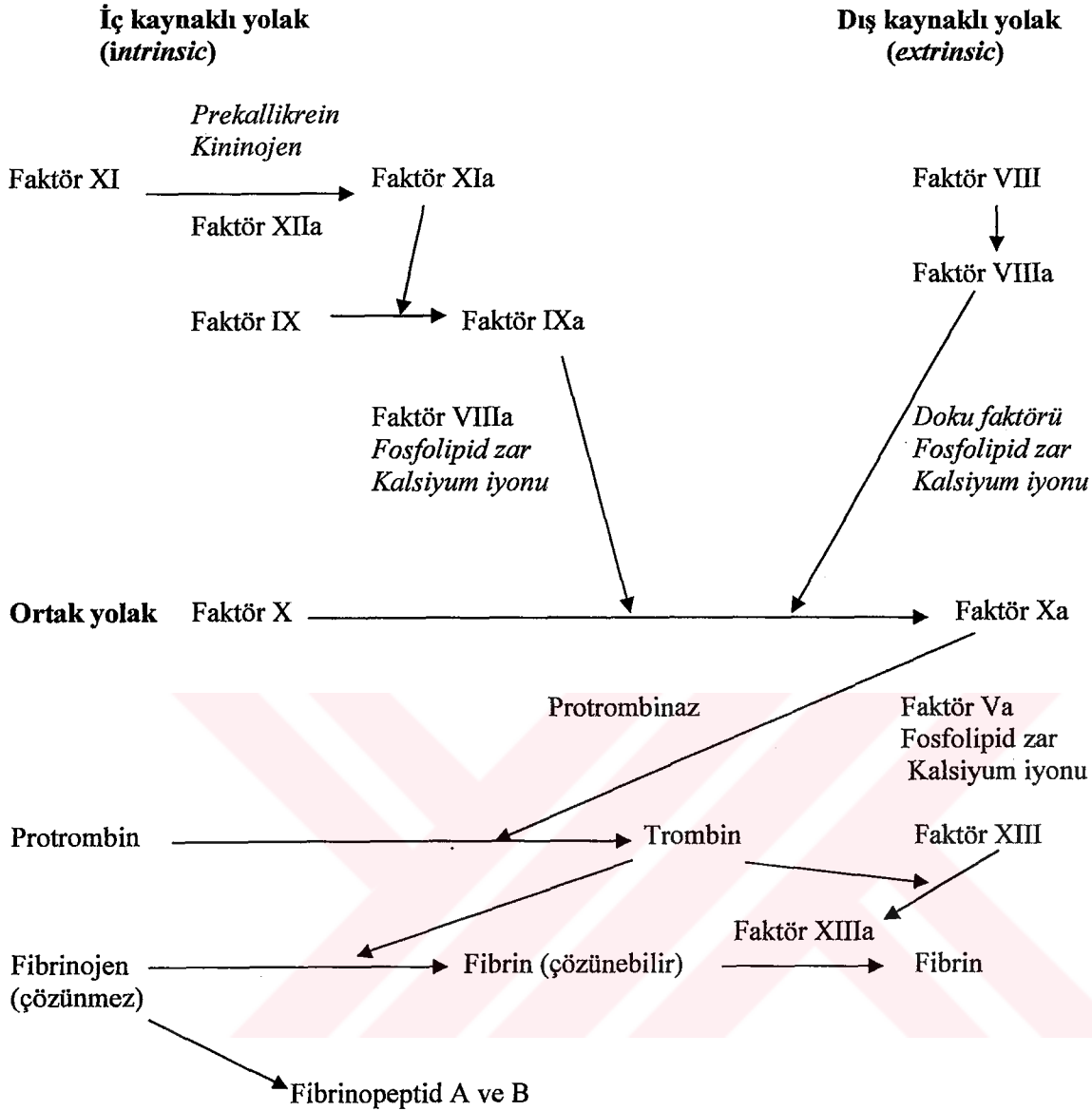
Damar yaralanması ayrıca, pıhtılaşma faktörlerini de harekete geçirir. Bir dizi etkinleştirme sonucunda oluşan trombin, plazmadaki çözünebilir fibrinojeni, çözülemeyen fibrine dönüştürür (şekil 4.2). Fibrinin katılımı, ilkinde oranla daha dirençli olan ve fibrin yıkım (fibrinoliz) sisteminin çalışması dışında parçalanmayacak olan ikincil tıkaçı oluşturur. Aşırı ve kontrolsüz kanamaya yol açan bozukluklar başlıca 1)damar duvarı, 2)trombositler, 3) pıhtılaşma düzeneği ve 4) fibrinoliz yıkımındaki, doğumdan gelen ve edinilmiş kusurlar olarak sınıflandırılabilir (104,15).

Hemostaz durağan değil, sürekli işleyen, dinamik bir düzeneğin parçasıdır. Eğer kontrol edilmezse aşırı fibrin oluşumu yoluyla damar tıkanıklığına yol açacaktır. Vücutta fibrin yıkımı için gelişmiş bir sistem, hemostazı dengelemektedir. Fibrin tıkaçları plazmin adı verilen bir enzim tarafından parçalanmaktadır. Fibrinin parçalanması sonucu oluşan fibrin yıkım ürünleri, sağlıklı bireyin plazmasında düşük düzeylerde tespit edilebilir; bu da hemostazın içinde bulunduğu dinamik bir sürecin varlığını ispatlamaktadır (15).

Trombin oluşumunu sağlayan, etkinleştğinde başka bir molekülü etkinleştirerek, bir şelale düzeneğinde ilerleyen pıhtılaşma (koagulasyon) düzeneğidir. Pıhtılaşma iki koldan ilerler. İlki, iç kaynaklı (*intrinsic*) adı verilen, harekete geçmesinde kanın endotel olmayan yüzeyiyle (kollajen proteiniyle) temasının yeterli olduğu mekanizmadır. Dış kaynaklı (*extrinsic*) olarak adlandırılan diğer mekanizmanın başlaması ise damar cidarının hasarı sonucu açığa çıkan doku faktörünün (*tissue factor*; transmembran glikoproteini; 100 kDa) pıhtılaşma faktörlerinden biriyle (faktör VII) etkileşmesi sonucu başlar ve iç kaynaklı kola iki aşamadan itibaren katkı sağlar (15,55).



Şekil 4.1: Hemostaz. A) Damarda bir zedelenme primer trombosit tıkaç oluşumu ile sonuçlanan reaksiyonlar zincirini başlatır. Ancak primer tıkaç stabilize edilemezse kan akışı ile dağılıbilir. B) Primer tıkaç bir fibrin ağı ile stabilize edilir. Sekonder tıkaç stabildir ve sadece fibrinolitik sistem etkinleşince yıkılabilir. PAF; trombosit aktivasyon faktörü, PF3; Trombosit faktörü 3, TPA; Doku tipi plazminojen aktivatörü, TXA₂ ; tromboksan A₂ , Va; aktive pıhtılaşma faktörü V, VIIIa; aktive pıhtılaşma faktörü VIII; vWF; von Willebrand faktörü (15).

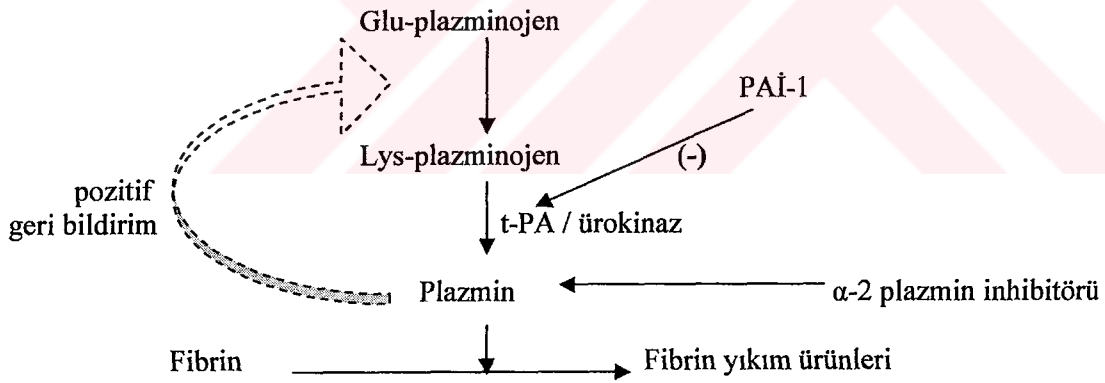


Şekil 4.2. Pıhtılaşma şelalesi (düzenegİ). Pıhtılaşmayı tetikleyen olayın, kanın doku faktörüyle temas etmesi olduğu kabul edilmektedir (113).

Pıhtılaşmanın kontrolü, kan akımının hızı, pıhtılaşma faktörlerinin seyreltilmesi, fibrinoliz, trombinin kendisi gibi birden fazla mekanizma ile sağlanmaktadır. Trombin ve pıhtılaşma faktörü X'u doğrudan engelleyen antitrombin III (65000 Da) pıhtılaşma inhibitörü molekülünden biridir. Trombini, fibrine bağlanmadığı sürece inhibe edebilir (124). Antitrombinin yanı sıra Protein C ve Protein S adı verilen iki molekül, pıhtılaşma faktörleri Va ve VIIIa'nın etkisizleştirilmesini sağlayarak, pıhtılaşmayı engelleyici görev yapmaktadır. Bunların dışında, pıhtılaşma düzeneginde fibrinojenin fibrine dönüşümünde ve başka basamaklarda etkinleştirici katkı sağlayan trombin molekülü,

normal endotelde eksprese edilen trombomodulinle (membran reseptörü, proteoglikan) bağlandığında, gösterdiği etki pıhtılaşmanın engellenmesine dönüşmektedir (15,55).

Fibrin oluşum hızını dengelemeye yönelik bu kontrol düzeneklerinin yanında, yukarda belirtildiği gibi, oluşmuş fibrinin yıkımını sağlayan (fibrinoliz) bir mekanizma da bulunmaktadır. Fibrin yıkımı da, pıhtılaşma gibi, bir şelale düzeneğini andırmaktadır (şekil 4.3). Kendine özgü dönüşümler, etkinleştirmeye ve engellemeye yönelik geri bildirimler (*feedback*) ve inhibitör moleküllere sahiptir (18,20). Plazminojen (92000 Da) adındaki, etkin olmayan, öncü protein doku plazminojen aktivatörü (65000 Da) ve ürokinaz (54000 Da) aracılığıyla plazmin adı verilen, etkin serin-proteaza dönüştürülür (17). Plazmin de fibrinin yıkılarak fibrin yıkım ürünlerinin ortaya çıkmasına yol açar. Plazminojen ve plazminin kendine özgü engelleyici molekülleri bulunmaktadır. α -2 plazmin (α -2 antiplazmin; 70000 Da) inhibitörü doğrudan plazmin üzerinde etkilidir. İlk hemostaz tıkaçının oluşması sırasında, trombositler ve endotel hücrelerinde salgılanan plazminojen aktivatör inhibitörü adlı moleküller (PAİ-1 [48000 Da] ve PAİ-2) doku plazminojen aktivatörünü engelleyerek, fibrin oluşumuna olanak sağlar (15).



Şekil 4.3 Fibrin yıkımı. Plazminojen, doku plazminojen aktivatörü (t-PA) ya da ürokinaz yardımıyla, etkin hâli olan plazmine dönüştürülür. Plazmin, glu-plazminojenin lys-plazminojeni çevrilmesini uyararak, kendi üretimine katkı sağlar (113).

4.3 Normal Gebelikte Hemostaz

4.3.1 Genel Değişiklikler

Gebelik sırasında kan pıhtılaşması ve fibrin yıkımında görülen fizyolojik değişikliklerin pıhtılaşmaya daha yatkın bir duruma yol açtığı kabul edilmektedir. Olasılıkla hormonlara bağlı değişikliklerden kaynaklanan bu durum anneyi tromboza ve tromboemboliye daha yatkın, ancak, doğum sırasında görülebilecek yoğun ve ölümlü sonuçlanabilecek kanamalara karşı da korunaklı kılmaktadır (14). Aşırı pıhtılaşma yatkınlığı ya da hiperkoagulasyon durumu trombosit birikiminin ve pıhtılaşma faktörlerinin artışı, pıhtılaşma inhibitörlerinin ve fibrin yıkım kapasitesinin azalmasından ileri gelebilir. Antitrombin III, protein C ve S önemli pıhtılaşma inhibitörleridir. Antitrombin III trombini, pıhtılaşma faktörleri Xa, IXa ve XIIa'yı ve plazmini inhibe etmekte; protein C etkinleştirildiğinde, faktör Va ve VIIIa'yı yıkarak antikoagulasyon etkisi göstermektedir. Protein C antikoagulasyon etkisi göstermek için serbest protein S'ye kofaktör olarak gereksinim duymaktadır (15,25).

Gebelik sırasında, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 ve -2'nin (PAİ-1 ve PAİ-2) plazmadaki yoğunlukları yükselmektedir (65).

Bunların dışında, gebelik sırasındaki aşırı pıhtılaşma varlığını destekleyen diğer bulgular, plazminin yol açtığı fibrin yıkımı sonucu oluşan ürünler olan D-dimerlerin, düşük düzeyde fibrin monomerlerinin ve trombin-antitrombin bileşkelerinin varlığıdır (65).

4.3.2. Trombositler

Kan damarlarının normal işlevinin ve tromboz olmadan kan dolaşımının sürmesi endotel bütünlüğünün korunmasına bağlıdır. Trombositler kanda, normal damar duvarıyla etkileşime girmeden dolaşır. Gebeliğin ilerleyen dönemlerinde trombosit sayısında azalma görüldüğü ve gebelerin trombositopenik (trombosit sayısı $< 150.000/mm^3$) olabildiği bildirilmiştir. Ortalama trombosit hacmindeki artışın bu azalmayı kompanse edebileceği tahmin edilmektedir. Trombositlerdeki araşidonik asit metabolizmasının başlıca ürünü olan tromboksan A_2 'nin idrarda atılan

metabolitlerinin, gebeliğin erken dönemlerinden itibaren yükselmeye başladığı ve gebelik sonuna dek yüksek düzeyde seyrettiği bilinmektedir. Bu bulgu, gebelik süresince trombosit aktivasyonunun fazla olduğunu düşündürmektedir (14).

4.3.3 Pıhtılaşma

Gebelik sırasında pıhtılaşma faktörleri V, VII, VIII, IX, X, von Willebrand (vWF) ve özellikle plazma fibrinojen düzeyinde belirgin artış olduğu bildirilmiştir (21). Plazma fibrinojen düzeyi üçüncü trimesterde, artmış üretim nedeniyle, gebelik öncesi normal düzeyinin 2,5-3 katına ulaşmaktadır. Diğer pıhtılaşma faktörlerinin düzeylerindeki ve etkinliklerindeki artış farklılık göstermektedir. Faktör II ve V'in düzeylerinin gebelik sırasında herhangi bir değişikliğe uğramadığı bilinmektedir (50).

Antitrombin düzeyleri, kadınlarda erkeklere göre belirgin olarak daha fazladır; yaşla artış gösterir ve hormonların kullanımıyla düzeyleri ters orantı içindedir. Çoğu çalışmada gebelik boyunca, antitrombin düzeyinin değişiklik göstermediği bulunmuştur (122).

Diğer pıhtılaşma inhibitörlerinden protein C'nin plazma düzeyi gebelik boyunca değişmemektedir. Trombinin pıhtılaşmayı indükleyen etkisini, protein C sistemini etkinleştirerek, engelleyici etki yönüne kaymasını sağlayan trombomodulin (TM) antitrombojenik etkinin başlıca belirleyicilerinden biridir. Fibrinolizde de rolü olan TM'nin düzeylerinin gebelik süresince arttığı, doğum sonrasında ise hızla gebelik öncesi değerlere gerilediği saptanmıştır. TM düzeyindeki yükselmenin, protein C'yi etkinleştirme kapasitesindeki artış ile ilişkili olduğu bulunmuştur (50).

Protein C kofaktörü olarak görev yapan protein S'nin düzeyinin gebelik sırasında azaldığı bilinmekle birlikte, bunun pıhtılaşma lehinde bir etki yaptığına ilişkin kesin bir bulgu yoktur. Ancak heterozigot konjenital protein S eksikliğinin, fizyolojik azalmayı arttırdığı ve tromboz yatkınlığını tetikleyebileceği düşünülmektedir (50).

Aktive protein C direnci terimi, plazmaya normal protein S varlığında aktive protein C (APC) eklendiğinde, antikoagülasyonun sağlanamaması durumu için kullanılmaktadır.

Gebelik sırasında APC duyarlılığının, kalıtsal faktör V bozukluğu olmadığında da azaldığı bildirilmiştir. Bu duruma ‘edinilmiş’ APC direnci adı verilmektedir (26).

4.3.4 Fibrinoliz

Plazma fibrin yıkım etkinliği gebelik süresince azalmış olarak seyreder, doğum sonrası plasentanın çıkışını izleyen ilk saat içinde tekrar eski düzeyine yükselir. Bu hızlı dönüş ve plasentanın fibrinolizi engelleyen inhibitörleri barındırması, gebelik boyunca fibrinolizin plasenta tarafından düzenlendiğini düşündürmektedir (126). Doku plazminojen aktivatörü etkinliği, gebelik sırasında artan plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAİ-1) ve PAİ-2 düzeylerine bağlı olarak düşük seyreder. Ürokinazın ve doku plazminojen aktivatörünün fizyolojik inhibitörü olan PAİ-1 endotel hücrelerinde yapılmaktadır. Normal insan plasentasında varlığı gösterilmiş ve düzeyinin gebelik süresince arttığı belirlenmiştir. PAİ-2 ilk olarak insan plasentasında bulunmuştur. Düzeyleri yalnızca gebelik döneminde ölçülebilir hale gelmektedir. PAİ-2 düzeyi plasenta ve fötüs ağırlığıyla doğru orantılı seyreder (65).

Son dönemde bulunmuş olan trombinle etkinleşen fibrinoliz inhibitörü (*thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*) plazminojenin fibrin ağı üzerinde etkin hale getirilmesini önleyerek, pıhtı çözülmesini geciktirmektedir. Bu molekülün düzeyinin gebelikten etkilenmediği gösterilmiştir (120).

4.4. Gebelik Komplikasyonları

4.4.1 Preeklampsi, Eklampsi

Gebelik, kan basıncı normal olan kadınlarda hipertansiyonu tetikleyebilir ya da daha önceden varolan hipertansiyonu şiddetlendirebilir. Yaygın ödem, proteinüri (idrarda normalden fazla protein atılımı) ya da her ikisi birden gebelikteki hipertansiyona eşlik edebilir. Hipertansiyon kontrol edilemezse konvulsiyonlar meydana gelebilir (23,105).

Gebelikte hipertansiyon, seyrek olmayan ve anne için ölümcül olabilecek komplikasyonlardan biridir. Gebeliğin hipertansiyonu nasıl tetiklediği ya da

şiddetlendirdiği, yoğun araştırmalara karşın tam olarak çözümlenememiş konulardan biridir.

4.4.1.1 Tanı

Gebeliğe bağlı hipertansiyon üç gruba ayrılabilir: 1) tek başına hipertansiyon, 2) preeklampsi, 3) eklampsi. Preeklampsi, hipertansiyona ek olarak proteinürinin ve / veya yaygın patolojik ödemin görülmesiyle teşhis edilir. Eklampsi tanısı ise, gebeliğe bağlı hipertansiyon ya da gebelikte şiddetlenen hipertansiyonun yol açtığı konvulsiyonlar görüldüğünde konur (23).

Preeklampsi tanı ölçütlerine göre, kan basıncı gebeliğin başlangıcında normal olan bir hastada, 20. gebelik haftasından sonra sistolik kan basıncının 140 mmHg ya da üzerinde ve diyastolik kan basıncının ise 90 mmHg ya da üzerinde olması hipertansiyon tanısı için gereklidir. Eğer gebeliğin başlangıcındaki kan basıncı değerlerine dayanılarak tanı konuluyorsa, sistolik kan basıncında 30 mmHg yada üzerinde, diyastolik kan basıncındaysa 15 mmHg ya da üzerinde bir artış gerçekleşmiş olmalıdır (5).

Proteinüri preeklampsinin önemli göstergelerinden biridir. 24 saatlik idrarda protein atılımının 300 mg ya da üzerinde olması ya da en az 6 saat arayla alınan iki ayrı idrar örneğinde protein yoğunluğunun 100 mg/dL ya da üzerinde olması, proteinüri anlamına gelir (5,23).

Ağır preeklampsi tanısı için Amerikan Obstetrik ve Jinekoloji Okulu (*American College of Obstetrics and Gynecology, ACOG*) aşağıdaki ölçütlerin bir tanesinin varolmasının gerekli olduğunu kabul etmiştir (5):

- Hasta yatakta istirahat halindeyken, en az 6 saat aralıkla 2 kez ölçülen kan basıncının 160/110 mmHg ya da daha yüksek olması
- 24 saatlik kan örneğinde 5 gram ya da daha fazla ya da en az 4 saat aralıkla rastgele toplanmış iki idrar örneğinde 3+ (≥ 150 mg/dL) ya da daha fazla protein
- 24 saatte 500 mL'den az idrar çıkışı
- Serebral ya da görsel rahatsızlıklar

- Pulmoner ödem ya da siyanoz
- Epigastrik ağrı ya da sağ üst kadrın ağrısı
- Karaciğer fonksiyonlarının bozulması
- Fötusta gelişme geriliği

4.4.1.2 Epidemiyoloji ve Etiyoloji

Preeklampsinin kesin sıklığı bilinmemekle birlikte, çeşitli çalışmalarda oranının %5-8 olduğu bildirilmiştir. Preeklampsi anne sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Preeklampsinin yol açtığı anne ölümlerinin oranı günümüzde %5 dolaylarındadır. Başlıca ölüm nedenleri erken plasenta dekolmanı (abruptio plasenta), HELLP (hemoliz, karaciğer enzimlerinde yükselme, trombosit sayısında azalma) sendromu, yaygın damariçi pıhtılaşma (*disseminated intravascular coagulation; DIC*), hepatik rüptür ve eklampsidir (5).

Preeklampsinin bilinen risk etkenleri gebenin yaşının 20'den küçük ya da 35'den büyük olması, çoğul gebelik, önceki gebeliklerde preeklampsi öyküsü, damar ya da bağ doku hastalıkları, antifosfolipid sendromu, şişmanlık ve Afrika ırkından olmak sayılabilir (23).

Etiyolojik araştırmalarda genetik hipotez, plasentada iskemi hipotezi ve bağışıklık sisteminde işlev bozukluğuna ilişkin hipotez ön plana çıkmaktadır. Aslında bugün kabul edilen görüş, preeklampsinin uteroplasental iskemi, endotel işlev bozukluğu ve etkinleşmiş pıhtılaşma ile tanımlanan, birden fazla etkenli bir bozukluk olduğudur. Temel sorun ise patofizyolojinin tam olarak anlaşılamamış olmasıdır (113).

Genetik hipoteze bakıldığında, bugün preeklampsi için sorumlu bir gen saptanmamış olmasına karşın, genetik yatkınlığı destekleyen aile çalışmaları varolduğu görülmektedir. 1986 yılında yayınlanan bir çalışmada tek gen hipotezinin düşünülebilir olduğu, ancak çok etkenli kalıtımın dışlanamadığı bildirilmiştir (23).

Tromboz yatkınlığını arttırdığı düşünölen genetik değışikliklerin bu rahatsızlığa olan yatkınlıkla da ilişkili olabileceğı düşünölmektedir. Bu yöndeki çalışmalar 1995'den bu yana sürmektedir. Ailesel tromboz yatkınlığı saptanmış ve preeklampsi ve eklampsi öyküsü bulunan gebelerde, antitrombotik tedavinin koruyuculuğı da araştırılmaktadır (105,131). Kalıtsal tromboz yatkınlığı ve gebelik komplikasyonları arasındaki ilişkiye yönelik bulgular ileriki bölümlerde ayrıntılı olarak sunulmaktadır.

Preeklampsi patofizyolojisi üzerine yapılmış çalışmaların çoğı, plasenta gelişimi bölümünde anlatılan trofoblastik ilerlemeyle (invazyon) ilgilidir. Preeklampside bu invazyonun tamamlanmamış olduğuna ilişkin bulgular elde edilmiştir. Uterusun spiral arterlerinin duvarlarına uzanan bu invazyon, damar çaplarının büyümesine ve damarın büzüşme (vazokonstriksiyon) yeteneğinin azalmasına yol açmakta, plasenta yoluyla fötusa anneden gidecek kan akımının gerektiğı miktarda tutulmasını sağlamaktadır. Preeklamptik gebelerde plasenta ve plasenta damar yatağının patolojik incelemeleri, bu fizyolojik değışikliklerin tamamlanmamış olduğuna işaret etmekte ve buna bağılı olarak da plasentada enfarkt alanlarının gelişebildiğı öne sürölmektedir. Ayrıca bu yetersiz invazyonun bağıışıklık yanıtını harekete geçirebileceğine ilişkin görüşler de öne sürölmüştür (39,105,131).

Preeklampsinin patofizyolojisinde temel unsur olan vazospazm, toplam periferik damar basıncının artışına yol açarak, hipertansiyon şeklinde kendini göstermektedir. Vazospazm (özellikle böbrek, karaciğer, beyin ve plasenta olmak üzere) bir çok organı etkilemektedir (5,23).

Damar değışikliklerinin dışında, preeklampsi özellikle ağır seyrettiğinde, yaygın damar içi pıhtılaşma (DIC), eritrosit yıkımı (hemoliz) ve trombosit sayısında azalma (trombositopeni) görölebilir. Ayrıca, hemoliz ve trombositopeni HELLP sendromu bulguları olarak ortaya çıkabilir (23,105).

Preeklamptik gebelerde, normal gebeliktekinin aksine, böbreklerden geçen kan akım hızı ve süzüleme oranı azalır. Çok ağır olguların dışında, bu azalma plazma hacmindeki düşüş ile bağılantılıdır. Ancak ağır olgularda böbrek işlev testlerinde belirgin artış, idrar

atılımında belirgin azalma görülebilir; tablo çok seyrek de olsa tübüler nekroza ilerleyebilir (32,105).

Karaciğer işlevinde de preeklampsiye bağlı bozulma meydana gelebilir ve kendini serum alanin transferaz (ALT) ve aspartat transferaz (AST) enzim düzeylerindeki artışla gösterir. Karaciğer işlevindeki bozulma, bu enzimlerdeki hafif yükselmeden subkapsüler hematoma ya da hepatik rüptüre uzanacak kadar geniş bir aralıkta değişken olabilir (23).

Etiyolojisi tam olarak açıklanmış olan beyin içi ödem ve kanama olguları da preeklampsi hastalarını etkileyebilecek komplikasyonlardır. Bulanık görme, şiddetli baş ağrısı ve eklampitik konvulziyonlar da görülebilecek ciddi nörolojik komplikasyonlardır. Eklampitik konvulziyonlarda mortalite oranı yüksektir. Öncesinde baş ağrısı, reflekslerde canlanma gibi nörolojik bulgular saptanır (5,105).

Preeklampitik anne bebeklerinde morbidite ve mortalite oranlarında da artış görülmektedir. Buna yol açan başlıca nedenler plasentada kan akımı yetmezliğine bağlı intrauterin gelişme geriliği, plasenta dekolmanı (abruptio placentae) ve prematüredir (5,98).

4.4.2 HELLP Sendromu

HELLP (hemoliz, karaciğer enzimlerinde artış, trombosit sayısında azalma; *hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count*) sendromu preeklampsi ve eklampsinin şiddetli organ tutulumlarıyla seyreden klinik tablosudur (5,23).

İlk olarak 1943 yılında tanımlanmıştır. Bir çalışmaya göre, ağır preeklampsi ve eklampsi olgularının %20'sinde HELLP sendromu geliştiği bildirilmektedir. HELLP sendromunda karaciğerde subkapsüler hematoma (%2), abruptio placentae (%7), akut böbrek yetmezliği (%2) ve pulmoner ödem (%6) gelişebilir (5,105).

HELLP sendromu öyküsü sonraki gebeliklerde preeklampsi, preterm doğum, İUGG, abruptio plasenta, sezaryen ile doğum ve HELLP sendromunun tekrarlama olasılıklarını arttırmaktadır.

Benedetto ve arkadaşları HELLP sendromlu gebelerde, sağlıklı gebelere göre daha yüksek oranda faktör V Leiden ve protrombin G20210A mutasyonları saptadıklarını bildirmişlerdir (32). Faktör V Leiden ve HELLP arasında ilişki olmadığını ifade eden çalışmalar da vardır (16).

4.4.3 Plasenta Dekolmanı (Abruptio Plasenta)

Plasenta dekolmanı normal yerleşimli plasentanın doğumdan önce yerinden ayrılmasıdır. Tüm plasentayı ya da bir kısmını kapsayabilir. İnsidansı her 150-200 doğumda 1 olarak bildirilmektedir. İzleyen gebeliklerde tekrarlama riski, öyküsü bulunmayan gebelere göre daha yüksektir (105,113).

Dekolmanın kaçınılmaz sonucu kanamadır. Klinik olarak vajinal kanama, karın ağrısı, uzun süreli uterus kasılmaları ve uterus hassasiyeti gelişir (24,105).

Kesin etiyoloji bilinmemektedir, ancak bazı belirgin ilişkiler ortaya çıkarılmıştır. Hipertansiyon (kronik ya da gebeliğe bağlı), sigara kullanımı, kokain kullanımı, erken membran rüptürü, çoğul gebelik, travma, ileri anne yaşı, birden fazla doğum öyküsü patojenezle ilişkili olarak bildirilmektedir (24).

Tromboz yatkınlığını artırıcı bozukluklar plasenta dekolmanının olası nedenleri arasındaki yeri araştırılmaktadır. Tromboz yatkınlığı birçok gebelik komplikasyonunda olası nedenlerden biri olarak ileri sürülmektedir (24,113).

Plasenta dekolmanının yol açtığı maternal morbidite ve mortaliteden şok, yaygın damar içi pıhtılaşma ve (hipovolemiye bağlı) böbrek yetmezliği sorumludur (24).

4.4.4 İntrauterin Gelişme Geriliği (İUGG)

İntrauterin gelişme geriliği (İUGG) fötusun gebelik yaşına göre beklenenden küçük olması şeklinde tanımlanmaktadır. Herhangi bir toplumda bir fötusun gelişimini etkileyen farklı genetik ve çevresel etkenler bulunduğu açıktır (8). Bu yüzden, o topluma özgün gelişme eğrilerinin kullanılması önemlidir. İUGG tanısının konması için referans alınacak eşik değeri Amerikan Obstetrik ve Jinekoloji Okulu'nun görüşüne göre yüzde 10'luk büyüme eğrisidir; birçok klinik de bu değeri kabul etmiştir (6).

İUGG simetrik ve asimetrik olarak iki ayrı tipte tanımlanmaktadır. Simetrik tipte baş ve gövde, erken gebelik haftalarından itibaren varolan etkene bağlı olarak, orantılı şekilde geri kalmış olabilir. Asimetrik tipte ise, ileri gebelik haftalarında ortaya çıkan bir etken, hücre büyümesini ve karaciğerde glikoz ve yağ depolanmasını engeller. Bu durumda tüm besinini baş gelişimi için kullanan fötusun, batin çevresi beklenenden küçük, baş gelişimi ise normal olur. Bu tip gelişme geriliği etkenlerine örnek olarak plasenta yetmezliği verilebilir (21).

Etiyolojik etkenler anne, fötus ve plasenta kaynaklı olarak sınıflandırılabilir. Annede sistemik hastalık, sigara, alkol ya da madde kullanımı, hipertansiyon, anemi, böbrek hastalığı, bağ doku hastalığı, damar hastalığı, teratojen etkenler (radyasyon, ilaçlar, viruslar) anne kaynaklı etkenler arasında yer alır. Değişik trombofilik bozukluklar ve perinatal komplikasyonlar arasındaki ilişki, İUGG'lerde de giderek artan bir ilgiyle araştırılmaktadır. Nedeni açıklanamayan İUGG'lerde yapılan bir çalışmada, olguların yarısında ailesel tromboz yatkınlığı saptanmıştır (20,21).

Preeklamps gibi hipertansif bozukluklar, çoğul gebelik, tümörler, plasenta mozaizmi ve kronik plasenta dekolmanı plasenta kaynaklı etiyolojik nedenlerdir. Fötusa bağlı etiyolojik nedenlere örnek olarak ağır yapı bozuklukları verilebilir (6).

İUGG'nin yol açtığı komplikasyonların başlıcaları fötus ölümü, doğum asfiksisi, yenidoğanda sepsis ve hipoglisemi ve uzun erimde anormal nörolojik gelişimdir (6).

4.4.5 İntrauterin Fötüs Ölümü (Ölü Doğum)

28. gebelik haftasından sonra, fötusta kalp aktivitesinin saptanmadığı gebeliklerde intrauterin fötüs ölümü söz konusudur. Ölü doğum oranı tüm gebeliklerin %1,2'sidir (20).

Etiyolojik etkenlerin başlıcaları annede hipertansiyon, kontrol edilemeyen diyabet, başka sistemik hastalıklar (enfeksiyon, böbrek hastalığı gibi), hemoglobinopatiler, Rh uyumsuzluğu ve kromozom bozuklukları sayılabilir. Anöploidi sıklığının ölü doğumlarda, sağlıklı doğumlara göre daha yüksek olduğu bilinmektedir. Ölü doğumlarda fötusun kromozom incelemesinin yapılması, teknik nedenlerden dolayı her zaman olanaklı olmasa da, gereklidir (22).

Tromboz yatkınlığı ile İUGG arasındaki olası ilişkiyi araştıran çalışmaların sayısı son yıllarda artmaktadır. Etiyolojide öngörülen mekanizmalardan bir tanesi placentada oluşabilecek mikrotrombuslara bağlı kan akımı kusurlarıdır (20).

4.4.6 Tekrarlayan Düşük (Habitüel Abortus)

Habitüel abortus, son adet tarihine göre 20. gebelik haftasından erken, klinik dönemde belirlenmiş en az üç gebelik kaybı şeklinde tanımlanmaktadır. Görülme sıklığı 1/300 dolaylarındadır (11).

Etiyolojisinde uterus yapı bozuklukları, endokrinolojik nedenler, enfeksiyonlar, immunolojik nedenler ve kromozom bozuklukları sayılabilir. Ancak olguların yaklaşık %60'ında hiç bir risk etkeni saptanamamıştır (11).

Habitüel abortus vakalarında ailesel trombofililerin varlığı birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (11).

4.5 Kalıtsal Tromboz Yatkınlığı

4.5.1 Genel Bilgi

Trombofili, edinilmiş ya da kalıtsal pıhtılaşma ya da fibrin yıkımı (fibrinoliz) kusurlarının yol açtığı, arter ya da venlerde anormal pıhtılaşma yatkınlığı durumunu ifade etmektedir (28). Günümüzde tromboz ve tromboembolinin temeli çok etkenli bir modele dayandırılmaktadır (28,107). Trombozun, genlerin birbiriyle ve çevreyle (örn. beslenme alışkanlığı, cerrahi, travma, gebelik, oral kontraseptif kullanımı) etkileşimlerinin sonucu geliştiği kabul edilmektedir (28,77). Özellikle genç hastalarda, trombofili biyokimyasal ve genetik risk etkenleri açısından araştırılmalıdır. Gençlerde kalıtsal etkenlerin görülme sıklığı yaşlılara göre daha fazla olarak bildirilmiştir. Bunun yanında, kalıtsal trombofilinin teşhis edilmesi gelecekteki tedavi yaklaşımlarını da etkileyecektir. Kadınlarda, kalıtsal trombofili varlığının bilinmesinin, gebeliklerin izlenmesinde önemli olabileceği düşünülmektedir (110). Günümüzde kalıtsal trombofilinin, yalnız derin ven trombozu, pulmoner emboli gibi yaşam kalitesini etkileyecek rahatsızlıklarla değil, belli gebelik komplikasyonlarıyla da ilişkili olabileceği ortaya konmuştur. Kalıtsal tromboz yatkınlığının etkenleri hakkında bilgi sahibi olunması ve tromboembolik komplikasyonların tedavisinin kalıtsal yatkınlığı olmayanlara göre değişiklik gösterip göstermediğinin belirlenmesi önemlidir.

Kalıtsal trombofili, 1956 yılında, klinik bir olgudan yola çıkılarak, Jordan ve Nannorff tarafından tanımlanmıştır (28). Kalıtsal antitrombin III, protein C ve onun kofaktörü olan protein S'nin eksikliği tanımlanan ilk trombofili nedenleridir (112).

4.5.2 Sınıflandırma

Kalıtsal trombofilileri sınıflandırmanın yöntemlerinden biri oluşum mekanizmalarına dikkate almaktır. Buna göre aşağıdaki iki grup oluşturulabilir (42):

- pıhtılaşmanın önlenmesinde yetersizlik (örn. protein C ya da protein S eksikliği)
- pıhtılaşmanın öncü moleküllerinin etkinliğinin artması (örn. pıhtılaşma faktörlerinde artış, faktör V Leiden mutasyonu, protrombin G20210A polimorfizmi gibi)

Başka bir sınıflandırma 1)trombin oluşumunu arttıran etkenler ve 2)trombini nötralize eden etkenlerde azalma şeklinde yapılabilir (110).

Daha pratik bir sınıflandırmaysa tanı yöntemine göre yapılabilir. Buna göre:

- genetik kusurun belirlenmemiş olduğu durumlar (faktör VIII artışı)
- genetik kusurun belirlenmiş olduğu, fenotipik değerlendirmenin kullanıldığı durumlar (antitrombin eksikliği, protein eksikliği, protein S eksikliği, disfibrinojenemi)
- tek bir genetik kusurun, örneğin bir nükleotid polimorfiziminin var olduğu ve tanı amaçlı kullanıldığı durumlar (faktör V Leiden [G1691A] mutasyonu), protrombin G20210A polimorfizmi) (110).

Belirtilen bu durumların dışında, herhangi bir sınıflandırmaya dahil edilemeyen, ancak göz önüne alınması gereken başka bir durum da homosistein düzeyinin yükselmesidir. Homosistein, doğrudan ya da türevi olan bazı moleküller (homosistein-sistein disülfid, s-nitrozo-homosistein, homosistein tiyolakton gibi) aracılığıyla endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri, trombositler ve pıhtılaşma faktörlerini etkileyerek pıhtılaşmayı arttırıcı rol oynayabilmektedir (97).

4.5.3 Etiyoloji

Kalıtsal tromboz yatkınlığıyla ilişkili durumların başlıcaları tablo 1'de sunulmaktadır. Trombofiliye yol açan farklı durumların prevalansları seçilen örnekleme göre değişmektedir. Buna göre, seçilen örneklemin etnik kökeni taranan polimorfizm ve mutasyon sıklıkları üzerinde etkili olmaktadır (110).

4.5.3.1 Doğal Pıhtılaşma İnhibitörlerinin Eksikliği

Toplamda antitrombin, protein C ve protein S'den oluşan pıhtılaşma inhibitörlerinin eksikliği, toplum genelinin %1'inden, rastgele seçilmiş venöz tromboemboli (VTE) hastalarının %10'undan daha azında görülmektedir. Bu tip kusurları taşıyan bireylerde VTE görülme riski taşımayan bireylere göre yaklaşık 5-8 kat daha fazla olarak bildirilmektedir (28,80,112).

Tablo 4.1. Aşırı pıhtılaşma yatkınlığında kalıtsal kusurlar (110).

- Antitrombin III eksikliği
- Protein C ve protein S sistemindeki kusurlar
 - Protein C eksikliği
 - Protein S eksikliği
 - Anormal trombomodulin
- Aktive olmuş protein C'ye direnç
 - Faktör V Leiden mutasyonu
- Protrombin artışı
 - Protrombin G20210A mutasyonu
- Disfibrinojenemi
- Fibrin yıkım sistemi kusurları
 - Hipo-, displazminojenemi
 - Plazminojen aktivatör inhibitör fazlalığı
 - Doku plazminojen aktivatörü eksikliği
- Homosistein artışı
- Heparin kofaktör II eksikliği
- Faktör XII eksikliği
- Histidinden zengin glikoprotein fazlalığı

Trombotik olayların yarısına yakını çevresel etkenlerin eşliğinde meydana gelmektedir, ve genelde bu durum, ilk olarak 45 yaş öncesinde görülmektedir (80).

Antitrombin III (AT-III) eksikliğinde VTE gelişen hastaların çoğunun, diğer kalıtsal kusura bağlı gelişen VTE hastalarından daha genç oldukları, ve AT-III eksikliğinin gebelikte tromboemboli ve fötüs ölümü için daha yüksek risk oluşturduğuna ilişkin veriler yayınlanmıştır. AT-III serpin (serin proteaz inhibitörü) gen ailesindendir, trombin ve başta faktör Xa olmak üzere bazı pıhtılaşma faktörlerini içeren sistemde görev yapmaktadır. Eksikliğinin sıklığı 1/2000 – 1/5000 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir (116).

Kalıtsal AT-III eksikliği kalıtımı otozomal baskın karakterdedir. Tip I ve tip II olarak, iki tip AT-III eksikliği tanımlanmıştır. Tip I'in heterozigot formunda derin ven trombozu ve pulmoner emboli riskinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Homozigot form genellikle yaşamla bağdaşık değildir. Tip II kusurunda AT-III düzeyi normalken, etkinlik düzeyi azalmıştır. İşlev kaybı, trombin ya da heparin bağlanma bölgelerinde meydana gelen değişikliklere bağlıdır (70).

Protein C, K vitaminine bağlı glikoproteinlerden biridir. Trombin tarafında etkin protein haline dönüştürülür. Etkinleşen protein C (EPC) aktif faktör VIII ve faktör V'i etkisiz hale getirerek trombin yapımını olumsuz yönde etkiler. Bu reaksiyonda protein S kofaktör olarak görev yapar (15). Protein C eksikliği ilk kez 1981 yılında bildirilmiştir. Protein C eksikliğinin VTE ve yüzeysel tromboflebit gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ortalama sıklığı yaklaşık 1-3/5000 dolayındadır. Kalıtımı otozomal baskındır. AT-III eksikliğinde olduğu gibi tip I ve tip II şeklinde iki alt gruba sahiptir. Heterozigotların önemli kısmında belirti görülmezken, homozigotlarda trombotik bozukluk ağır seyreder (4,108).

EPC kofaktörü olarak görev yapan protein S için de kalıtsal eksiklik kusuru tanımlanmıştır. Kalıtım otozomal baskındır. Tip protein S eksikliğinde antijen ve etkinlik düzeyleri düşüktür. Tip II'de ise yalnızca etkinlik düzeyinde azalma görülür (111).

4.5.3.2 Etkinleşmiş Protein C Direnci - Faktör V Leiden Mutasyonu

Pıhtılaşma faktörü V yüksek molekül ağırlıklı bir plazma proteindir ve trombinin oluşumunda ve hemostazın düzenlenmesinde görevlidir (62). Karaciğer ve megakaryositlerde yapılmaktadır (29,62). A1-A2-A3-B-C1-C2 şeklinde dizilmiş olan domen yapısı başka bir pıhtılaşma faktörü VIII ile benzerlik gösterir. Kanda, tek bir polipeptid zinciri halinde bulunur (330 kDa) ve pıhtılaşmayla ilgili herhangi bir etkinliğe sahip değildir (29). Pıhtılaşma düzeneğinin birbirini izleyen reaksiyonları sırasında, trombin tarafından, B domeni farklı bölgelerden kesilip uzaklaştırılarak, aktif faktör V (Va) haline dönüştürülür; bu şekilde, faktör Xa ve protrombinle etkileşebilecek yüzeyler kazanmış olur (51). Faktör Va, kalsiyum iyonları tarafından bir arada tutulan bir hafif (A3-C1-C2), bir de ağır zincirden (A1-A2) oluşmaktadır (29). Protein, bu konumuyla, faktör Xa, kalsiyum iyonları ve eksi yüklü fosfolipid yüzeylerle bir araya gelerek (protrombinaz bileşkesi), protrombinin trombine dönüştürülmesini hızlandırır (15). Faktör Va, protrombinin etkinleştirilmesinin dışında, protein C'nin de etkin konuma geçmesine yardımcı olur. Doğal koagülasyon inhibitörlerinden olan protein C, pıhtılaşma faktörü V'i, B domen içinde yer alan, 306., 506. ve 679. sıralardaki arjinin amino asitlerinden keserek, etkisiz duruma getirmektedir. Böylece trombin yapımı azaltılarak, pıhtılaşmanın kontrol altında tutulmasına yardımcı olunmaktadır (61).

Faktör V geni 1. kromozomun uzun kolunda 23-24 (1q23-24) yerleşiminde yer almakta, 25 ekzon ve 24 introndan oluşmaktadır ve yaklaşık 80 kb büyüklüğündedir (29).

1993 yılında, üç trombofili ailesinde etkinleşmiş protein C (EPC) direnci olarak tanımlanan, EPC'ye karşı zayıf antikoagülasyon yanıtı saptanmıştır (26). EPC batı toplumundaki en

yaygın kalıtsal trombofililerden biridir (129). Bu direncin kalıtımının otozomal baskın nitelikte olduğu belirtilmiştir. 1994 yılında Bertina ve arkadaşları tarafından, yaklaşık bir yıl önce tanımlanan EPC direncinin, faktör V geninde, 506. amino asidinin kodonuna denk gelen 1691. nükleotidde gerçekleşen guanin-adenin baz değişikliğine bağlı olduğu ortaya konmuştur. Bu nokta mutasyonu 506'daki arjininin yerine bir glutaminin kodlanmasına yol açmakta ve Leiden mutasyonu olarak anılmaktadır (13).

Faktör V Leiden nerdeyse yalnızca beyaz ırkta görülmektedir. Derin ven trombozu riskini ve yüzeyel tromboflebit riskini beş katına kadar arttırabildiği bildirilmiştir. Beyaz ırkta görülen trombofilik mutasyonlar ve polimorfizmler arasında, sıklığı en yüksek olanıdır. Avrupa toplumları genelinde görülme sıklığı %4 dolaylarındadır (93,132).

506'daki arjinin, bu kısmın başında belirtildiği gibi, aktif protein C tarafından kesilen üç faktör V protein bölgesinden bir tanesidir. Arjininin yerine gelen glutamin, bu bölgenin protein C'ye dirençli hale gelmesine neden olur. Böylece, faktör V'in etkisizleştirilmesi tam anlamıyla gerçekleşemez ve aktif faktör V protrombinin trombine dönüşümündeki rolünü sürdürür (29).

Faktör V geninin bir aleli üzerindeki birkaç polimorfizmden oluşan faktör V R2 haplotipi, farklı toplumlarda yaygın olarak rastlanan bir genetik varyasyondur (129). EPC direncinin daha hafif seyreden bir formu, bu haplotipin içerdiği mutasyonlardan biri olan, faktör V geninin 13. ekzonu üzerinde 4070. nükleotiddeki adenin-guanin nokta mutasyonu ile da görülmüştür (29,129). Bu mutasyon 1299. amino asidin histidinden arjinine dönüşmesine neden olmaktadır (His1299Arg) (76). R2 haplotipinin faktör V düzeyi ve EPC yanıtı üzerindeki etkilerine ilişkin farklı yorumlar yayınlanmıştır. Birkaç çalışmada venöz tromboz ile R2 arasındaki ilişki incelenmiştir. İlk kez 1996 yılında tanımlanmış olan A4070G (His1299Arg) mutasyonunun, mutant faktör V molekülünün B domen karboksi terminalinde glikolizasyonu kısmen bozduğu ortaya konmuş, bunun da, doğal durumdaki ekspresyon düzeyini değil, ancak salgılanma miktarını değiştirebileceği ileri sürülmüştür.

Bu çalışmada Arg 1299 (R2) aleli taşıyan bireylerde faktör V etkinliğinin daha düşük düzeyde olduğu bildirilmiştir (58). Ayrıca, bu mutasyonun, faktör V Leiden taşıyıcılarında da EPC antikoagülasyon yanıtını etkilediği ortaya konmuştur (29). Yakın dönemde yayınlanan bir çalışmanın sonuçlarına dayanılarak, His1299Arg mutantının faktör V B-domain C-terminali glikolizasyonunu olumsuz etkileyebileceği düşünülmüştür (129).

İzleyen dönemdeki çalışmalardan elde edilen bulgular farklılık göstermektedir. Bernardi (59) ve arkadaşlarının çalışmasında R2 alelinin EPC duyarlılığında azalmayla ilişkili olduğu sonucuna varılmış (29,129), ancak R2 alelinin varlığıyla faktör V düzeylerinin düşük olması ya da venöz tromboz gelişimi arasında bir bağlantı kurulamamıştır. Fransa'da yapılmış bir çalışmada ise, R2 alelinin faktör V düzeyinde azalmayla ve EPC direnciyle olan ilişkisi ortaya konmuştur. Aynı zamanda, bu çalışmanın sonuçları venöz tromboemboli riskinin R2 aleline bağlı olarak artış gösterdiğini kaydetmektedir (3). Yakın geçmiş dönemde yayınlanan bir çalışmada verilerin, cinsiyet, faktör V Leiden ve protrombin G20210A mutasyonuna göre düzeltildikten sonra, R2 alelinin derin ven trombozu için bağımsız bir risk etkeni olduğu sonucuna varıldığı bildirilmiştir (32).

4.5.3.3 Homosisteinemi

Homosistein, esansiyel aminoasitlerden olan metioninin metabolizma döngüsü sırasında oluşan bir ara üründür. Plazmada az oranda (%3) serbest olarak bulunur; bu haliyle glomerüllerden süzülebilmektedir. Geri kalanı proteine bağlı (%75) ya da sisteine bağlı (%22) durumdadır (81).

Besinlerle ya da endojen proteinlerin yıkımıyla oluşan metionin, yeni proteinlerin yapımında kullanılmasının yanı sıra, enzimatik reaksiyonla önce S-adenozil metionine, bu molekülün metil grubunu yitirmesiyle de S-adenozil homosisteine dönüşür. S-adenozil homosistein hidrolize uğradığında, adenozin ve homosisteine ayrılır (96).

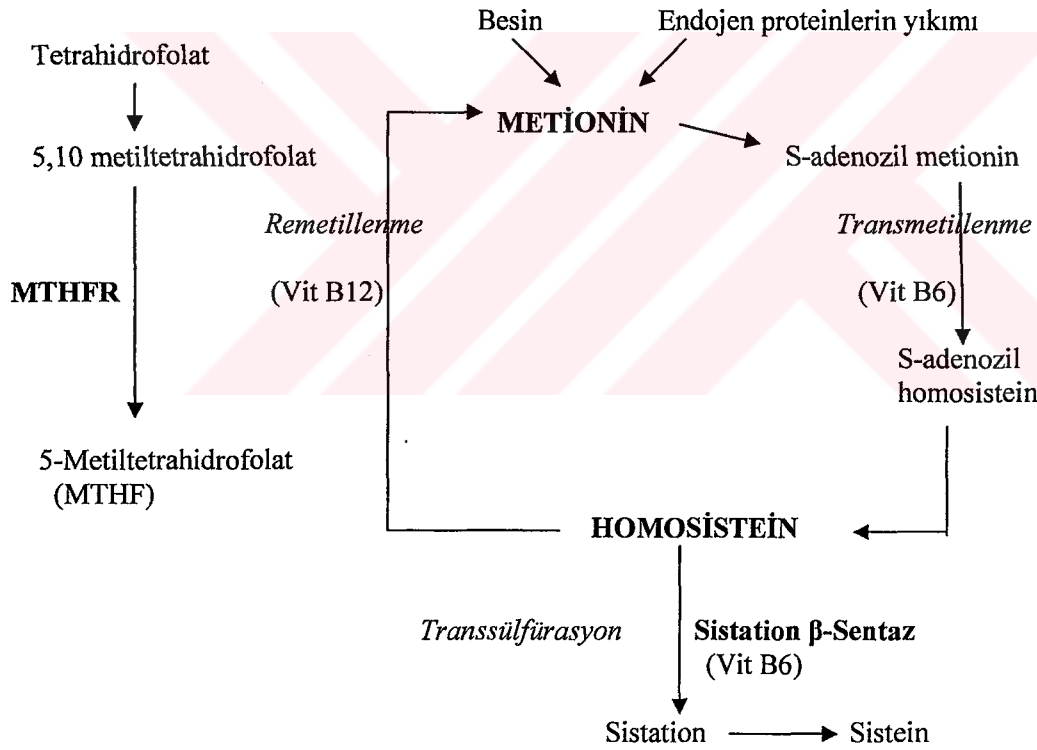
Oluşan homosistein iki farklı yol izleyebilmektedir: transsülfürasyon ve remetilasyon. Transsülfürasyonda, homosistein, sistatyon beta-sentaz enzimi yoluyla sistatiyona dönüştürülür ve bu yol sistein ve sülfür içeren diğer bileşiklerin (glutation, taurin) oluşumuna girer. Transsülfürasyonda B6 vitamini kofaktör olarak görev yapmaktadır (şekil 4.4).

Homosisteinin diğer yolu, remetilasyondur; burada metil grubunu tekrar kazanan molekül metionine geri dönüşür. Folik asidin dolaşımdaki etkin formu olan metiltetrahidrofolat (MTHF), metil grubunun metionin sentaz enziminin yardımıyla homosisteine aktarılmasını sağlamaktadır. MTHF'nin oluşmasını sağlayan reaksiyonda görevli olan enzim ise metilentetrahidrofolat redüktazdır (MTHFR). Bu reaksiyonda B12 vitamini kofaktör olarak görev yapmaktadır (97).

Hiperhomosisteinemi yani kanda homosistein düzeyinin normalin üzerinde bulunmasının, toplum genelindeki sıklığı %5-7 olarak bildirilmiştir (54). Bu oranın aterosklerozlu hastalar arasında %20-30 oranında olduğu görülmektedir. Homosisteinin normal plazma aralığı 5-15 mikromol/L olarak verilmektedir. Homosistein yüksekliğinin nedenleri arasında kalıtsal enzim yetersizlikleri (sistatyon sentaz, MTHFR), sistemik hastalıklar (pernisyöz anemi, kronik böbrek yetmezliği, akut lenfoblastik lösemi, hipotiroidi, meme ve over kanserleri, sistemik lupus eritematozus), ilaç kullanımı (metotroksat, fenitoin, teofilin), diyetle bağlı alım yetersizlikleri (B6, B12, folik asit) sayılabilir. Homosistein plazma düzeyinin saptanması için kan örneğinin sabah erken alınması önerilmektedir (63).

1969 yılında, homosistinürlü hastaların otopsi bulgularına dayanılarak, damar hastalığı ve homosistein yüksekliği arasındaki olası ilişkinin varlığına işaret eden ilk bulgular yayınlanmıştır (82). İlerleyen yıllarda damar hastalığı ve homosistein yüksekliği arasındaki ilişki kardiyovasküler ve serebrovasküler bozuklukları konu alan çalışmalarda araştırılmaya devam edilmiştir. Homosisteinin tek başına, ya da damar hastalığına yönelik başka risk etkenleriyle bir aradayken varolan riski arttırdığını ileri süren araştırmalar yayınlanmıştır.

Homosisteinin damarlar üzerindeki hasarı nasıl oluşturduğu konusunda bazı teoriler öne sürülmüş ve araştırılmıştır. Bu teorilerin başlıcaları homosisteinin endotel hücrelerine olan sitotoksik etkisi, endotelde faktör V'in etkin konuma geçirilmesi, homosisteinin düz kas hücrelerinde büyümeyi destekleyici etkisi, endotelde C proteini etkileşmesinin azalması ve oksidasyona bağlı olarak hasar artışı oluşması sayılabilir. Bunların yanında trombosit ömrünün ve birikme yeteneğinin azalması, trombomodulin yapımının azalması, faktör XII'nin etkinleştirilmesi, antitrombin III yapımının azalması da ek olarak sayılabilir (63).



Şekil 4.4 Metiyonin döngüsü içinde homosistein ve metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) yeri

Homosistein yüksekliği plazma düzeyine göre üç gruba ayrılmaktadır:

Hafif:	16-24 mikromol/L	normal: 5-15 µmol/L (117)
Orta:	25-100 mikromol/L	
Şiddetli:	>100 mikromol/L	

Gebelik döneminin ilk üç ayında homosistein düzeylerinde azalma görüldüğü bilinmektedir. Homosistein düzeyi, gebeliğin sonuna doğru artışa geçerek, ilk üç aydaki değeri yakalar. Gebelikteki bu değişim için bazı teoriler öngörülmektedir. Bunlar arasında homosistein bağlayan albuminin azalması, B12 vitamini ve folik asit düzeylerinin azalması, kanın fizyolojik olarak seyrelmesi, karaciğer ve böbrek enzimlerinin etkinliğinin artması, fötusunun annedeki homosisteini kullanması sayılabilir (67).

Hiperhomosisteineminin tekrarlayan düşük ve intrauterin fötal ölüm riskini artırıcı etki yaptığına ilişkin çalışmalar bulunmaktadır. Ağır preeklampsili gebelerin dahil edilmiş olduğu çalışmalarda, homosistein oranının sağlıklı gebelere göre daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir (66,68). Başka bir grup araştırmacı, intrauterin gelişme geriliği ve intarauterin fötus ölümü görülen gebelerde homosistein plazma düzeylerinde yükselme olduğunu saptamışlardır (7).

Bu bulgudan yola çıkarak, homosistein düzeyini belirleyen etkenler ile gebelik komplikasyonları arasında olası ilişkileri araştıran çalışmalar yapılmaktadır. Son dönemdeki çalışmalar homosistein düzeylerinin belirlenmesinde, metabolizmasında görevli enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizmlerin de önemi olduğuna işaret etmektedir.

4.5.3.4 MTHFR Geni ve Polimorfizmleri

MTHFR geni 1. kromozomun kısa kolunda 36.3 yerleşiminde bulunmaktadır. Toplam büyüklüğü 1980 baz çiftidir, ürünün molekül ağırlığı 74.6 kDa'dur. MTHFR enzimi 5.10

metilentetrahidrofolat'ın 5-metiltetrahidrofolat'a (5-MTHF) dönüştürülmesini sağlamaktadır (40).

MTHFR enziminin etkinlik düzeyini düşüren iki ayrı polimorfizm saptanmıştır. Bunların ilki, enzimin folat bağlanma bölgesinin kodlanmasında görevli bir dizide, 1995 yılında saptanmıştır. 677. nükleotiddeki bu nokta mutasyonunda bir timin bazı, bir sitozinin yerini almaktadır (C677T). Bu transizyon mutasyonu gen ürünüde bir alanin amino asidi, yerini bir valine bırakmaktadır. Homozigot bireylerde enzimin, sıcaklığa bağlı işlev kaybıyla, normal kişilerdeki etkinlik düzeyinin %35'ine dek gerileyebildiği, bunun da etkin 5-MTHF yapımını belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir. Heterozigot taşıyıcı bireylerde de enzim etkinliğinin azaldığı, buna bağlı olarak homosistein plazma düzeyinin yükseldiği ortaya konmuştur (42).

Van der Put ve arkadaşları, 1998 yılında MTHFR geninin başka bir polimorfizmini bulmuşlardır: 1298. nükleotid sırasında, bir adenin-sitozin dönüşümü. Bu değişiklik 429. amino asit olan glutaminin yerine alanin gelmesine yol açmaktadır. Aynı çalışmada bu mutasyonun alel sıklığı %33 olarak belirtilmiştir. Mutasyonun olduğu bölgenin, proteinin düzenleyici domen bölgesini kodlayan dizi olduğu düşünülmektedir (119). Homozigot mutant bireylerde, MTHFR'nin aktivitesinin %60'ına gerilediği, plazma homosistein ya da folik asit düzeylerinde ise bir değişiklik oluşmadığı gösterilmiştir. Ancak, C677T ve A1298C mutasyonlarının, heterozigot olarak birlikte bulunduğu durumlarda, enzim aktivitesinin ve homosistein plazma düzeyinin, C677T homozigot mutant durumdakine benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle, A1298C polimorfizminin C677T polimorfizminin etkisini arttırdığı düşünülmüştür (119). Birleşik heterozigotluk (*compound heterozygosity*) oranının, toplum geneli içinde yaklaşık %15 oranında olduğu bildirilmiştir (40). Aynı olguda, 677 ve 1298 polimorfizmlerinden biri için homozigotluk, diğeri için heterozigotluk bildirilmiş olmasına karşın (40,41) polimorfizmin de homozigot olduğu vaka henüz bildirilmemiştir. Bu durum, her iki polimorfizmin seleksiyon açısından dezavantaj yaratıp yaratmadığı yönünde incelenebilir.

4.5.3.5 Fibrin Yıkım Yetmezliği

Fibrin yıkım kapasitesinin düşük olduğu ve buna bağlı olarak, en azından teorik düzeyde, tromboz riskinin yüksek olduğu birkaç bozukluk bildirilmiştir (31). Ancak bunların toplam sayısı fazla değildir, ve bir kısmı hakkında bildirilen sonuçlar birbiriyle örtüşmemektedir. Fibrinolizdeki başlıca moleküller, etkin olmayan proenzim plazminojen ve bunun etkinleştirilmiş hali olan plazmin enzimidir. Plazminojen yetersizliği ya miktarın azlığına (hipoplazminojenemi, tip I) ya da işlevin yetersiz olmasına (displazminojenemi, tip II) bağlı olabilir (31). Yüksek sayıda denek (1192 hasta) seçilerek yapılan bir çalışmada, tromboz hastaları içinde plazminojen düzeyinin düşüklüğü çok küçük bir oranda saptanmış (%2) ve hastaların aile bireylerinin de araştırılması sonucunda, durumun herhangi bir risk artışına yol açmadığı öne sürülmüştür (33).

Gebelik döneminde plazmanın fibrin yıkım etkinliği azalmıştır, ancak hemen doğumu takiben normale döner. Bu hızlı değişim, plasentanın çıkışıyla ilişkilidir, zira plasenta fibrin yıkımını engelleyen moleküller içermektedir (110).

Plazminojenin başlıca aktivatörü olan doku plazminojen aktivatörü (t-PA) ve plazminojen aktivatör inhibitörü (PAİ)-1 de, venöz tromboz ile ilişkileri yönünden araştırılmıştır. Tip 1 plazminojen aktivatör inhibitörü (PAİ-1) doku plazminojen aktivatörünün fizyolojik inhibitörüdür, bu nedenle plazmin yapımının düzenlenmesinde anahtar bir noktada yer almaktadır (121). Kültür ortamında PAİ-1'in bir çok farklı hücre tarafından üretildiği görülmüştür. İn vitro koşullarda PAİ-1 yapımı glukokortikoidler, sitokinler, insülin ve lipoproteinlerin de içinde olduğu farklı maddeler tarafından kontrol edilmektedir (31).

PAİ-1, molekül ağırlığı yaklaşık 50 kDa olan bir glikoproteindir. Serin proteaz inhibitörleri (SERPIN) ailesine aittir (31). PAİ-1 geni 7. kromozom üzerinde (q21.3-q22) yer almaktadır; dokuz ekzon ve sekiz intron içermektedir. Gen dizisinin büyüklüğü yaklaşık olarak 12,3 kilobazdır (114).

PAİ-1 plazma yoğunluğunun farklı bir kaç gen polimorfizmiyle bağlantılı olduğu bilinmektedir. Bu polimorfizmlerden bir tanesi, transkripsiyon başlangıç bölgesinden 675 baz daha yukarda, promotor bölge içinde yer almaktadır ve bir guanin insersiyon/delesyon değişikliğiyle tanımlanmıştır (4G/5G) (27). 4G alelini homozigot olarak taşıyan bireylerin plazma PAİ-1 düzeylerinin daha yüksek olduğu bildirilmektedir. 4G alelinin yalnızca bir aktivatör transkripsiyon proteinine bağlandığı, 5G alelinin ise aktivatörün yanısıra baskılayıcı (represör) bir proteine de bağlandığı gösterilmiş, buna bağlı olarak da 5G alelinin, 4G'ye oranla daha düşük düzeyde PAİ-1 transkripsiyonuna yol açtığı belirtilmiştir (35). 4G alelinin prevalansı genç miyokard enfarktüsü hastalarında ve derin ven trombozu olgularında daha yüksek olduğu bildirilmiştir (38). Bu çalışmanın dışında, PAI-1 geni promotorundaki 4G/5G polimorfizminin arter ve ven trombozuyla ilişkili olduğunu öne süren ve bu görüşü reddeden çalışmalar yayınlanmıştır (46).

4.6 Tromboz Yatkınlığı ve Gebelikteki Vasküler Komplikasyonlar

4.6.1 Gebelikte Venöz Tromboemboli

Gebelikle bağlantılı venöz tromboembolinin (VTE) toplum genelindeki sıklığı hakkında değişik oranlar bildirilmektedir. En sık verilen oran 1/1000'dir. VTE'nin gebeliğin son üç aylık döneminde daha sık görüldüğü bildirilmektedir (51).

Gebelikle ilişkili VTE riskini arttırdığı bilinen bazı etkenler vardır (51). Bunlar:

- Yaşın 35'den fazla olması
- Gebelik sırasında hareketliliğin kısıtlanması
- Sezaryen kesi ile doğum (özellikle acil yapıldığında)
- VTE öyküsü
- Trombofili

Homozigot faktör V Leiden ve heterozigot protrombin G20210A mutasyonu taşıyıcılarında gebelikle ilişkili tromboz riskinin, normal deneklerden fazla olduğu bildirilmiştir (80). Asemptomatik taşıyıcılarda ise riskin düşük düzeyde olduğu gösterilmiştir.

Gebelikte VTE öyküsü olan kadınlarda, geriye dönük olarak yapılan bir çalışmada, Leiden mutasyon sıklığı %8, protrombin G20210A mutasyonu ise %9 oranında bulunmuştur. Diğer pıhtılaşma etkenlerinin düzeylerinin belirlenmesinden sonra yapılan risk hesaplamasına dayanılarak, araştırmacılar tarafından erken gebelikte, rutin trombofili taramasının yapılması gerekli bulunmadığı bildirilmiştir (82).

Bir vaka-kontrol çalışmasında (49) Leiden mutasyonu hasta grubunda %23,8, kontrol grubundaysa %1,9 oranında saptanmıştır. Ayrıca protrombin ve MTHFR C677T sıklıkları da hasta grubunda, kontrol grubuna göre, anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (protrombin: %31-%4,2; MTHFR: %28,6-%16). Bu sonuçlara dayanılarak, bu mutasyonların, venöz tromboz öyküsü olan kadınlarda gebelik döneminde taranması gerektiği öne sürülmektedir.

Gebelik sırasında ya da sonrasında tromboz geçiren kadınlarda trombofiliye sık oranda rastlandığı bildirilen kadınlarda trombofili taraması önerilmektedir (49). Ancak bu durum her gebelik için geçerli gibi gözükmemektedir. Bilinen trombofili öyküsü varlığında, profilaktik müdahalenin de kesinlikle gerekli olduğuna ilişkin bir uzlaşma yoktur.

4.6.2 Preeklampsi

Preeklampsi ve anılan diğer gebelik komplikasyonlarındaki patolojik bulgular (plasenta villus enfarktleri, endotel işlev bozukluğu, uterus spiral arter trombozu), bu bozukluklarda aşırı pıhtılaşmanın patofizyolojiye katkısının olup olmadığının sorgulanmasını sağlamıştır. Trombofililer ve preeklampsi arasındaki ilişkiyi araştıran bir çok çalışma yapılmıştır. Bu

Çalışmaların bir kısmında trombofili mutasyonları preeklampsili gebelerde, sağlıklı gebelere oranla daha yaygın olarak bulunmuştur. 1996'da Dizon-Townson (34) ve arkadaşları 158 preeklampsili ve 453 normal gebe üzerinde yaptıkları çalışmada faktör V Leiden mutasyonu sıklığını hasta grubunda daha yüksek tespit etmişlerdir (85). Benzer sonuçlar İtalya ve Macaristan'da yapılmış iki ayrı çalışmada da elde edilmiştir (48,88). Lindoff'un (75) alışmasında ise, faktör V Leiden sıklığının, ikisi de 50'şer kişiden oluşan preeklampsisi ve sağlıklı gebe gruplarında, farklılık göstermediği kaydedilmektedir.

Kupferminc (66) ve arkadaşları tarafından yürütölmüş kapsamlı bir çalışmada, yüz on komplikasyonlu ve aynı sayıda sağlıklı gebe çalışmaya dahil edilmiştir. Ağır preklampsisi, gebelik yaşına göre yüzde 5'lik dilimin altındaki intrauterin gelişme geriliği ve ağır plasenta dekolmanı hasta grubunu oluşurmaktadır. Ağır preeklampsisi olgularında Leiden mutasyonu %26, kontrol grubunda ise %6,4 oranında bulunmuştur. MTHFR C677T mutant homozigotluğu hastaların %20,6'sında, sağlıklı gebelerin ise %8,2'sinde saptanmıştır. Toplamda, preeklampsisi hastalarının %52,9'unda, sağlıklı gebelerin ise %17,3'ünde bir trombofilik mutasyon saptanmıştır. Aynı grubun başka bir çalışmasında (67) ağır preeklampsili altmış üç gebe ve yüz yirmi altı sağlıklı gebede trombofili mutasyonları taranmış, faktör V Leiden ve MTHFR 677 homozigotluk sıklığı hasta grubunda daha yüksek bulunmuştur. Protrombin G20210A sıklığı hasta grubunda daha fazla olmasına karışın, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Hastaların % 67'sinde, sağlıklı gebelerin %20'sinde trombofilik bir mutasyon tespit edilmiştir. İzleyen dönemde faktör V Leiden sıklığının ağır preeklampsili gebelerde anlamlı olarak daha yüksek olduğunu bildiren çalışmalar yayınlanmıştır (103).

Bazı çalışmalarda trombofili mutasyon oranlarının preeklampsisi olgularında, sağlıklı kontrollere göre değişiklik göstermediği bildirilmiştir. O'Shaughnessy (91) ve arkadaşlarının çalışmasında faktör V Leiden ve MTHFR 677 mutasyon sıklıkları hasta ve kontrol grupları arasında benzer bulunmuştur. Çalışmaya alınan 283 preeklampsisi olgusunun 149'u ağır preeklampsisi, 25 tanesi HELLP (hemoliz, karaciğer enzimlerinde yükselme,

trombositlerde azalma) sendromudur. Bu gruplar ve kontroller arasında da mutasyonların sıklığı farklılık göstermemiştir. Powers (99) ve arkadaşları da preeklampsili ve sağlıklı gebeler arasında MTHFR 677 mutasyon sıklığı açısından fark olmadığını bildirmişlerdir.

Alfirevic (2) tarafından hazırlanmış olan meta-analizde, preeklampsisi ve eklampsisi olguları sağlıklı gebeliklerle karşılaştırıldığında, heterozigot Leiden taşıyıcılığının daha yüksek oranda olduğu belirtilmiştir.

Çalışmalar arasındaki farklılıklar araştırmanın niteliklerinden ve yapıldığı toplumdan kaynaklanabilir. Örneğin faktör V Leiden mutasyonu sıklığı Orta Avrupa'da %5 dolaylarında, Kuzey Avrupa'da %10-15 arasında iken, Asya, Afrika ve Güney Amerika toplumlarında nerdeyse sifıra yakındır (132). Bu durum hasta ve kontrol grupları oluştururken eşleştirmenin dikkatli yapılması gerekliliğine işaret etmektedir.

Faktör V. Leiden ve MTHFR C677T mutasyonlarının yanısıra, plazminojen aktivatör inhibitörü (PAİ)-1 geninde görülen 4G/5G insersiyon/delesyon mutasyonun da preeklampsisi gelişiminde rol oynadığına ilişkin bulgular yayınlanmıştır. Yamada (128) ve arkadaşlarınca yapılan çalışmada, 4G alel sıklığının preeklampsisi hastalarında sağlıklı gebelere ve gebe olmayan, sağlıklı kadınlara göre daha yüksek olduğu saptandığı bildirilmektedir.

Preeklampsisi, henüz bir kısmıyla ilişkisi ortaya konulamamış, birden fazla genin belirlediği bir bozukluk görüntüsü vermektedir. Ortaya çıkış dönemine ve şiddetine göre prognozu farklılık göstermektedir (68). Aşırı pıhtılaşmanın preeklampsisi patofizyolojisindeki yeri araştırılmaya devam etmektedir.

4.6.3 Plasenta dekolmanı

Wiener-Megnagi ve arkadaşları (125) yaptıkları çalışmada faktör V Leiden mutasyonu sıklığını plasenta dekolmanı olan gebelerde %29,6, sağlıklı gebelerde ise %3,4 oranında

saptamışlardır. Van der Molen'in (118) çalışmasında da, benzer şekilde, faktör V Leiden sıklığı ve ayrıca, MTHFR 677T polimorfizm sıklığı dekolmanlı gebe grubunda sağlıklı gebelerden daha fazla bulunmuştur.

Başka bir çalışmada, hiperhomosisteinemi, plasenta enfarktı olan gebelerde, sağlıklı gebelere göre yaklaşık 3 kat daha yüksek oranda bulunmuştur (sırasıyla %31 - %9). Kupferminc'in (66) çalışmasında, plasenta dekolmanı olan hastalarda trombofili mutasyonlarının sıklığı %70 olarak saptanmıştır.

4.6.4 İntrauterin Gelişme Geriliği

Komplikasyonlu 62 gebeyi içeren bir çalışmada, 13 tane intrauterin gelişme geriliği (İUGG) olan gebede hiperhomosisteinemi protein S eksikliği ve faktör V Leiden mutasyonu sırasıyla %38, %23 ve %12,5 oranlarında tespit edilmiştir. Çalışmada kontrol grubu kullanılmadığından istatistiksel karşılaştırma yapılmamıştır (30).

Kupferminc (66) ve arkadaşları, toplam 222 hastayı ve 156 sağlıklı gebeyi kapsayan çalışmalarında, İUGG'li gebelerde protrombin G20210A mutasyonunun, kontrollere oranla daha yaygın olarak bulunduğunu bildirmişlerdir.

4.6.5 İntrauterin Fötüs Ölümü

1996 yılında yayınlanan EPCOT (*European Prospective Cohort on Thrombophilia*) (100) çalışmasında, ailesel trombofili saptanan gebelik olgularında ölü doğum riskinin 3 kat artmış olduğu bildirilmiştir.

Faktör V Leiden mutasyonu ile intrauterin fötus ölümü arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda, mutasyonu taşıyan bireylerde, fötus kaybı riskinin, gebeliğin tamamı boyunca 2,7 kat arttığı bildirilirken, asıl yüksek riskin, ölü doğum, yani 20. gebelik haftasından önceki kayıplar için olduğu ortaya konmuştur (98). Homozigot Leiden taşıyıcılarında risk daha fazla artmaktadır (69).

Başka  alıŐmalarda, MTHFR C67T mutasyonu ile, ölü doğum arasında bir ilişki olmadığı belirtilmektedir (17,127).

4.6.6 Tekrarlayan Düşük (Habitüel Abortus)

Tekrarlayan düŐükler tüm gebeliklerin yaklaşık %1-2'sinde görülmektedir (102). Nedenleri arasında anatomik, endokrinolojik, otoimmün etkenler ve kromozom bozuklukları (translokasyonlar, inversiyonlar) vardır. Ancak bu grupların dışında kalan ve nedeni belli olamayan, tekrarlayan düşük olgularına sık rastlanmaktadır. Bu grup olgular üzerinde trombofil mutasyonlarının yeri araştırılmaktadır.

Grandone (48) ve arkadaşları faktör V Leiden mutasyonun, tekrarlayan düşük olgularında %16 oranında, aynı çalışmanın sağlıklı gebe kontrollerinde ise, oranın %4 olduğunu bildirmişlerdir. Tekrarlayan düşük olguları ile faktör V Leiden ilişkisini destekleyen başka bir  alıŐma Ridker (102) tarafından yayınlanmıştır.

Nelen (89) tekrarlayan düşük olgularında hiperhomosisteineminin yerini inceleyen çalışmalar üzerinde yaptığı meta-analizde, bu tip 10 çalıŐmadan elde edilen sonuçlara göre, hiperhomosisteineminin tekrarlayan düşük riskini 3-4 kat arttırdığı sonucuna varmıştır.

Gris ve arkadaşları (52) nedeni açıklanamayan tekrarlayan d Ő kl  616 gebede PA  etkinlik düzeyinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Son dönemlerde, yukarda daha sık olarak anılan faktör V Leiden, MTHFR C677T ve protrombin G20210A mutasyonlarının yanı sıra, başka polimorfizmlerin de gebelik komplikasyonlarının patofizyolojisiyle ilişkisini araştıran çalışmalar yapılmaktadır. Glueck (44) ve arkadaşları komplikasyonlu 94 gebeye eşleştirilmiş, sağlıklı 95 gebeyi karşılaştırmıştır. Komplikasyonlu gebelerde PAİ-1 4G/4G homozigotluğunun sağlıklı gebelere oranla daha fazla olduğu (sırasıyla, %33 - %0; p=0,008) belirtilmiştir. Ağır preeklampsi, plasenta dekolmanı, ağır İUGG ve intrauterin fœtus ölümünde 4G/5G sıklığının yüksek olduğu ortaya konmuştur. Bu veriler grubun daha önceki çalışmalarıyla da benzerlik göstermektedir (46,47).

Tablo 4.2’de gebelik komplikasyonları ve etiyojisinde üzerinde durulan kalıtsal kusurlar sunulmuştur.

Tablo 4.2 Plasentada Tromboz Yatkınlığı ile İlişkili Vasküler Komplikasyonlar

KUSUR	Düşük	İUMF	Preeklampsi	dekolman
Antitrombin eksikliği	++	++	+	
Protein C eksikliği	++	++	+	
Protein S eksikliği	++	++	+	+
Disfibrinojenemi	+	+		
APC direnci	++	++	++	+
Faktör V Leiden	++	++	++	++
MTHFR C677T	+	+	+	+
Hiperhomosisteinemi	+	+	++	++
Faktör II G20210A	+	+	+	++
Antifosfolipid sendromu	++	++	++	++

İUMF, intrauterin fœtus ölümü; APC, aktive protein C; MTHFR, metilentetrahidrofolatredüktaz;

* İlişki kuvveti: +, olası ilişki; ++, gösterilmiş ilişki

5. GEREÇ - YÖNTEM

5.1 Gereç

5.1.1 Cihazlar

Derin dondurucu (-20°C)	<i>Philco, Türkiye</i>
Buzdolabı	<i>Arçelik, Türkiye</i>
Distile su cihazı	<i>Milli Q [JSI] UF Millipore</i>
Hassas terazi	<i>Mettler PJ6000, Almanya</i>
Hassas terazi	<i>Mettler AT261, Almanya</i>
Otoklav	<i>All American, A.B.D.</i>
Manyetik karıştırıcı	<i>Elektro-Mag, Türkiye</i>
pH-metre	<i>WTW, Almanya</i>
Santrifüj tüpleri, 15 mL	<i>Falcon, İngiltere</i>
Otomatik mikropipetler	<i>Gilson, İngiltere</i>
Soğutmalı Santrifüj	<i>IEC - MP4R, A.B.D.</i>
Mikrosantrifüj	<i>Heraeus, Almanya</i>
Etüv	<i>Heraeus, Almanya</i>
Kırık Buz makinası	<i>Scotsman, A.B.D.</i>
Isı döngü cihazı	<i>Biometra, A.B.D.</i>
Yatay elektroforez düzeneği	<i>Biometra, A.B.D.</i>
Dikey elektroforez düzeneği	<i>Bio-Rad, A.B.D.</i>
Güç kaynağı	<i>ATTO, Japonya</i>
Mor ötesi ışık kaynağı	<i>Vilber Lourmat, Fransa</i>
Görüntüleme düzeneği	<i>Polaroid MP 4⁺ Camera System, A.B.D.</i>
Floresan Polarizasyon Immunoassay	<i>IMX, A.B.D.</i>

5.1.2 Kimyasal maddeler

Sodyum klorür	<i>Merck, Almanya</i>
Potasyum klorür	<i>Sigma, A.B.D.</i>
Magnezyum klorür (MgCl ₂)	<i>Sigma, A.B.D.</i>
Trizma baz	<i>Sigma, A.B.D.</i>
Etilen-diamin tetraasetik asit (EDTA)	<i>Carlo Erba, Almanya</i>
Sodyum dodesil sülfat	<i>Merck, Almanya</i>
Fenol	<i>Merck, Almanya</i>
Kloroform	<i>Sigma, A.B.D.</i>
İzoamil alkol	<i>Sigma, A.B.D.</i>
Etanol	<i>Carlo Erba, Almanya</i>
DNA (Taq) polimeraz	<i>MBI Fermentas, Litvanya</i>
10X polimeraz enzimi	<i>MBI Fermentas, Litvanya</i>
MgCl ₂ (25 mM)	<i>MBI Fermentas, Litvanya</i>
Dinükleotid seti	<i>MBI Fermentas, Litvanya</i>
Oligonükleotidler	<i>İyontek, Türkiye</i>
Madeni yağ	<i>Sigma, A.B.D.</i>
Agaroz	<i>Prona</i>
Borik asit	<i>BioRad, A.B.D.</i>
Bis-akrilamid	<i>Sigma, A.B.D.</i>
N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED)	<i>Sigma, A.B.D.</i>
Ammonyum per sülfat	<i>Sigma, A.B.D.</i>
Gliserol	<i>Sigma, A.B.D.</i>
Restriksiyon enzimleri	
Rsa I	<i>MBI Fermentas, Litvanya</i>
MboII	<i>MBI Fermentas, Litvanya</i>
Etidyum bromür	<i>Sigma, A.B.D.</i>

Bromfenol mavisi	<i>Sigma A.B.D.</i>
Ksilen siyanol	<i>Sigma, A.B.D.</i>

5.1.2.1 Tampon çözeltiler

Tüm çözeltiler distile su ile hazırlanmış, sonrasında otoklavlanarak steril hale getirilmiştir (108).

5x TBE

Tris-HCl	0,45 M
Borik asit	0,45 M
EDTA (pH=8,0)	0,01 M

TE

Tris-HCl (pH=7,6)	10 mM
EDTA	1 mM

Solüsyon I

Magnezyum klorür	10 mM
Potasyum klorür	10 mM
Tris	10 mM

Solüsyon II

Magnezyum klorür	10 mM
Potasyum klorür	10 mM
Tris	10 mM
Sodyum klorür	0,5 mM
Sodyum dodesil sülfat	% 0,5
EDTA	2 mM

Kloroform - izoamil alkol 24:1

Doymuş fenol eriyiği

kristalize fenol	250 gram
distile su	50 mL
Tris (1 mol/litre, pH=8,0)	100 mL

10x DNA polimeraz tamponu

Tris-Hcl	100 mM pH= 9,0
Potasyum klorür	500mM
Triton X-100	%1

Deoksinükleotidtrifosfat (dNTP) karışımı

deoksiadenin trifosfat (dATP)	10 mM
deoksiguanin trifosfat (dDGT)	10 mM
deoksitimidin trifosfat (dTTP)	10 mM
deoksisitozin trifosfat (dCTP)	10 mM

EDTA 0,5 M pH=8,0

Yükleme tamponu

Bromfenol mavisi	%0,25
Ksilen siyanol FF	%0,25
Gliserol	%30

Etidyum bromür 10 mikrogram/mL ($\mu\text{g/mL}$)

Akrilamid stok çözeltisi (%30)

Akrilamid	29 gram
Bis-akrilamid	1 gram
toplam hacim	100 mL

Akrilamid jel (%12; gliserol %10)

% 30 Akrilamid	13 mL
distile su	12,7 mL
5x TBE	6,5 mL
%10 APS	0,25 mL
TEMED	0,35 mL
Gliserol	3 mL

5.2 Yöntem

5.2.1 Hasta ve Kontrol Grubunun Belirlenmesi

Bu çalışma için gerekli olan etik onay, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu tarafından verilmiştir (B.30.2.MAR.0.70.00.03/1111).

Çalışmaya alınacak hastaların tanıları, Ocak 2003 – Haziran 2003 dönemi içinde, Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nde konulmuştur. Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğinde takip edilen, sağlıklı gebeler arasından, yaş ve gebelik haftası verileri, hasta grubuyla eşleştirilen 100 gebeyle kontrol grubu oluşturulmuştur.

Hasta grupları, aşağıdaki tanıları alan gebe kadınlar arasından, ardışık olarak 100 kişinin seçilmesiyle oluşturulmuştur:

- Amerikan Obstetrik ve Jinekoloji Okulu (*American College of Obstetrics and Gynecology; ACOG*) (30) ölçütlerine uyan ağır preeklampsi ve eklampsi olguları,
- Plasenta dekolmanı olguları,
- Hemoliz, karaciğer işlev bozukluğu ve trombositopeninin görüldüğü HELLP sendromlu olgular,
- Gebelik haftasına göre, fötüs ağırlığı yüzde 3'lük dilimin / -2 standart sapmanın altında kalan ve nedeni belli olmayan intrauterin gelişme geriliği olguları,
- 28. gebelik haftasından sonraki, nedeni açıklanamayan intrauterin fötüs ölümü olguları,
- En az 3 tane, nedeni açıklanamayan, gebeliğin ilk 6 ayında görülmüş, spontan (tekrarlayan) düşük olguları.
- Derin Ven Trombozu (DVT) olguları

Kronik hipertansiyon, herhangi bir tip diyabet mellitus, baş doku hastalığı, kronik böbrek hastalığı bulunan olgular ve 40 yaş üzerindeki gebeler ile çoğul gebeliği olan olgular çalışma dışında bırakılmışlardır.

Çalışmaya alınan tüm gebelerin obstetrik öyküleri ve değerlendirmeleri tamamlanmıştır. Gebelik süresince vitamin, sigara, alkol kullanımı kaydedilmiştir. Kan basıncı, kalp tepe atımı, vücut ağırlığı değişimi ve ultrasonografik ölçümlere göre fötus gelişimi izlenmiştir. Rutin biyokimya tetkiklerinin yanısıra, tanılarına göre gerekli ek tetkikleri yaptırılmıştır.

5.2.2 Genetik İnceleme

5.2.2.1 Kan rneğinin Alınması

Hasta ve kontrol grubundaki tüm gebelerden faktör V A4070G, metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) A1298C ve plazminojen akıvatr inhibitörü (PAİ)-1 4G/5G mutasyonlarının taranması amacıyla kan rneği alınmıştır. rnek, hastanın bulunduğu poliklinik ya da serviste, periferik bir venden, steril teknikle, pıhtılaşmasını engellemek amacıyla, 0,5 mmol/L etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren tüpe, 5 mL olarak alınmıştır. Örnekler, genetik incelemenin yapılacağı Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirilmeden önceki dönemde +4°C'ta bekletilmiştir. Örnekler alınmalarından, ortalama bir hafta sonra deoksiribonükleik asit (DNA) ayrıştırması için laboratuvara getirilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi aşamasına gelinene kadar örneklerin hangi gruba dahil olduğu ğrenilmemiştir.

5.2.2.2 DNA Ayrıştırması

Bu işlem için daha önce tarafından bildirilmiş, hızlı DNA izolasyon yöntemi kullanılmıştır (109). Deney protokolü aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

- EDTA ile karışmış kan örneğinin, 15 mL'lik konik santrifüj tüpüne alınması
- Örnek hacminin solüsyon I kullanılarak 10 mL'ye tamamlanması
- 120 mikrolitre iyonik olmayan deterjan eklenmesi ve tüpün yavaşça döndürülerek örneğin karıştırılması
- Santrifüjde 600 g hızda, 10 dakika süreyle tüpün çevrilmesi
- Çökelti yerinden oynatılmadan üst sıvının atılması
- Çökelti üzerine 800 mikrolitre solüsyon II eklenmesi
- Çökeltinin solüsyon II içinde süspanse edilmesi ve mikrosantrifüj tüpüne alınması
- Tüpe 400 mikrolitre, Tris ile doyurulmuş fenol eklenmesi ve karıştırılması
- 1 dakika süreyle, 12000 rpm (dönüş/dakika) hızla santrifüj yapılması
- Üst fazın, temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınması
- Tüpe 200 mikrolitre fenol ve eş hacimde, 24:1 oranında hazırlanmış kloroform:izoamilalkol karışımının eklenmesi ve tüpün karıştırılması
- 12000 rpm'de 1 dakika süreyle çevrilmesi
- Üst sıvının temiz mikrosantrifüj tüpüne alınması; üzerine 700 mikrolitre kloroform:izoamil alkol karışımı eklenip karıştırılması
- 12000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj
- Üst sıvının temiz tüpe alınması; DNA'nın çöktürülmesi amacıyla, -20°C'de bekleyen saf etanolün eklenmesi
- Yoğunlaşan DNA'nın Pasteur pipetinin ucuyla, %70'lik etanol içeren mikrosantrifüj tüpüne aktarılması ve yıkanması
- 12000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj yapılması
- Etanolün, çöken DNA kaldırılmadan dökülmesi ve kalan etanolün oda ısısında uçurulması.
- DNA'nın Tris-EDTA tamponunda çözülmesi.

İzolasyon sırasında tüpler ve atık üst sıvılar, çamaşır suyu içine boşaltılmış; 3 saat bekletildikten sonra atılmıştır.

DNA çözeltileri –20°C’de saklanmıştır.

5.2.2.3 DNA yoğunluğunun belirlenmesi

Elde edilen DNA süspansiyonunun yoğunluğunun ve saflığının belirlenmesi amacıyla, spektrofotometrede, 260 ve 280 nanometre (nm) dalga boylarında absorbans (emilim) ölçümü yapılmıştır (108).

Asıl DNA süspansiyonundan alınan 20 mikrolitre örnek, steril bir tüp içinde, steril distile su ile 1000 mikrolitreye tamamlanmış, yani 1’e 50 oranında seyreltilmiştir. Seyreltilmiş örneğin spektrofotometrede önce 260 nm, sonra 280 nm’de absorbans (optik yoğunluk, OY) değeri ölçülmüştür.

50 milimolar (mM) çift sarmal DNA’nın 260 nm’deki optik yoğunluğu (OY) 1’e eşittir. Buna göre:

$$OY_{260 \text{ nm}} \times 50 \text{ mM} \times \text{seyreltme faktörü (50)} = \text{DNA yoğunluğu (mM)}$$

İkiyüzaltmış nm’deki optik yoğunluk (OY) değerinin 280 nm’dekine oranı (OY_{260} / OY_{280}) DNA örneğinin saflığı hakkında bilgi vermektedir. Eğer bu oran 1,6’dan aşağıdaysa DNA örneğinde protein kontaminasyonu, 2,0’ın üzerindeyse RNA kontaminasyonu olduğu kabul edilir (108).

5.2.2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, belirlenmiş bir hedef DNA dizisini, in vitro koşulda, in vivo DNA eşlenmesi düzeneğini kısmen taklit ederek, çoğaltmaya yarayan bir yöntemdir (110). Yöntem, bir DNA karışımı içinde, çoğaltılacak dizinin seçilmesini ve yalnız bu dizinin

çoğaltılmasını olanaklı kılar. Bu seçiciliği sağlamak için, çoğaltılacak dizi hakkında önceden bilgi sahibi olunması gereklidir. Çoğaltılması hedeflenen dizinin başlangıç ve bitişini çevreleyen bölgelerin baz dizilişinin bilinmesi, bu bölgelere özgün olarak bağlanacak iki kısa nükleotid (oligonükleotid) dizisinin oluşturulmasına imkan verir. Bu oligonükleotidler ya da PZR reaksiyonundaki adlarıyla primerler, yüksek ısıda iki ipliği birbirinden ayrılacak DNA molekülünde, kendilerine özgün ipliğe bağlanabilme yeteneğine sahiptir. Bu primerler, DNA yapıtaşı olan dört deoksinnükleotidin (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP), ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi aracılığıyla yeni DNA ipliklerinin yapımında kullanılmalarını sağlar. Yeni yapılan DNA iplikleri, primerlerin de bağlandığı, kalıp DNA ipliklerinin komplementeri özelliktedir. Böylece hedef bölge kopyalanmış olmaktadır (110).

Polimeraz zincir reaksiyonu sırasındaki aşamalar, basamaklar halinde şu şekilde özetlenebilir:

- Denaturasyon: çift iplik DNA molekülünün, yüksek ısıda (92-95°C) tek iplikli hale dönüşmesi.
- Bağlanma: tek iplik halindeki DNA süspansiyonunda, birbirini tamamlayan (birbirine komplementer olan) nükleotid dizilerinin çift sarmal oluşturması. Bu basamakta primerlerin, özgün oldukları kalıp DNA bölgesine bağlanması beklenir (40-65°C).
- Uzama: Isıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi, ortamda bulunan dNTP moleküllerini kullanarak, primerlerin serbest 3'-OH uçlarından, kalıp DNA'ya komplementer kopyanın yapımını gerçekleştirir (72°C). *Thermus aquaticus* (Taq) adlı bakteriden elde edilen ve yüksek ısıya dirençli olan DNA polimeraz enzimi PZR'de kullanılmaktadır (110).

Bu üç basamak, ısı döngü cihazında arka arkaya yaklaşık 30 kez tekrarlanır. Her bir tur bir döngü olarak adlandırılır.

Önceki paragraflarda anılan ve PZR için gerekli olan bileşenler şöyle sıralanabilir:

- Kalıp DNA
- İki adet oligonükleotid (primerler)
- Deoksiribonükleotid fosfat karışımı (dNTP'ler)
- Yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi (Taq polimeraz)
- Enzimin çalışması için uygun tampon çözelti ve magnezyum klorür
- Reaksiyonun içinde gerçekleşeceği ısı döngü cihazı (110)

5.2.2.5 PZR Optimizasyonu

Bu çalışmada kalıp DNA, önceki bölümde anlatılan yöntemle elde edilmiş ve PZR'de kullanılmıştır. DNA ayrıştırması sonucunda, her kan örneğinden aynı miktarda DNA elde edilmediği görülmüştür. Bazı DNA süspansiyonlarında, izole edilen miktarın fazla oluşu, DNA yoğunluğunun yüksek olmasına yol açmıştır. Bu yüzden, reaksiyona konacak kalıp DNA örneği, esas DNA süspansiyonundan değil, onun steril distile suda seyreltilmiş örneğinden alınarak kullanılmıştır. Çalışma içindeki üç farklı bölge için yapılan PZR'lerde, reaksiyona sokulan kalıp DNA miktarı toplam hacimde 100-150 mmol olacak şekilde ayarlanmıştır.

Çalışmada kullanılan primerler liyofilize halde satın alınmıştır. Primerler 100 mikrolitre steril distile su içinde çözülmüş; reaksiyonlarında kullanılmak üzere 10 pmol/mikrolitre yoğunlukta alikotlar hazırlanmıştır. Hem ana stok, hem de hazırlanan seyreltiler -20°C 'de saklanmıştır.

Nükleik asitlerin kararlılığını göstermede kullanılan ölçütlerden biri, ikili sarmal ısının yükselmesiyle tek iplik haline dönüşürken, yarısının bu konumda, yarısının çift sarmal halde bulunduğu sıcaklığı belirten ve T_m (*melting temperature*) olarak gösterilen değerdir. Uygun bağlanma ısısının seçilmesi, primerlerin özgün oldukları bölgeden başka bir yere

bağlanmalarını engellemek içindir. Primerler için T_m aşağıdaki formüle göre hesaplanmaktadır:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 (A+T) + 4 (G+C)$$

A, T, G, C (sırasıyla) : adenin, timin, guanin ve sitozin bazlarının primer molekülündeki sayısını gösterir.

Tablo 5.1. Primer dizileri, PZR ürün büyüklükleri.

Gen polimorfizm /	İleri primer Geri primer	Ürün büyüklüğü (baz çifti)	Ref.
FV A4070G	5'- CAA GTC CTT CCC CAC AGA TAT A -3' 5'- AGA TCT GCA AAG AGG GGC AT -3'	702	29
MTHFR A1298C	5'- CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA C-3' 5'- CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG -3'	163	119
PAİ-1 4G/5G	5'- GTC TGG ACA CGT GGG GA -3' 5'- GTC TGG ACA CGT GGG GGA -3' 5'- TGC AGG AAT TCA GCT GCT GGA -3'	765 (766)	44
ER1 IVS401	5'- CTG CCA CCC TAT CTG TAT CTT TTC CTA TTC TCC -3' 5'- TCT TTC TCT GCC ACC CTG GCG TCG ATT ATC TGA	1300	86

FV: faktör V, MTHFR: metilentetrahidrofolat redüktaz; PAİ-1: plazminojen aktivatör inhibitörü-1; ER1-IVS: östrojen reseptörü-1, *intervening sequence*.

PZR ana karışımı, steril koşullarda, 0,5 mikrolitrelik, ince duvarlı tüplerde hazırlanmıştır. Üzeri 35-40 mikrolitre madeni yağ ile kapatıldıktan sonra, DNA karışımının içine eklenmiştir. Tüpler reaksiyon karışımı ve yağ ayrışımı için çok kısa süreyle, yüksek hızda çevrilip ısı döngü cihazına yerleştirilmiştir.

Magnezyum klorür Taq polimerazın kofaktörü olarak görev yapar. Magnezyum yoğunluğu olması gerekenin altında ise, enzimin verimi düşer, hedef bölge yetersiz çoğaltılır.

Magnezyum yoğunluğu gerekenden yüksekse, hedef bölge dışında kalan, primerlerin özgün olarak tanımadığı başka bölgeler çoğaltılabilir.

Bu çalışmada son magnezyum yoğunluğu 1.5 mM ile 3,5 mM arasında, 0,5'er mM artacak şekilde, her reaksiyon için deneme yapılmış ve bant niteliklerine göre, kullanılacak yoğunluk seçilmiştir.

Tablo 5.2. Faktör V A4070G taraması için PZR

PZR bileşeni	1x (μ L)	Son yoğunluk	PZR koşulları:	döngü
10x PZR tamponu	5	1x	94°C	5 dakika
MgCl ₂ (25 mM)	4	2 mM	<u>35 döngü</u>	
dNTP karışımı (10'ar mM)	1,5	0,3 mM	94°C	30 saniye
İleri primer (10 μ M)	1	0,2 μ M	58°C	1 dakika
Geri primer (10 μ M)	1	0,2 μ M	72°C	1 dakika
Taq polimeraz (5 ünite/ μ L)	0,25	0,025 ünite/ μ L	72°C	7 dakika
Steril distile su	32,25			
DNA (20-25 mM)	5	100-125 mmol / 50 μ L		
Toplam hacim	50			

Tablo5.3. MTHFR A1298C taraması için PZR

PZR bileşeni	1x (µL)	Son yoğunluk	PZR döngü koşulları:
10x PZR tamponu	2,5	1x	95°C - 5 dakika
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	1,5 mM	35 döngü
dNTP karışımı (10'ar mM)	0,5	0,2 mM	94°C - 30 saniye
İleri primer (10 µM)	1,5	0,6 µ	52°C 30 saniye
Geri primer (10 µM)	1,5	0,6 µM	72°C 30 saniye
Taq polimeraz (5 ünite/µL)	0,125	0,025 ünite/µL	72°C 10 dakika
Steril distile su	12,375		
DNA (20-25 mM)	5	100-125 mmol / 50 µL	
Toplam hacim	25		

Tablo 5.4. PAİ-1 4G/5G taraması için PZR

PZR bileşeni	1x (µL)	Son yoğunluk	PZR döngü koşulları:
10x PZR tamponu	5	1x	95°C 5 dakika
MgCl ₂ (25 mM)	3,5	1,75 mM	15 döngü:
dNTP karışımı (10'ar mM)	1,5	0,3 mM	95°C 1 dakika
4G ileri primer (10 µM)	1	0,2 µM	55°C 1 dakika
veya			72°C 1 dakika
5G ileri primer (10 µM)			20 döngü:
Ortak geri primer (10 µM)	1	0,2 µM	95°C 1 dakika
ER ileri primer (10 µM)	1	0,2 µM	62°C 1 dakika
ER geri primer (10 µM)	1	0,2 µM	72°C 1 dakika
Taq polimeraz (5 ünite/µL)	0,3	0,03 ünite/µL	72 °C 5 dakika
Steril distile su	30,7		
DNA (20-25 mM)	5	100-125 mmol / 50 µL	
Toplam hacim	50		

5.2.2.6 Alele Özgü Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İki alel arasında tek bir nükleotidden oluşan fark, oligonükleotid primerlerinin, farklı iki aleli tanıyacak şekilde tasarlanması durumunda, doğrudan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sonunda saptanabilir. Alele özgü primerler, 3' uçlarındaki son baz dışında birbirinin aynı olarak sentezlenir. Son nükleotidler, taranacak polimorfizmin alellerine göre belirlenir; böylece iki ileri primer oluşturulur. PZR ile çoğaltılacak bölgeyi sınırlayan geri primer ise bir tanedir. O halde, çoğaltılacak DNA dizisi için , iki farklı reaksiyon gerçekleştirilir; bu iki

ana karışımın arasındaki fark, polimorfik alele göre belirlenmiş iki ileri primerden yalnız birini içermeleridir.

PAİ-1 4G/5G polimorfizmine yol açan bir guanin insersiyon/delesyon değişikliğinin belirlenmesi için, dört ve beş guaninle sonlanan, iki farklı ileri primer ve bir ortak geri primerin seçildiği bir protokol kullanılmıştır (111) (tablo5.4). Bu reaksiyonda, iki farklı primerin, karşılıklı olarak, birbirlerinin kalıp aleline, düşük bir özgünlük ve kararlılıkla bağlanabileceği düşünülerek, reaksiyon döngüleri, her iki primerin bağlanma ısılarını da kullanacak şekilde tasarlanmıştır (tablo5.4).

Aynı reaksiyon karışımı için de, mutasyon taraması yapılan bölgeden daha uzun bir bağımsız bölgenin amplifikasyonunun yapılması, PZR'nin gerçekleşip gerçekleşmediğini göstermek açısından gereklidir. Daha uzun olan bu bölgenin çoğaltılması ve jel elektroforezinde görüntülenmiş olması, PZR düzeneğinin işlediğini ortaya koyar. PAİ-1 4G/5G polimorfizminin alele özgü PZR yöntemiyle taranmasında, östrojen reseptörü-1'in 1. intron bölgesinde yer alan, 1300 baz çift uzunluğundaki bir DNA dizisi kontrol amaçlı olarak, hem 4G hem de 5G ileri primerinin yer aldığı tüplerde çoğaltılmıştır. Bu dizinin primerleri ER1 ve ER2 olarak adlandırılmıştır.

5.2.2.7 PZR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimiyle Kesilmesi

Restriksiyon enzimleri, DNA üzerinde belirli dizileri, DNA'nın neresinde olursa olsun tanıyan ve DNA'nın iki ipliğini birden belli noktalardan kesen enzimlerdir. Bakterilerden saflaştırılan bu enzimler, bakterileri yabancı organizmalardan koruma görevini yapar. Enzimleri, izole edildikleri bakterinin türüne göre adlandırılır. Tanıdıkları diziler genellikle 4-6 baz uzunluğundadır ve her dizi belli bir bakteri için özgünlüğe sahiptir.

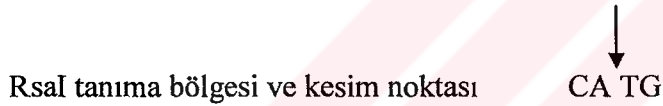
Enzimler, DNA dizilerini tanımalarındaki özgünlük sayesinde, DNA molekülünün nitelendirilmesinde, gen aktarımı işlemlerinde kullanılabilir. Tanıma bölgelerinde ya da

kesim noktalarında oluşacak değişiklikler, enzimin işlevini engeller. Bir DNA dizisi üzerinde, belli bir restriksiyon enziminin tanıma ya da kesim bölgesinde yer alan bir nükleotid değişikliğinin varlığı, enzimin o diziyi kesip kesmemesi ile takip edilebilir.

Bu çalışmada, faktör V geni üzerindeki A4070G nokta mutasyonunun ve metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) genindeki A1298C polimorfizminin saptanması için, bu nükleotid değişikliklerini içine alan iki bölge, polimeraz zincir reaksiyonuyla çoğaltılmış, ve bölgeler ayrı birer restriksiyon enzimiyle kesilmeye çalışılmıştır.

Faktör V A4070G polimorfizminin restriksiyonla gösterilmesi

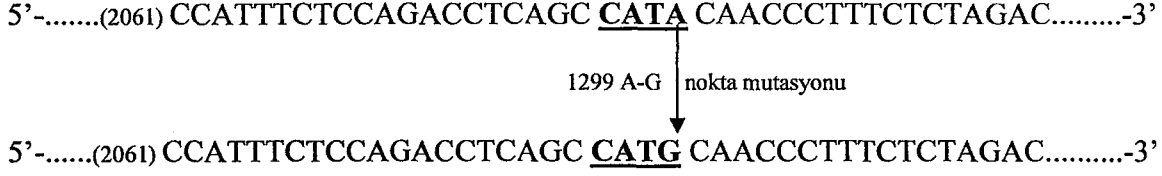
Faktör V geni üzerinde 1299. amino asidin kodonunda yer alan adenin (A) bazı guaninle yer değiştirdiğinde, kendisinden önceki üç nükleotidle birlikte, RsaI restriksiyon enziminin tanıma bölgesi oluşmaktadır:



RsaI restriksiyon enzim reaksiyonu

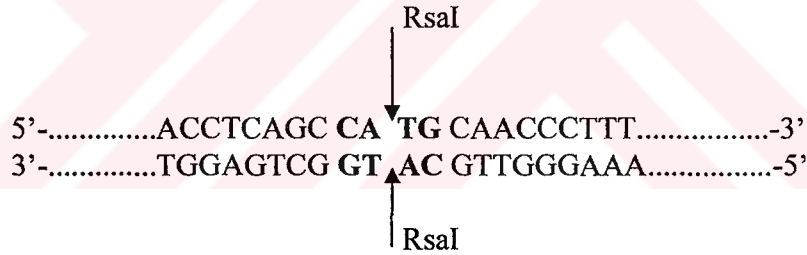
	<u>1x</u>	<u>son yoğunluk</u>
RsaI enzimi (10 ünite/ μ L)	0,1 μ L	1 ünite / 30 μ L
Enzim tamponu (10x)	3 μ L	1x
PZR ürünü	15 μ L	
<u>Steril distile H₂O</u>	<u>11,85</u>	Hazırlanan reaksiyon bileşimi, gece
Toplam hacim	30 μ L	boyu 37°C'de bekletilmiştir.

Faktör V geni, 13. ekzonda, A4070G'yi içeren bölge:

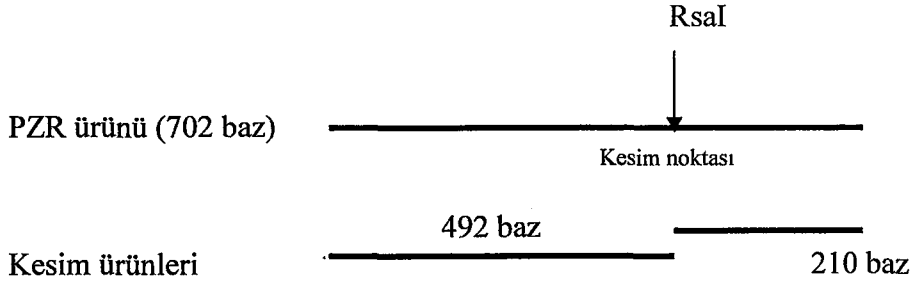


PZR ile çoğaltılmış olan bölge (toplam uzunluğu 702 baz) RsaI restriksiyon enzimiyle kesilmeye çalışıldığında, eğer yukarda gösterilen A-G baz değişikliği olmuşsa, enzim kendine özgü CATG tanıma bölgesini bulacak, ve bu dörtlünün tam ortasındaki kesim noktasından diziyi kesecektir. Çoğaltılan DNA bölgesinde RsaI enziminin başka tanıma bölgesi olmadığından, bölge iki parçaya ayrılacaktır. Eğer değişiklik olmamışsa, tanıma bölgesi oluşmayacağından, çoğaltılmış dizi kesilmeyecektir.

Her restriksiyon enzimi DNA'yı iki iplikten birden kesmektedir. Buna göre:



Bu işlem sonucunda, polimeraz zincir reaksiyonunda çoğaltılan bölgeye göre uzunluğu farklı olan iki ayrı DNA parçası ortaya çıkmaktadır. Oluşan parçalar 492 ve 210 baz uzunluğundadır. Bu parçaların birbirinden ve kesilmemiş PZR ürününden ayrılması elektroforezle sağlanmaktadır. Bu işlem ilerde anlatılmaktadır.



Şekil 5.1. Faktör V A4070G PZR ürününün restriksiyon enzimi kesimi, ürün büyüklükleri.

MTHFR A1298C polimorfizminin restriksiyonla gösterilmesi

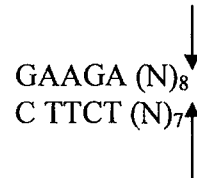
MTHFR A1298C polimorfizmini içeren bir DNA dizisinin PZR ile çoğaltılmasından sonra, çoğaltılan dizi, Moraxella bovis isimli bakteriden elde edilen MboII restriksiyon enzimiyle kesilmektedir.

Mbo II Restriksiyon enzim reaksiyonu

	<u>1x</u>	<u>son yoğunluk</u>
MboII enzimi (10 ünite/ μ L)	0,2 μ L	2 ünite / 25 μ L
Enzim tamponu (10x)	2,5 μ L	1x
PZR ürünü	10 μ L	
Steril distile H ₂ O	12,3	
Toplam hacim	25 μ L	

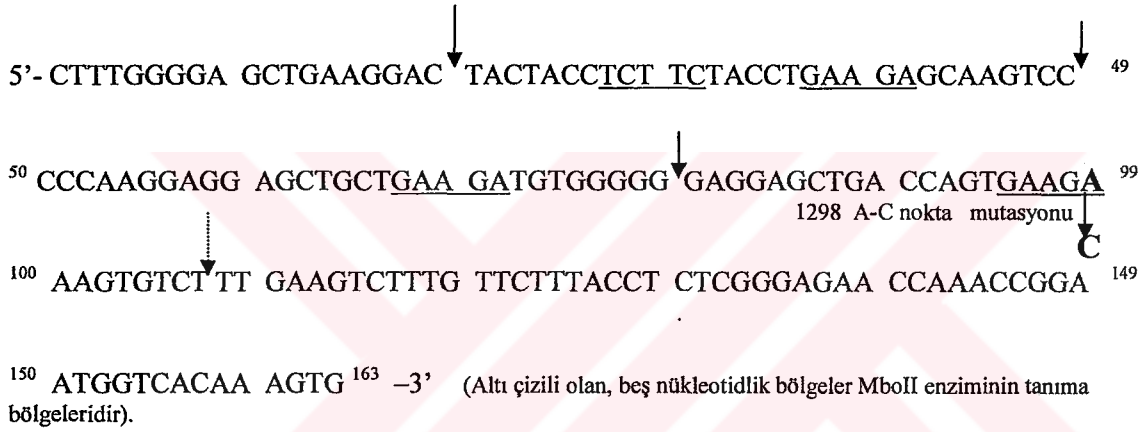
Hazırlanan reaksiyon karışımı gece boyu, 37°C'de bekletilmiştir.

MboII tanıma bölgesi ve kesim noktaları

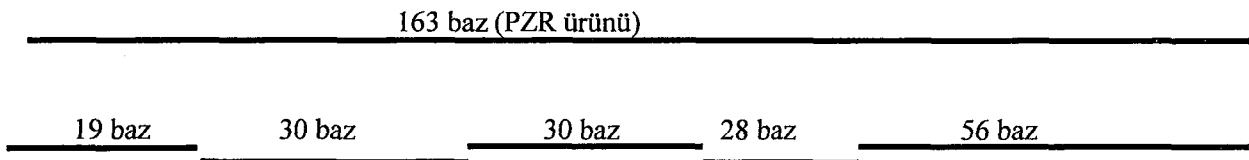


MTHFR üzerinde A1298C baz değişikliğini göstermek üzere PZR ile çoğaltılan 163 baz uzunluğundaki bölge, genin 7. ekzonunun içindedir. Dizi üzerinde MboII enziminin, 1298. sıradaki baz adenin (A) ise üç, eğer baz sitozin (C) ise dört ayrı tanıma bölgesi olur. Bu nedenle 1298A aleli MboII tarafından dört parçaya ayrılırken, 1298C aleli beş parçaya ayrılır.

MTHFR A1298C polimorfizmi taraması için PZR ile çoğaltılan dizi:

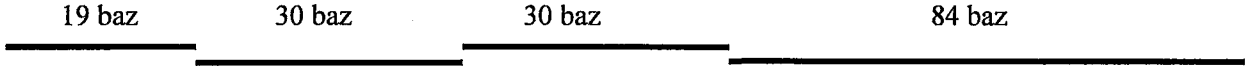


PZR ile çoğaltılmış olan yukardaki bölge, MboII restriksiyon enziminin kesme noktalarından bölünmektedir. Eğer dizinin 99. sıradaki bazı adenin (A) ise, 105 ve 106. nükleotidler arasında bir kesim noktası oluşur ve dizi, yani MTHFR 1298A alelini içeren dizi toplamda 5 parçaya ayrılmış olur.



Şekil 5.2. MTHFR A1298C PZR ürününün MboII restriksiyon enzimi kesimi; homozigot (1298 AA) genotip

Eğer dizinin 99. sırasındaki nükleotid sitozine (C) dönüşmüşse, o zaman 105. ve 106. nükleotid arasındaki kesim noktası ortadan kalkar. MTHFR 1298C alelini içeren dizi, toplamda 4 parçaya ayrılmış olur.



Şekil 5.3 MTHFR A1298C PZR ürününün MboII restriksiyon enzim kesimi, homozigot (1298 CC) genotip.

MTHFR A1298C polimorfizmi için çoğaltılan PZR ürünü yatay agaroz jel elektroforeziyle, MboII ile kesim sonrası elde edilen ürünler ise dikey akrilamid jel elektroforeziyle görüntülenmiştir. Her iki deney de izleyen elektroforez bölümünde anlatılmaktadır.

5.2.2.8 PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezi

PZR ürünlerinin ayrıştırılmasında agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Agaroz yoğunluğu, ayrıştırılması gereken DNA parçalarının büyüklüğüne göre ayarlanmaktadır. Faktör V A4070G ve PAİ-1 4G/5G polimorfizmi için çoğaltılan parçalar %1,6'lık agaroz jelinde yürütülmüştür. MTHFR A1298C'yi içeren DNA parçasının elektroforezi ise % 2'lik agaroz jelinde yapılmıştır.

Yatay Agaroz Jel Elektroforezi

Küçük jel tankında hazırlanacak %1,6 yoğunluğundaki jel için, 480 mg agaroz, 5x ana stoktan seyreltilerek hazırlanan, 30 mL 1x TBE (tris-borat-EDTA) içinde çözülmüştür.

%2'lik jel için, 600 mg agaroz, 30 mL 1x TBE içinde çözülmüştür. Jellere, DNA görüntülemesi için, 0,5 µg/mL yoğunluğunda olacak şekilde etidyum bromür (EB) eklenmiştir.

EB, DNA ikili sarmal yapısında, baz çiftleri arasına bağlanarak, morötesi ışıktaki DNA molekülünün görünür bir ışıma vermesini sağlar. PZR ürünleri ve restriksiyon enzimiyle kesim ürünleri bu yöntemle görüntülenmiştir.

Kaynatılarak hazırlan jel oda sıcaklığında bir süre soğutulmuş ve ardından kabına dökülmüş, örneklerin yükleneceği kuyuların oluşabilmesi için taraklar yerleştirildikten sonra, polimerleşmesi beklenmiştir. Jel kabı, 1x TBE içeren elektroforez tankına konmuş ve örnekler 6x yükleme tamponuyla, tampon 5'e 1 seyreltilecek oranda parafilm üzerinde karıştırıldıktan sonra, jele yüklenmiştir. Yürütülen PZR ya da kesim ürünlerinin büyüklüklerinin yorumlanması için, büyüklüğü bilinen DNA parçalarından oluşan DNA *marker*, yükleme tamponuyla bire bir karıştırılarak yüklenmiştir. Kullanılan marker 50 ya da 100 baz çift'lik merdiven özelliğindedir.

Jellere yüklenen örnekler 40-50 miliamper (mA) akımda, yaklaşık 50 dakika yürütülmüştür.

5.2.2.9 Restriksiyon Kesim Ürünlerinin Jel Elektroforezi

Faktör V A4070G Kesim Ürünlerinin Elektroforezi

Faktör V A4070G kesim ürünleri %2'lik agaroz jelinde yürütülerek görüntülenmiştir. Küçük jel tankında, 30 mL 1x TBE içinde, 600 mg agaroz çözülmüş, 0,5 µg/mL yoğunluğunda EB eklenmiştir. Kesim ürünleri ve DNA marker 6x yükleme tamponuyla karıştırılarak jele yüklenmiş ve yürütülmüştür.

MTHFR A1298C Kesim Ürünlerinin Dikey Akrilamid Jel Elektroforezi

Dikey akrilamid jel elektroforezi, kısalığı nedeniyle agaroz jel elektroforezinde yeterince ayrıştırılamayacak ürünler için kullanılmaktadır. MTHFR A1298C kesim ürünleri 19, 30 (2 tane) ve 84 (ya da 56 ve 28) baz uzunluğunda ürünler içermektedir. Bu ürünlerin ayrıştırılması için, 30 mL hacimde % 12 yoğunluğunda akrilamid jel hazırlanmış ve örnekler bu jelde yürütülmüştür.

30 mL'lik jel için sırasıyla, 12 mL önceden hazırlanmış %30'luk akrilamid (akrilamid/bis-akrilamid, 29:1) çözeltisi, 8,76 mL distile su, 210 µL %10'luk amonyum per sülfat, 6 mL 5x TBE, 3 mL gliserol ve 23 µL TEMED (N, N, N', N' –tetrametiletildiamin) karıştırılmıştır. Hazırlanan jel, düzeneğin iki cam tabakası arasına, hava kabarcığı kalmayacak şekilde, enjektör ile dökülmüş, kuyuların oluşumu için tarak yerleştirildikten sonra, 1-1,5 saat boyunca polimerleşmesi için, oda ısısında bırakılmıştır. Polimerleşen jele, 6x yükleme tamponuyla karıştırılan, yaklaşık 15 µL kesim ürünleri yüklenmiştir. DNA parça uzunluklarının belirlenebilmesi için, kuyulardan birine tamponla karıştırılıp yüklenen DNA marker kullanılmıştır. Örnekler 50 mA akımda yaklaşık 2 saat süreyle yürütülmüştür. Bu işlem sonunda cam tabakaların arasından alınan jel, 1 µg/mL EB içeren 1x TBE tamponunda 4-5 dakika süreyle bekletilerek, EB'nin DNA parçalarıyla etkileşimi sağlanmıştır.

5.2.2.10 Jel Elektroforezi Sonrası Örneklerin Görüntülenmesi

EB ile boyanmış olan ve morötesi ışıpta turuncu ışıma veren DNA parçaları, bu ışık özelliğine sahip ışık kaynağı üzerinde incelenmiş ve Polaroid filmle fotoğraflanmıştır.

5.2.2.11 Homosistein ölçümü

Homosistein ölçümü için, hastalardan sabah, kuru tüpe kan alınmış ve bekletilmeden santrifüjde çevrildikten sonra, ayrılan serum -20°C'ye kaldırılarak, çalışılana dek saklanmıştır. Örnekler, çalışılacağı laboratuara, soğuk koruyucu ve buz içinde taşınmıştır.

Homosistein ölçümü floresan polarizasyon immunoassay yöntemiyle yapılmıştır.

5.2.3 İstatistik İnceleme

İstatistik incelemede kullanılan *p* (*probability*) değeri, hipotez kurulurken öngörülen hatanın oluşam oranını göstermektedir (113). Seçilen hata oranı %5'dir; buna göre *p* değerinin 0,05'den düşük olduğu durumlarda, dağılımı karşılaştırılan değerler arasındaki farkın, istatistiksel anlamı olduğu kabul edilmiştir.

Risk hesaplaması için olasılıkların oranı (*odds ratio*) kullanılmıştır. Olasılık oranı iki bağımsız grupta, bir olayın gerçekleşme olasılığını incelemektedir (114). Bu çalışmada olasılık oranı, gebelik komplikasyonu görülenlerde arasında risk etkenini (örn. alel) taşıyanların, aynı grupta taşımayanlara oranının, sağlıklı kontroller arasında etkeni taşıyanların, taşımayanlara oranına bölünmesiyle elde edilmiştir.

Çalışmada nitel sayısal verilerin karşılaştırılmasında kullanılan ki-kare (*chi square*) testi, genotip dağılımlarının hasta ve kontrol gruplarındaki dağılımının karşılaştırılmasında uygulanmıştır. Nicel verilerin karşılaştırılması için ise eşlenmemiş-t testi, tek yönlü ANOVA ve Kruskal-Wallis testleri uygulanmıştır. İstatistik incelemeler için SPSS 11.5 bilgisayar programı kullanılmıştır.

6. BULGULAR

6.1 DNA Ayırıştırması

Tüm hastaların kan örneklerinden, hızlı fenol-kloroform yöntemiyle ayrıştırılan DNA örnekleri, 200 mikrolitre (μL) Tris-EDTA tamponu içinde çözüldü. DNA yoğunlukları ölçüldüğünde, elde edilen DNA'ların ortalama yoğunluğunun $210 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ($84 - 582 \text{ ng}/\mu\text{L}$ aralığında) olduğu belirlendi (59). İkiyüzaltmış nanometredeki (nm) optik yoğunluk (OY) değerinin 280 nm 'dekine oranıyla belirlenen DNA saflığının, tüm örnekler için $1,48 - 1,76$ aralığında olduğu görüldü.

Elde edilen DNA örneklerinden, çalışmada yer alan üç ayrı DNA bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yoluyla, ilk seferde çoğaltılma başarısı % 94 oldu.

6.2 Deneklerin Demografik ve Klinik Verileri

Çalışmaya 100 komplikasyonlu ve 100 sağlıklı gebe alındı. Sağlıklı gebelerin her biri, herhangi bir tıbbi sorunla karşılaşmadan, gebelik sürecini sağlıklı doğumla tamamlamışlardır. Tablo 6.1'de tüm deneklere ilişkin genel ve klinik veriler sunulmaktadır. Hasta ve kontrol grupları arasında sistolik ve diyastolik kan basıncı değerleri ile, gebelik ve doğum sayıları arasında, hastalar yönünde görünen fazlalık istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Hasta grubunda en kalabalık grubu %36 (36/100) oranla ağır preeklampsili olgular oluşturmaktadır. Olguların tanılarına göre dağılım oranları tablo 6. 2'de verildi.

Tablo 6.1 Hasta ve kontrollerin genel ve klinik özellikleri.

	Hasta (n=100)		Kontrol (n=100)		p
	Ortalama	Standart sapma	Ortalama	Standart sapma	
Yaş (yıl)	27,93	6,507	27,86	4,862	>0,05
Gebelik haftası	34,77	4,724	33,83	4,339	>0,05
Gebelik	2,88	2,318	2,19	1,116	0,008
Doğum	1,28	1,969	0,83	0,779	0,034
Abortus	0,38	0,97	0,20	0,532	>0,05
Kürtaj	0,36	1,51	0,14	0,377	>0,05
Sistolik tansiyon (mmHg)	157,78	32,025	118,0	13,8	<0,001
Diyastolik tansiyon (mmHg)	99,70	20,774	77,95	11,126	<0,001
Yenidoğan ağırlığı (gram)	2178,25	863,04	3232,00	534,445	<0,001

p: olasılık (*probability*) değeri.

p>0,05: istatistiksel olarak fark yok

Her iki grupta tercih edilen doğum şekilleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Bulgular tablo 6.3’de sunuldu.

Tablo 6.2. Olguların tanılarına göre dağılımı.

Tanı	Olgu sayısı (%)
Ağır preeklampsi	36 (36)
HELLP	13 (13)
İUMF	12 (12)
Eklampsi	9 (9)
İUGG	8 (8)
Dekolman	6 (6)
Preeklampsi + İUMF	6 (6)
Gebeliğe bağlı hipertansiyon	2 (2)
Tekrarlayan düşük	2 (2)
Preeklampsi + dekolman	2 (2)
İki taraflı derin ven trombozu	1 (1)
HELLP + İUGG	1 (1)
HELLP + İUMF	1 (1)
Dekolman + İUMF	1 (1)
Toplam	100 (100)

HELLP: hemoliz+karaciğer enzimleri yüksekliği+trombositopeni;

İUMF: intrauterin fötüs ölümü (*intrauterin mord de fetus*); İUGG: intrauterin gelişme geriliği

Tablo 6.3. Hasta ve kontrol gruplarının doğum şekilleri

	Hasta (n=95) (%)	Kontrol (n=100) (%)	p
Doğum şekli			
Vajinal doğum	59 (62,1)	55 (55)	
Sezaryen	36 (37,9)	45 (45)	>0,05

p>0,05 : istatistiksel olarak fark yok

Çalışmaya alınan tüm deneklerde, tromboz yatkınlığını attırdığı kabul edilen edinsel nedenlerden sigaranın kullanımı sorgulandı. Kullanım oranı hem hasta hem de kontrol grubunda yarıya yakındır; her iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı (tablo 6.3). Gebelik süresince destek amacıyla, ağızdan folik asit içeren vitamin uygulamasının etkisinin değerlendirilmesi için, gruplarda vitamin kullanımı sorgulandı (tablo 6.3). Folik asit destek tedavisinin, homosistein metabolizması üzerinde, homosistein düzeyini normalleştirici etkisinin olduğu (54,81), bunun da dolaylı olarak damar hastalıkları riskini azalttığı yönünde görüş ileri sürüldü (81). Çalışmada, folik asit

uygulanmasında kontrol grubu lehine görülen fark, istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$).

Tablo 6.4. Hasta ve kontrollerde sigara kullanımı ve folik asit uygulaması.

		Hasta (%)	Kontrol (%)	p
Sigara (n=100)	evet	20 (20)	16 (16)	>0,05
	hayır	80 (80)	84 (84)	
Vitamin (n=99)	evet	51 (51,5)	77 (77)	<0,001
	hayır	48 (48,5)	23 (23)	

$p>0,05$: istatistiksel olarak fark yok

Her iki gruptaki gebelerin bir bölümünde homosistein serum düzeyi ölçüldü (tablo 6.5). elde edilen sonuçların karşılaştırılmasıyla, homosistein düzeylerinin hasta grubunda, istatistiksel olarak daha yüksek olduğu bulundu (eşlenmemiş t-testi; $p=0,002$).

Tablo 6.5. Hasta ve kontrollerde serum homosistein ölçümü

Grup (n)	Ortalama ($\mu\text{mol/L}$)	Standart sapma ($\mu\text{mol/L}$)	P
Hasta (65)	7,445	5,640	0,002
Kontrol (55)	5,012	1,428	

$T=3,113$, $p=0,002$.

istatistiksel olarak anlamlı fark.

Homosistein düzeyinin belirlendiği tüm deneklerde ($n=120$) ortalama düzey 6,33 ($\pm 4,42$) $\mu\text{mol/L}$ 'dür. Ölçülen en düşük değer 2,70 $\mu\text{mol/L}$, en yüksek değerse 45,19 $\mu\text{mol/L}$ 'dür.

Homosistein düzeylerinin olgulara göre dağılımı tek yönlü varyans analiziyle değerlendirildi ve dağılımdaki farklılık anlamlı bulundu ($p=0,02$). Ancak dağılımın çok homojen olmadığı ve bazı olguların sayısının az olması göz önüne alınarak, hasta grubu

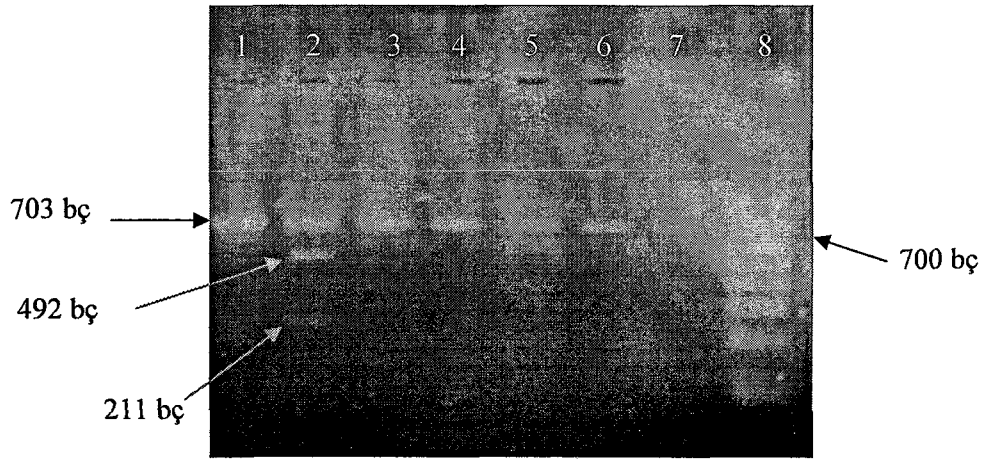
kendi içinde **kan basıncı yüksek** olan komplikasyonlu gebeler (gebelik + hipertansiyon, ağır preeklampsi, eklampsi, HELLP, ağır preeklampsi + dekolman, ağır preeklampsi + İUMF, HELLP + İUGG, HELLP + İUMF; **n=70**) ve **kan basıncı normal** olan gebeler (iki taraflı DVT, İUMF, İUGG, dekolman, dekolman + İUMF; **n=30**) şeklinde ikiye ayrılmış, ve hasta ile kontrol grupları arasındaki homojen düzeyi farklılığı, tek yönlü varyans incelemesi kullanılarak yorumlanmaya çalışıldı. Test sonucunda, homosistein düzeylerinin, kan basıncı yüksek olan komplikasyonlu gebeler ve kontrol grubu arasında, komplikasyonlu gebeler yönünde, istatistiksel düzeyde farklılık gösterdiği saptandı ($F=5,418$, $p= 0,006$). Kan basıncı normal gebelerin homosistein düzeyleri, diğer hasta grubu ve kontrol grubuyla anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$).

Folik asit alan ve almayan gebelerin homosistein düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

6.3 Deneklerin Genotip Verileri

6.3.1 Faktör V A4070G Mutasyonu

Faktör V (fV) geninin 4070. nükleotidindeki adenin-guanin (A-G) nokta mutasyonu polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PZR-RPUP) yöntemiyle tarandı (şekil 6.1). Kontrol ve hasta gruplarındaki fV 4070 alel sıklıkları arasında anlamlı farklılık görülmedi (tablo 6.6). Faktör V 4070G alelinin hasta grubunda görülme olasılığı, kontrol grubunda görülme olasılığına göre 2,8 kat daha fazla olarak bulundu (olasılık oranı [*odds ratio*] = 2,8; güvenilirlik aralığı: %95).



Resim 6.1 Faktör V A4070G'in PZR-RPUP yöntemiyle taranması. 1. *kuyu*: PZR ürünü. 2. *kuyu*: heterozigot (4070AG) genotip, kesilmemiş (703 bç) ve kesilmiş (492 bç + 211 bç) alele ait parçalar. 3.-7. *kuyu*. Kesilmemiş PZR ürünleri, normal genotip. 8. *kuyu*: 100 baz çift, merdiven DNA.

Olasılık oranı

$$\frac{([G \text{ alelini taşıyan hastalar} / \text{taşımayan hastalar}])}{([G \text{ alelini taşıyan kontroller} / \text{taşımayan kontroller}])} = \frac{(8 / 92)}{(3 / 97)} = 2,8$$

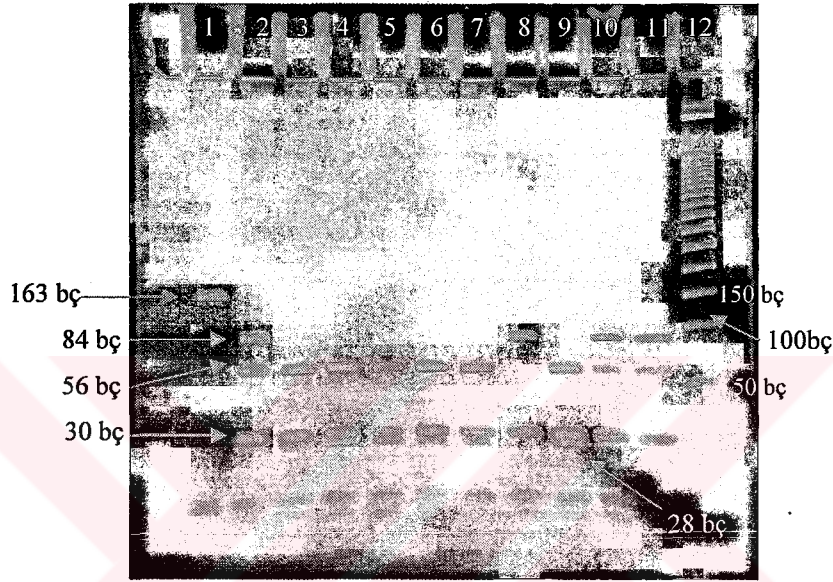
Tablo 6.6. Faktör V A4070G alellerinin hasta ve kontrollerdeki dağılımı.

		Hasta (n=100) (%)	Kontrol (n=100) (%)	Toplam
Faktör V 4070	AA	92 (92)	97 (97)	100
	AG	8 (8)	3 (3)	100
Toplam		100	100	200

p>0,05: istatistiksel olarak fark yok

6.3.2 Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) A1298C Polimorfizmi

MTHFR geni 1298. nükleotiddeki adenin-sitozin (A-C) baz değişikliği polimeraz zincir reaksiyonu – restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi yöntemiyle tarandı (şekil 6.2). MTHFR 1298 alellerinin dağılımı hasta ve kontrol grupları arasında oldukça benzerdir ve istatistiksel farklılık bulunmadı (tablo 6.7).



Resim 6.2 MTHFR A1298C polimorfizminin PZR-RPUP ile taranması. 1.kuyu: PZR ürünü. 2, 10. ve 11. kuyu: heterozigot (1298AC) genotip. 3.-7 ve 9.kuyu: homozigot (1298AA) birey. 8. kuyu: homozigot (1298CC) genotip.

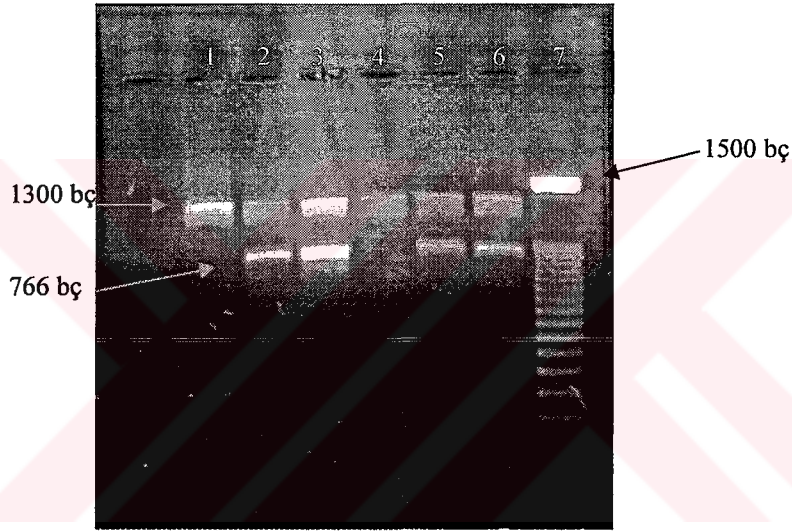
Tablo 6.7. MTHFR A1298C polimorfizminin hasta ve kontrollerdeki dağılımı.

		Hasta (n=100) (%)	Kontrol (n=100) (%)	Toplam
MTHFR 1298	AA	46 (46)	46 (46)	92
	AC	45 (45)	46 (46)	91
	CC	9 (9)	8 (8)	17
Toplam		100	100	200

p>0.05, istatistiksel olarak fark yok.

6.3.3 Plazminojen Aktivatör İnhibitörü (PAİ)-1 Geni 4G/5G Polimorfizmi

PAİ-1 geni promotor bölgede, transkripsiyon başlangıç noktasından 675 baz daha yukarda yer alan bir guanin insersiyon / delesyon'unun yol açtığı 4G/5G polimorfizmi, alele özgü polimeraz zincir reaksiyon yöntemiyle tarandı (şekil 6.3). hasta ve kontrol gruplarındaki alel dağılımlarına bakıldığında 4G alelinin hasta grubundaki sıklığı (0,585), kontrol grubundaki sıklığına (0,485) göre fazla bulundu; iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,015$). Olasılık oranına (*odds ratio*) göre, komplikasyonlu gebelik grubunda, 4G alelinin görülme sıklığı, sağlıklı gebelere göre 2,99 kat artmış bulundu (güvenilirlik aralığı: %95).



Resim 6.3 PAİ-1 4G/5G polimorfizminin alele özgü PZR ile taranması. 1300 bazlık PZR ürünü, PZR kontrolü olarak çoğaltılan bölgeye aittir). 1-2. kuyu: homozigot (5G/5G) birey. 3.-4. kuyu: homozigot (4G/4G). 5.-6. kuyu: heterozigot (4G/5G) birey. 7. kuyu: merdiven DNA, 50 bazlık.

Olasılık oranı

$$\frac{([4G \text{ alelini taşıyan hastalar} / \text{taşımayan hastalar}])}{([4G \text{ alelini taşıyan kontroller} / \text{taşımayan kontroller}])} = \frac{(89 / 11)}{(73 / 27)} = 2,11$$

Tablo 6.8. PAİ-1 4G/5G polimorfizminin hasta ve kontrollerdeki dağılımı.

	Hasta (n=100) (%)	Kontrol (n=100) (%)	Toplam
4G/4G	28 (28)	24 (24)	52
PAİ-1 4G/5G	61 (61)	49 (49)	110
5G/5G	11 (11)	27 (27)	38
Toplam	100	100	200

Ki kare= 8,354, P=0,015, istatistiksel olarak anlamlı fark.

Phi katsayısı=0,015.

6.4 Komplikeasyonlu Gebeliklerin Tanılarına Göre Genotiplerin Dağılımı

Çalışmaya alınan komplikeasyonlu gebelik olgularında faktör V A4070G, MTHFR A1298C ve PAİ-1 4G/5G genotiplerinin dağılımı (tablo 6.9 – 6.11) incelendiğinde, tanı gruplarının kendi aralarında ve kontrol grubuyla aralarında, genotiplerin görülme sıklıkları açısından anlamlı farklılık saptanmadı.

Tablo 6.9 Faktör V A4070G genotiplerinin olgulara göre dağılımı

TANI	FAKTÖR V		Toplam
	AA (%)	AG (%)	
ağır preeklamps	32 (88,9)	4 (11,2)	36 (100)
eklamps	9 (100)	0	9 (100)
HELLP	13 (100)	0	13 (100)
dekolman	4 (66,7)	2 (33,3)	6 (100)
IUGG	8 (100)	0	8 (100)
IUMF	12 (100)	0	12 (100)
Tekrarlayan düşük	2	0	2 (100)
Gebelik + HT	1(50)	1 (50)	2 (100)
İki taraflı DVT	1 (100)	0	1 (100)
dekolman + IUMF	1 (100)	0	1 (100)
preeklamps + dekolman	1 (50)	1 (50)	2 (100)
preeklamps + IUMF	6 (100)	0	6 (100)
HELLP + IUGG	1 (100)	0	1 (100)
HELLP + IUMF	1 (100)	0	1 (100)
kontrol	97 (97)	3 (3)	100 (100)
Toplam	189	11	200

HELLP: hemoliz, karaciğer enzimlerinde yükselme, trombositopeni

IUGG: intrauterin gelişme geriliği IUMF: intrauterin fötüs ölümüDVT: derin ven trombozu

Tablo 6.10 MTHFR A1298C genotiplerinin olgulara göre dağılımı.

TANI	MTHFR1298			Toplam
	AA (%)	AC (%)	CC (%)	
ağır preeklampsi	21 (58,3)	13 (36,1)	2 (5,6)	36 (100)
eklampsi	6 (66,7)	2 (22,2)	1 (11,1)	9 (100)
HELLP	3 (23,1)	9 (69,2)	1 (7,7)	13 (100)
dekolman	3 (50,0)	3 (50,0)	0	6 (100)
IUGG	2 (25,0)	5 (62,5)	1 (12,5)	8 (100)
IUMF	5 (41,7)	6 (50,0)	1 (8,3)	12 (100)
Tekrarlayan düşük	0	1 (50)	1 (50)	2 (100)
Gebelik + HT	0	2 (100)	0	2 (100)
İki taraflı DVT	1 (100)	0	0	1 (100)
dekolman + IUMF	0	1 (100)	0	1 (100)
preeklampsi + dekolman	2 (100)	0	0	2 (100)
preeklampsi + IUMF	3 (50)	1 (16,7)	2 (33,3)	6 (100)
HELLP + IUGG	0	1 (100)	0	1 (100)
HELLP + IUMF	0	1 (100)	0	1 (100)
kontrol	46 (46)	46 (46)	8 (8)	100 (100)
Toplam	92 (46)	91 (45,5)	17 (8,5)	200

HELLP: hemoliz, karaciğer enzimlerinde yükselme, trombositopeni

IUGG: intrauterin gelişme geriliği

IUMF: intrauterin fœtus ölümlü

DVT: derin ven trombozu

Tablo 6.11 PAİ-1 4G/5G genotiplerinin olgulara göre dağılımı.

TANI	PAİ-1			Toplam
	4G/4G (%)	4G/5G (%)	5G/5G (%)	
ağır preeklampsi	12 (33,3)	20 (55,6)	4 (11,1)	36 (100)
eklampsi	1 (11,1)	6 (66,7)	2 (22,2)	9 (100)
HELLP	4 (30,8)	8 (61,5)	1 (7,7)	13 (100)
dekolman	3 (50)	3 (50)	0	6 (100)
IUGG	0	7 (87,5)	1 (12,5)	8 (100)
IUMF	2 (16,7)	7 (58,3)	3 (25)	12 (100)
Tekrarlayan düşük	1 (50)	1 (50)	0	2 (100)
Gebelik + HT	1 (50)	1 (50)	0	2 (100)
İki taraflı DVT	0	1 (100)	0	1 (100)
dekolman + IUMF	1 (100)	0	0	1 (100)
preeklampsi + dekolman	1 (50)	1 (50)	0	2 (100)
preeklampsi + IUMF	2 (33,3)	4 (66,7)	0	6 (100)
HELLP + IUGG	0	1 (100)	0	1 (100)
HELLP + IUMF	0	1 (100)	0	1 (100)
kontrol	24 (24)	49 (49)	27 (27)	100 (100)
Toplam	52 (26)	110 (55)	38 (19)	200

HELLP: hemoliz, karaciğer enzimlerinde yükselme, trombositopeni

IUGG: intrauterin gelişme geriliği

IUMF: intrauterin fœtus ölümü

DVT: derin ven trombozu

Kan basıncının düzeyine göre, yüksek kan basıncılı (n=70) ve normal kan basıncılı (n=30) olarak ikiye ayrılan gebeler kendi aralarında ve kontrol grubuyla (n=100), her üç gendeki genotip dağılımları yönünden karşılaştırıldı. Üç gruptaki genotip dağılımları arasında, anlamlı fark saptanmadı.

Faktör V A4070G, MTHFR A1298C ve PAİ-1 4G/5G alellerinin sıklıkları, tüm deneklerin demografik ve klinik özellikleri arasındaki ilişki, tek yönlü varyans testi ile incelendi. MTHFR 1298CC genotipine sahip bireylerde, düşük sayısının, MTHFR 1298AA ve AC genotipine sahip kişilere göre daha fazla görüldüğü ve bu farkın anlamlı olduğu saptandı (p=0,011). Homosistein düzeylerinin herhangi bir genotiple ilişkisi saptanmadı.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Preeklampsi, eklampsi, intaruterin gelişme geriliği, plasenta dekolmanı ve intrauterin fötüs ölümü gebeliğin, anne ölüm ve morbidite oranı en yüksek komplikasyonlarından (21,105). Bu gebelik komplikasyonlarında sorumlu görülen ortak patofizyolojik bulgu, uterus-plasenta dolaşım yetmezliğidir (32).

Gebelik sürecinde, tromboz oluşumuna yönelik etkinliklerin bir kısmının artmış olduğu görülmektedir (71). Gebeliğe bağlı oluşan fizyolojik değişiklikler, pıhtılaşma ve pıhtı yıkımı düzeneklerini etkileyerek, trombozun klinik bulgu verecek hale gelmesine yol açabilir (56). Kurulan bu hipotezden yola çıkılarak, kalıtsal tromboz yatkınlığına yol açan değişikliklerle, gebelik komplikasyonları arasında bir bağlantı olup olmadığını inceleyen araştırmalar yapılmaktadır (68).

Faktör V, pıhtılaşma şelalesi içinde yer alan, etkinleştirildiğinde protrombini trombine dönüştürecek olan bileşiğin içinde görev yapan bir moleküldür (15). Faktör V etkinlik düzeyinin kontrolsüz artmasının, ven trombozuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (15,113). Bu değişiklikten sorumlu olduğu bilinen bir mutasyon olan faktör V Leiden mutasyonu, venöz tromboz vakalarında ve gebelik komplikasyonlarında, kimi yerlerde rutin klinik taraması aşamasına gelecek kadar sık araştırılmaktadır (68). Faktör V geninin 13. ekzonundaki A4070G mutasyonunun, faktör V proteininde 1299. sıradaki histidinin yerine arjinin gelmesine yol açarak, faktör V'in pıhtılaşma sürecindeki etkinliğini arttırmaktadır (A4070G) (19). Bu mutasyonun venöz trombozla ilişkili olduğu öne sürülmüştür (3). Faktör V A4070G mutasyonu taşıyıcılığı, venöz trombozu olanlarda, sağlıklı kontroller göre yaklaşık 1,6 kat (%9,5 - %5,8) fazla bulunmuş, bunun yanında A4070G taşıyıcılarında faktör V molekülü düzeyinin, taşıyıcı olmayanlardan düşük olduğu, ancak bu molekülün, pıhtı yıkım düzeniği içinde faktör V'in etkisizleştirmeden sorumlu aktive protein C'ye, daha çok direnç gösterdiği gösterilmiştir (3). Bu bulgular A4070G mutasyonunun tromboz yatkınlığına, hangi yollarla katkı yapabileceğine işaret etmektedir.

Gebelik komplikasyonlarında, tromboz yatkınlığını arttıran mutasyonlardan biri olarak, faktör V A4070G'nin bu hastalarda ve sağlıklı gebelerde taranması hedeflenmiştir. Bu şekilde kurgulanmış, 2001 yılına ait bir çalışmada, A4070G sıklığının sağlıklı gebe ve komplikasyonlu gebeler arasında fark göstermediği bildirilmiştir (95). Burada sunulan çalışmada, A4070G sıklığı hasta ve kontrol grupları arasında, yaklaşık 2,5 kat (hasta %8, kontrol %5) farklı bulunmuştur. Bu oranlar istatistiksel olarak anlam taşımamaktadır; ancak olasılık oranının 2,8 (%95 güvenirlilik aralığı: 1,1-3,9) olması, gebelik komplikasyonlarıyla 4070G alelinin ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. A4070G genotiplerinin hasta grubundaki olgulara dağılımına bakıldığında 4070AG heterozigotluğunun ağır preeklampsilerdeki oranı (%11,2) kontroller arasındaki oranın (%3) yaklaşık 3,6 katıdır. Dekolman, preeklampsi + dekolman ve gebeliğe bağlı hipertansiyon olgularının örnek sayısı çok az olduğu için, bu hastalardaki, sırasıyla %33, %50 ve %50'lik AG heterozigotluk oranları istatistiksel yoruma katkı yapmamaktadır. Onüç ve 12 hastadan oluşan HELLP (hemoliz, karaciğer enzimlerinde artış, trombositopeni) sendromu ve intrauterin fötüs ölümü olgu serilerinde A4070G mutasyonuna rastlanmamış olması da, bu mutasyonun faktör V etkinliğini tromboza yardımcı yönde değiştirse bile, genelde bu tür olguların patofizyolojisinde, Leiden mutasyonu kadar etkin olmadığını düşündürülebilir. Tamamlanmış olan bu çalışmanın kapsamının genişletilmesi sırasında, olgularda faktör V Leiden mutasyonu taramasının yapılması ve iki mutasyonun birlikte heterozigot oldukları olguların sıklığının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Faktör V A4070G mutasyonu, kan basıncı düzeyi, obstetrik öykü, gebelik haftası gibi klinik veriler arasında bir ilişki saptanamamıştır.

Homosistein damar içi endotel hasarından sorumlu tutulan bir metabolik ara üründür (54). Ateroskleroz ve ven trombozunda, yüksek homosistein plazma düzeyinin risk oluşturduğu kabul edilmektedir (54). Homosistein düzeyini belirleyen etkenlerden biri, 1p36.3 kromozom bölgesinde kodlanan metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimidir. MTHFR, homosisteinin metiyonine dönüşmesi için gerekli aktif folat türevini oluşturan reaksiyonda görevli bir enzimdir. Eksikliği, homosistein birikimine

yol açar (40). Bu gendeki C677T ve A1298C mutasyonları enzimin etkinlik düzeyini düşürerek, işlevini engeller (40).

Homosistein düzeyinin, preeklampside, sağlıklı gebeliklere oranla yaklaşık iki kat arttığı bildirilmiştir (101). Çalışmamızda, homosistein düzeyi ortalaması, komplikasyonlu gebelerde sağlıklı gebelere göre, anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (hasta $7,445 \pm 5,64$; kontrol $5,012 \pm 1,428$; $p=0,002$). Olgular kendi içinde, hipertansif ve normotansif gebeler olarak gruplandıktan sonra, homosisteinin dağılımı incelenmiş ve anlamlı düzeyde, hipertansif komplikasyon grubunda yüksek bulunmuştur ($p=0,006$).

Damar hastalığı oluşumunda rol oynadığı düşünülen homosisteinin düzeyi, MTHFR enzim polimorfizmlerinin dışında, folik asidin serumdaki düzeyinden de etkilenmektedir. Folik asidin yetersiz alınmasının homosistein yüksekliğine katkı yapabildiği bildirilmiştir (41).

Sunulan çalışmada vitamin kullanan, dolayısıyla folik asit desteği verilmekte olan gebelerle, kullanmayanların homosistein düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır. MTHFR 1298C alelini taşıyanlarla taşımayanların homosistein düzeyleri de anlamlı fark göstermemektedir. MTHFR A1298C mutasyonunun tanımlanmasında da, enzimin işlevinin azaldığının gösterilmiş olmasına karşın, homosistein ya da folik asit düzeyinin etkilenmediği bildirilmiştir (119). Preeklampsi ya da intrauterin gelişme geriliği öyküsü olan kadınlarda yapılan bir çalışmada, deneklerde homosistein düzeyi ölçülmüş, yüksek bulunanlara folik asit ve B6 vitamini verilmeye başlanmıştır (72). Bu kadınların bir kısmı, tedavi sırasında gebe kalmıştır. Gebelik süresince vitaminin yanısıra, düşük doz aspirin de verilmiştir. Vitamin destek tedavisi sonrasında kadınların tedaviye yanıtlarının, metionin yükleme testiyle bakıldığında, olumlu olduğu görülmüştür. Gebelerden bir kısmında preeklampsi gelişmiştir. Doğum ağırlıkları önceki gebeliklerle karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde artmış olduğu, preeklampsi gelişiminde ise bir fark gelişmediği bulunmuştur.

Komplikasyonlu ve sağlıklı gebe grupları arasında, MTHFR 1298 genotip dağılımı çok benzer bulunmuştur. Bunun yanı sıra, alellerin olgu grupları içindeki dağılımında da istatistiksel fark bulunmamıştır; bu nedenle komplikasyon olgularıyla MTHFR 1298C aleli arasında ilişki olduğu söylenemez. Benzer sonuçlar 2001 ve 2002 yılındaki iki çalışmada da elde edilmiştir (57,60). MTHFR C677T mutasyonu ile preeklampsi, intrauterin gelişme geriliği ve plasenta dekolmanı arasında ilişki olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (66,67,118); ancak A1298C mutasyonunun tek başına, gebelik komplikasyonlarından biriyle ilişkili olabileceğini gösteren fazla çalışma yoktur. Bir çalışmada A1298C'nin C677T mutasyonu ile birlikte bulunduğu, plasenta dekolmanı riskini artırıcı etki yaptığı bildirilmiştir (43).

MTHFR 1298C alel sıklığı, Sunulan çalışmada %31 olarak bulunmuştur. Alel sıklığı hasta ve kontrol grupları için birbirine çok yakın bulunmuştur (hasta: %31, kontrol: %31,5). Benzer bir oran Kuzey Avrupa'dan bildirilmiştir (123).

Her iki MTHFR mutasyonu da, MTHFR enziminin etkinliğini düşürmektedir. Buna karşın MTHFR C677T'nin homosistein düzeyini arttırdığı, A1298C'nin böyle bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Homosisteinin içinde yer aldığı metionin döngüsünde kazanılan serbest metil grubu, DNA ve protein metillenmesinde kullanılmaktadır (96). Homosistein düzeyinin yükseldiği koşullarda, belirli proteinlerin metillenmesinin bozulduğunu gösteren in vitro çalışmalar bulunmaktadır (124). Metillenmenin DNA transkripsiyonu, zarar görmüş proteinlerin onarımı gibi düzeneklerde rol oynadığı bilinmektedir (1,96).

Metillenme işlevinin burada anılmasının nedeni, metillenmenin ve metillenmeyi etkileyen MTHFR C677T ve A1298C mutasyonlarının gebeliğin erken dönemindeki düşüklerle ilişkili olabileceği düşüncesinden kaynaklanmaktadır. Transgenik fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, embriyonik dönemdeki farelerde DNA metiltransferaz enzimi geninin işlevsiz hale getirilmesinden (*knock-out*) sonra, embriyoların erken dönemde kaybedildiği bildirilmiştir (1,73). C677T ve A1298C mutasyonlarını ele alan bazı çalışmalarda, spontan düşük yapan gebelerde ve embriyo genomlarında her iki mutasyon sıklığının, sağlıklı gebelere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (58,130).

Zetterberg'in (130) çalışmasında her iki MTHFR mutasyonunun spontan düşükli gebelerde bir arada görülme olasılığı, sağlıklı gebelere oranla daha yüksek olarak verilmektedir (olasılık oranı [*odds ratio*]=14,2). Bu çalışmada, sağlıklı yenidoğanların hiçbirinde, MTHFR C677T ve A1298C mutasyonlarının aynı anda homozigot (TT / CC), ya da birinin homozigot, diğerinin heterozigot (CT / CC ya da TT / AC) olduğu kombinasyonlara rastlanmadığı bildirilmiştir. Ancak başka gruplarda, 677 ve 1298 mutasyonlarından birinde homozigotluk, ötekinde heterozigotluk şeklinde taşıyıcılık saptandığı da bildirilmiştir (58, 123). Isotalo ve ekibi, MTHFR 677TT / 1298CC, yani her iki mutasyonun da homozigot olduğu genotipe yalnızca, spontan düşük görülen embriyolarda rastladıklarını açıklamışlardır. Her iki çalışma grubunun verileri arasında görülen farkın, üzerinde çalışılan örnekleminden ve mutasyon tarama yöntemlerinden kaynaklanması olasıdır (58,130). Burada sunulan çalışmada, Zetterberg ve Isotalo'nun bulgularını akla getirecek şekilde, tüm gebeler göz önüne alındığında, düşük sayısının MTHFR 1298CC genotipine sahip gebelerde, 1298 AA ve AC genotipine sahip olanlardan, anlamlı olarak daha fazla olduğu görülmüştür (olasılık oranı 2,8; p=0,011). Araştırmacılar, bu iki mutasyonun birlikte bulunmasının, embriyo ya da fötusun kaybedilmesiyle sonuçlanan, doğal seçicilik yönünde bir devinime yol açabileceğine işaret etmektedirler. Bu arada, anne ve embriyo ya da fötusun genotiplerinin birlikte belirlenip, MTHFR mutasyonlarının her ikisi tarafından taşındığı durumda, gebelik prognozu üzerindeki etkinin değişiklik gösterip göstermediğinin anlaşılması, bizce önemlidir.

Homosistein düzeyleri ise, hasta grubunda kontrollere oranla yüksek olmasına karşın, MTHFR mutasyonu ile ilişkili bulunmamıştır. Eldeki sonuçlar çalışmanın kapsamının genişletilmesi düşüncesi çerçevesinde, hasta grubundaki spontan ve tekrarlayan düşük olgu sayılarının arttırılarak, bunlarda ve var olanlarda MTHFR C677T mutasyonlarının araştırılmasının ve homosisteinin üzerinde bulunduğu yolağın ve onun etkilediği metillenmenin daha ayrıntılı ele alınmasının önemli olacağına işaret etmektedir.

Fibrin yıkımının başlıca inhibitörü olan plazminojen aktivatör inhibitörü (PAİ)-1, plazmin yapımından sorumlu olan doku plazminojen aktivatörünün doğal inhibitörüdür (128). PAİ-1 plazma düzeyinin, preeklampsili gebelerde sağlıklı gebelere göre belirgin

olarak artış gösterdiği bildirilmiştir (36). Aynı çalışmada, bu değişikliğe bağlı olarak fibrin yıkım kapasitesinde de azalma saptanmıştır. PAİ-1 geni, 7. kromozomda q21.3-q22 bölgesinde yer almaktadır. Gen üzerinde bir çok polimorfik lokus yer almaktadır. Bunlardan biri, promotor bölgede, transkripsiyon başlangıç noktasından 675 baz yukarda yer alan bir guanin insersiyon/delesyon polimorfizmidir (27). PAİ-1 düzeylerinin 4G/4G genotipi taşıyıcılarında 5G/5G genotipi taşıyıcılarından yaklaşık %25 oranında daha fazla olduğu (27) ve 4G/4G genotipinin ven trombozuyla ilişkili olduğu bilinmektedir (44,46). Farklı kıtalardan bildirilen çalışmalara bakıldığında, 4G alel sıklığının Avrupa kıtasında 0,50 ile 0,64 arasında olduğu görülmektedir (27,35,106). Bu çalışmada 4G alel sıklığı, hasta grubunda 0,59 kontrol grubunda 0,49 olarak bulunmuştur. Tüm gebelere bakıldığında 4G sıklığı 0,54'dür. 4G sıklığının genel oranı Avrupa kıtasından bildirilen çalışmalarla benzer gözükmektedir (46). Sağlıklı ve komplikasyonlu gebe grupları arasındaki PAİ-1 4G/5G genotip dağılımı arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0,015$; olasılık oranı 2,99). Ağır preeklampsili gebelerin, sağlıklı gebeler ve gebe olmayan, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığı bir çalışmada, 4G sıklığı preeklampsili gebelerde 0,76, sağlıklı gebelerde 0,68, sağlıklı kontrollerde 0,67 bulunmuştur (128). Preeklampsisi grubuyla öteki gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu bildirilmiştir. Sunulan çalışmada, yalnız ağır preeklampsisi grubu ele alındığında, 4G sıklığı, komplikasyonlu gebe grubundakinin yakın, ancak biraz üzerinde (0,61) bulunmuştur. Komplikasyonlu gebe grubunu oluşturan olgulara göre PAİ-1 genotip dağılımının, gruplar arasında fark göstermediği saptanmıştır. Gruplar hipertansif komplikasyonlu ve normotansif komplikasyonlu olanlar şeklinde kendi arasında ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında da, dağılımın anlamlı farklılığı yoktur. 4G/4G genotipinin hasta grubunda homojen dağıldığı düşünülebilir, ancak her grubun olgu sayısı eşit olmadığından, bu değerlendirme kesin değildir. Bazı gruplardaki olgu sayılarının azlığı unutulmadan değerlendirmek şartıyla, dekolman (6 olgu), preeklamsiye bağlı İUMF (5 olgu), tekrarlayan düşük (2 olgu), gebeliğe bağlı hipertansiyon (2 olgu), preeklamsiye bağlı dekolman (2 olgu), iki taraflı derin ven trombozu (1 olgu), dekolmana bağlı intarauterin fötüs ölümü (İUMF) (1 olgu), HELLP sendromu (hemoliz, karaciğer enzimlerinde artış ve trombositopeni) ile birlikte İUMF ve intrauterin gelişme geriliği (İUGG) (bire olgu) görülmüş tüm gebeliklerin 4G aleliyle ilişkili olduğuna işaret edilebilir. Daha fazla denek sayısıyla,

farkın sonuçların anlamlı olma olasılığı artabilir. Glueck (80) ve arkadaşları 4G/4G genotipine sahip gebelerde canlı doğumun daha az, prematür bebek, erken dönemde fötus  l m , İUGG ve genel gebelik komplikasyonlarının daha sık olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgular, grubun daha sonraki çalışmalarında da tekrarlanmaktadır (46,47).

Sunulan çalışmaya hafif preeklampsi olguları dahil edilmemiştir. Bu hasta grubunu kapsayan bir çalışmada 4G/4G genotip sıklığının, hasta grubunda, kontrollere göre, anlamlı düzeyde daha fazla ve hafif preeklampsi gelişimiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (131). Hasta grubunun bu yönde genişletilerek, hem hafif preeklampside 4G alelinin yerinin, hem de ağır preeklampsideki sıklığıyla ve alel yerleşimiyle karşılaştırılarak, doz-klinik bulgu ilişkisinin incelenmesi olanaklı olabilir.

PAİ-1 4G/5G genotip dağılımıyla, çalışmada sorgulanan klinik özellikler arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Gebelikte tromboz yatkınlığı ve fibrin yıkım yetmezliğiyle ilişkili komplikasyonların ortak paydasının plasenta dolaşım yetmezliği olduğu d ş n lmektedir (22,71). Plasantanın hızla geliştiği, uterusu endometriyum ve myometriyumla damar anastomozlarını oluşturduğu süreçte aşırı tromboz gelişimi plasentada yetmezliğe, bu da dolaylı olarak düşük, intrauterin gelişme geriliği, ölü doğum, preeklampsi ve plasenta dekolmanı gibi sonuçlara neden olmaktadır (22,71,105). Tromboz yatkınlığına yol açan edinsel ve kalıtsal etkenlerin gebelikte erken dönemde bilinmesinin önemli olduğu gündeme getirilmektedir. Genotip, obstetrik komplikasyon riskini belirleyen etkenlerden yalnızca bir tanesidir. Kalıtsal tromboz yatkınlıklarının gebelik üzerindeki etkileri, koruyucu amaçlı antitromboz tedavisinin sonuçları, farklı gruplarca farklı hatta çelişen bulgularla sunulmaktadır. Günümüzde bir görüş vasküler gebelik patolojilerinin yüzde 50'sinin tromboz yatkınlığının var olan etkenleriyle açıklanamadığını belirtmektedir (18) ki, bu görüşün trombofilik mutasyonlarla ilgili oranların genelde dünya genelinden yüksek olarak bildirildiği bir ülkeden gelmesi, a ıklanamayanların oranının yaridan da fazla olduğunu düşündürmektedir; bir çok çalışmada da bu doğrulanmıştır. O halde, henüz ortaya çıkarılmamış ya da etkisi tam olarak

belirlenememiş genetik etkenlerin varlığı kabul edilebilir. Bu çalışmada seyrek olarak anılan, pıhtılaşma ve pıhtı yıkımı düzeneklerinde başka bir çok molekülün yeri aydınlatılmamıştır. Bazı araştırmacıların savunduğu, riskli gebeliklerde kalıtsal etkenlerin rutin olarak taranması ise, hem tedavi seçeneklerini içeren bir algoritmaya ilişkilendirilmenin yapılmamış olması, hem de maliyeti arttırıcı etkisi yüzünden yaygın kabul görmemektedir. Ancak bu uygulamanın, etkenler daha belirgin olarak ortaya konduktan sonra, gelinecek nokta olduğu da unutulmamalıdır.

Bu çalışmada incelenen faktör V A4070G, metilentetrahidrofolat redüktaz A1298C ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1 4G/5G mutasyonları, gebelik komplikasyonlarıyla ilişkili olduğu bildirilmiş faktör V Leiden (fVL), MTHFR C677T ve protrombin G20210A mutasyonları kadar sık olarak, bu olgularda gündeme gelmemektedir. PAİ-1, bu olgularda, diğerlerine göre daha sık incelenmiş ve bir çok çalışmada, gebelik komplikasyonlarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda da, fibrin yıkımını azalttığı ve bu yolla tromboza katkı yaptığı bilinen 4G aleli, hasta grubunda, anlamlı olarak daha yaygın bulunmuştur. Faktör V 4070G alelinin, faktör V'in daha kararlı hale gelmesini sağlayarak, tromboz yatkınlığını arttırdığı gösterilmiştir. Çalışmada, PAİ-1'de görülen dağılım farklılığı, fV 4070G aleli için saptanmamıştır; ancak, fV 4070G alel sıklığı hasta grubunda daha yüksek bulunmuştur. Leiden mutasyonunun etkisini arttırdığına ilişkin bulgular olan fV A4070G'nin, Leiden taraması eşliğinde incelenmesinin daha önemli olduğu düşünülmüştür. MTHFR A1298C mutasyonunun daha sık görülen MTHFR C677T polimorfizminin etkisini arttırdığı, MTHFR enzim düzeyinin ve etkinlik düzeyinin azalmasına yol açtığı bilinmektedir. Çalışmamızda ise, hasta ve kontrol grubundaki A1298C genotip dağılımları nerdeyse eşit bulunmuştur. FV A4070G'de olduğu gibi, MTHFR A1298C'nin de, bu olguların patofizyolojik gelişiminde tek başına anlam taşımadığı düşünülmüştür.

8. KAYNAKLAR

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Molecular Biology of The Cell. 4th edition. s: 434-435, Garland Science, New York, 2002.
2. Alfirevic Z, Roberts D, Martlew V: How strong is the association between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? A systematic review. *European Journal of Obstetrics and Gynecology*, 101:6-14, 2002.
3. Alhenc-Gelas M, Nicaud V, Gandrille S, van Dreden P, Amiral J, Aubry ML, Flessinger JN, Emmerich J, Aiach M: The factor V gene A4070G mutation and the risk of venous thrombosis. *Thrombosis Hameostasis*, 81:193-197, 1999.
4. Allaart CF, Rosendaal FR, Noteboom WMP, Bret E: Survival in fazmilies with hereditary protein C deficiency, 1820-1993. *British Medical Journal*, 311:910-913, 1995.
5. American College of Obstetricians and Gynecologists: ACOG practice bulletin. No: 33, January 2002. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics* 2002; 77(1):67-75.
6. American College of Obstetricians and Gynecologists: ACOG practice bulletin. No: 12, January 2002. Intrauterine Growth Restriction. Washington, 2002.
7. Aubard Y, Darodes N, Cantaloube M: Hyperhomocysteinemia and pregnancy – review of our present understanding and therapeutic implications. *Obstetrics Gynecology* 93:157-165, 2000.
8. B, Marder VJ, Conard J, Women's Issues in Thrombosis and Hemostasis. S:33-43, Martin Dunitz, London, 2002.
9. Barker K: At the Bench: A Laboratory Navigator. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1998.
10. Benedotto C, Marozio L, Salton L, Maula V, Chieppa G, Massobrio M: Factor V Leiden and factor II G20210A in preeclampsia and HELLP syndrome. *Acta Obstetrics Gynecology Scandinavia*, 81(12):1095-100, 2002.
11. Berek JS, Adashi EY, Hillard PA, Novak's Gynecology. 12th edition, s:963-81, Williams&Wilkins, Baltimore, 1996.

12. Bernardi F, Faioni EM, Castoldi E, Lunghi B, Castaman G, Sacchi E, Mannucci PM: A factor V genetic component differing from factor V R506Q contributes to the activated protein C resistance phenotype. *Blood*, 90:1552-1557, 1997.
13. Bertina RM, Koelaman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, Ronde H, van der Valden PA, Reitsma PH: Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, 369:64-67, 1994.
14. Bonnar J: Haemostasis and coagulation disorders in pregnancy. Ed.: Bloom AL, Thomas DP. *Haemostasis and Thrombosis*, s:570-584, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1987.
15. Boynes J, Dominiczak MH: Hemostasis and Thrombosis. Ed.: Boynes J, Dominiczak MH, *Medical Biochemistry*. S:55-67, Harcourt Brace and Company Limited, London, 1999.
16. Bozzo M, Carpani G, Leo L, Marozzi S, Sacchi E, Moroni G, Pardi G: HELLP syndrome and Factor V Leiden. *European Journal Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 95(1):55-8 2001.
17. Brenner B, Sarig G, Weiner Z, Younis J, Blumenfeld Z, Lanir N.: Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause. *Thrombosis and Haemostasis* 82:6-9, 1999
18. Brenner B: Inherited thrombophilia and pregnancy loss. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 16(2): 311-320, 2003.
19. Castaman G, Lunghi B, Missiaglia E, Bernardi F, Rodeghiero F: Phenotypic homozygous activated protein C resistance associated with compound heterozygosity for Arg506Gln (factor V Leiden) and His1299Arg substitutions in factor V. *British Journal of Haematology*, 99:257-261, 1997.
20. Copper RL, Goldenberg RL, DuBarda MB, Davis RO and the collaborative group on preterm birth prevention: Risk factors for fetal death in white, black and hispanic women. *Obstetrics and Gynecology* 1994; 84:490-495.
21. Creasy RK, Resnik R: Intrauterine Growth Restriction. Ed: Creasy RK, Resnik R. *Maternal-fetal medicine*. 4th edition, s:569-583, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1999.

22. Cunningham FG, Mac Donald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hankins GDV, Clark SL: Williams Obstetrics. 20th edition, s:1-13, Appleton & Lange, Connecticut, 1997.
23. Cunningham FG, Mac Donald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hankins GDV, Clark SL. Williams Obstetrics. 20th edition, s:693-745, Connecticut, Appleton & Lange, 1997.
24. Cunningham FG, Mac Donald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hankins GDV, Clark SL. Williams Obstetrics. 20th edition, s:745-783, Appleton & Lange, Connecticut, 1997.
25. Dahlbaeck B: Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulation system. Thrombosis and Hemostasis, 66:49-61, 1991.
26. Dahlbaeck B, Carlsson M, Svensson PJ: Familial thrombophilia due to previously unrecognized mechanism characterized by a poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a co-factor to activated protein C. Proc Natl Acad Sci USA, 94:1004-1008, 1993.
27. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. Journal of Biological Chemistry, 268(15):10739-10745, 1993.
28. De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM: Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. Blood, 87:3531-3544, 1996.
29. de Visser MCH, Guasch JF, Kamphuisen PW, Vos HL, Rosendaal FR, Bertina RM: The HR2 haplotype of factor V: Effects on factor V levels, normalized activated protein C sensitivity ratios and the risk of venous thrombosis. Thrombosis and Hemostasis, 83:577-582, 2000.
30. de Vries JI, Dekker GA, Huijgens PC, Jakobs C, Blomberg BM, van Gejin HP: Hyperhomocysteinemia and protein S deficiency in complicated pregnancies. British Journal Obstetrics and Gynecology, 104:1248-1254, 1997.
31. Declerck PJ, Juhan-Vague I, Felez J, Wiman B: Pathophysiology of fibrinolysis, 236:425-432, 1994.

32. Dekker GA, Sibai BM: Etiology and pathophysiology of pre-eclampsia: current concepts. *New England Journal of Medicine*, 325:1063-1066, 1998.
33. Demarmels Biasutti F, Sulzer I, Stucki B, Wuillemin WA, Furlan M, Lammle B: Is plasminogen deficiency a thrombotic risk factor? A study on 23 thrombophilic patients and their family members. *Thrombosis and Hemostasis*, 80(1):167-170, 1998.
34. Dizon-Townson DS, Nelson LM, Easton K, Ward K: The factor V Leiden mutation may predispose women with severe preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 175:902-905, 1996.
35. Eriksson P, Kallin B, van't Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A: Allele specific increase in the basal transcription of plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:1851-1855, 1995.
36. Estelles A, Gilabert J, Aznar J; Loskutoff DJ; Schleef RR: changes in the plasma levels of type 1 and 2 plasminogen activator inhibitors in normal pregnancy and in patients with severe preeclampsia. *Blood* 74:1332-1338, 1989.
37. Fabbro D, D'Elia AV, Spizzo R, Driul L, Barillari G, Di Loreto C, Marchesoni D, Damante G: association between plasminogen activator inhibitor 1 gene polymorphisms and preeclampsia. *Gynecological Obstetrical Investigation*, 56(1):17-22, 2003.
38. Falk G, Almqvist A, Nordenhem A, Svensson H, Wiman B: Allel specific PCR for detection of a sequence polymorphism in the promoter region of the plasminogen activator inhibitor (PAI-1) gene. *Fibrinolysis*, 9:170-174, 1995.
39. Fisher SJ: The placenta dilemma. *Seminars in Reproductive Medicine*, 18:321-326, 2000.
40. Födinger M, Hörl WH, Sunder-Plassmann G: Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *Journal of Nephrology*, 13(1):20-33, 2000.
41. Födinger M, Wagner OF, Hörl WH, Sunder-Plasmann G: Recent insights into the molecular genetics of the homocysteine metabolism. *Kidney International*, 59 Spp:78 s:238-242, 2001.
42. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP.: A candidate genetic risk

- factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics*, 10:111-113, 1995.
43. Gebhardt GS, Scholtz CL, hillermann R, Odenthal HJ: Combined heterozygosity for methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutation C677T and A1298C is associated with abruptio placentae but not with intrauterine growth restriction. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 97(2):174-177, 2001.
44. Glueck CJ, Fontaine RN, Gruppo R, Stroop D, Sieve-Smith L, Tracy T, Wang P: the plasminogen activator inhibitor-1 gene, hypofibrinolysis, osteonecrosis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 366:133-146, 1999.
45. Glueck CJ, Wang P, Fontaine RN, Sieve-Smith L, Tracy T, Moore SK: Plasminogen activator inhibitor activity: an independent risk factor for the high miscarriage rate during pregnancy in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism*, 48(12):1589-95, 1999
46. Glueck CJ, Philips H, Cameron D, Wang P, Fontaine RN, Moore SK, Sieve-Smith, Tracy T: The 4G/4G polymorphism of the hypofibrinolytic plasminogen activator inhibitor type 1 gene: an independent risk factor for serious pregnancy complications. *Metabolism*, 49(7):845-852, 2000.
47. Glueck CJ, Kupferminc MJ, Fontaine RN, Wang P, Weksler BB, Eldor A: Genetic hypofibrinolysis in complicated pregnancies. *Obstetrics and Gynecology*, 97(1):44-8, 2001.
48. Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D: factor V Leiden, C>T MTHFR polymorphism and genetic susceptibility to pre-eclampsia. *Thrombosis and Hemostasis*, 77:1052-1054, 1997.
49. Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D: Genetic susceptibility to pregnancy-related venous thromboembolism: roles of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 179: 1324-1328, 1998.
50. Greer IA: Haemostasis and thrombosis in pregnancy. Ed.: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD. *Haemostasis and Thrombosis*, 3rd edition, s:987-1015, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1994.

51. Greer IA: Thrombosis in pregnancy: maternal and fetal issues. *Lancet*, 353:1258-1265, 1999.
52. Gris JC, Ripart-Neveu S, Maugard C, Tailland ML, Brun S, Courtieu C, Biron C, Hoffet M, Hedon B, Mares P: Respective evaluation of the prevalence of haemostasis abnormalities in unexplained primary early recurrent miscarriages. The Nimes Obstetricians and Haematologists (NOHA) study. *Thrombosis and Hemostasis*, 77:1096-1103, 1997.
53. Gris JC, Quere I, Monpeyrroux F: Case control study of the frequency of thrombophilic disorders in couples with late fetal loss and no thrombotic antecedent. *Thrombosis and Haemostasis*, 81:891-899, 1999.
54. Gupta A, Robinson K: Hyperhomocysteinaemia and end stage renal disease. *Journal of Nephrology*, 10(2):77-84, 1997.
55. Guyton AC: Hemostasis and Blood Coagulation. Textbook of Medical Physiology, s:390-399, 8th edition, W.B.Saunders, Philadelphia, 1993.
56. Higgins JR, Walsh JJ, Darling MR, Noris L, Bonnar J: Hemostasis in uteroplacental and peripheral circulations in normotensive and pre-eclamptic pregnancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 179:520-526.
57. Infante Rivard C, Rivard GE, Yotov WV, Genin E, Guiget M, Weinberg C, Gautier R, Feoli-fonseca JC: Absence of association of thrombophilia polymorphisms with intrauterine growth restriction. *New England Journal of Medicine*, 347(1): 57-59, 2001.
58. Isolato PA, Wells GA, Donnelly JG: Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. *American Journal of Human Genetics*, 67(4):986-990, 2000.
59. John SWM, Weitzner G, Rozen R, Sriver CR: A Rapid Procedure for Extracting Genomic DNA from Leukocytes. *Nucleic Acid Research*, 19(2): 408, 1988.
60. Kaiser T, Brennecke SP, Moses EK: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms are not a risk factor in Australian women. *Gynecologic Obstetrical Investigation*, 50(2):100-102, 2002.

61. Kalafatis M, Betina RM, Rand MD, Mann KG: characterization of the molecular defect in the FV R506Q. *Journal of Biological Chemistry*, 270:4053-4057, 1995.
62. Kane WH, Davie EW: cloning of a cDNA coding for human factor v, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:6800-6804, 1986.
63. Kang SS, Wong PWK, Malinow MR: Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Ann Rev Nutr*, 12: 279-298, 1992.
64. Knofler M, Vasicek R, Sreber M: Apoptosis, molecular and genetic contributions: key regulatory transcription factors involved in placental trophoblast development-a review. *Placenta (Supp A)*:83-92, 2001.
65. Kruithof EKO, Tran-Thang C, Gudinchet: Fibrinolysis in pregnancy. A study of plasminogen activators and inhibitors. *Blood*, 69:460-466, 1987.
66. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N: Increased frequency of the genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 340:9-13, 1999.
67. Kupferminc MJ, Fait G, Many A, Gordon D, Eldor A, Lessing JB: Severe preeclampsia and high frequency of genetic thrombophilic mutations. *Obstetrics and Gynecology*, 96:45-49, 2000.
68. Kupferminc MJ: Thrombophilia and gestational vascular complications. Ed.: Brenner B, Marder VJ, Conard J, *Women's Issues in Thrombosis and Hemostasis*. S:235-247, Martin Dunitz, London, 2002.
69. Kutteh WH, Park VM, Deitcher SR: Hypercoagulable state mutation analysis in white patients with early first-trimester recurrent pregnancy loss. *Fertility Sterility*, 71:1048-1053, 1997.
70. Lane DA, Bayston T, Olds RA: Antithrombin III mutation database: 2nd update. *Thrombosis and Hemostasis*, 77:197-211, 1997.
71. Lanir N, Aharon A, Brenner B: Haemostatic mechanisms in human placenta. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 16(2):183-195, 2003.
72. Leda M, Riyazi N, de Vries JI; Jakobs C, van Geijn HP, Dekker GA: Effects of folic acid and vitamin B6 supplementation on women with hyperhomocysteinemia and a history of preeclampsia or fetal growth restriction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 179:135-139, 1998.

73. Li E, Bestor TH, Jaenisch R: Targeted mutation of DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69:915-926, 1992.
74. Lijnen HR, Collen D. Interaction of plasminogen activators and inhibitors with plasminogen and fibrin. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 8:2-10, 1982.
75. Lindoff C, Ingemarsson I, Martinsson G, Segelmark M, Thysell H, Astedt B: Pre-eclampsia is associated with reduced response to activated protein C. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 176:457-460, 1997.
76. Lunghi B, Iacovello L, Gemmati D, Dilasio MG, Castoldi E, Pinotti M; Castaman G, Redaelli R, Mariani G, Marchetti G, Bernardi F: Detection of new polymorphic markers in the factor V gene: association with factor V levels in the plasma. *Thrombosis and Haemostasis*, 75:45-48, 1996.
77. Mackie MJ, Ludlam CA, Haynes AP: Diseases of the blood. Ed.: Haslett C, Chilvers ER, Hunter JAA, Boon NA. *Davidson's Principles and Practice of Medicine*. S: 737-800, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1999.
78. Margaglione M, Bossone A, Coalizzo D, D'Andrea G, Brancaccio V, Ciampa A, Grandone E, Di MG: FV HR2 haplotype as additional inherited risk factor for deep vein thrombosis in individuals with a high-risk profile. *Thrombosis and Hemostasis*, 87(1):32-36, 2002.
79. Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V, Taioli E, Rossi V, Crosti F: Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood*, 92:2353-2358, 1998.
80. Martinelli I, Legnani C, Bucciarelli P, Grandone E, De Stefano V, Mannucci PM: Risk of pregnancy-related venous thrombosis in carriers of severe inherited thrombophilia. *Thrombosis and Hemostasis*, 86:300-303, 2001.
81. Mayer EM, Jacobsen DW, Robinson K: Homocysteine and coronary atherosclerosis. *Journal American College of Cardiology*, 27(3):517-27, 1996.
82. McColl MD, Ellison J, Reid, Tait RC, Walker ID, Greer IA: Prothrombin 20210 G-A, MTHFR C677T mutations in women with venous thromboembolism associated with pregnancy. *British Journal of Obstetrics and Gynecology*, 107:565-569, 2000.

83. McCully KS: Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *American Journal of Pathology*, 56:111-118, 1969.
84. McIntire DD, Bloom SL, Casey BM, Leveno KJ: Birth weight in relation to morbidity among newborn infants. *New England Journal of Medicine*, 340:1234-1238, 1999.
85. Miletich JP, Sherman I, Boze G: absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *New England Journal of Medicine*, 57:44-48, 1987.
86. Modugno F, Weissfeld JL, Trump DL, Zmuda JM, Shea P, Cauley JA, Ferrell RE: Allelic variants of the aromatase and the androgen and estrogen receptors: toward the multigenic model of the prostate cancer risk. *Clinical Cancer Research* 7(10):3092-3096, 2001.
87. Moore KL: *The Developing Human Clinically Oriented Embryology*. Fourth Edition. S: 104-130, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1988.
88. Nagy B, Toth T, Rigo JJR, Karadi I, Romics L, Papp Z: Detection of factor V Leiden in severe pre-eclamptic Hungarian women. *Clinical Genetics*, 53:478-481, 1998.
89. Nelen WJDM, Blom HJ, Steegers EAP, den Heijer M, Eskes TKAB. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertility Sterility*, 74:1196-1199, 2000.
90. Nemes L, Pajor A, Cegledi A, Szen L, Sas G: Comparison of the risk of fetal loss between homozygous and heterozygous patients with factor V Leiden mutation. *Thrombosis and Hemostasis*, 82 Supp:534, 1999.
91. O'Shaughnessy KM, Fu B; Ferrero F, Lewis I, Downing S, Morris NH: Factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase gene variants in East-Anglian pre-eclampsia cohort. *Hypertension*, 33:1338-1341, 1999.
92. Obwegeser R, Hohlgeschwandter MHS: Homocysteine – a pathophysiological cornerstone in obstetrical and gynaecological disorders? *Human Reproduction Update*, 5:64-72, 1999.
93. Özbek U, Tangün Y: Frequency of factor V Leiden (Arg506Gln) in Turkey. *British Journal of Haematology*, 97:504-505. 1997.

94. Pearce N: What does the odds ratio estimate in a case-control study? *International Journal of Epidemiology*, 22(6):1189-1192, 1993.
95. Pecheniuk NM, Morris CP, Walsh IP, Marsh MA: A factor V HR2 haplotype: prevalence and association of the A4070G and A6755G polymorphisms. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 12(3):201-206, 2001
96. Perna AF, Castaldo P, Ingrosso D, De Santo NG: Homocysteine, a new cardiovascular risk factor, is also a powerful uremic toxin. *Journal of Nephrology*, 12:230-240, 1999.
97. Perna AF, Castaldo P, Ingrosso D, De Santo NG: Homocysteine, a new cardiovascular risk factor, is also a powerful uremic toxin. *Journal of Nephrology*, 12:230-240, 1999.
98. Plouin PF, Chattler G, Brerart G: Frequency and perinatal consequences of hypertensive disease of pregnancy. *Adv Nephrol* 57:69-74, 1986.
99. Powers RW, Minich LA, Lykins DL, Ness RB, Crombleholme WR, Roberts JM: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, folate, and susceptibility to re-eclampsia. *Journal of Soc Gynecological Investigation*, 6:74-79, 1999.
100. Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID: Increased fetal loss in women with inherited thrombophilia. *Lancet*, 348:913-916, 1996.
101. Rajkovic A, Catlano PM, Malinow MR: Elevated homocysteine levels with pre-eclampsia. *Obstetrics and Gynecology*, 90:168-171, 1997.
102. Ridker PM, Miletich JP, Stampfer MJ, Goldhaber SZ, Lindpinter K, Hennekens CH: Factor V Leiden and Risks of Recurrent Idiopathic Venous Thromboembolism. *Circulation*, 92:2800-2802, 1995.
103. Rigo J Jr, Nagy B, Fintor L: Maternal and neonatal outcome of preeclamptic pregnancies: the potential roles of factor V Leiden mutation and 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase. *Hypertension and Pregnancy*, 19:163-172, 2000.
104. Robbins KD. A study on the conversion of fibrinogen to fibrin. *American Journal of Physiology*, 142:581-590, 1994.

105. Roberts RM: Pregnancy-Related Hypertension. Ed.: Creasy RK, Resnik R. Maternal-fetal medicine. 4th edition, s:833-73, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1999.
106. Rosaak JI, van Rij AM; Jones GT, Harris EL: Association of the polymorphism in the promoter region of plasminogen activator inhibitor-1 with abdominal aortic aneurysms. *Journal of Vascular Surgery*, 31(5):1026-1032, 2000.
107. Rosendaal FR: Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet*, 353:1167-1173, 1999.
108. Salafia CM, Pezzulo JC, Lopez-Zeno JA, Minior VK, Vintzileos AM: Placental pathological features of preterm pre-eclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 173:1079-1105, 1995.
109. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1982.
110. Schulman S: Inherited thrombophilia. Ed.:Brenner B, Marder VJ, Conard J, Women's Issues in Thrombosis and Hemostasis. S:81-93, Martin Dunitz, London, 2002.
111. Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P: Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood*, 64:1297-1300, 1984.
112. Seligsohn S, Lubetsky A: Genetic susceptibility to venous thrombosis. *New England Journal of Medicine*, 344:1222-1231.
113. Shen O, Younis JS, Samueloff A: Human gestation and pregnancy complications. Ed.:Brenner B, Marder VJ, Conard J, Women's Issues in Thrombosis and Hemostasis. S:33-43, Martin Dunitz, London, 2002.
114. Strandberg L, Lawrance D, Ny T: The organization of the human-plasminogen-activator-inhibitor-1 gene. Implications on the evolution of the serine-protease inhibitor family. *European Journal of Biochemistry*, 176:609-616, 1988.
115. Şenocak M: Temel Biyoistatistik. Çağlayan Basımevi, İstanbul, 1990.
116. Thaler E, Lechner K. Antithrombin III deficiency and thromboembolism. *Clinical Haematology*, 10:369-390, 1981.
117. Ueland P, Refsum H: Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clinical Chemistry*, 39:1764-1779, 1993.

118. van der Molen EF, Verbruggen B, Novakova I, Eskes TK, Monnens LA, Blom HJ: Hyperhomocysteinemia and other thrombotic risk factors in women with placental vasculopathy. *British Journal of Obstetrics and Gynecology*, 107(6):785-791, 2000.
119. van der Put NM, Gabreel F, Stevens EMB, Smeitink JAM, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van den Heuvel LP, Blom HJ: A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *American Journal of Human Genetics*, 62(5):1044-1051, 1998.
120. van Tilburg NH, Rosendaal FR, Bertina RM: Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood*, 95:2855-2859, 2000.
121. van Zonneveld AJ, Curriden SC, Loskutoff DJ: Type 1 plasminogen activator inhibitor gene: Functional analysis and glucocorticoid regulation of its promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:5525-5529, 1988.
122. Weiner CP, Brandt J: Plasma antithrombin III activity in normal pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*, 56:601-603, 1980.
123. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R: A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Molecular Genetics of Metabolism*, 64:169-172, 1998.
124. Weitz JI, Huboda M, Massel : Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors. *Journal of Clinical Investigation*, 86:385-391, 1990.
125. Wiener-Megnagi Z, Ben-Shlomo I, Goldberg Y, Shalev E: Resistance to activated protein C and the leiden mutation: high prevalence in patients with abruptio placentae. *American Journal Obstetrics Gynecology*, 179(6 Pt 1):1565-1567, 1998.
126. Wiman B, Csemiczky G, Marsk L, Robbe H: The fast inhibitor of tissue plasminogen activator in plasma during pregnancy. *Thrombosis and Hemostasis*, 52:124-126, 1984.
127. Wouters MG, Boers GH, Blom HJ: Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertility Sterility* 60:820-51993.

128. Yamada N, Arinami T, Yamakawa-Kobayashi T, Watanabe H, Sohda S, Hamada H, Kubo T, Hamaguchi H.: The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with severe preeclampsia. *Journal of Human Genetics*, 45:138b-141b, 2000.
129. Yamazaki T, Nicolaes GAF, Serensen KW, Dahlbaeck B: Molecular basis of quantitative factor V deficiency associated with factor V R2 haplotype. *Hemostasis, thrombosis and Vascular Biology*, 100:2515-2521, 2002.
130. Zetterberg H, Regland B, Palmer M, Ricksten A, Palmqvist L, Arvanitis DA, Spandidos DA, Blennow K: Increased frequency of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. *European Journal of Human Genetics*, 10(2):113-118, 2002.
131. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M: Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate: a strategy for succesful endovascular invasion. *Journal of Clinical Investigation*, 99:2139-2151, 1997.
132. Zöller B, Hillarp A, Dahlbaeck B: Activated protein C resistance caused by a common factor V mutation has a single origin. *Thrombosis Research*, 85:237-243, 1997.

9. ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında İstanbul'da doğdum. Liseyi İstanbul Alman Lisesi'nde (1990), lisans eğitimini Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde (1996) tamamladım. 1998 yılında başladığım Aile Hekimliği Uzmanlığı eğitimini, Bakırköy Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde 2002 yılında tamamladım. Doktora dönemi çalışmalarımı 1996 yılından bu yana Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yürütüyorum ve 2003 yılı başından beri Öğretim Elemanı olarak görev yapıyorum.

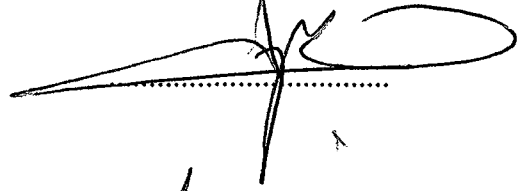


SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

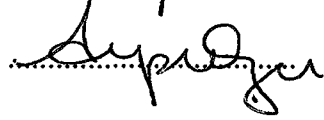
Doktora öğrencisi Can ERZİK'in, çalışması jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Doktora tezi olarak uygun görülmüştür.

İMZA

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Beyazıt ÇIRAKOĞLU
Üniversitesi : Marmara



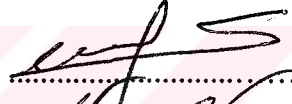
Üye : Prof.Dr.Ayşe ÖZER
Üniversitesi : Marmara



Üye : Doç.Dr.Önder ŞİRİKÇİ
Üniversitesi : Marmara



Üye : Doç.Dr.Engin ORAL
Üniversitesi : İstanbul

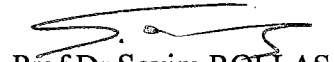


Üye : Yrd.Doç.Dr.İlter GÜNEY
Üniversitesi : Marmara



ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 01 / 10 / 2003 tarih ve 3... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof.Dr.Sevim ROLLAS
Müdür

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ