



T.C.

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

DURSUN ODABAŞ TIP MERKEZİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI ÖYKÜSÜ OLAN HASTALARDA
NESFATİN-1, ADROPİN, İRİSİN VE PREPTİN DEĞERLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Perihan Önal

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. H. GÜLER ŞAHİN

VAN – 2020



T.C.

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

DURSUN ODABAŞ TIP MERKEZİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI ÖYKÜSÜ OLAN HASTALARDA
NESFATİN-1, ADROPİN, İRİSİN VE PREPTİN DEĞERLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Perihan Önal

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. H. GÜLER ŞAHİN

VAN – 2020

DİP NOT: Bu çalışma YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2019-TFU-02 nolu proje olarak desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Kadın Hastalıkları ve Doğum alanındaki asistanlık eğitimim süresince, değerli bilgi ve deneyimleri ile bu uzmanlık alanını sevmemde ve yetişmemde katkıda bulunan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Anabilim Dalı öğretim üyeleri, çok kıymetli hocalarım; Prof. Dr. Hanım Güler ŞAHİN, Prof. Dr. Abdulaziz GÜL, Prof. Dr. Ali KOLUSARI, Doç. Dr. İsmet ALKIŞ, Doç. Dr. Erbil KARAMAN, Dr. Öğr. Üys. Onur KARAASLAN, Dr. Öğr. Üys. Deniz DİRİK'e,

Tezimin hazırlanması sırasında yardımlarını esirgemeyen çok değerli hocam ve tez danışman hocam sayın Prof. Dr. H. Güler ŞAHİN'e,

Tezimin hazırlanış aşamasında her konuda bana yardımcı olan ve yol gösteren yardımcı danışman hocalarım Doç. Dr. Erbil KARAMAN'a, Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Sermin ALGÜL'e

Tez hazırlama sürecinde tecrübelerinden istifade ettiğim değerli hocam Dr. Öğr. Üys. Onur KARAASLAN'a,

Her konuda bizlere destek olan sevgili uzmanımız Dr. Gökçe Naz BÜYÜKBAŞ'a,

Numune toplama konusunda bana fedakârca yardım eden sevgili asistan arkadaşlarımdan Dr. Betül Tuncer İLDOĞAN'a, Dr. Ülkü YAKA'ya, Dr. Gamze KARABABA'ya, Dr. Mücahit ARANLI'ya ve Dr. Ali ÇAKIR'a ve bu numuneleri gözü gibi muhafaza eden transfüzyon merkezinde görev yapan sevgili arkadaşım Pınar GÜNDOĞDU'ya, aynı çatı altında beraber çalışmaktan keyif aldığım hepsi birbirinden kıymetli sevgili asistan doktor arkadaşlarıma, doğumhane, servis ve polikliniklerimizin cefakar hemşireleri ve ebelerine, kıymetli sekreterlerimize ve personellerimize,

Çalışmama maddi destek sağlayan YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına,

Hayatım boyunca hep yanımda olan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, uzmanlık eğitimim süresince fedakarlığı, anlayışı ve sabrı için başta annem olmak üzere canım aileme ve her zaman yanımda olan dostlarıma,

Sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım...

Dr. Perihan ÖNAL

İÇİNDEKİLER

İçindekiler.....	3
Tablolar Dizini.....	5
Resimler Dizini.....	6
Şekiller Dizini.....	7
Kısaltmalar Listesi.....	8
Özet.....	9
Abstract.....	11
1. Giriş ve amaç.....	13
2. Genel bilgiler.....	14
2.1. Tekrarlayan gebelik kaybı.....	14
2.1.1. Tanım.....	14
2.1.2. İnsidans.....	14
2.1.3. Etiyoloji	15
2.1.4. Risk Faktörleri.....	17
2.1.4.1. Gebelik Kaybı Öyküsü.....	17
2.1.4.2. Uterin Faktörler.....	18
2.1.4.2.1. Uterin Anomaliler.....	18
2.1.4.2.2. Leiomyom.....	19
2.1.4.2.3. Endometrial Polipler.....	19
2.1.4.2.4. İntrauterin Adezyonlar.....	19
2.1.4.3. Servikal Yetmezlik.....	20
2.1.4.4. Yetersiz Endometriyal Reseptivite.....	20
2.1.4.5. İmmünojik Faktörler	20
2.1.4.6. Antifosfolipid Antikor Sendromu.....	20
2.1.4.7. Diğer İmmünojik Faktörler	20
2.1.4.8. Endokrin Faktörler.....	21
2.1.4.8.1. Diabetes Mellitus.....	21
2.1.4.8.2. Polikistik Over Sendromu.....	21
2.1.4.8.3. Tiroid Antikorları ve Hastalıkları.....	21
2.1.4.8.4. Hiperprolaktinemi	22
2.1.4.8.5. Luteal Faz Defekti	22

2.1.4.9. Genetik Faktörler.....	22
2.1.4.9.1. Anöploidi.....	22
2.1.4.9.2. Kromozomal Yeniden Düzenleme.....	23
2.1.4.10. Trombofili ve Fibrinolitik Faktörler.....	23
2.1.4.11. Çevresel Kimyasallar ve Stres.....	24
2.1.4.12. Diğer Faktörler.....	24
2.1.4.12.1. Kişisel Alışkanlıklar.....	24
2.1.4.12.2. Erkek Faktörü.....	24
2.1.4.12.3. Enfeksiyon.....	24
2.1.4.12.4. Azalmış Over Rezervi.....	24
2.1.4.12.5. Çölyak Hastalığı.....	24
2.2. Adropin.....	25
2.3. İrisin.....	26
2.4. Preptin.....	27
2.5. Nesfatin-1.....	28
3. Materyal ve Metod.....	31
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Aletler.....	32
3.2. Hormon Analizleri.....	32
3.2.1. İnsan İrisin ELISA Kiti Analizi.....	32
3.2.2. İnsan Nesfatin-1 ELISA Kiti Analizi.....	34
3.2.3. İnsan Preptin ELISA Kiti Analizi.....	35
3.2.4. İnsan Adropin ELISA Kiti Analizi.....	36
3.3. İstatistiksel Analiz.....	38
4. Bulgular.....	39
5. Tartışma.....	46
6. Sonuç.....	52
7. Referanslar.....	53

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Yaşla bağılı olarak değişen abortus, ektopik gebelik ve canlı doğum oranları.

Tablo 2. Tekrarlayan gebelik kayıplarında risk faktörleri.

Tablo 3. Araştırmaya dahil edilen hastalardan, kan örnekleme yapıldığı sırada gebe olan ve olmayan hastaların temel karakteristikleri ve kan irisin, nesfatin-1, adropin ve preptin düzeylerinin karşılaştırılması.

Tablo 4. Araştırmaya dahil edilen hastalardan, TGK öyküsü olan ve olmayan hastaların temel karakteristikleri ve kan irisin, nesfatin-1, adropin ve preptin düzeylerinin karşılaştırılması.

Tablo 5. Klinik değişkenlerin tekrarlayan gebelik kaybı ve biyobelirteçlerle olan ilişkisinin regresyon analiziyle değerlendirilmesi.

Tablo 6. Tekrarlayan gebelik kaybı olan ve olmayan katılımcıların VKİ için eğilim skoru eşleştirmesi yapılması sonrasında irisin, nesfatin-1, adropin ve preptin düzeyleri.

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Doğuştan uterin malformasyonların sınıflandırılması

Resim 2. Leiomyomların uterusta yerleşimi

Resim 3. Adropin hormonunun aminoasit dizilimi

Resim 4. Adropinin fonksiyonları

Resim 5. İrisin hormonunun aminoasit dizilimi

Resim 6. İrisinin fonksiyonları

Resim 7. Preptin hormonunun yapısı

Resim 8. Preptinin fonksiyonları

Resim 9. Nesfatin hormonunun yapısı

Resim 10. Nesfatinin fonksiyonları



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Katılımcılara kan örnekleme yapıldığı sırada gebe olan ve olmayan kadınlarda irisin, nesfatin-1, preptin ve adropin düzeylerini gösteren kutu grafiği.

Şekil 2. TGK olan ve olmayan kadınlarda irisin, nesfatin-1, preptin ve adropin düzeylerini gösteren kutu grafiği.

Şekil 3. Yönlendirilmiş döngüsüz grafiklerle karıştırıcı, medyatör etkilerin tespiti.

Şekil 4-5. Normal bir geç dönem gebelikte plazma glukoz ve insülin düzeylerinin diurnal değişimleri .



KISALTMALAR LİSTESİ

- AFAS:** Antifosfolipid antikor sendromu
ASRM: America society for reproductive medicine
DM: Diabetes Mellitus
ENCHO: Enerji homeostazisiyle ilişkili gen
ESHRE (European Society of Human Reproduction
E2: Estradiol
FSH: Folikül uyarıcı hormon
GDM: Gestasyonel diabetes mellitus
GH: Gebelik haftası
GK: Gebelik kaybı
GKA: Gebe kalma aralığı
GLUT4: Glikoz transporter 4
hCG: Human Chorionic Gonadotropin
IVF: İnvitro fertilizasyon
İD: İnsülin direnci
LH: Luteinize edici hormon
NUCB2: Nükleobindin-2
PKOS: Polikistik over sendromu
SLE: Sistemik lupus eritematozus
TGK: Tekrarlayan gebelik kaybı
VKİ: Vücut kitle indeksi

ÖZET

Amaç

İrisin, nesfatin-1, adropin ve preptin hormonlarının tekrarlayan gebelik kayıpları (TGK) üzerine olan etkilerini incelemek.

Materyal metod

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi kadın hastalıkları ve doğum kliniğinde, Ocak 2019 ve Temmuz 2020 tarihleri arasında polikliniğe başvuran TGK öyküsü olan 100 ve TGK öyküsü olmayan 104 toplamda 204 katılımcının dahil edildiği prospektif bir çalışmadır. TGK öyküsü olanlarda etiyolojik faktörler yönünden incelendikten sonra, herhangi bir faktör bulunmayan hastalar çalışmaya dahil edildi. Katılımcıların kanında irisin, nesfatin-1, adropin ve preptin düzeylerine bakıldı. Katılımcıların gravida, parite ve abort sayıları, yaş, boy, kilo, vücut kitle indeksi (VKİ), açlık kan şekeri (AKŞ) değerleri kayıt altına alındı.

Bulgular

Araştırmaya TGK hikayesi olan 100, TGK hikayesi olmayan 104 kişi olmak üzere toplamda 204 katılımcı dahil edildi. Kan örnekleme yapılan katılımcıların 48.5%’i (n: 99) gebeyken 51.5%’i (n: 105) gebe değildi. Gebelerde irisin (ortanca 827.9’a karşı 832.7, P <0.001) ve adropin (ortanca 1511’a karşı 1924, P <0.001) düzeyi anlamlı şekilde düşük, preptin (ortanca 10.9’a karşı 8.9, P <0.001) ve nesfatin-1 düzeyi (ortanca 7855’e karşı 5879, P <0.001) anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır. TGK olan kadınlarda irisin (ortanca 876.4’e karşı 896.5, P = 0.016) ve adropin (ortanca 1724’e karşı 1924, P <0.001) düzeyi anlamlı şekilde düşük, preptin (ortanca 14.9’a karşı 8.9, P <0.001) ve nesfatin-1 düzeyi (ortanca 6986’ya karşı 5865, P <0.001) anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır. TGK olan ve olmayan katılımcıların VKİ için eğilim skoru eşleştirmesi yapılması sonrasında gruplar karşılaştırıldı . İrisin (ortalama: 13.27, %95 güven aralığı: 0.99-25.55, P = 0.034) ve adropin (ortalama: 396.3, %95 güven aralığı: 386.7-405.8, P < 0.0001) düzeyleri TGK olmayan ve örnekleme sırasında gebe olan olgularda anlamlı şekilde yüksek izlendi. Nesfatin-1 (ortalama: -1044, %95 güven aralığı: -1150 – -938, P < 0.0001) ve preptin (ortalama: -6.0, %95 güven aralığı: -6.19 – -5.80, P < 0.0001) düzeyleri tekrarlayan gebelik kaybı olmayan ve örnekleme sırasında gebe olan olgularda anlamlı şekilde düşük izlendi. Analiz örnekleme sırasında gebe olmayan katılımcılarda tekrarlandığı benzer bulgular irisin, adropin, nesfatin-1 ve preptin düzeyleri için P < 0.0001 anlamlılık düzeyinde tekrarlandığı izlendi.

Sonuç

İrisin, nesfatin-1, preptin ve adropin hormonlarının metabolizma üzerinde farklı etkileri bulunmaktadır. Direkt ya da indirekt olarak insülin direncini (İD) etkileyerek materno-fetal glukoz homeostazını bozduğu, moleküler ve immünolojik faktörler üzerinden etki ederek, villöz trombozu indüklediği ve böylece plasental kan akışını bozduğu ya da endometriyal reseptiviteyi olumsuz etkileyerek implantasyon başarısızlığına yol açtığı düşünülmektedir. Çalışmamız; TKG öyküsü olan kadınlarla, böyle bir öyküye sahip olmayanlar karşılaştırıldığında adropin ve irisin hormon düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük olduğunu gösterirken, nesfatin-1 ve preptinin düzeylerinin daha yüksek olduğunu göstermiştir. Nesfatin-1, irisin, adropin ve preptin hormonları ve GK' ları arasındaki ilişkiyi daha net ortaya koyabilmek için; karıştırıcı faktörlerin etkisinin olmadığı, daha çok randomize kontrollü çalışmalara gerek duyulmaktadır.

ABSTRACT

Objectives

To investigate the association between irisin, nesfatin-1, adropin, and preptin levels with recurrent pregnancy loss (RPL).

Material and methods

A prospective study conducted between January 2019 and July 2020 in Van Yuzuncu Yil University, Department of Obstetrics and Gynecology. One hundred women with a history of RPL and 104 women without such history were included for a total of 204 participants. Women with a history of RPL without a clear etiologic factor were included in the study. Irisin, nesfatin-1, adropin, and preptin levels were determined in venous blood samples. Data on gravida, parity, age, height, weight, body-mass index, and fasting blood glucose were collected from all participants.

Results

A total of 204 women, 104 with a history of RPL and 100 without a history of RPL, were included in the study. At the time of venous sampling, 48.5% of participants (n: 99) were pregnant were as 51.5% (n: 105) of them were not. Irisin levels (median: 827.9 vs 832.7, $P < 0.001$) and adropin levels (median 1511 vs 1924, $P < 0.001$) were lower, preptin (median 10.9 vs 8.9, $P < 0.001$) and nesfatin levels (median 7855 vs 5879, $P < 0.001$) were higher in pregnant women compared to those who were not. Women with a history of RPL had lower irisin (median: 876.4 vs 896.5, $P = 0.016$) and adropin levels (median 1724 vs 1924, $P < 0.001$) while nesfatin düzeyi (median 6986 vs 5865, $P < 0.001$) and preptin levels (median 14.9 vs 8.9, $P < 0.001$) were higher compared to women without RPL history. We matched the women with RPL to those without using propensity score matching for body-mass index and stratification for pregnancy at the time of sampling. . Irisin (mean: 13.27, 95% CI: 0.99-25.55, $P = 0.034$) and adropin (mean: 396.3, 95% CI: 386.7-405.8, $P < 0.0001$) levels were higher in pregnant women without a history of RPL compared to pregnant women with a history of RPL. Nesfatin-1 (mean: -1044, 95% CI: -1150 – -938, $P < 0.0001$) and preptin (mean: -6.0, 95% CI: -6.19 – -5.80, $P < 0.0001$) levels were higher in pregnant women without an history of RPL compared to pregnant women with an history of RPL. A repeat analysis for non-pregnant women at the time of venous sampling revealed similar results for irisin, adropin, nesfatin-1 ve preptin levels at a significance level of < 0.0001 .

Conclusion

Irisin, nesfatin-1, preptin and adropin hormones have different effects on metabolism. It disrupts materno-fetal glucose homeostasis by directly or indirectly affecting insulin resistance (ID), It disrupts materno-fetal glucose homeostasis by directly or indirectly affecting insulin resistance (ID), by acting on molecular and immunological factors, induce villous thrombosis and thus impair placental blood flow or adversely affect endometrial receptivity, leading to implantation failure. Our study showed that the hormone levels of adropin and irisin were statistically significantly lower, while nesfatin-1 and preptin levels were higher in women with a history of RPL compared to control group. In order to reveal more clearly the relationship between nesfatin-1, irisin, adropin and preptin hormones with RPL, we need randomized controlled studies without the effect of confounding factors.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tekrarlayan gebelik kaybı(TGK) üreme tıbbının hem klinisyen hem de çiftler açısından en yorucu ve zorlayıcı alanlarından. Özellikle gebelik kaybı sayısı arttıkça çiftler üzerindeki travmatik etkileride katlanarak artmaktadır.

Etiyoloji çiftlerde araştırılsa da çiftlerin 50%'sinde herhangi bir faktör bulunamazken, bazen de etiyojide birden fazla faktör yer almaktadır. Etiyoloji değerlendirilirken klinikte en sık TGK nedenleri arasında bulunan; epidemiyolojik faktörler (hastanın yaşı, gebelik kaybı (GK) öyküleri.), anatomik faktörler (konjenital uterin malformasyonlar, servikal yetmezlik, leiomyom, uterin polipler), immünolojik faktörler (antifosfolipid antikor sendromu (AFAS), sistemik lupus eritematozus (SLE), endokrin faktörler (diabetes mellitus (DM), tiroit hastalıkları, polikistik over sendromu (PKOS), genetik faktörler, trombofililer, enfeksiyonlar, diğer faktörler (erkek faktörü, azalmış over rezervi, kişisel alışkanlıklar) değerlendirilmektedir. Tedaviler etiyojide yer alan faktöre göre belirlenir. Etiyolojik faktör bulunmayanlarda tedavi stratejileri oldukça sınırlı olup genellikle kanıta dayalı değildir, daha çok klinik tecrübe ve gözlemlere dayanmaktadır.

İnsülin direnci (İD), İD'yle bağlantılı endokrin hastalıkların ve İD sonucu meydana gelen endometriyal reseptivitenin bozulmasının GK'larına yol açtığı çalışmalarla bildirilmiştir. TGK ile ilgili ise bu kadar net bir ilişki bazı çalışmalarda gösterilirken, bazılarında ise gösterilememiştir.

Adropin, preptin, nesfatin-1, irisin hormonları uzun zaman önce keşfedilmiş ve metabolizma üzerindeki etkileri bilinen hormonlardır. Dolaylı yada direkt olarak bu metabolizma üzerinde etkileriyle İD üzerinde değişiklikler oluşturmaktadırlar. Bu nedenle bu hormonların İD üzerindeki etkileri nedeniyle, endometriyal reseptiviteyi bozarak TGK'ları üzerinde etkileri olabileceği düşünülmektedir.

Biz bu çalışmada TGK öyküsü olan ve olmayan hastaları karşılaştırarak irisin, adropin, nesfatin-1 ve preptin seviyelerini değerlendirdik. TGK hastaları ve irisin, adropin, nesfatin-1 ve preptin düzeyleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tekrarlayan Gebelik Kaybı

2.1.1. Tanım

Tekrarlayan gebelik kaybının(TGK) birden fazla tanımı bulunmaktadır;

- Ultrasonografi veya histopatolojik inceleme ile kanıtlanan iki veya daha fazla başarısız klinik gebelik (1),
- Ardışık üç gebelik kaybı (biyokimyasal gebelikler de dahil), (2,3).

Günümüzde klinikte, biyokimyasal gebeliklerde dahil olmak üzere iki GK(gebelik kaybı) sonrası araştırmaya başlanılmaktadır. Görüntüleme yöntemleriyle yeri tespit edilememiş gebelikler (biyokimyasal GK'ları ve/veya yeri bilinmeyen gebelikler), gelecekteki meydana gelebilecek canlı doğumların üzerinde, intrauterin görüntüleme yöntemleriyle tespit edilmiş GK'ları ile aynı olumsuz etkiye sahip olması nedeniyle tanımlamalarda yer almışlardır (4). Bu farklı tanımlamalar sonrasında 2017 yılında Avrupa Üreme ve Embriyoloji derneği bir bildiri yayınlamıştır. Buna göre; idrar ve kanda human chorionic gonadotropin (hCG) ile tespit edilebilen iki ya da daha fazla GK, TGK olarak kabul edilmiştir. Bu tanıma yeri belli olmayan ve biyokimyasal gebeliklerde dahilken, ektopik ve molar gebelikler dahil değildir (5).

TGK'ları ayrıca primer ve sekonder olarak sınıflara ayrılmaktadır (5,6). Primer grubunda 24. gebelik haftasından (GH) daha küçük viabilite sınırına ulaşmamış TGK'lar yer alırken, sekonder grubunda ise öncesinde ≥ 24 GH'dan daha büyük bir canlı doğumu bulunan TGK'ları yer almaktadır. Başarılı gebelik süreci yönünden prognoz sekonder grupta daha iyidir (6). < 12 . GH'dan daha küçük olan kayıplar "erken dönem kayıplar" olarak isimlendirilirken, > 12 . GH'dan sonra olan kayıplar ise "geç dönem kayıplar" olarak isimlendirilmektedir (6).

2.1.2. İnsidans

Gebe kadınların yaklaşık 15%'i, klinik olarak tanımlanan bir sporadik GK yaşamaktadır. Gebe kadınların sadece yüzde 2%'si art arda iki GK yaşarken, yalnızca 0,4%-1%'i art arda üç GK yaşamaktadır (7).

Maternal yaş ilerledikçe ve GH azaldıkça düşük yapma sıklığı artmaktadır (örn. 6 haftadan küçük gebeliklerde, düşük yapma riski 22%-57% iken, 6-10 hafta arasında 15%, > 10 .GH sonrasında ise 3%'tür. Tablo 1), (8).

Fetal kardiyak aktivitenin saptandığı gebeliklerde düşük oranı 15%’dir. Bu düşüklerin 62%’si 12. GH’dan önce iken; 75%’i ise 16. GH’sından önce olmaktadır.

Tablo 1. Yaşa bağlı olarak değişen abortus, ektopik gebelik ve canlı doğum oranları

Percent pregnancy loss by maternal age at conception

Maternal age	Spontaneous abortions (percentage)	Ectopic pregnancies (percentage)	Stillbirths rate/1000
12-19	13.3	2.0	5.0
20-24	11.1	1.5	4.2
25-29	11.9	1.6	4.0
30-34	15.0	2.8	4.4
35-39	24.6	4.0	5.0
40-44	51.0	5.8	6.7
≥45	93.4	7.0	8.2

*Adapted from: Anderson et al. Figures 2,4,5. The total spontaneous abortion rate is estimated using the assumption that only 80 percent of women with abortions in recognized pregnancies were hospitalized. Adapted from: Anderson FWJ, Johnson TRB. Maternal mortality at Y2K. Postgraduate Obstetrics and Gynecology 2000; 20:1.

2.1.3. Etiyoloji

GK yaşayan çiftlerin iki önemli endişesi vardır; neden bir GK meydana geldiği ve tekrarlama riski. TKG’ları kadın sağlığında önemli bir sorun olmasına rağmen, etiyoloji, değerlendirme ve yönetim ile ilgili hala birçok cevaplanmamış soru işareti bulunmaktadır. Ne yazık ki, TKG’larının sadece 50%’sinde bir neden bulunabilmektedir (9). TKG’nın genel etiyolojik kategorileri içerisinde anatomik, immünolojik, genetik, endokrin, enfeksiyöz, trombofilik ve çevresel faktörler yer almaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. Tekrarlayan gebelik kayıplarında risk faktörleri

Etiyoloji	Hastalık
Epidemiyolojik	Hastanın yaşı Hastanın üreme öyküsü
Anatomik	Konjenital uterin malformasyonlar Servikal yetmezlik Leiomyom Uterin polipler İntrauterin adezyonlar
İmmünolojik Faktörler	Antifosfolipid antikor sendromu (AFAS) SLE (Sistemik lupus eritematozus) Otoimmün troiditler Romatoid artrit
Endokrin Faktörler	Diabetes mellitus (DM) PKOS (Polikistik over sendromu) Troid antikorları ve hastalıkları Hiperprolaktinemi Luteal faz defekti
Genetik Faktörler	Embriyonik kromozomal anormallikler Kromozomal yeniden düzenlenmeler
Trombofililer	Konjenital trombofililer Akkiz trombofililer
Enfeksiyon	Listeria monositogenez, Toxoplasma gondii Sitomegalovirüs, Primer genital herpes
Diğer Faktörler	Kişisel alışkanlıklar Erkek faktörü Azalmış over rezervi Çevresel kimyasallar ve stress Yetersiz endometriyal reseptivite

2.1.4. Risk Faktörleri

2.1.4.1. Gebelik Kaybı Öyküsü

İlk gebelikte, ortalama düşük yapma riski 11%-13% olarak bildirilmiştir (10). Birinci düşük sonrasında bu oran 14%-21% aralığına yükselmektedir. Ardışık iki veya üç düşüğün sonrasında, oranlar sırasıyla 24%-29% ve 31%-33%'e yükselmektedir. Bununla birlikte, birkaç faktör bu oranları etkilemektedir;

- GK'nın nedeni, düşük yapma riskini etkiler. Örnek olarak, 22:22 translokasyonu taşıyıcıları neredeyse her zaman düşük yaparken, 13:14 translokasyonu olan kadınların 25% 'i abortus riski taşımaktadırlar (10).
- Önceki GK'nın GH ve gebe kalma aralığı (GKA), TGK riskini etkileyebilir. Daha önce GK yaşayan 677 katılımcının bulunduğu bir çalışmanın ikincil analizinde (ortalama GH 8.6 ± 2), ilk trimester kaybından sonraki GKA'nın, sonraki gebelikte canlı doğum oranını etkilemediği gösterilmiştir (11). Bununla birlikte, 14-19 GH'ları arasında (anne yaşı standardize edilmiş) GK yaşayan kadınlarla ilgili bir çalışmada, $GKA \leq 3$ ay, 9-12 aylık bir GKA ile karşılaştırıldığında, artmış bir tekrarlayan kayıp oranı ile ilişkilendirilmiştir (22%'ye karşı 11%), (12).
- İleri anne yaşı, hem normal hem de anormal konseptuslarda daha yüksek oranda artmış GK ile ilişkilidir (13). Bu durumun, yaşın ilerlemesine bağlı azalan oosit kalitesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Spontan GK'nın genel oranı yüzde 11%'dir. Anne yaşına göre klinik olarak tanı alan yaklaşık düşük oranları; 20-30 yaş (9%-17%), 35 yaş (20%), 40 yaş (40%) ve 45 yaş (80%) (Tablo 1).
- Artan parite, düşük yapma oranının artmasıyla da ilişkilidir. Bu, kısmen anne yaşı ile parite arasındaki korelasyon ve "üreme telafisi" (çiftlerin düşük yaptıktan sonra çocuk sahibi olmak için tekrarlayan girişimlerde buldukları bir davranış modeli) ile açıklanabilir.
- Önceki gebelik sonucu, bir sonraki gebelikteki riski olumlu veya olumsuz etkileyebilir. Genel olarak, ardışık GK ile birlikte düşük riskinin arttığı kabul edilirken, bazı çalışmalarda canlı doğumla biten bir gebeliğin sonraki gebelikte düşük yapma riskini azalttığı bildirilmektedir (14).
- Hem etiyojijiyi hem de nüks riskini belirlemede GK anındaki GH dikkate alınmalıdır. TGK tipik olarak birbirini takip eden gebeliklerde benzer bir GH'da ortaya çıkar (14). Kayıp anındaki GH arttıkça nüks riski artmaktadır.

2.1.4.2. Uterin Faktörler

Edinilmiş ve konjenital uterin anomaliler, TGK'nın 10%-50%'sinden sorumludur (15).

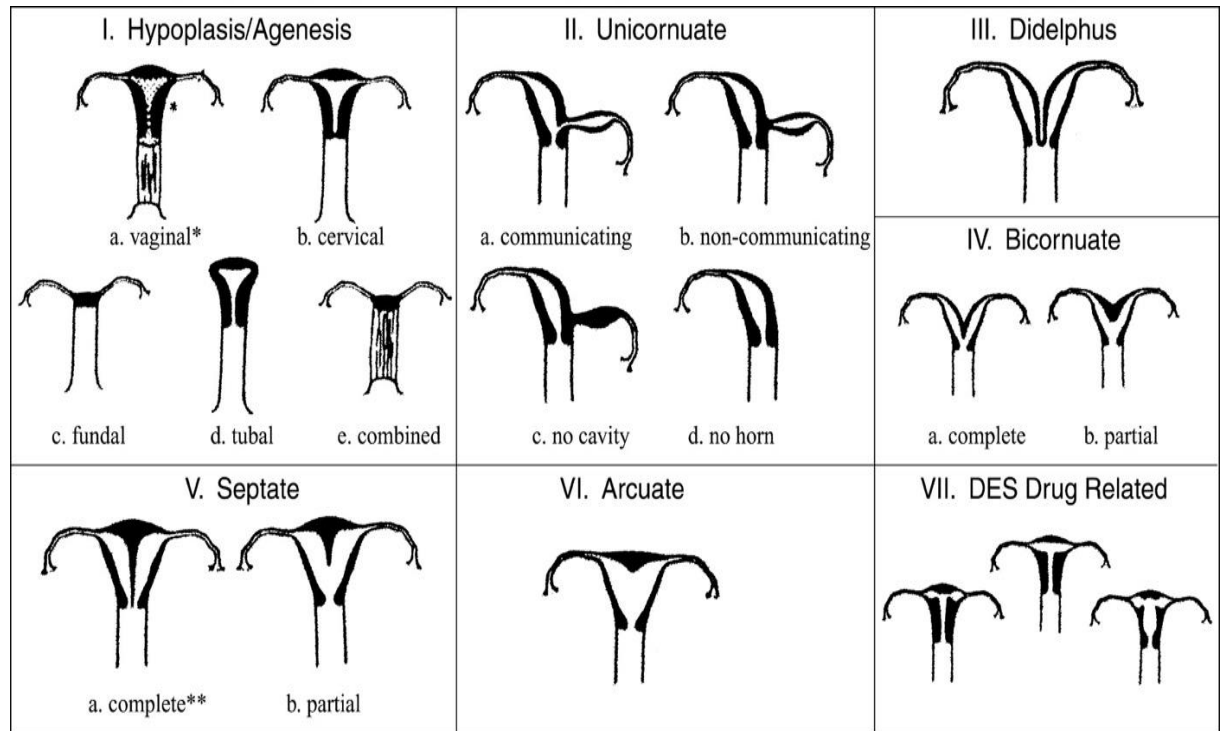
2.1.4.2.1. Uterin Anomaliler

Doğuştan uterin anomaliler (Resim 1) TGK'lı kadınların yüzde 10%-15%'inde bulunurken tüm kadınların 7%'sinde mevcuttur (16). TGK'nın, bozulmuş uterin distansiyon, septuma bağlı azalmış damarlanma sonucu meydana gelen anormal implantasyon, artmış inflamasyon, steroid hormonlara verilen yanıtta azalma nedeniyle meydana geldiği düşünülmektedir (17).

Septat uterus, kötü gebelik sonuçları ve TGK ile ilişkili en yaygın görülen uterus anomalisidir (18,19).

Tedavi edilmemiş septumu olan kadınlarda fetal sağkalım oranı 6%-28%'dir ve düşük oranı 60%'ın üzerindedir. Septum ne kadar uzunsa prognoz o kadar kötüdür (20). Septat uterusun GK'na neden olduğu mekanizma tam olarak anlaşılammıştır, ancak septumun zayıf kanlanması nedeniyle kötü implantasyona neden olabileceği düşünülmektedir.

Resim 1. Doğuştan uterin malformasyonların sınıflandırılması

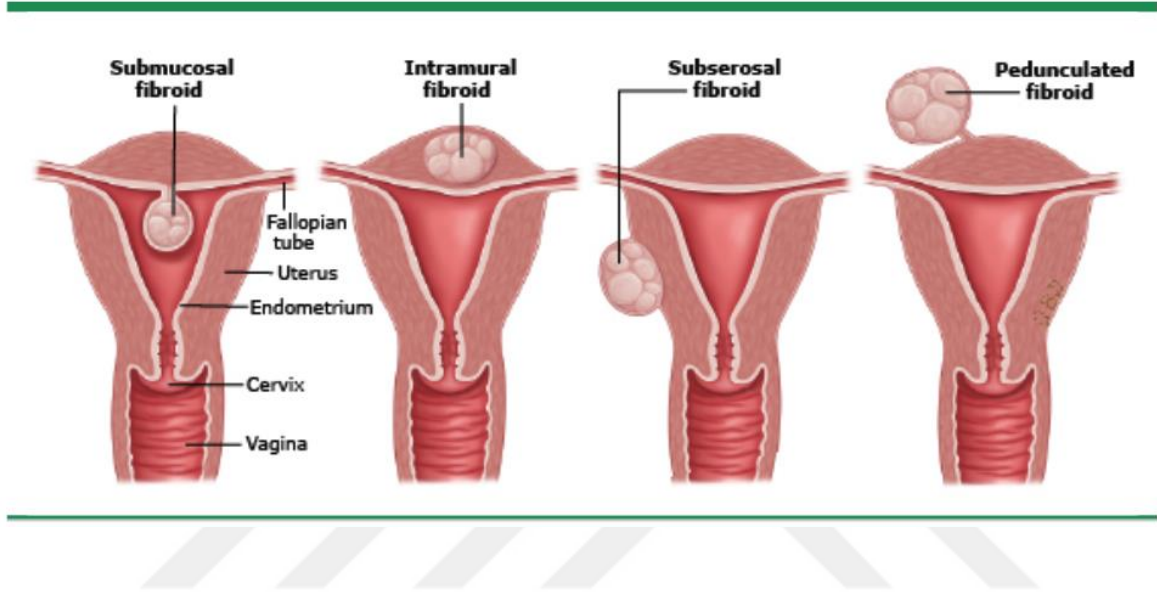


*American fertility society classification of mullerian anomalies

2.1.4.2.2. Leiomyom

Endometrial kaviteye bası yapan submukoz leiomyomlar, yerleşim yerleri, myomu örten desidua'nın zayıf endometriyal reseptivitesi veya artan sitokin üretimi nedeniyle meydana gelen dejenerasyona bağlı normal implantasyonu engelleyebilceği bildirilmiştir (Resim 2), (21).

Resim 2. Leiomyomların uterusu yerleşimi



2.1.4.2.3. Endometrial Polipler

Endometrial polipler ve TGK'ları arasında henüz kanıtlanmış bir ilişki bulunmamaktadır.

2.1.4.2.4. İntrauterin Adezyonlar

İntrauterin adezyonlar veya sineşi, fetoplasental büyümeyi desteklemek için yeterli endometriyum yüzeyi olmadığından GK'na neden olabilir. İntrauterin adezyonların ana nedeni gebeliğe bağlı komplikasyonlar için uygulanan küretajlardır. Özellikle postpartum ilk dört hafta içinde yapılan küretaj işlemi, endometriyumun bazalis tabakasını travmatize eder ve daha sonra granülasyon dokusu oluşumu ile iyileşmektedir. Uterusun karşı yüzeylerinde oluşan granülasyon dokusu nedeniyle, endometriyal dokudan oluşan ince yapışıklıklardan, tamamen bağ dokusundan oluşan yoğun yapışıklıklara kadar değişen, doku köprüleri oluşturabilir ve uterus duvarları birbirlerine yapışabilirler. Uterin kavitenin kısmen veya tamamen yapışması sonucunda, adet düzensizliklerine (hipomenore, amenore), siklik pelvik ağrıya, infertiliteye ve TGK'na yol açabilmektedir.

2.1.4.3. Servikal Yetmezlik

Servikal yetmezlik, ikinci trimesterde TKG'nın bir nedenidir. Spontan abortusların 0.2%'sinden, 2. ve 3. trimester GK'larının 16%–20%'sinden ve TKG'larının 8%–15%'inden sorumludur. Preterm doğumların ise yaklaşık 10%'unda servikal yetmezlik sorumlu tutulmaktadır (22).

2.1.4.4. Yetersiz Endometriyal Reseptivite

Östrojen ve progesteron hormonları endometriumu gebelik için hazırlamaktadırlar (23). Normal endometriyal reseptivite, embriyonun implantasyonuna, invazyonuna ve plasantanın gelişmesine izin verir. Endometriyal reseptivite yetersiz olduğunda, açıklanamayan infertilite veya TKG meydana gelebilir. Endometrial reseptivitenin değerlendirilmesi için yetersiz endometrial reseptivitenin nedenleri ve biyomarkerlar araştırılmaktadır (24). Araştırmalarda, TKG'nin uterin kök hücre eksikliği ve artmış hücre yaşlanma ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (25). Klinik testler henüz mevcut değildir.

2.1.4.5. İmmünolojik Faktörler

Normal bir gebeliğin oluşumundaki her basamak, bir immün tolerans (modülasyondur). Hem otoimmün hem de alloimmün mekanizmalarla düzenlenmektedir. Annenin semi-allojenik durumunu meydana getiren tolerasyon mekanizmaları iyi tanımlanmadığı için, reproduktif başarısızlıkta anormal immünolojik faktörlerin rolünü değerlendirmek mümkün değildir (26).

2.1.4.6. Antifosfolipid Antikor Sendromu

Bazı otoimmün hastalıklar, kötü obstetrik sonuçlarla ilişkilendirilmiştir, ancak antifosfolipid antikor sendromu (AFAS), GK'nın bir tanı kriteri olduğu tek immün hastalıktır. TKG'lı hastaların 5%-15%'i AFAS'a sahip olabilir (27).

2.1.4.7. Diğer İmmünolojik Faktörler

Allojenik faktörler, nakil alıcılarındaki greft reddine benzer bir mekanizma ile TKG'na neden olabilir. Blastokist gelişimi normal ve intakt ise, embriyo trofoblast hücreleri tarafından tamamen korunmalıdır. Ancak bazı gebeliklerde blastokist genetik olarak deforme olur ve tam olarak intakt değildir. Sonuç olarak, paternal antijenler maternal bağışıklık sistemine maruz kalır ve bu da bir greft reddi yanıtına benzer bir yanıtı yol açar. TKG vakalarında sekonder immün yanıtın erken bir rejeksiyona neden olması beklenmektedir.

2.1.4.8. Endokrin Faktörler

Endokrin faktörler TGK'nın yüzde 15%-60%'ını oluşturmaktadırlar.

2.1.4.8.1. Diabetes Mellitus

Nadiren de olsa, kötü kontrollü DM erken ve geç dönem GK ile ilişkilidir. Birkaç çalışma, gebeliğin erken dönemlerinde yüksek hemoglobin A1C değerlerini (özellikle 8%'in üzerindeki değerler) artan düşük ve konjenital malformasyon riskiyle ilişkilendirmiştir (28). Kötü kontrollü DM'a bağlı kadınlarda meydana gelen hiperglisemi, maternal vasküler hastalık ve muhtemelen immünolojik faktörlere sekonder GK'larının meydana geldiğine inanılmaktadır. İyi kontrol edilen DM'u olan kadınlarda ise düşük yapma riski artmamıştır (29). PKOS sahip kadınlarda görülen insülin direncide GK'da bir faktör olabilir.

2.1.4.8.2. Polikistik Over Sendromu

PKOS'lu kadınlarda düşük oranı 20%-40% kadar yüksek olabilir ve bu genel obstetrik popülasyondaki GK oranından (10%-20%) daha yüksektir (30). Bu hastalarda artmış GK'nın mekanizması bilinmemektedir, ancak yüksek serum luteinize edici hormon (LH) seviyeleri, yüksek testosteron ve androstenedion konsantrasyonları (endometriumu olumsuz etkileyebilecek) veya insülin direnci ile ilişkili olabilir.

PKOS'lu kadınlarda seks hormonu anormallikleri erken veya gecikmiş ovülasyona, azalmış endometriyal reseptiviteye ve prostaglandinlerin, overyan büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin sentezinde / salgılanmasında / hareketinde bozukluklara neden olmaktadır.

TGK öyküsü kadınlarda, PKOS olsun ya da olmasın, canlı doğum yapan gebelerle karşılaştırıldığında daha yüksek insülin direnci seviyelerine sahiplerdir (31). PKOS'lu kadınlarda İD metformin ile tedavisinin, gebelik kaybında bir azalmayla ilişkili olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (32,33).

2.1.4.8.3. Tiroid Antikorları ve Hastalıkları

Bazı çalışmalarda, yüksek serum tiroid antikor konsantrasyonlarına (tiroid peroksidaz veya tiroglobulin) sahip olan kadınlarda artmış fetal kayıp oranları bildirilmiştir (34). Tiroid otoimmünitesi, açıklanamayan infertilite ve implantasyon başarısızlığı ile de ilişkilendirilmiştir (35). Kötü kontrol edilen tiroid hastalığı (hipo- veya hiper-tiroidizm) infertilite ve GK ile ilişkilidir. Aşırı yüksek düzeylerde artmış tiroid hormonu maternal metabolik disfonksiyondan bağımsız olarak düşük riskini arttırmaktadır (36).

2.1.4.8.4. Hiperprolaktinemi

Normal dolaşımdaki prolaktin seviyeleri, gebeliğin erken dönemlerinin sürdürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Düşük prolaktin konsantrasyonuna yönelik verilen tedavi sonrasında, daha yüksek başarılı gebelik oranları elde edilmiştir (52%'ye karşı 86%),(37).

2.1.4.8.5. Luteal Faz Defekti

Başarılı bir implantasyon ve gebeliğin devamı için progesteron gereklidir; bu nedenle, bozulmuş progesteron üretimi veya fonksiyonu ile ilgili sorunların gebelik başarısını etkilemesi muhtemeldir. Korpus luteumun işlevindeki bir sorunun (yani, luteal faz defekti) bozulmuş progesteron üretimine ve sonuçta ortaya çıkan infertilite veya GK'nın potansiyel bir nedeni olduğu varsayılmıştır. Bununla birlikte, böyle bir defektin gerçekten var olup olmadığı ve düşükle ilişkili olup olmadığı tartışmalıdır ve en ideal tanı veya tedavi yöntemi konusunda fikir birliği yoktur (38,39).

Anormal luteal faz progesteron üretimi, artmış prolaktin veya anormal tiroid fonksiyonu gibi medikal durumların bir sonucu olarak meydana gelebilir; bu bozukluklardan birine sahip olduğundan şüphelenilen kadınlar, altta yatan durum için değerlendirilir ve tedavi edilirler.

2.1.4.9. Genetik Faktörler

Kromozom sayısı veya yapısındaki anormallikler sporadik erken dönem GK'nın en yaygın nedenidir (40). TGK'nın önemli bir kısmı, yapısal veya sayısal kromozomal anormalliklerle (örn. anöploidi, mozaizim, inversiyon, translokasyon, delesyon, kırılğan bölgeler) ilişkili olabilir (41,42). Tek gen, X-linked veya poligenik/multifaktöriyel bozukluklar da sporadik veya TGK ile sonuçlanabilir. Açıklanamayan TGK'lı kadınların birinci derece akrabalarında artmış bir TGK riskinin olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (43). Bu, ortak HLA tipleri, pıhtılaşma kusurları, immün disfonksiyon veya diğer tanımlanmamış kalıtsal faktörlerle ilgili olabileceği düşünülmektedir.

2.1.4.9.1. Anöploidi

Önceki düşüklerin sayısı arttıkça anöploidi riski artmaktadır (44). Düşüğün karyotipi ile TGK riski arasındaki ilişkiyi ve hangi anormalliklerde tekrarlamaya olasılığının daha yüksek olduğunu tanımlamak için daha fazla çalışma gerekmektedir. Bazı olgu serilerinde, kromozomal bir anormalliğe bağlı bir spontan abortusun olması, kromozomal anormallikle ilişkili sonraki GK riskini artırdığı görülmüştür (45,46). Aneuploidi veya euploidiye bağlı

abortedan sonra ikinci bir düşükte anormal karyotip sıklığının sırasıyla 70% ve 20% olduğunu bildirilmiştir (45).

2.1.4.9.2. Kromozomal Yeniden Düzenleme

TGK'lı çiftlerin 3%-5%'i major bir kromozomal yeniden düzenlemeye sahiptir (genel popülasyonun 0,7%'si); genellikle dengeli translokasyon (60% Resiprokal, 40% Robertsonian) daha nadir olarakta inversiyonlar görülmektedir (28,47). Partnerlerden biri veya her ikisi, onları etkilemeyen heterozigot veya dengeli bir kombinasyonda letal genler barındırabilir, ancak bu embriyoya homozigot yada dengesiz bir kombinasyonla aktarıldığında GK'na yol açabilir. Dengeli translokasyonlar kadınlarda erkeklerden daha yaygındır ve eğer translokasyon maternal kaynaklıysa gebelik kaybına neden olma olasılığı daha yüksektir. TGK'nın ebeveynlerin karyotipik anormalliği ile ilişkili olma olasılığı, aşağıdaki özelliklerden biri veya daha fazlası mevcut olduğunda daha yüksek ihtimalle görülmektedir; ikinci düşükte genç anne yaşı, üç veya daha fazla düşük öyküsü, kardeşlerde veya eşlerden birinin ebeveynlerinde iki veya daha fazla düşük öyküsü bulunması, ailede ölü doğum veya anormal bir canlı doğum öyküsü de risk faktörleri arasında yer almaktadır (21,48). Bununla birlikte, anormal bir ebeveyn karyotipi mevcut olmasına rağmen, TGK'na neden olmayabileceğindedir dikkat edilmelidir; bu nedenle, TGK ile başvuran çiftlerde tam bir değerlendirme yapmaya özen gösterilmelidir (49).

2.1.4.10. Trombofili ve Fibrinolitik Faktörler

Spiral arterlerin trombozu ve plasentanın maternal tarafındaki intervillöz boşluk, yeterli plasental perfüzyonu bozabilir. Ortaya çıkan uteroplasental dolaşım anormallikleri, geç fetal kayba, fetal gelişme geriliğine, plasenta dekolmanına veya preeklampsiye neden olabilir. Erken dönem GK ile arasındaki ilişki yeterince net değildir ve yeterince tanımlanmamış spesifik trombofilik kusurlarla veya multiple defektlerin varlığıyla sınırlı olabileceği düşünülmektedir.

Fibrinolitik defektler ile TGK'ları arasındaki ilişkiyi incelemek için yapılan sistematik bir derlemede, faktör XII eksikliği ile TGK'ları arasında önemli bir ilişki bulunmuştur (50).

Prokoagülan mikropartiküller ayrıca hiperkoagülasyona katkıda bulunabilir ve bu nedenle başarılı implantasyon ve fetal büyümeyi etkileyebilirler. Yapılan çalışmalarda mikropartiküllerin erken ve geç açıklanamayan GK ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (51). Plasental mekanizmalar TGK' de rol oynayabilir. Bazı veriler, yaygın haplotip M2'nin anneksin A5 genindeki (anneksin A5 bir plasental antikoagülan proteindir) ekspresyonunun TGK ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (52-56).

2.1.4.11. Çevresel Kimyasallar ve Stres

Hastalarda sık görülen bir endişe olmasına rağmen, TGK ile mesleki faktörler, stres veya çoğu çevresel kimyasallara düşük düzeyde maruz kalma arasında bir ilişki olduğunu gösteren yüksek kalitede kanıt bulunmamaktadır (21,57). Sporadik spontan gebelik kaybıyla ilişkilendirilen kimyasallar arasında anestezi gazları (azot oksit), arsenik, anilin boyaları, benzen, etilen oksit, formaldehit, pestisitler, kurşun, cıva ve kadmiyum bulunur (58).

2.1.4.12. Diğer Faktörler

2.1.4.12.1. Kişisel Alışkanlıklar

TGK ile obezite, sigara, alkol kullanımı ve kafein tüketimi arasındaki ilişki net değildir (59). Bu faktörler, sporadik GK oranını artırmak için doza bağlı bir şekilde veya sinerjik olarak etki göstermektedirler. Egzersiz, sporadik GK veya TGK oranlarını artırmıyor gibi görünmektedir (57).

2.1.4.12.2. Erkek Faktörü

Erkek partnerde anormal sperm varlığı, tekrarlayan düşüklere neden olmaya bir eğilim oluşturmaktadır (örn. 4% 'ten az normal form, sperm kromozom anöplodisi) (60-63). İleri baba yaşı, düşük yapma için bir risk faktörü olabileceği düşünülmektedir.

2.1.4.12.3. Enfeksiyon

Listeria monositogenez, toxoplasma gondii, sitomegalovirüs ve primer genital herpes gibi bazı enfeksiyonların sporadik gebelik kaybına neden olduğu bilinmektedir, ancak hiçbir enfeksiyöz ajanın TGK'na neden olduğu kanıtlanamamıştır (57).

2.1.4.12.4. Azalmış Over Rezervi

Nedeni belli olmayan TGK'lı olan kadınlarda, TGK nedeni belli olan kadınlara göre 3. gün serum folikül uyarıcı hormon (FSH) ve estradiol (E2) düzeylerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (64).

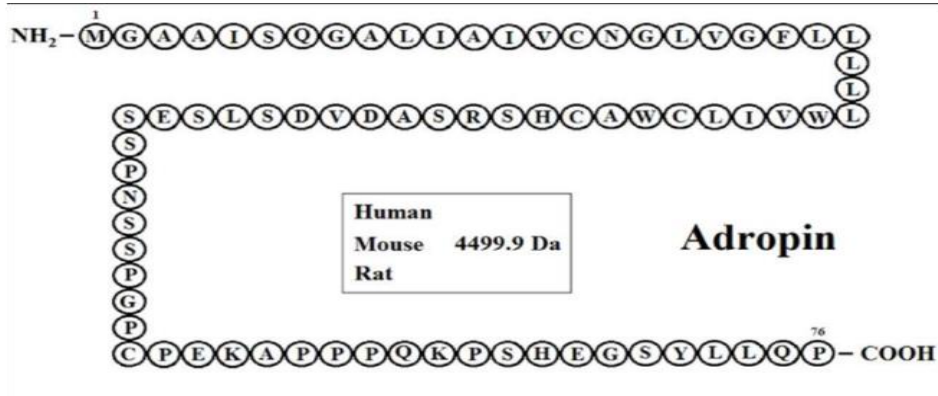
2.1.4.12.5. Çölyak Hastalığı

Tedavi edilmeyen çölyak hastalığı, subklinik olsa bile, GK, menstruel bozukluklar ve infertilite ile ilişkilendirilmiştir. Tedavi ile bu sorunların engellendiği görülmektedir (65-67).

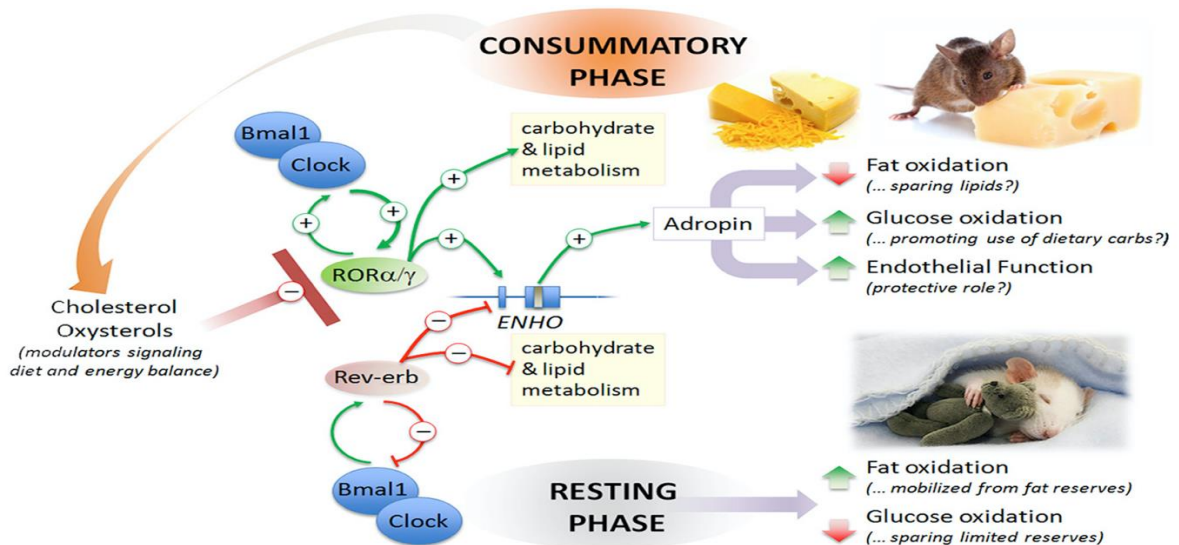
2.2. Adropin

Adropin, enerji homeostazisiyle ilişkili gen (Encho) tarafından kodlanan özellikle karaciğer ve beyin başta olmak üzere, birçok periferik dokuda sentezlenen bir hormondur (Resim 3),(68). Lipid metabolizmasında, insülin duyarlılığının sürdürülmesinde ve enerji homeostazinde önemli rol oynar, İD ve glikoz intoleransını anlamlı düzeyde azaltır (Resim 4),(68). Encho geni olmayan farelerde adipozite ve insülin direnci artmıştır (68). Glikoz ve lipid metabolizmasını düzenleyen bir faktör olması nedeniyle, obezite ile ilişkili hepatosteatoz ve hiperinsülinemiye karşı koruyucu etkisi bulunmaktadır (68). Diyabetli ratlarda serum ve doku adropin düzeyi artmış olduğu gösterilmiştir (69). Plazma adropin konsantrasyonu ile açlık trigliserid seviyesi arasında negatif bir ilişki bilinmektedir (70). Metabolik strese cevap olarak kanda artmış adropin, İD ve glikoz intoleransını azaltır (68). İD'nin TGK'larında rol oynayabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (71).

Resim 3. Adropin hormonunun aminoasit dizilimi



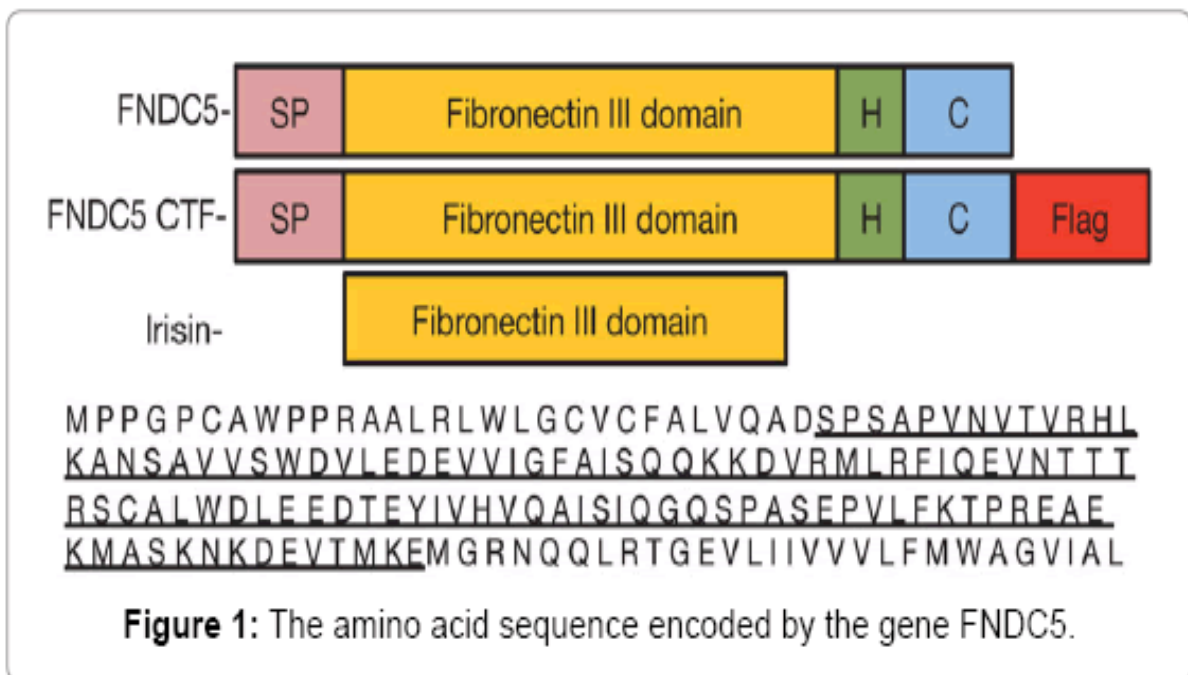
Resim 4. Adropinin fonksiyonları



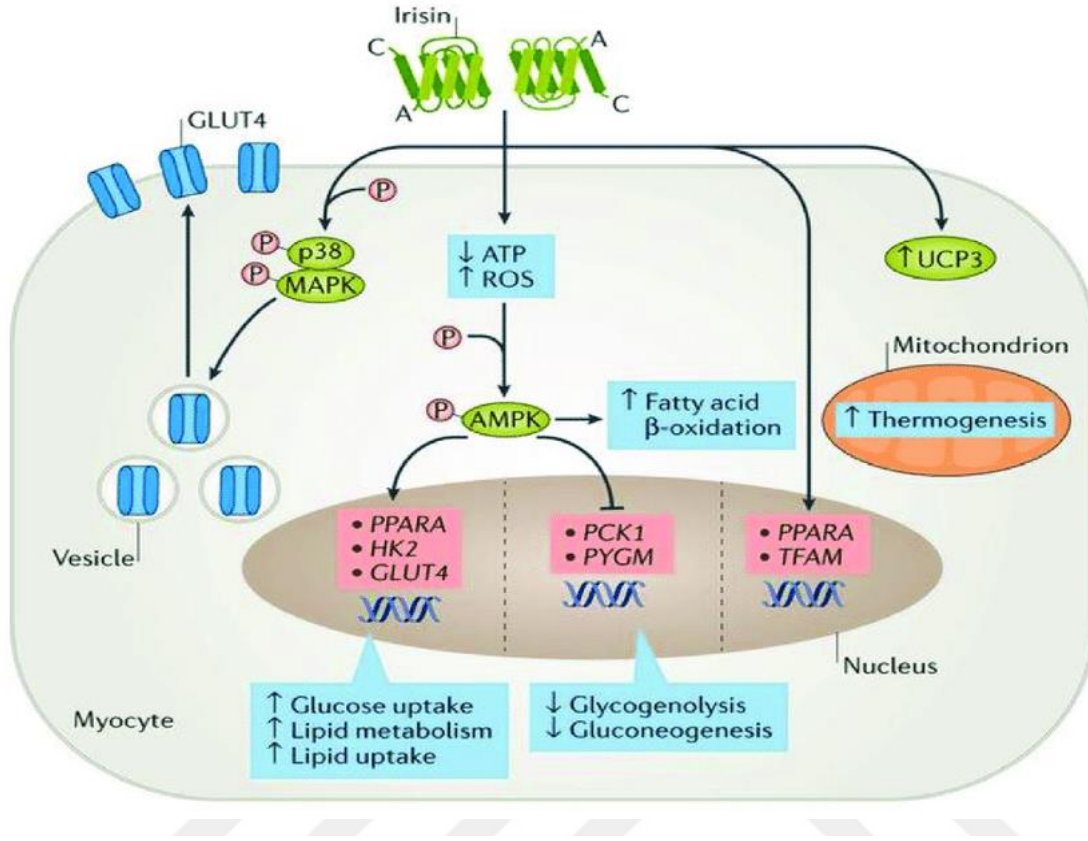
2.3. İrisin

İrisin egzersiz indüklü miyokin olarak enerji homeostazı ve metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan yeni bir hormondur (72). İlk kez 2012 yılında Boström ve arkadaşları tarafından çizgili kas dokusunda izole edilmiş olup, 112 aminoasitten oluşan bir proteindir (Resim 5), (73). Egzersizle birlikte düzeyi artarak enerji depolayan beyaz adipoz dokunun enerjisi ısı şeklinde dağıtan kahverengi yağ dokusuna dönüştürülmesinde rol oynamaktadır (74). Bu olay vücutta enerji tüketiminde artışa yol açar (Resim 6). Moleküler mekanizmasında egzersiz, enerji metabolizmasında önemli rolü olan PPAR γ (peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama)'nın koaktivatörü olan koaktivatör-1a (PGC1- α)'nın salınımını uyarır. Bu da bir transmembran protein olan FNDC5'in (fibronektin tip III domein içeren protein 5) ekspresyonunu uyarır. FNDC5 proteolitik olarak ayrılarak yeni hormon irisinin dolaşıma salınmasına yol açar. İrisin yağ dokusundaki henüz tanımlanmamış reseptörüne bağlanır. Bu termogenezi ve öncelikli olarak subkutanöz ve aynı zamanda visseral adipoz dokunun kahverengileşmesini sağlayan mitokondrial UCP1 (ayırıcı protein-1) ve cidea (hücre ölümü aktivatörü) mRNA'nın ekspresyonunu artırır. Enerji depolayan beyaz adipoz doku, enerjisi ısı şeklinde dağıtan kahverengi adipoz dokuya dönüştürülür. Böylece enerji tüketiminde artış meydana gelir (75). İrisinin bu etkisiyle insülin direncini azaltarak, glikoz homeostazisini iyileştirerek obezite ve diyabet tedavisinde yararlı etki gösterebileceği düşünülmektedir.

Resim 5. İrisin hormonunun aminoasit dizilimi



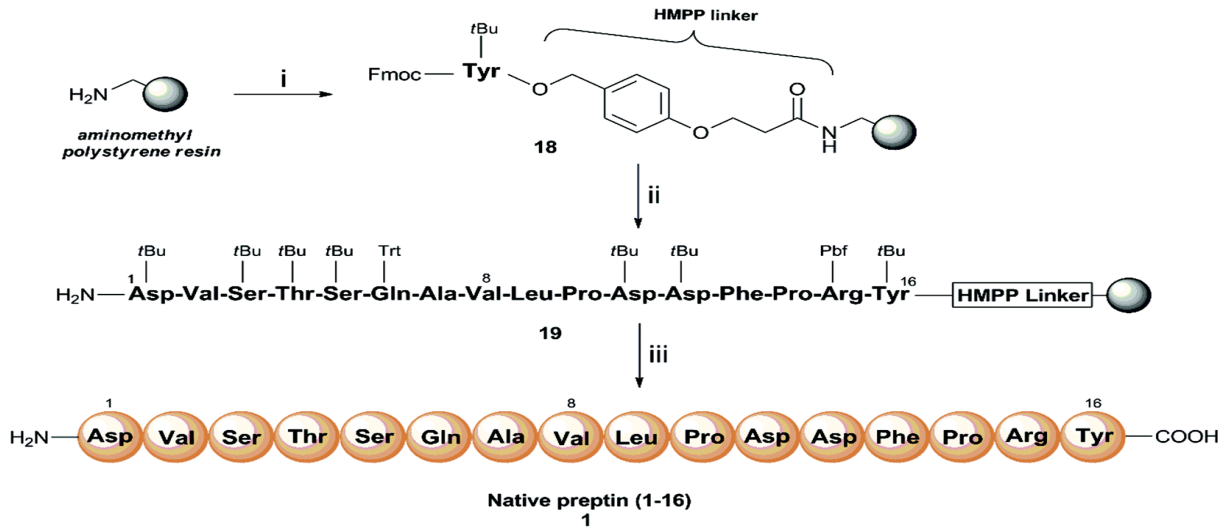
Resim 6. İrisinin fonksiyonları



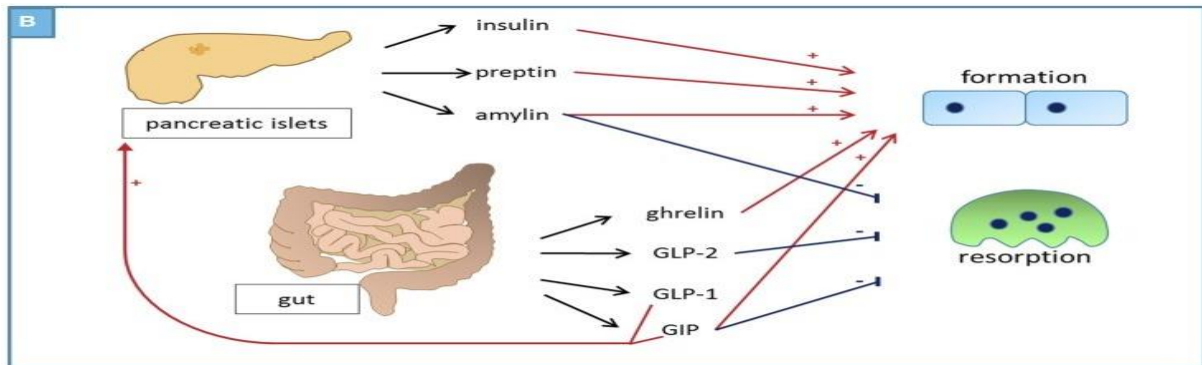
2.4. Preptin

34 aminoasitten oluşan, Proinsülin benzeri büyüme faktörü II'den (ProIGF-II) elde edilen preptin, pankreatik adacık β hücrelerinden salgılanır ve insülin sekresyonunu artırır (Resim 7). Glikoza cevaben pankreatik hücrelerden insülin ile birlikte salgılanır (Resim 8). Preptin düzeyleri, glukoz intoleransı olan tüm tip 2 DM hastalarında ve GDM hastalarında artmıştır. Ayrıca, GDM'li hastalarda maternal serum ve kordon kanında bakılan preptin düzeyleri kontrol gebe kadınlara göre daha yüksek bulunmuştur. Preptin, glukoz konsantrasyonlarına bağlı olarak fizyolojik olarak insülin sekresyonuna aracılık eder. Şimdi glikoz homeostazında önemli olan 4 aktif pankreas hormonlarından biri olarak düşünülmektedir (amilin, glukagon ve insüline ek olarak).

Resim 7. Preptin hormonunun yapısı



Resim 8. Preptinin fonksiyonları

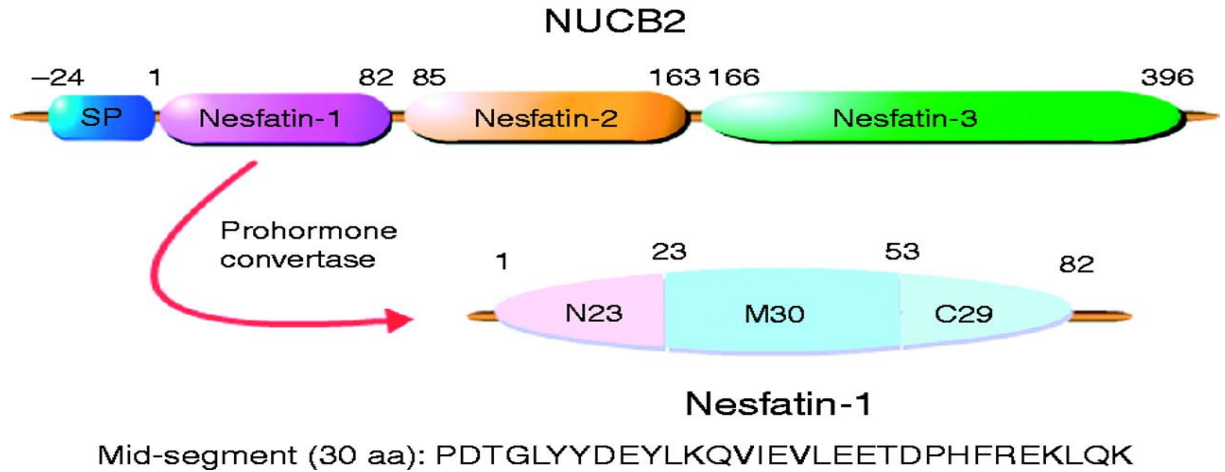


2.5. Nesfatin-1

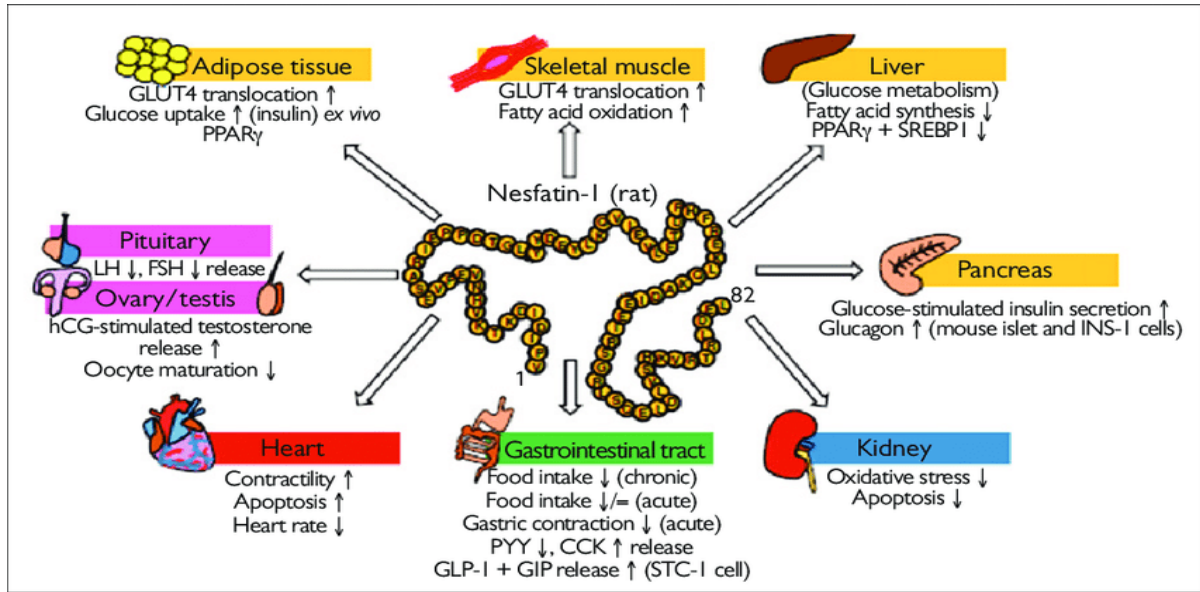
Son zamanlarda keşfedilen nesfatin-1, Nükleobindin-2'den (NUCB2) türetilen 82 amino asitten oluşan bir metabolik peptittir (Resim 9). Hipotalamusta bulunan bir tokluk molekülü olan bu hormonun enerji metabolizması üzerine etkileri bilinmektedir (Resim 10),(76). Nesfatin-1 lateral hipotalamik alan, paraventricüler çekirdek, supraoptik çekirdek ve arkuat nükleusta bulunduğu bildirilmiştir (76). Nesfatin-1'in yiyecek alınımını baskılama mekanizması leptinden bağımsızdır, bununla birlikte melanokortin $\frac{3}{4}$ reseptörlerine bağımlı olduğu yapılan çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır. Nesfatin-1 iştahın düzenlenmesinde önemli rolleri olduğu bilinen nöropeptid Y, kokain amfetain related peptid, proopio melanokortin,

oksitosin gibi peptidlerle birlikte bulunmaktadır. Özellikle otoimmün hastalıklar, stress, metabolik bozukluklar, artan oksidatif stres gibi durumlarda bu hormonların farklı cevaplar verdiği bildirilmiştir. Nesfatin-1 hormonunun depresif hastalarda enerji düzenleme yerine stresle mücadele edici etkisinde bulunduğu bildirilmiştir (77). Nesfatin-1 glukoz metabolizması, insülin sekresyonu, gastrointestinal motilite, stress cevabı ve pubertenin başlangıcını düzenlemektedir. Nesfatin-1 testiküler Leydig hücreleri, over teka hücrelerinde bulunduğu son zamanlarda rapor edilmiştir. Son veriler NUCB2/nesfatin-1'in de enerji durumu ile üreme arasındaki ilişkiye dahil olduğunu gösterilmektedir (78). Özellikle de kadınlarda pubertal geçiş sırasında NUCB2 mRNA ve protein ekspresyonu hipotalamusta anlamlı olarak artmıştır (79). Bütün bu bilgiler nesfatin-1'in üreme fonksiyonunun modülasyonunda olası bir rolünün olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda gestasyonel diyabetli kadınlarda 24-28. Gebelik haftalarında kontrol grubuna göre daha düşük nesfatin-1 seviyeleri olduğu gösterilmiştir (80). Merkezi ya da periferik olarak uygulandığında, nesfatin-1'in kemirgenlerde gıda alımını azalttığı gösterilmiştir (81,82). İnsülin fetal gelişimde potent bir düzenleyicidir (83). Nesfatin-1 yüksekliğinde gıda alımının azalmasına bağlı olarak insülin sentezinin azalacağı ve fetal gelişimin olumsuz olarak etkileneceği öngörülmektedir.

Resim 9. Nesfatin hormonunun yapısı



Resim 10. Nesfatinin fonksiyonları



GK ebeveynler için travmatik bir süreçtir. Çiftler üzerinde maddi ve manevi olumsuz sonuçları bulunmaktadır ve GK sayısı arttıkça da bu olumsuz sonuçlar çiftleri daha fazla etkilemektedir. Etiyolojide bir çok faktör bulunmasına rağmen, TGK vakalarının 50%'sinde herhangi bir etken bulunamamaktadır. Tedavi bazı etiyolojik faktörlere sahip çiftlerde mümkün olsada, çiftlerin büyük bir çoğunluğunda tedavi verilememektedir ya da verilen tedavilerin bir etkinliği bulunmamaktadır.

Adropin, irisin, preptin, nesfatin-1 metabolizma üzerinde direkt ve indirekt etkileri olan gıda alımının düzenlenmesi, glukoz intoleransı ve insülin direncinin düzenlenmesinde rol oynayan hormonlardır. İD, glukoz seviyeleri ve DM ile TGK'ları arasındaki ilişkiyi ortaya koyan literatürde çalışmalar yer almaktadır (71).

Çalışmamızda, metabolizma üzerindeki etkileri kanatlanan adropin, irisin, preptin ve nesfatin-1 hormonlarının TGK ile ilişkisini araştırmayı amaçladık.

3. Materyal ve Yöntem

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğinde Ocak 2019 ve Temmuz 2020 tarihleri arasında, yaşları 18-45 arasında değişen, polikliniğe TGK nedeniyle başvuran ya da öyküsünde TGK olan 100 hasta ve TGK öyküsü ve TGK için risk faktörü bulunmayan 104 sağlıklı, toplamda 204 katılımcının dahil edildiği prospektif bir çalışmadır. Çalışmamız Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2019-TFU-02 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başkanlığına sunulmuş olup 01.02.2019 sayı: 02 numarasıyla onay alınmıştır. Etik kurul onayı alındıktan sonra, tüm hastalar çalışma hakkında aydınlatılmış onamları alındıktan sonra çalışmaya dahil edildiler.

TGK tanısı konulurken ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) ve ASRM (America society for reproductive medicine) klavuzları göz önünde bulunduruldu (1,5). Ultrasonografi veya histopatolojik inceleme ile belgelenen iki veya daha fazla başarısız klinik gebelik veya biyokimyasal gebelik kayıpları dahil ardışık üç GK öyküsü olan hastalar TGK olarak kabul edildi.

Çalışma grubuna, çalışmaya katılmayı aydınlatılmış onam sonrası kabul eden kliniğimize dışarıdan sevk edilen veya kendi başvuran, yaşları 18-45 arasında değişen DM, kalp yetmezliği, kronik böbrek hastalığı, otoimmün hastalık, kalıtsal anemi ve bunlar gibi sistemik hastalık öyküsü bulunmayan, sigara, kafein, alkol, ilaç, uyuşturucu madde kullanmayan katılımcılar dahil edildi. TGK öyküsüne sahip olan bütün hastalar ayrıntılı bir etiyojolojiye yönelik taramadan geçirildi. TGK öyküsünü açıklayacak anatomik, trombofilik, genetik, immünolojik bir faktöre sahip olan hastalar çalışma dışında bırakıldı. Etiyoloji de herhangi bir etken bulunamayan hastalar ise çalışma grubuna dahil edildi.

Hasta bilgilerine; yatış ve takip dosyasındaki bilgiler, telefon görüşmesi ve yüzyüze görüşme şeklinde ulaşıldı. TGK tanısı alan hastaların hepsinde etiyojolojiye yönelik ayrıntılı olarak değerlendirildi. Her iki hasta grubunda da maternal yaş, boy, kilo, vücut kitle indeksleri (VKİ), ölçülerek kaydedildi. Hastaların bir kısmında önceki başvurdukları sağlık merkezinde yapılan laboratuvar ve görüntüleme sonuçları değerlendirilerek kayıt altına alındı. Hastaların detaylı obstetrik hikayesi (daha önceki düşüklerin gerçekleştiği gestasyonel yaş, düşüklerin detaylı öyküsü, canlı doğumların hikayesi, varsa gebeliklere ait karyotip analizi) sorgulandı. Menstruel öyküde, döngü uzunlukları, düzensizlikler, dismenore sorgulanarak varsa kayıt altına alındı. Çalışmaya dahil edilen bütün hastalar ayrıntılı genel fizik ve jinekeolojik muayeneden geçirildi, uterin anomaliler açısından ultrason ve histerosalpingografi tercih edildi. Her iki partnerin karyotip analizi yapıldı. Trombofilik ve hamatolojik nedenler açısından; tam

kan, antitrombin III, protein C, protein S, aktif protein C rezistansı, Factor V Leiden mutasyonu, Protrombin G 20210 A mutasyonu, kan homosistein düzeyi, folik asit, vit. B12 seviyesi, endokrin nedenler açısından; açlık kan şekeri, menstruasyonun 3. günü FSH, LH, TSH, prolaktin, serbest testosteron, DHEAS seviyesi, otoimmünite açısından; lupus antikoagulanı, antikardiolipin antikor IgG ve IgM, ANA (antinükleer antikor), antitiroid antikorları içeren detaylı bir incelemeye tabi tutuldular.

Deneklerden Kan Örnekleri Alımı

Çalışmaya katılan kişilerden bir gecelik açıklarını takiben sabah 08:00-10:00 saatleri arasında ön kol venlerinden 5 ml kan örnekleri alınmıştır. 5 ml kan örnekleri aprotinin ve antikoagülan tüpler (2.5 ml) (Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) ve sodyum heparin) ile normal biyokimya tüplerinde (2.5 ml) toplanmıştır. Tüm kan örnekleri +4 oC'de 4500 devirde (rpm) 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra elde edilen serum ve plazmalar analiz edilinceye kadar -80 oC'de saklanmıştır. Hemoliz olan kan örneklerinden hatalı sonuç alınacağından hemoliz olayına dikkat edilip bu tür kan örnekleri çıkartılmış ve analiz için saklanmamıştır.

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Aletler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve cihazların listesi aşağıda gösterilmiştir.

ELISA Yıkama Cihazı: BIOTEK ELX 50, ABD

ELISA Okuma Cihazı: BIOTEK ELX 50, Microplate Reader, ABD

Santrifüj: Nüve CN 180

Nesfatin-1: Cloud-Clone Corp. Wuhan, Çin, (Katalog Numarası: SEN242Hu).

İrisin: Cloud-Clone Corp. Wuhan, Çin, (Katalog Numarası: SEN576Hu).

Adropin: Cloud-Clone Corp. Wuhan, Çin, (Katalog Numarası: SEN251Hu).

Preptin: Cloud-Clone Corp. Wuhan, Çin, (Katalog Numarası: SEN051Hu).

3.2. Hormon Analizleri

Çalışmadaki analizler çift kör esasıyla gerçekleştirilmiştir. İrisin, nesfatin-1, preptin ve adropin düzeyi enzim işaretli-immunosorbent analiz (ELISA) yöntemiyle hazır ticari kit kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.1. İnsan İrisin ELISA Kiti Analizi

Analizde kullanılacak tüm malzemeler ve örnekler kullanılmadan önce oda ısısına (18-25 C) getirilmiştir. Test reaktanları aşağıdaki gibi hazırlanmıştır;

- 1000 pg/ml İnsan İrisin Standart Solüsyonu: Bir tüpün içine 1 ml. standart sulandırıcı eklenmiş ve 10 dk. oda ısısında tüp tutulmuş ve karıştırılmıştır.

- 1000 pg/ml'den 15.6 pg/ml insan irisin standart solüsyonu hazırlamak için 7 tane ependorf tüpü 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.2 pg/ml ve 15.6 pg/ml olacak şekilde etiketlenmiştir. Her tüpe 0.5 ml standart sulandırıcı buffer eklenmiştir. Birinci tüpe daha önce hazırlanan 1000 pg/ml irisin standart solüsyonundan 0.5 ml eklenmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra 1. tüpten 0.5 ml alınmış 2. tüpe eklenmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra 2. tüpten 3. tüpe, 3.tüpten 4. tüpe, 4. tüpten 5. tüpe, 5 tüpten 6. tüpe 0.5 ml eklenmiş karıştırılmıştır.

Detection Reaktan A ve B'nin Hazırlanması; Stok Detection A ve B hafifçe karıştırılmıştır. Daha sonrasında Analiz sulandırıcı buffer A ve B ile 1:100 oranında sulandırılmıştır.

Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması; 20 ml yıkama solüsyonu (30X) 580 ml distile su ile sulandırılmıştır.

- Ön kaplamaya tabi tutulmuş 96 kuyucuklu plate'in standart için ayrılmış kuyucukların her birine 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.2 pg/ml ve 15,6 pg/ml insan irisin standart solüsyonundan 0.1 ml eklenmiştir.

- Plate'te bir kuyucuk blank olarak ayrılmıştır.

- Plate'in örnek için ayrılmış kuyucuklarına 0.1 ml örnek yüklenmiştir. Plate plate kapatici ile kapatılmıştır.

- Plate 1 saat 37 derecede inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklar aspire edilmiştir ve 100µL Detection reaktan A eklenmiştir, Plate plate kapatici ile kapatılmıştır ve 1 saat 37 derecede inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklar tekrar aspire edilip 350 µL yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkanmıştır.

- Daha sonra herbir kuyucuğa 100 µL Detection reaktan B eklenmiştir, Plate plate kapatici ile kapatılmıştır ve 30 dakika 37 derecede inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklar aspire edilmiş ve daha sonra 350µL yıkama solüsyonuyla 5 kez yıkanmıştır.

- Daha sonra 90µL substrat solüsyonu eklenmiş, Plate plate kapatici ile kapatılmıştır ve 10-20 dakika 37 derecede karanlıkta inkübe edilmiştir. Plate'in rengi maviye dönmeye başlamıştır.

-En sonunda 50µL stop solüsyonu eklenmiş, renk hemen sarıya dönmüştür ve ardından plate hemen 450 nm'de plate okuyucuda okunmuştur.

Hesaplama için $O.D._{450} = (\text{Her bir kuyucuğun } O.D._{450}) - (\text{Boş kuyucuğun } O.D._{450})$

Belirleme Aralığı 15.6-1000 pg/ml

*Intra assay CV: <% 10 *Inter assay CV: <% 12

3.2.2. İnsan Nesfatin-1 ELISA Kiti Analizi

Analizde kullanılacak tüm malzemeler ve örnekler kullanılmadan önce oda ısısına (18-25 C) getirilmiştir.

Test reaktantları aşağıdaki gibi hazırlanmıştır;

- 20000 pg/ml İnsan Nesfatin-1 Standart Solüsyonu; Bir tüpün içine 1 ml. standart sulandırıcı eklenmiş ve 10 dk. oda ısısında tüp tutulmuş ve karıştırılmıştır.

- 20000 pg/ml'den 0 pg/ml insan nesfatin-1 standart solüsyonu hazırlamak için 6 tane endorf tüpü 20000 pg/ml, 6666.7 pg/ml, 2222.2 pg/ml, 740.7 pg/ml, 246.9 pg/ml, 0 pg/ml olacak şekilde etiketlenmiştir. Her tüpe 0.3 ml standart sulandırıcı buffer eklenmiştir. Birinci tüpe daha önce hazırlanan 20000 pg/ml nesfatin-1 standart solüsyonundan 0.3 ml eklenmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra 1. tüpten 0.3 ml alınmış 2. tüpe eklenmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra 2. tüpten 3. tüpe, 3.tüpten 4. tüpe, 4. tüpten 5. tüpe, 0.3 ml eklenmiş 5 tüpten 6. tüpe sadece 0.3 ml standart sulandırıcı eklenmiş ve karıştırılmıştır.

Detection Reaktan A ve B'nin Hazırlanması; Stok Detection A ve B ampülleri hafifçe karıştırılmıştır. Daha sonrasında Analiz sulandırıcı buffer A ve B ile 1:100 oranında sulandırılmıştır.

Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması; 20 ml yıkama solüsyonu (30X) 580 ml distile su ile sulandırılmıştır.

- Ön kaplamaya tabi tutulmuş 96 kuyucuklu plate'ın standart için ayrılmış kuyucukların her birine 6666.7 pg/ml, 2222.2 pg/ml, 740.7 pg/ml, 246.9 pg/ml, ve 0 pg/ml insan nesfatin-1 standart solüsyonundan 50µL eklenmiştir.

- Plate'te bir kuyucuk blank olarak ayrılmıştır.

- Plate'in örnek için ayrılmış kuyucuklarına 50µL örnek yüklenmiştir. Plate hafifçe çalkalanmıştır. Plate plate kapatici ile kapatılmıştır.

- Plate 1 saat 37 derecede inkübe edilmiştir.
 - İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklar aspire edilmiştir ve 100µL Detection reaktan A eklenmiştir, plate kapatıcı ile kapatılmıştır ve 1 saat 37 derecede inkübe edilmiştir.
 - İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklar tekrar aspire edilip 350µL yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkanmıştır.
 - Daha sonra her bir kuyucuğa 100µL Detection reaktan B eklenmiştir, plate kapatıcı ile kapatılmıştır ve 30 dakika 37 derecede inkübe edilmiştir.
 - İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklar aspire edilmiş ve daha sonra 350µL yıkama solüsyonuyla 5 kez yıkanmıştır.
 - Daha sonra 90µL substrat solüsyonu eklenmiş, plate kapatıcı ile kapatılmıştır ve 10-20 dakika 37 derecede karanlıkta inkübe edilmiştir. Plate'in rengi maviye dönmeye başlamıştır.
 - En sonunda 50µL stop solüsyonu eklenmiş, renk hemen sarıya dönmüştür ve ardından plate hemen 450 nm'de plte palte okuyucuda okunmuştur.
- Hesaplama için $O.D._{450} = (\text{Her bir kuyucuğun } O.D._{450}) - (\text{Boş kuyucuğun } O.D._{450})$
- Belirleme Aralığı 246.9-20000 pg/ml
- *Intra assay CV: <% 10 *Inter assay CV: <% 12

3.2.3. İnsan Preptin ELISA Kiti Analizi

Analizde kullanılacak tüm malzemeler ve örnekler kullanılmadan önce oda ısısına (18-25 C) getirilmiştir.

Test reaktanları aşağıdaki gibi hazırlanmıştır;

-160 ng/ml İnsan Preptin Standart Solüsyonu; Bir tüpün içine 1 ml. standart sulandırıcı eklenmiş ve 10 dk. oda ısısında tüp tutulmuş ve karıştırılmıştır.

-160 pg/ml'den 0.312 ng/ml insan preptin standart solüsyonu hazırlamak için 7 tane ependorf tüpü 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2.5 ng/ml, 1.25 ng/ml, 0.625 ng/ml ve 0.312 ng/ml olacak şekilde etiketlenmiştir. Her tüpe 0.5 ml. standart sulandırıcı buffer eklenmiştir. Birinci tüpe daha önce hazırlanan 160ng/ml preptin standart solüsyonundan 0.5 ml eklenmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra 1. tüpten 0.5 ml. alınmış 2. tüpe eklenmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra 2. tüpten 3. tüpe, 3.tüpten 4. tüpe, 4. tüpten 5. tüpe, 5. tüpten 6. Tüpe, 6. tüpten 7. tüpe 0.5 ml. eklenmiş karıştırılmıştır.

Detection Reaktan A ve B'nin Hazırlanması; Stok Detection A ve B ampülü hafifçe karıştırılmıştır. Daha sonrasında Analiz sulandırıcı buffer A ve B ile 1:100 oranında sulandırılmıştır.

Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması; 20 ml. yıkama solüsyonu (30X) 580 ml distile su ile sulandırılmıştır.

- Ön kaplamaya tabi tutulmuş 96 kuyucuklu plate'ın standart için ayrılmış kuyucukların her birine 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2.5 ng/ml, 1.25 ng/ml, 0.625 ng/ml ve 0.312 ng/ml insan preptin standart solüsyonundan 0.1 ml. eklenmiştir.

- Plate'te bir kuyucuk blank olarak ayrılmıştır.

- Plate'in örnek için ayrılmış kuyucuklarına 0.1 ml. örnek yüklenmiştir. Plate plate kapatıcı ile kapatılmıştır.

- Plate 1 saat 37 derecede inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklar aspire edilmiştir ve 100µL Detection reaktan A eklenmiştir, Plate plate kapatıcı ile kapatılmıştır ve 1 saat 37 derecede inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklar tekrar aspire edilip 350µL yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkanmıştır.

- Daha sonra herbir kuyucuğa 100µL Detection reaktan B eklenmiştir, Plate plate kapatıcı ile kapatılmıştır ve 30 dakika 37 derecede inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklar aspire edilmiş ve daha sonra 350µL yıkama solüsyonuyla 5 kez yıkanmıştır.

- Daha sonra 90µL substrat solüsyonu eklenmiş, Plate plate kapatıcı ile kapatılmıştır ve 10-20 dakika 37 derecede karanlıkta inkübe edilmiştir. Plate'in rengi maviye dönmeye başlamıştır.

- En sonunda 50µL stop solüsyonu eklenmiş, renk hemen sarıya dönmüştür ve ardından plate hemen 450 nm'de plate okuyucuda okunmuştur.

Hesaplama için $O.D._{450} = (Her\ bir\ kuyucuğun\ O.D._{450}) - (Boş\ kuyucuğun\ O.D._{450})$

Belirleme Aralığı 0.312-20 ng/ml

*Intra assay CV: <% 10 *Inter assay CV: <% 12

3.2.4. İnsan Adropin ELISA Kiti Analizi

Analizde kullanılacak tüm malzemeler ve örnekler kullanılmadan önce oda ısısına (18-25 C) getirilmiştir.

Test reaktanları aşağıdaki gibi hazırlanmıştır;

-2000 pg/ml İnsan Adropin Standart Solüsyonu; Bir tüpün içine 1 ml. standart sulandırıcı eklenmiş ve 10 dk. oda ısısında tüp tutulmuş ve karıştırılmıştır.

-2000 pg/ml'den 31,2 pg/ml insan adropin standart solüsyonu hazırlamak için 7 tane ependorf tüpü 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.2 pg/ml ve 15.6 pg/ml olacak şekilde etiketlenmiştir. Her tüpe 0.5 ml standart sulandırıcı buffer eklenmiştir. Birinci tüpe daha önce hazırlanan 160 ng/ml preptin standart solüsyonundan 0.5 ml eklenmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra 1. tüpten 0.5 ml alınmış 2. tüpe eklenmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra 2. tüpten 3. tüpe, 3.tüpten 4. tüpe, 4. tüpten 5. tüpe, 5. tüpten 6. Tüpe, 6. tüpten 7. tüpe 0.5 ml eklenmiş karıştırılmıştır.

Detection Reaktan A ve B'nin Hazırlanması; Stok Detection A ve B ampülü hafifçe karıştırılmıştır. Daha sonrasında Analiz sulandırıcı buffer A ve B ile 1:100 oranında sulandırılmıştır.

Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması; 20 ml yıkama solüsyonu (30X) 580 ml distile su ile sulandırılmıştır.

- Ön kaplamaya tabi tutulmuş 96 kuyucuklu plate'in standart için ayrılmış kuyucukların her birine 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2.5 ng/ml, 1.25 ng/ml, 0.625 ng/ml ve 0.312 ng/ml insan preptin standart solüsyonundan 0.1 ml eklenmiştir.

- Plate'te bir kuyucuk blank olarak ayrılmıştır.

- Plate'in örnek için ayrılmış kuyucuklarına 0.1 ml örnek yüklenmiştir. Plate plate kapatıcı ile kapatılmıştır.

- Plate 1 saat 37 derecede inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklar aspire edilmiştir ve 100µL Detection reaktan A eklenmiştir, Plate plate kapatıcı ile kapatılmıştır ve 1 saat 37 derecede inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklar tekrar aspire edilip 350 µL yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkanmıştır.

- Daha sonra herbir kuyucuğa 100 µL Detection reaktan B eklenmiştir, Plate plate kapatıcı ile kapatılmıştır ve 30 dakika 37 derecede inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklar aspire edilmiş ve daha sonra 350 µL yıkama solüsyonuyla 5 kez yıkanmıştır.

- Daha sonra 90 µL substrat solüsyonu eklenmiş, Plate plate kapatıcı ile kapatılmıştır ve 10-20 dakika 37 derecede karanlıkta inkübe edilmiştir. Plate'in rengi maviye dönmeye başlamıştır.

- En sonunda 50 µL stop solüsyonu eklenmiş, renk hemen sarıya dönmüştür ve ardından plate hemen 450 nm'de plate okuyucuda okunmuştur.

Hesaplama için $O.D._{450} = (\text{Her bir kuyucuğun } O.D._{450}) - (\text{Boş kuyucuğun } O.D._{450})$

Belirleme Aralığı 31.2-2000 pg/ml

*Intra assay CV: <% 10 *Inter assay CV: <% 12

3.3. İstatistiksel Analiz

Devamlı değişkenler ortanca ve interkuartil aralık veya ortalama ve standart sapma olarak gösterildi. Kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak gösterildi. Devamlı değişkenlerin normal dağılım varsayımı Shapiro-Wilk testi ile denendi. Yönlendirilmiş döngüsüz grafiklerle karıştırıcı ve mediyatör etkiler belirlendi. Kohort gebeliğin biyobelirteçler üzerindeki etkisi göz önüne alınarak tabakalandırıldı. Karıştırıcı etkiler için eğilim skoru eşleştirmesi yapılmasından sonra gruplar analiz edildi. Gruplar arası hipotez testleri devamlı değişkenler için t-testi veya Wilcoxon-signed-rank test ile yapıldı. Kategorik değişkenler için hipotez testi ki-kare testiyle yapıldı.

4. Bulgular

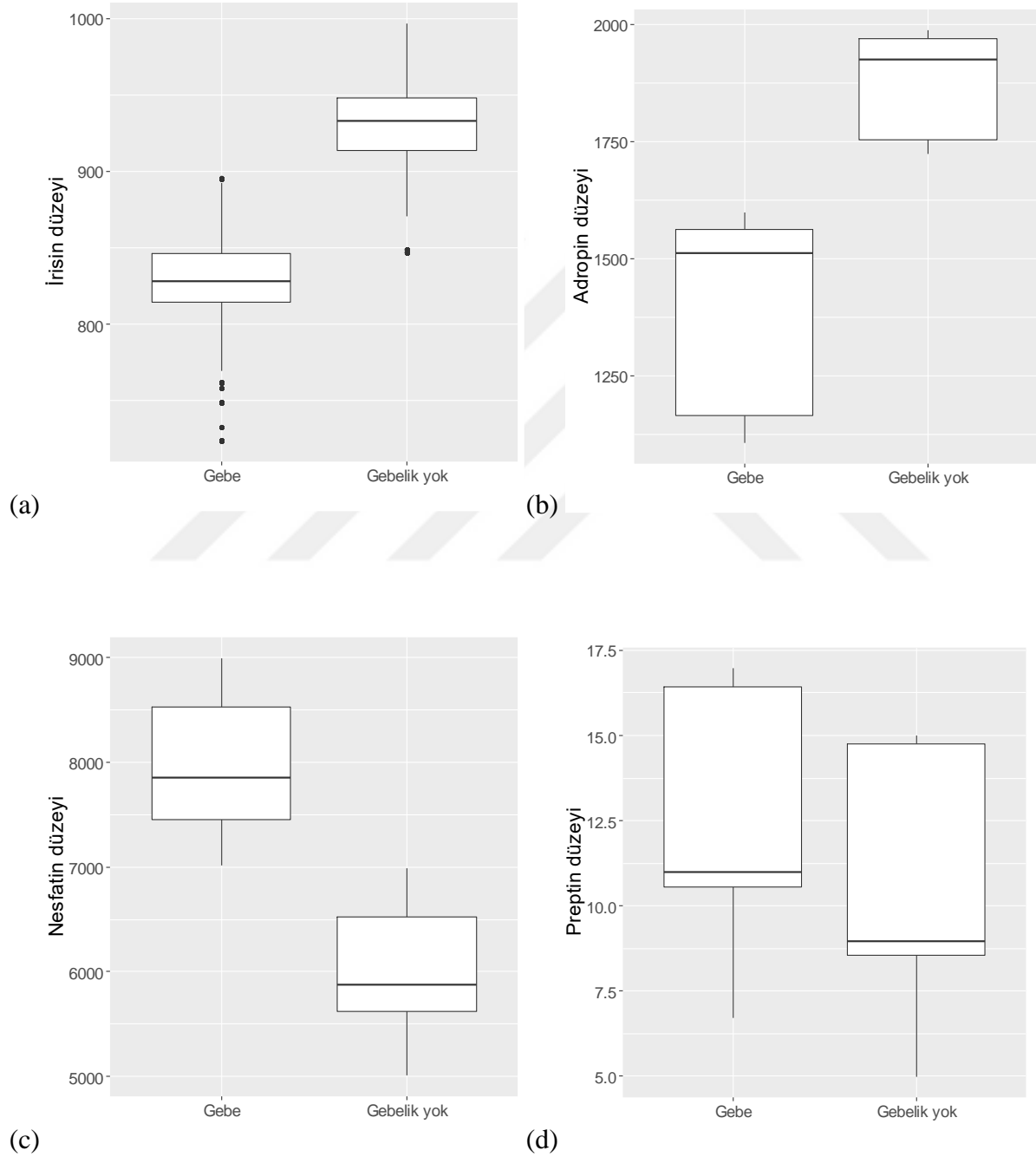
Araştırmaya TKG hikayesi olan 100, TKG hikayesi olmayan 104 kişi olmak üzere toplamda 204 katılımcı dahil edildi. Kan örnekleme yapılan katılımcıların 48.5%’i (n: 99) gebeyken 51.5%’i (n: 105) gebe değildi. Kan örnekleme sırasında gebe olmayan kadınların gebe olan kadınlara kıyasla yaş ortalamasının daha yüksek olduğu gözlemlendi (ortalama 31.9’a karşı 29.4 yıl, P= 0.004). Kan örnekleme sırasında gebe olan ve olmayan kadınlar arasında gravida (ortanca: 3.0’a karşı 3.0, P= 0.146), parite (ortanca: 1.0’e karşı 2.0, P= 0.105), yaşayan (ortanca: 2.0’ye karşı 2.0, P = 0.055), TKG (%49.5’e karşı %48.6, P = 0.895), VKİ indeksi (ortanca: 23.8’e karşı 24.7 kg/m², P = 0.615), AKŞ (ortanca: 90’a karşı 91.0 mg/dL, P = 0.350) değişkenleri bakımından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi (Tablo 3). Gebelerde irisin (ortanca 827.9’a karşı 832.7, P <0.001) ve adropin (ortanca 1511’a karşı 1924, P <0.001) düzeyi anlamlı şekilde düşük, preptin (ortanca 10.9’a karşı 8.9, P <0.001) ve nesfatin-1 düzeyi (ortanca 7855’e karşı 5879, P <0.001) anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır (Tablo 3, Şekil 1).

Tablo 3. Araştırmaya dahil edilen hastalardan, kan örnekleme yapıldığı sırada gebe olan ve olmayan hastaların temel karakteristikleri ve kan irisin, nesfatin-1, adropin ve preptin düzeylerinin karşılaştırılması.

Değişkenler	Gebe (n: 99)	Gebe değil (n: 105)	P*
Yaş, ortalama (SS)	29.4 (5.4)	31.9 (7.2)	0.004
Gravida, ortanca (IKA)	3.0 (3.0-5.0)	3.0 (2.0-5.0)	0.146
Parite, ortanca (IKA)	1.0 (1.0-3.0)	2.0 (1.0-3.0)	0.105
Yaşayan, ortanca (IKA)	2.0 (1.0-2.0)	2.0 (1.0-3.0)	0.055
Abortus, ortanca (IKA)	1.0 (0.0-2.0)	1.0 (0.0-3.0)	0.476
Tekrarlayan düşük, n (%)	49 (49.5)	51 (48.6)	0.895
Gebelik yaşı, ortanca (IKA)	21.0 (10.1-30.4)	-	-
Vücut kitle indeksi, ortanca (IKA)	23.8 (21.8-27.2)	24.7 (22.0-27.0)	0.615
Açlık kan şekeri, ortanca (IKA)	90.0 (86.0-98.0)	91.0 (76.0-97.5)	0.350
Irisin, ortanca (IKA)	827.9 (814.2-845.9)	932.7 (913.8-947.7)	<0.001
Nesfatin-1, ortanca (IKA)	7855 (7449-8524)	5879 (5625-6522)	<0.001
Adropin, ortanca (IKA)	1511 (1165-1562)	1924 (1753-1968)	<0.001
Preptin, ortanca (IKA)	10.9 (10.5-16.4)	8.9 (8.5-14.7)	<0.001

SS: standart sapma; IKA: interkuartil aralık *Devamlı değişkenler dağılım özelliklerine göre t-testi Wilcoxon signed-rank testi veya Ki-kare testiyle hesaplanmıştır.

Şekil 1. Katılımcılara kan örnekleme yapıldığı sırada gebe olan ve olmayan kadınlarda irisin, nesfatin-1, preptin ve adropin düzeylerini gösteren kutu grafiği. Kutu içerisindeki düz çizgi ortanca değeri, kutunun alt ve üst çizgilerin interkuartil aralığı, siyah noktalar ise dışta kalan değerleri göstermektedir. Gebelerde irisin (a) ve adropin düzeyi (b) anlamlı şekilde düşük, preptin (c) ve nesfatin-1 düzeyi (d) anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır ($P < 0.001$, hepsi için).



TGK olan ve olmayan kadınlar arasında gravida (ortanca: 4.0'a karşı 3.0, $P < 0.001$), parite (ortanca: 1.0'e karşı 2.0, $P < 0.001$), yaşayan (ortanca: 1.0'ye karşı 2.0, $P < 0.001$) ve abort (ortanca: 2.0'a karşı 0.0, $P < 0.001$) sayıları arasında anlamlı fark gözlemlendi (Tablo 4). TGK olan ve olmayan kadınlar arasında yaş (ortalama 30.8'e karşı 30.5 yıl, $P = 0.741$), örnekleme sırasında gebelik (49.0% 'a karşı 48.1%, $P = 0.895$), GH (ortanca 23.0'e karşı 20.1 hafta, $P=0.544$), ve AKŞ (ortanca: 93.0'a karşı 89.0 mg/dL, $P = 0.274$) değişkenleri bakımından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi (Tablo 4). TGK olan kadınlarda VKİ anlamlı şekilde daha yüksek saptandı (ortanca: 26.0'a karşı 22.9 kg/m^2 , $P < 0.001$). TGK olan kadınlarda irisin (ortanca 876.4'e karşı 896.5, $P = 0.016$) ve adropin (ortanca 1724'e karşı 1924, $P < 0.001$) düzeyi anlamlı şekilde düşük, preptin (ortanca 14.9'a karşı 8.9, $P < 0.001$) ve nesfatin-1 düzeyi (ortanca 6986'ya karşı 5865, $P < 0.001$) anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır (Tablo 4, Şekil 2).

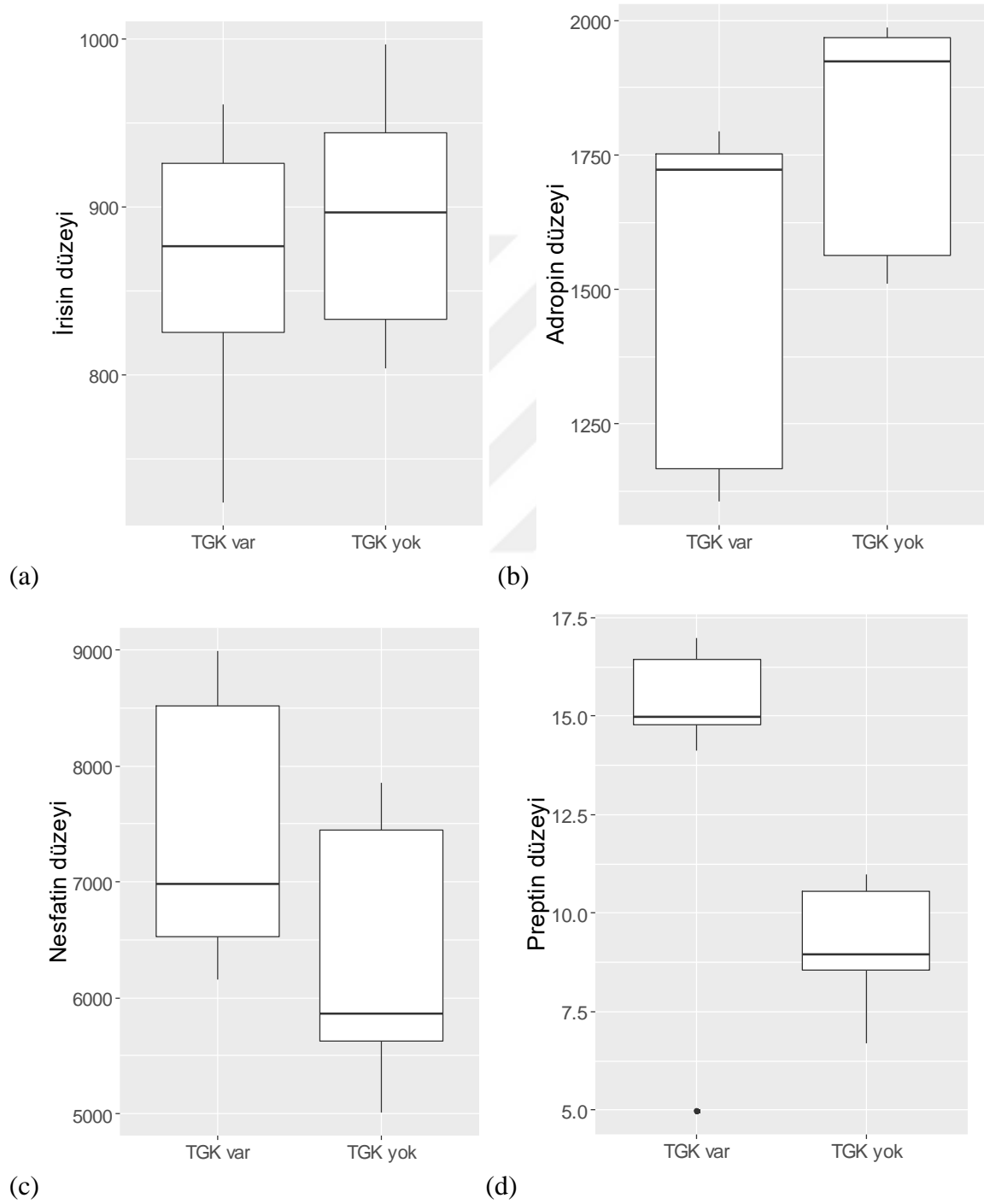
Tablo 4. Araştırmaya dahil edilen hastalardan, TGK öyküsü olan ve olmayan hastaların temel karakteristikleri ve kan irisin, nesfatin-1, adropin ve preptin düzeylerinin karşılaştırılması.

Değişkenler	TGK öyküsü var (n: 100)	TGK öyküsü yok (n: 104)	P*
Yaş, ortalama (SS)	30.8 (6.5)	30.5 (6.5)	0.741
Gravida, ortanca (IKA)	4.0 (3.0-6.0)	3.0 (2.0-3.0)	<0.001
Parite, ortanca (IKA)	1.0 (0.0-3.0)	2.0 (1.0-3.0)	<0.001
Yaşayan, ortanca (IKA)	1.0 (0.0-2.0)	2.0 (1.0-3.0)	<0.001
Abortus, ortanca (IKA)	2.0 (2.0-3.0)	0.0 (0.0-0.0)	<0.001
Gebelik, n (%)	49 (49.0)	50 (48.1)	0.895
Gebelik yaşı, ortanca (IKA)	23.0 (12.0-30.4)	20.1 (9.8-30.1)	0.544
Vücut kitle indeksi, ortanca (IKA)	26.0 (23.4-28.6)	22.9 (21.3-24.8)	<0.001
Açlık kan şekeri, ortanca (IKA)	93.0 (86.0-97.2)	89.0 (86.0-98.0)	0.274
Irisin, ortanca (IKA)	876.4 (825.4-925.5)	896.5 (832.8-944.3)	0.016
Nesfatin-1, ortanca (IKA)	6986 (6527-8522)	5865 (5624-7443)	<0.001
Adropin, ortanca (IKA)	1724 (1167-1753)	1924 (1563-1968)	<0.001
Preptin, ortanca (IKA)	14.9 (14.7-16.4)	8.9 (8.5-10.5)	<0.001

SS: standart sapma; IKA: interkuartil aralık

*Devamlı değişkenler dağılım özelliklerine göre t-testi Wilcoxon signed-rank testi veya Ki-kare testiyle hesaplanmıştır.

Şekil 2. TGK olan ve olmayan kadınlarda irisin, nesfatin-1, preptin ve adropin düzeylerini gösteren kutu grafiği. Kutu içerisindeki düz çizgi ortanca değeri, kutunun alt ve üst çizgilerin interkuartil aralığı, siyah noktalar ise dışta kalan değerleri göstermektedir. TGK olan kadınlarda irisin (a) ve adropin düzeyi (b) anlamlı şekilde düşük, preptin (c) ve nesfatin-1 düzeyi (d) anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır ($P = 0.016$ İrisin, $P < 0.001$ adropin, preptin ve nesfatin-1 için) .



TGK'yla ilişkili nedensel ve karıştırıcı etkilerin belirlenmesi için regresyon analizi yapıldı. VKİ'nin adropin (regresyon tahmini: 13.8, standart hata: 5.75), nesfatin-1 (regresyon tahmini: 47.2, standart hata: 21.9) ve preptin (regresyon tahmini: 0.331, standart hata: 0.05) düzeylerine ve TGK'na (regresyon tahmini: 0.272, standart hata: 0.05) anlamlı şekilde etki ettiği ($P < 0.001$) ve karıştırıcı bir etki olduğu gözlemlendi (Tablo 5). Gebelik varlığı irisin (regresyon tahmini: -101.7, standart hata: 4.24), adropin (regresyon tahmini: -500.1, standart hata: 22.2), nesfatin-1 (regresyon tahmini: 1951, standart hata: 78.9) ve preptin (regresyon tahmini: 2.02, standart hata: 0.43) düzeylerine anlamlı bir şekilde ($P < 0.001$) etki ederken TGK üzerine etkisi izlenmedi ($P > 0.05$). Gebeliğin etkisinin dışlanması için analiz örnekleme sırasında gebe olan ve olmayan katılımcılar arasında tabakalandırılarak yapıldı (Şekil 3).

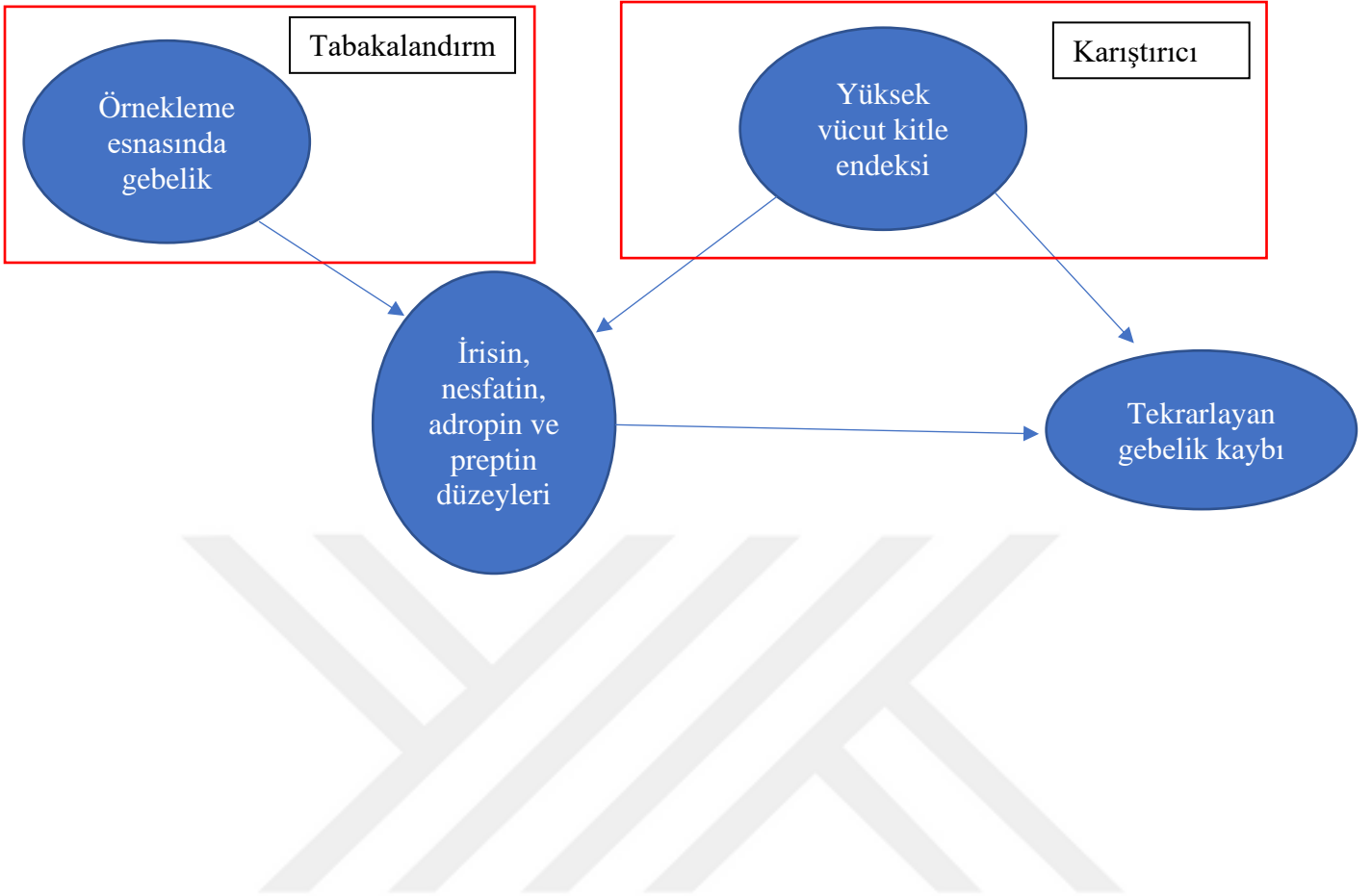
Tablo 5. Klinik değişkenlerin tekrarlayan gebelik kaybı ve biyobelirteçlerle olan ilişkisinin regresyon analiziyle değerlendirilmesi. Biyobelirteç (irisin, adropin, nesfatin-1, preptin) ve tekrarlayan gebelik kaybına ortak etki gösteren değişkenler karıştırıcı etki olarak kabul edilmiştir.

Değişkenler	Tekrarlayan gebelik kaybı	Irisin	Adropin	Nesfatin-1	Preptin	Biyobelirteç ve tekrarlayan gebelik kaybına ortak etki
Yaş	0.007 (0.02)	0.901 (0.63)	6.27 (3.17)	-29.6 (12.0)	-0.030 (0.03)	Yok
Gebelik	0.036 (0.28)	-101.7 (4.24)*	-500.1 (22.2)*	1951 (78.9)*	2.02 (0.43)*	Yok
Vücut kitle indeksi	0.272 (0.05)*	-0.22 (1.16)	13.8 (5.75)*	47.2 (21.9)*	0.331 (0.05)*	Var
Açlık kan şekeri	0.035 (0.02)	0.942 (0.53)	0.272 (2.61)	-7.12 (8.81)	0.033 (0.02)	Yok

* $P < 0.001$

Değerler lineer regresyon modelinin değişkenler için tahmin ettiği değer ve standart hata olarak verilmiştir.

Şekil 3. Yönlendirilmiş döngüsüz grafikte karıştırıcı, medyatör etkilerin tespiti.



TGK olan ve olmayan katılımcıların VKİ için eğilim skoru eşleştirmesi yapılması sonrasında gruplar karşılaştırıldı (Tablo 6). İrisin (ortalama: 13.27, 95% güven aralığı: 0.99-25.55, $P = 0.034$) ve adropin (ortalama: 396.3, 95% güven aralığı: 386.7-405.8, $P < 0.0001$) düzeyleri TGK olmayan ve örnekleme sırasında gebe olan olgularda anlamlı şekilde yüksek izlendi. Nesfatin-1 (ortalama: -1044, 95% güven aralığı: -1150 – -938, $P < 0.0001$) ve preptin (ortalama: -6.0, 95% güven aralığı: -6.19 – -5.80, $P < 0.0001$) düzeyleri tekrarlayan gebelik kaybı olmayan ve örnekleme sırasında gebe olan olgularda anlamlı şekilde düşük izlendi. Analiz örnekleme sırasında gebe olmayan katılımcılarda tekrarlandığı benzer bulgular iris, nesfatin-1 ve preptin düzeyleri için $P < 0.0001$ anlamlılık düzeyinde tekrarlandığı izlendi (Tablo 6).

Tablo 6. Tekrarlayan gebelik kaybı olan ve olmayan katılımcıların VKİ için eğilim skoru eşleştirmesi yapılması sonrasında irisin, nesfatin-1, adropin ve preptin düzeyleri. Sonuçlar örnekleme sırasında gebe olan ve olmayan kişilere göre tabakalandırılarak verilmiştir.

Örnekleme sırasında gebe olanlar	Tekrarlayan gebelik kaybı yok (n: 49)	Tekrarlayan gebelik kaybı var (n: 49)	Ortalama fark (95% güven aralığı)	P*
Irisin, ortalama (SS)	835.4 (21.9)	822.1 (37.8)	13.27 (0.99-25.55)	0.034
Nesfatin-1, ortalama (SS)	7452.7 (215.5)	8497.1 (272.9)	-1044 (-1150 -- 938)	<0.0001
Adropin, ortalama (SS)	1556.6 (20.8)	1160 (24.9)	396.3 (386.7 -- 405.8)	<0.0001
Preptin, ortalama (SS)	10.5 (0.60)	16.5 (0.26)	-6.00 (-6.19 -- -5.80)	<0.0001
Örnekleme sırasında gebe olmayanlar	Tekrarlayan gebelik kaybı yok (n: 49)	Tekrarlayan gebelik kaybı var (n: 49)	Ortalama fark (95% güven aralığı)	P*
Irisin, ortalama (SS)	942.9 (23.7)	916.6 (27.2)	26.3 (16.8 -- 38.9)	<0.0001
Nesfatin-1, ortalama (SS)	5530.9 (234.1)	6529.9 (229.7)	-999.0 (-1092.1 -- 905.9)	<0.0001
Adropin, ortalama (SS)	1959.8 (21.9)	1754.9 (20.2)	204.9 (196.4 -- 213.3)	<0.0001
Preptin, ortalama (SS)	8.57 (0.24)	14.50 (1.38)	-5.93 (-6.32 -- -5.54)	<0.0001

*t-testi

SS: standart sapma

5. Tartışma

Gebelik kayıpları çiftler için oldukça travmatik bir süreçtir. Özellikle TGK'larında çiftler ölü doğum veya yenidoğan kaybına benzer şekilde duygusal bir travmatik deneyim yaşamaktadırlar. Bu nedenle GK yaşayan çiftlerin empati ve anlayışa ihtiyaçları vardır. TGK'larında genellikle etioloji bilinmemekle birlikte, çok az kanıta dayalı tanı ve tedavi stratejisi vardır.

Adropin, irisin, nesfatin-1, preptin hormonlarının metabolizma üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Bu hormonların glukoz metabolizması, insülin sentezi ve insülin duyarlılığı üzerinde direkt yada indirekt etkileri bilinmektedir. Adropinin dolaşımdaki konsantrasyonu, metabolik durum ve diyetteki makro besinler tarafından düzenlenmektedir. İnsülin duyarlılığının sürdürülmesinde ve enerji hemostazında rol oynamaktadır. Eksikliğinde artmış yağ dokusu ve insülin duyarlılığında azalma görülmektedir (84). Yağ ve kas dokusu artık bir endokrin organ olarak kabul edilmektedir. Yağ dokusu iki işlevsel birimden oluşur beyaz yağ dokusu, enerji depolamansının birincil bölgesi olup, aynı zamanda hormonal sinyaller yoluyla tüm vücut ve kas ve/veya karaciğer insülin duyarlılığını düzenlemesine katkıda bulunmaktadır (85). Kahverengi yağ dokusu, esas olarak memelilerde bulunan ikinci tip yağ dokusudur, termogenezdeki rolü aracılığıyla insülin duyarlılığını ve tüm vücut metabolizmasını etkilemektedir (86). İrisinin beyaz yağ dokusunu kahverengi yağ dokusuna dönüştürmesi sonucunda ortaya çıkan termogenezdeki artış sonucunda, insülin duyarlılığında artış, vücut ağırlığında azalma ve gelişmiş glikoz toleransını teşvik etmektedir (87). Preptin, proinsülin benzeri büyüme faktörü II'nin (pro-IGF-II) e-peptidinden türetilir, adacık hücresi granüllerinde bulunur ve glikoza yanıt olarak insülin ile birlikte salgılanır ve glikoz aracılı insülin sekresyonunu artırır (88-91). Gestasyonel DM'li, PKOS'lu ya da tip 2 DM'li hastalarda İD nedeniyle artmış insülin salgısına bağlı olarak daha yüksek preptin seviyeleri izlenmiştir (92,93). Nesfatin-1 vücut ağırlığı ve insülin sekresyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır, plazma nesfatin-1 seviyelerini yeni tanı almış tip 2 DM'li ve bozulmuş glukoz toleransı olan deneklerde İD'den etkilenebilmektedir (94). Glukoz metabolizması bozulmuş hastalarda daha yüksek insülin değerleri görülmektedir, bu nedenle serum nesfatin-1 düzeylerinin GDM hastalarında daha yüksek olacağı düşünülmektedir.

Uterus endometriyumuna embriyonun yerleşmesi için uygun koşulların oluşarak, embriyoyu kabul etmesi üreme tıbbının en önemli basamaklarından biri olan implantasyon aşamasıdır. İmplantasyon için gerekli değişikliklerin oluşabilmesi için endometriyumun gelen sinyallere yanıt vererek endometriyumun uygun hale getirilmesi gerekmektedir. Bu sinyallerin

alınıp uygun ortamın oluşturulmasında endometriyal reseptivite rol oynamaktadır. IVF (invitro fertilizasyon) gebelik oranlarında başarıyı etkileyen en önemli etkenlerden biri implantasyon başarısızlığıdır (95,96). İmplantasyon için uygun bir endometriyal reseptivite gerekli olduğu düşünülmektedir (97). İmplantasyon başarısızlıklarının 2/3'ünde yetersiz endometriyal reseptivite rol oynamaktadır (98).

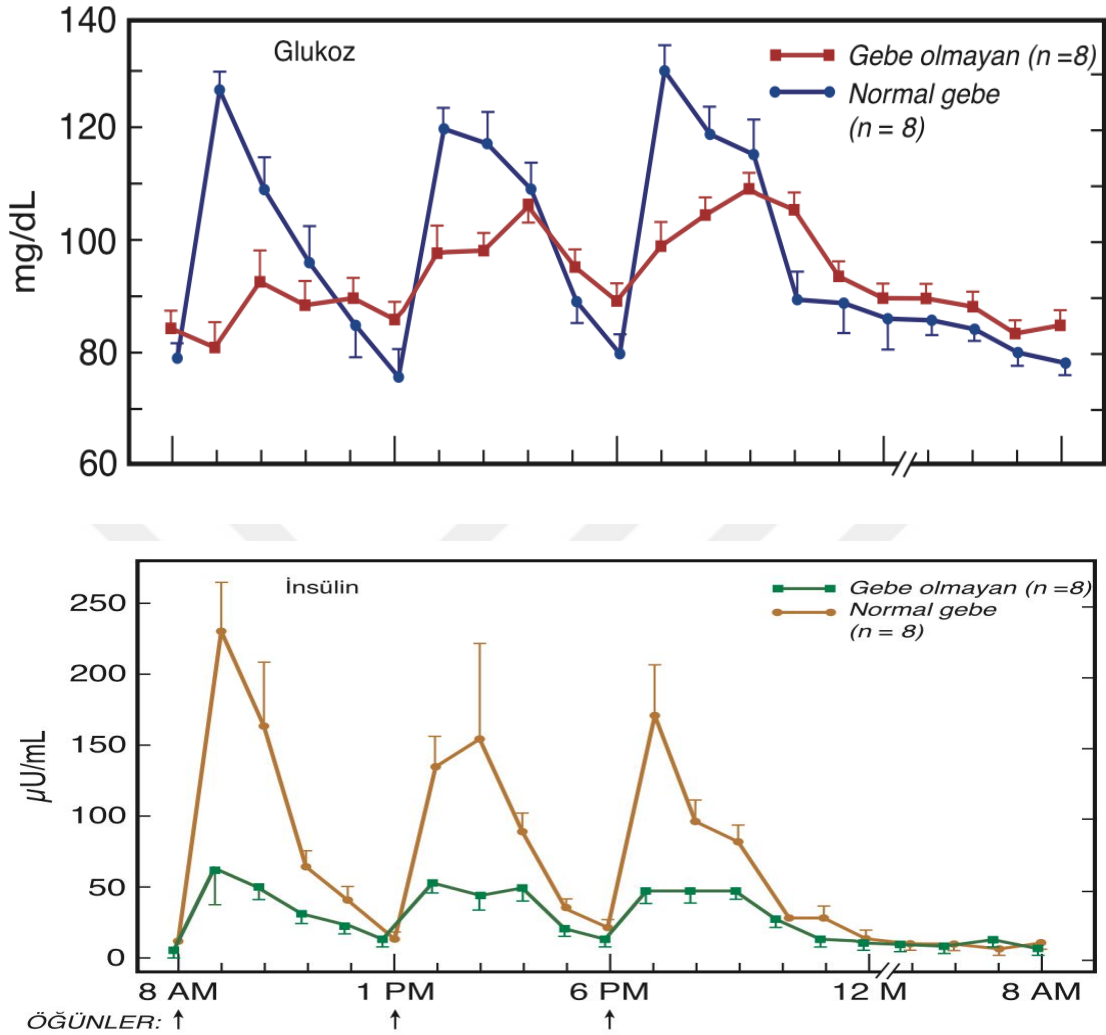
Ratlar üzerinde yapılan çalışmalarda Nesfatin-1/NUCB2 mRNA ve proteininin uterin glandlar ve endometriyum çevresindeki epitel hücrelerinden eksprese edildiği bildirilmiştir. (99). Bir başka çalışmada ise abortus modeli oluşturulan ratlardaki nesfatin-1/NUCB2 ekspresyonunun, gebeliği devam eden ratlara kıyasla arttığı bildirilmiştir (100). Ayrıca ratlarda gebelik ilerledikçe uterin nesfatin-1 ekspresyon düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (101). Bu çalışmalara bakarak Nesfatin-1 düzeyleri yükseldikçe abort oranlarının arttığı düşünülmektedir.

PKOS'lu hastalarda infertilitenin temel nedenleri oligoovulasyon veya anovulasyon olmasına rağmen, endometrial reseptivitenin azalmasının PKOS hastalarında düşük gebelik oranı ve yüksek GK oranlarında da önemli bir rol oynayabileceği gösterilmiştir (102-104). Çalışmalar göstermiştir ki, PKOS'lu hastalarda başlıca endokrin değişikliklerden ikisi olarak kabul edilen İD ve hiperinsülinemi, hastaların endometriyal reseptivitesini çeşitli yollarla etkileyebilir ve ayrıca gebelikten sonra yetersiz implantasyon veya GK ile sonuçlanabilir (105-107). Son yıllarda, çok sayıda çalışma, PKOS'lu hastalarda dolaşımdaki irisin düzeyinin değiştiğini göstermiştir (108,109). Bununla birlikte, son yapılan çalışmalarda overyan ve endometriyal İD'nin de var olduğu gösterilmiştir (110). Bir dizi çalışma; endometrial glikoz transporter 4 (Glut4), IRS-1 ve IRS-2 dahil olmak üzere insülin sinyal yolağı moleküllerinin ekspresyonunun İD mevcut PKOS hastalarında azaldığını göstermiştir (111). Bunun sonucunda endometriyal glukoz kullanımının bozulmasıyla, endometriyal desidualizasyon bozukluklarına yol açtığı ve böylece azalmış endometriyal reseptiviteye neden olduğu bildirilmiştir (112). İrisin düzeylerindeki düşüklük sonucunda ortaya çıkan İD'ne bağlı olarak endometriyal reseptivitenin bozulabileceği düşünülmektedir.

Epidermal growth factor domain-specific O-linked GlcNAc transferase (EOGT)'ın up regülasyonunun, normal desidual fonksiyon için kritik bir önem taşıdığı gösterilmiştir (113). ENCHO majör EOGT'ye cevap veren bir gen olarak tanımlanmıştır (113). Obezitenin endometriyumdaki EOGT-adropin aksını bozarak, metabolik bozukluklara plasental vasküler patolojilere ve olumsuz gebelik sonuçlarına yol açtığı bildirilmiştir (113).

Gebelikte anneden gelişen fetus ve plasentaya devamlı glukoz formunda bir enerji transportunun devamını sağlamak için karbonhidrat metabolizmasında önemli değişiklikler meydana gelmektedir. Hafif açlık hipoglisemisi, postprandiyal hiperglisemi ve hiperinsülinemi ile karakterizedir (Şekil 4,5). Buradaki hiperinsülinemiye rağmen hiperglisemi görülmesinin nedeni periferik İD'dir. İlk 3 ayda İD nadiren görülürken son 3 ayda en yüksek noktasındadır (114-115). Son trimestırda başta iskelet kası olmak üzere insülin duyarlılığında 50%-80% azalma görölmektedir (116). İD'ne neden olan mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. Plasental laktojen hormonu (hPL) lipolitik ve antiinsülin etkilere sahiptir. hPL'nin plasentayla doğru orantılı olarak gebelik ilerledikçe dolaşımdaki miktarları artmaktadır. Bunun dışında östrojen, progesteron, prolaktin ve kortizolde bu etkinin meydana gelmesinde katkıda bulunmaktadırlar. Plasentadan glukozun geçişi enerji bağımsız kolaylaştırılmış difüzyonla meydana gelmektedir (117). Bu nedenle fetusa gerekli glukoz transportunun devam edebilmesi için postprandiyal bir hiperglisemi ve bunun içinde periferik bir İD gerekmektedir.

Şekil 4-5. Normal bir geç dönem gebelikte plazma glukoz ve insülin düzeylerinin diurnal değişimleri



Katılımcılar arasında gebelerde irisin (ortanca 827.9'a karşı 832.7, $P < 0.001$) ve adropin (ortanca 1511'a karşı 1924, $P < 0.001$) düzeyi anlamlı şekilde düşük saptanırken, preptin (ortanca 10.9'a karşı 8.9, $P < 0.001$) ve nesfatin-1 düzeyi (ortanca 7855'e karşı 5879, $P < 0.001$) anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır. İrisin ve adropinin insülin duyarlılığını arttırıcı etkileri nedeniyle, insüline yanıt olarak daha düşük glukoz değerleri gözükülebilmektedir. Fetusa glukoz transportu için maternal kanda daha yüksek glukoz değerlerine ihtiyaç duyulması nedeniyle irisin ve adropinin gebelerde daha düşük çıktığı düşünülmektedir. Maternal kanda daha yüksek glukoz düzeylerini sağlamak için gebelerde İD bulunmaktadır. Bunun sonucunda daha fazla sentezlenen insülin nedeniyle nesfatin-1 ve preptin değerlerinin çalışmamızda olduğu gibi daha yüksek olması beklenmektedir.

TGK öyküsü olmayanlarda beklenildiği gibi parite ve yaşayan sayısı, TGK olan grupta ise abortus ve parite sayılarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Normalde yaşla birlikte TGK'larının artması nedeniyle TGK hikayesi olan grubun yaş ortalamasının daha yüksek olması beklenirken, grupların yaş ortalaması arasında istatistiksel bir fark izlenmemiştir ($p=0.741$).

Obezitenin toplumda görülme sıklığının artmasıyla birlikte gebelik üzerine olan etkileri zaman içerisinde daha sık gözükmemektedir. Obezite ve GK arasındaki ilişki net olarak bilinmesine rağmen (118), obezite TGK arasındaki ilişki o kadar net değildir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda normal kilolu kadınlara kıyasla obez kadınlarda TGK riskinin 10 kat artış gösterdiği bildirilmiştir (119). Daha önce yapılan 16 çalışmanın meta-analizinde araştırmacılar, gebe kalma yöntemine (IVF veya normal) bakılmaksızın, GK ve obezite arasında önemli bir ilişki bulmuşlardır (118). Bu meta-analizde obez kadınlarda TGK için pooled OR'si 1.67 (95% CI 1.25–2.25) bulunmuştur. TGK ve obezite arasındaki ilişki obeziteye eşlik eden endokrin bozuklukların varlığıyla açıklanabilmektedir; PKOS, diyabet ve tiroid hastalığı TGK'nın risk faktörleri arasında yer almaktadır (120). Literatürde obezite ve TGK arasındaki ilişkiyi immünolojik faktörlerle açıklayan çalışmalar da yer almaktadır (121). Obezlerde artmış interlökin-6 ve C reaktif protein (CRP) seviyeleri nedeniyle, obezitenin TGK'na neden olabileceği düşünülmektedir (122-124). VKİ yüksek olan kadınlarda kilo kaybının, anovuluar obez kadınlarda azalmış GK oranı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir ,ancak TGK oranlarını azalttığına dair bir çalışma bulunmamaktadır (125). Çalışmamızda TGK öyküsü olan katılımcılarda VKİ'nin, TGK öyküsü olmayan gruba göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. VKİ'deki artışın TGK'na obezitede ki artışa bağlı olarak, bunun sonucunda eşlik eden endokrin hastalıklar ve immünolojik faktörler üzerinden neden olduğu düşünülürken, bir başka nedende İD'deki artış olduğu düşünülmektedir.

Yunhui Wang ve ark. çalışmasında TGK yaşayan hastalar TGK yaşamayanlarla karşılaştırılmış ve İD'nin istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (126). Başka bir çalışma da ise yardımcı üreme teknikleri kullanılan 107 hastayı içeren bir kohort çalışmasında, İD'nin PKOS ve obeziteden bağımsız olarak spontan düşük için bir risk faktörü olabileceğini bildirmişlerdir (127). Son zamanlarda yapılan çalışmalar PKOS veya İD olan hastalarda metformin gibi insülin duyarlılaştırıcı ilaçların kullanımının düşük yapma oranını önemli ölçüde azaltabileceğini göstermiştir (128). Başka bir çalışmada ise gebelik sırasında metformin alırken gebe kalan ve metformin kullanımına devam eden 120 hasta ve

gebe kalma sırasında veya gebelik sırasında metformin kullanımını bırakan 80 kadını incelemiş ve gebeliğin erken dönemlerinde düşük yapma oranları deney ve kontrol gruplarında sırasıyla 11.65% ve 36.3% olarak bildirilmiştir (129). Jakubowicz ve ark. hiperinsülineminin gebeliğin erken evresinde insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1 (IGFBP-1) ve glikodelin konsantrasyonlarının azalmasına yol açarak düşük olasılığını artırdığını öne sürmüşlerdir (130). Hiperinsülineminin, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAİ-1) düzeyini artırabileceği, villöz trombozu indükleyebileceği ve böylece plasentaya kan akışını bozarak GK ile sonuçlanabileceğini bildiren çalışmalarda bulunmaktadır (131). İrisin ve adropin düzeylerinin düşük olması, preptin ve nesfatin-1 değerlerinin yüksek olması İD'nin artışıyla paralellik göstermektedir, bu nedenle çalışmamızda TGK yaşayan kadınlarda irisin (ortanca 876.4'e karşı 896.5, $P = 0.016$) ve adropin (ortanca 1724'e karşı 1924, $P < 0.001$) düzeyi anlamlı şekilde düşük, preptin (ortanca 14.9'a karşı 8.9, $P < 0.001$) ve nesfatin-1 düzeyi (ortanca 6986'ya karşı 5865, $P < 0.001$) anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır (Tablo 4, Şekil 2).

Tekrarlayan gebelik kaybıyla ilişki nedensel ve karıştırıcı etkilerin belirlenmesi için yapılan regresyon analizi sonucunda VKİ'nin adropin, nesfatin-1, preptin düzeylerine ve TGK'ya anlamlı düzeyde etki ettiği saptandı ($P < 0.001$), (Tablo 5). Gebeliğin varlığı irisin, adropin, nesfatin-1 ve preptin düzeylerini anlamlı bir şekilde etki ederken ($P < 0.001$) TGK üzerine etkisi izlenmedi ($P > 0.05$). Gebeliğin etkisinin dışlanması için analiz örnekleme sırasında gebe olan ve olmayan katılımcılar arasında tabakalandırılarak yapıldı (Şekil 3).

TGK olan ve olmayan katılımcıların VKİ için eğilim skoru eşleştirmesi yapılması sonrasında gruplar karşılaştırıldı (Tablo 6). İrisin ($P = 0.034$) ve adropin ($P < 0.0001$) düzeyleri TGK olmayan ve örnekleme sırasında gebe olan olgularda anlamlı şekilde yüksek izlenirken, nesfatin-1 ($P < 0.0001$) ve preptin ($P < 0.0001$) düzeyleri TGK olmayan ve örnekleme sırasında gebe olan olgularda anlamlı şekilde düşük izlendi. Analiz örnekleme sırasında gebe olmayan katılımcılarda tekrarlandığında; benzer bulgular irisin, adropin, nesfatin-1 ve preptin düzeyleri için $P < 0.0001$ anlamlılık düzeyinde tekrarlandığı izlendi (Tablo 6). Sonuç olarak VKİ'nden bağımsız TGK kaybı olgularında irisin ve adropin TGK kaybı öyküsü olmayan gruba göre istatistiksel olarak daha düşük bulunurken nesfatin-1 ve preptin değerleri daha yüksek izlendi. İrisin, adropin düşüklüğünün ve nesfatin-1, preptin yükseliğinin İD artışına neden olduğu ve bunun sonucunda endometriyal reseptivitenin bozularak veya vasküler patolojilere yol açarak GK'larına neden olduğu düşünülmektedir

İrisin ilk kez 2012 yılında yeni keşfedilmiş ve beyaz yağ dokusunun kahverengi yağ dokusuna dönüşümünü uyaran bir moleküldür. Bu özelliği ile irisinin tip 2 diyabet, metabolik sendrom, kardiyovasküler hastalıklar ve osteoporoz gibi birçok kronik hastalıkla ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda irisinin gebelikte ortaya çıkan ve artan oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin olabileceği belirtilmiştir (132). Bu nedenle implantasyon döneminde ve gebeliğin devamında artan oksidatif stres ortamında gebeliğin devamı için irisin seviyelerinin önemli olabileceği hipotezi ortaya atılmıştır. Çalışmamızda TGK öyküsü olanlarda irisin seviyelerinin daha düşük görülmesi de bu hipotezi desteklemektedir.

Adropin ve preptin molekülleri yağ metabolizmasında, glukoz homeostazında ve materno-fetal etkileşimde önemli yer tutan hormonlardır. Dolaylı yada direkt olarak bu metabolizma üzerinde etkileriyle İD üzerinde değişiklikler oluşturmaktadırlar. Bu nedenle bu hormonların İD üzerindeki etkileri nedeniyle, endometriyal reseptiviteyi bozarak TGK'ları üzerinde etkileri olabileceği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada İD ile selüler immunitenin bozulmasının(lenfosit oranlarında) gebelik kaybı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (133).İmmün sistem, gebeliğin oluşumu ve sürdürülmesi sırasında, uterus ve konseptus arasında iyi organize edilmiş etkileşimler gerektiren bir dizi karmaşık süreci içeren hayati işlevlere sahiptir. Konseptusun, maternal bağışıklık sisteminin reddinden korunması ve gebelik sırasında bağışıklık toleransının sürdürülmesinden çeşitli mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır. Maternal bağışıklık sistemi tarafından genetik olarak uyumsuz fetusun toleransı, birçok sitokinin etkileşimine bağlı olduğuna inanılmaktadır, her şeyden önce aktif maternal lenfositlerin apoptozu tetiklenmektedir (134-135). Bu immün toleranstaki eksiklikler nedeniyle GK'na neden olabilir. Gebelik sırasında T hücreleri tarafından üretilen sitokinlerdeki değişiklikler, maternal-fetal immüno-regülasyon ve immüno-stimülasyonda önemli bir rol oynamaktadırlar. T helper hücrelerinin yeni bir alt kümesi olan Th17 hücreleri, ayırt edici sitokin IL-17A'yı üretir ve inflamasyonun indüksiyonunda ve otoimmün hastalıkların patogeneğinde ve allojenik organ reddinde kritik bir rol oynamaktadır (136). Gebelik ve abort oluşumu implantasyon bölgesinde farklı immunolojik hücrelerin ve leptin, grelin , nesfatin 1 gibi gebelik ile ilişkili hormonların etkili olduğu kompleks bir mekanizmaya bağlıdır. Nesfatin 1 ve onun bağlandığı bölgenin reproduktif tract organlarında eksprese edildiği gösterilmiştir (137).Ayrıca yakın zamandaki bir çalışmada ratlarda gebeliğin ilerlemesi sırasında nesfatin-1 ekspresyon düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı bildirilmiş, bu da nesfatin-1'in gebelik ve fetal gelişim sırasında önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Nesfatin-1/NUCB2, mRNA ve proteininin gebelik sırasında hem implantasyon bölgelerinde hem de abortus bölgelerinde eksprese edildiği

gösterilmiştir (138). Uterus içindeki implantasyon ve abortus bölgelerinde nesfatin-1 / NUCB2 ekspresyonunun Th17 hücre birikimi ve aktivasyonunda rol oynayabileceği öne sürülmektedir. Bu sonuçlar, uterusta lokal olarak eksprese edilen nesfatin-1'in implantasyon ve abort bölgelerinde Th17 hücre aktivasyonunda rol oynayabileceğini göstermektedir (138). Nesfatin-1 yüksekliği nedeniyle artmış Th17 hücre aktivasyonuna bağlı GK'larında artış olabileceği düşünülmektedir. Bu durum çalışmamızda TKG'larında artmış nesfatin-1 seviyelerini desteklemektedir.

6. Sonuç

Çalışmamız; TKG öyküsü olan kadınlarda, böyle bir öyküsü olmayanlarla karşılaştırıldığında adropin ve irisin hormon düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük olduğunu gösterirken, nesfatin-1 ve preptinin düzeylerinin daha yüksek olduğunu göstermiştir. Gebelik oluşumu implantasyon bölgesinde farklı moleküler ve immunolojik hücrelerin, gebelik ile ilişkili hormonların denge içinde çalıştığı kompleks bir mekanizmadır. Bu mekanizmanın herhangi bir bileşeninde oluşacak bozukluk endometrial reseptiviteyi bozarak implantasyon başarısızlığına, materno-fetal etkileşimi bozarak abortusa sebep olabilir. İrisin, adropin, preptin ve nesfatin-1 hormonlarının metabolizma üzerindeki direkt ya da indirekt etkileriyle ID'ni, moleküler ve immünolojik basamakları bozarak endometriyal reseptiviteyi etkilediği, vasküler patolojiler oluşturabileceği ve böylece TKG'larına neden olabileceğini düşünmekteyiz. Nesfatin-1, irisin, adropin ve preptin hormonları ve GK'ları arasındaki ilişkiyi daha net ortaya koyabilmek için karıştırıcı faktörlerin etkisinin olmadığı, randomize kontrollü çalışmalara gerek duyulmaktadır.

7. Referanslar

1. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address: asrm@asrm.org. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril* 2020; 113:533.
2. Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2006; 21:2216.
3. Greentop Guideline 17. Recurrent Miscarriage, investigation and treatment of couples. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, 2011.
4. Kolte AM, van Oppenraaij RH, Quenby S, et al. Non-visualized pregnancy losses are prognostically important for unexplained recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2014; 29:931.
5. ESHRE Guideline Group on RPL, Bender Atik R, Christiansen OB, et al. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod Open* 2018; 2018:hoy004.
6. Paukku M, Tulppala M, Puolakkainen M, et al. Lack of association between serum antibodies to *Chlamydia trachomatis* and a history of recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 1999; 72:427.
7. Salat-Baroux J. [Recurrent spontaneous abortions]. *Reprod Nutr Dev* 1988; 28:1555.
8. Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, et al. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1988; 319:189.
9. Abramson J, Stagnaro-Green A. Thyroid antibodies and fetal loss: an evolving story. *Thyroid* 2001; 11:57.
10. Stirrat GM. Recurrent miscarriage. *Lancet* 1990; 336:673.
11. Wong LF, Schliep KC, Silver RM, et al. The effect of a very short interpregnancy interval and pregnancy outcomes following a previous pregnancy loss. *Am J Obstet Gynecol* 2015; 212:375.e1.
12. Roberts CL, Algert CS, Ford JB, et al. Association between interpregnancy interval and the risk of recurrent loss after a midtrimester loss. *Hum Reprod* 2016; 31:2834.
13. Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, et al. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* 2000; 320:1708.
14. Clifford K, Rai R, Regan L. Future pregnancy outcome in unexplained recurrent first trimester miscarriage. *Hum Reprod* 1997; 12:387.

15. Hill JA. Recurrent pregnancy loss. In: Kistner's Gynecology and Women's Health, 7th ed, Ryan KJ, Berkowitz RS, Barbieri RL, Dunaif A (Eds), Mosby, St. Louis 1999. p.396.
16. Ación P, Ación M, Sánchez-Ferrer M. Complex malformations of the female genital tract. New types and revision of classification. *Hum Reprod* 2004; 19:2377.
17. Devi Wold AS, Pham N, Arici A. Anatomic factors in recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2006; 24:25.
18. Homer HA, Li TC, Cooke ID. The septate uterus: a review of management and reproductive outcome. *Fertil Steril* 2000; 73:1.
19. Proctor JA, Haney AF. Recurrent first trimester pregnancy loss is associated with uterine septum but not with bicornuate uterus. *Fertil Steril* 2003; 80:1212.
20. Buttram VC Jr, Gibbons WE. Müllerian anomalies: a proposed classification. (An analysis of 144 cases). *Fertil Steril* 1979; 32:40.
21. Simpson JL. Causes of fetal wastage. *Clin Obstet Gynecol* 2007; 50:10.
22. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Practice Bulletin No.142: Cerclage for the management of cervical insufficiency. *Obstet Gynecol* 2014; 123:372. Reaffirmed 2019.
23. Paulson RJ. Hormonal induction of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2011; 96:530.
24. Lessey BA. Assessment of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2011; 96:522.
25. Kallen CB, Arici A. Immune testing in fertility practice: truth or deception? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003; 15:225.
26. Reindollar RH. Contemporary issues for spontaneous abortion. Does recurrent abortion exist? *Obstet Gynecol Clin North Am* 2000; 27:541.
27. Hill JA, Choi BC. Maternal immunological aspects of pregnancy success and failure. *J Reprod Fertil Suppl* 2000; 55:91.
28. Miller E, Hare JW, Cloherty JP, et al. Elevated maternal hemoglobin A1c in early pregnancy and major congenital anomalies in infants of diabetic mothers. *N Engl J Med* 1981; 304:1331.
29. Mills JL, Simpson JL, Driscoll SG, et al. Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin-dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. *N Engl J Med* 1988; 319:1617.
30. Glueck CJ, Wang P, Goldenberg N, Sieve-Smith L. Pregnancy outcomes among women with polycystic ovary syndrome treated with metformin. *Hum Reprod* 2002; 17:2858.
31. Craig LB, Ke RW, Kutteh WH. Increased prevalence of insulin resistance in women with a history of recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2002; 78:487.

32. Glueck CJ, Phillips H, Cameron D, et al. Continuing metformin throughout pregnancy in women with polycystic ovary syndrome appears to safely reduce first-trimester spontaneous abortion: a pilot study. *Fertil Steril* 2001; 75:46.
33. Jakubowicz DJ, Iuorno MJ, Jakubowicz S, et al. Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:524.
34. Stagnaro-Green A, Glinoe D. Thyroid autoimmunity and the risk of miscarriage. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2004; 18:167.
35. Bellver J, Soares SR, Alvarez C, et al. The role of thrombophilia and thyroid autoimmunity in unexplained infertility, implantation failure and recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2008; 23:278.
36. Anselmo J, Cao D, Karrison T, et al. Fetal loss associated with excess thyroid hormone exposure. *JAMA* 2004; 292:691.
37. Hirahara F, Andoh N, Sawai K, et al. Hyperprolactinemic recurrent miscarriage and results of randomized bromocriptine treatment trials. *Fertil Steril* 1998; 70:246.
38. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Current clinical irrelevance of luteal phase deficiency: a committee opinion. *Fertil Steril* 2015; 103:e27.
39. Regan L, Rai R. Epidemiology and the medical causes of miscarriage. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14:839.
40. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod* 2002; 17:446.
41. Sierra S, Stephenson M. Genetics of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2006; 24:17.
42. Toncheva D. Fragile sites and spontaneous abortions. *Genet Couns* 1991; 2:205.
43. Christiansen OB, Mathiesen O, Lauritsen JG, Grunnet N. Idiopathic recurrent spontaneous abortion. Evidence of a familial predisposition. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1990; 69:597.
44. Bianco K, Caughey AB, Shaffer BL, et al. History of miscarriage and increased incidence of fetal aneuploidy in subsequent pregnancy. *Obstet Gynecol* 2006; 107:1098.
45. Hassold TJ. A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions. *Am J Hum Genet* 1980; 32:723.
46. Rubio C, Simón C, Vidal F, et al. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* 2003; 18:182.
47. Franssen MT, Korevaar JC, Leschot NJ, et al. Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *BMJ* 2005; 331:137.

48. Goddijn M, Joosten JH, Knecht AC, et al. Clinical relevance of diagnosing structural chromosome abnormalities in couples with repeated miscarriage. *Hum Reprod* 2004; 19:1013.
49. Sotiriadis A, Makriganakis A, Stefos T, et al. Fibrinolytic defects and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2007; 109:1146.
50. Laude I, Rongières-Bertrand C, Boyer-Neumann C, et al. Circulating procoagulant microparticles in women with unexplained pregnancy loss: a new insight. *Thromb Haemost* 2001; 85:18.
51. Tiscia G, Colaizzo D, Chinni E, et al. Haplotype M2 in the annexin A5 (ANXA5) gene and the occurrence of obstetric complications. *Thromb Haemost* 2009; 102:309.
52. Bogdanova N, Horst J, Chlystun M, et al. A common haplotype of the annexin A5 (ANXA5) gene promoter is associated with recurrent pregnancy loss. *Hum Mol Genet* 2007; 16:573.
53. Miyamura H, Nishizawa H, Ota S, et al. Polymorphisms in the annexin A5 gene promoter in Japanese women with recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 2011; 17:447.
54. Rogenhofner N, Engels L, Bogdanova N, et al. Paternal and maternal carriage of the annexin A5 M2 haplotype are equal risk factors for recurrent pregnancy loss: a pilot study. *Fertil Steril* 2012; 98:383.
55. Karata S, Aydin Y, Ocer F, et al. Hereditary thrombophilia, anti-beta2 glycoprotein 1 IgM, and anti-annexin V antibodies in recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2012; 67:251.
56. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG practice bulletin. Management of recurrent pregnancy loss. Number 24, February 2001. (Replaces Technical Bulletin Number 212, September 1995). American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 78:179.
57. Savitz DA, Sonnenfeld NL, Olshan AF. Review of epidemiologic studies of paternal occupational exposure and spontaneous abortion. *Am J Ind Med* 1994; 25:361.
58. Christiansen OB, Nybo Andersen AM, Bosch E, et al. Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2005; 83:821.
59. Bellver J, Rossal LP, Bosch E, et al. Obesity and the risk of spontaneous abortion after oocyte donation. *Fertil Steril* 2003; 79:1136.
60. Plouffe L Jr, White EW, Tho SP, et al. Etiologic factors of recurrent abortion and subsequent reproductive performance of couples: have we made any progress in the past 10 years? *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:313.

61. Gopalkrishnan K, Padwal V, Meherji PK, et al. Poor quality of sperm as it affects repeated early pregnancy loss. *Arch Androl* 2000; 45:111.
62. Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, et al. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 2003; 101:1229.
63. Zidi-Jrah I, Hajlaoui A, Mougou-Zerelli S, et al. Relationship between sperm aneuploidy, sperm DNA integrity, chromatin packaging, traditional semen parameters, and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2016; 105:58.
64. Trout SW, Seifer DB. Do women with unexplained recurrent pregnancy loss have higher day 3 serum FSH and estradiol values? *Fertil Steril* 2000; 74:335.
65. Bustos D, Moret A, Tambutti M, et al. Autoantibodies in Argentine women with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55:201.
66. Bradley RJ, Rosen MP. Subfertility and gastrointestinal disease: 'unexplained' is often undiagnosed. *Obstet Gynecol Surv* 2004; 59:108.
67. Stazi AV, Mantovani A. (Celiac disease. Risk factors for women in reproductive age). *Minerva Ginecol* 2000; 52:189.
68. K Ganesh Kumar, James L Trevaskis, Daniel D Lam et. al, Identification of adropin as a secreted factor linking dietary macronutrient intake with energy homeostasis and lipid metabolism 2008 Dec;8(6):468-81. doi: 10.1016/j.cmet.2008.10.011.
69. Suleyman Aydin, Tuncay Kuloglu, Suna Aydin et. al, Expression of adropin in rat brain, cerebellum, kidneys, heart, liver, and pancreas in streptozotocin-induced diabetes. 2013 Aug;380(1-2):73-81. doi: 10.1007/s11010-013-1660-4.Epub 2013 Apr 26.
70. Andrew A. Butler, Charmaine S. Tam, Kimber L. Stanhope et. al, Low Circulating Adropin Concentrations with Obesity and Aging Correlate with Risk Factors for Metabolic Disease and Increase after Gastric Bypass Surgery in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 97, Issue 10, 1 October 2012, Pages 3783–3791, <https://doi.org/10.1210/jc.2012-2194>
71. Hong Y, Xie QX, Chen CY et. al, Insulin resistance in first-trimester pregnant women with pre-pregnant glucose tolerance and history of recurrent spontaneous abortion. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 01 Jan 2013, 27(1):225-231
72. Joung KE, Park KH, Filippaios A, Dincer F, Christou H, Mantzoros CS et. al, Cord blood irisin levels are positively correlated with birth weight in newborn infants. *Metabolism* 2015; 64:1507–14

73. Arturo Roca-Rivada, Cecilia Castelao, Lucía L Senin et. al, FNDC5/irisin is not only a myokine but also an adipokine. 2013;11;8(4):e60563. doi:10.1371/journal.pone.0060563.
74. Pontus Boström, Jun Wu, Mark P Jedrychowski, A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012;11;481(7382):463-8. doi: 10.1038/nature10777.
75. Rajni Dawar Mahajan and Surajeet Kumar Patra. Irisin, a Novel Myokine Responsible for Exercise Induced Browning of White Adipose Tissue. *Indian J Clin Biochem.* 2013; 28(1): 102–103. doi: 10.1007/s12291-012-0255-2
76. Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, et. al. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology* 2009;150:662–71.
77. Algul S, Ozkan Y, Ozcelik O, Serum Nesfatin-1 levels in patients with different glucose tolerance. *Physiol. Res.* 65;979-985, 2016 <https://doi.org/10.33549/physiolres.933186>
78. David García-Galiano, Manuel Tena-Sempere. Emerging roles of NUCB2/nesfatin-1 in the metabolic control of reproduction. 2013;19(39):6966-72.
79. David García-Galiano¹, Victor M Navarro, Francisco Gaytan, *J Mol Endocrinol.* Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. 2010 Nov;45(5):281-90. doi: 10.1677/JME-10-0059.Epub 2010 Aug 3.
80. Esra Nur Ademoglu, Suheyla Gorar, Muge Keskin, et. al, Serum nesfatin-1 levels are decreased in pregnant women newly diagnosed with gestational diabetes. *Arch Endocrinol Metab.* Sept-Oct 2017;61(5):455-459. doi: 10.1590/2359-3997000000288.Epub 2017 Sep 18.
81. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 2006;443:709–12.
82. Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, et al. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology* 2009;150:662–71.
83. Krew MA, Kehl RJ, Thomas A, Catalano P. Relation of amniotic fluid C-peptide levels to neonatal body composition. *Am J Obstet Gynecol* 1994;84:96–100.
84. K Ganesh Kumar, Jingying Zhang, Su Gao, et al. Adropin Deficiency Is Associated With Increased Adiposity and Insulin Resistance Obesity (Silver Spring) 2012 Jul;20(7):1394-402.
85. Cinti S. Between brown and white: novel aspects of adipocyte differentiation. *Ann Med.* 2011;43:104–115.

86. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. 2007;131:242–256.
87. Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, et al. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest*. 2013;123:215–223.
88. Tatemoto K, Efendic S, Mutt V, Makk G, Feitner G and Barachas J. Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature (London)*1986;324(6096): 476–8.
89. Hutton JC, Peshavaria M, Johnston CF, Ravazzola M, Orci L. Immunolocalization of betagranin: a Chromogranin A-related protein of the pancreatic B-cell. *Endocrinology*. 1988;122(3):101420.
90. Lewitt MS, Dent MS, Hall K. The insulin-like growth factor system in obesity, insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Med*. 2014;3(4):1561–74.
91. Buchanan CM, Peng Z, Cefre A. Preptin analogues: chemical synthesis, secondary structure and biological studies. *Chem Biol Drug Des* 2013;82(4):429-37.
92. Buchanan CM, Phillips AR, Cooper GJ. Preptin derived from proinsulin-like growth factor II (proIGF-II) is secreted from pancreatic islet beta-cells and enhances insulin secretion. *Biochem J* 2001;360(2):431–9.
93. Cooper G, Willis A, Clark A, Turner R, Sim R and Reid K. Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997;84(23):8628–32.
94. Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, et al. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology* 2009;150:662–71.
95. Nardo LG. Human embryo implantation failure and recurrent miscarriage: basic science and clinical. *Reprod Biomed Online* 2006;13:11-2.
96. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Updnte* 2006;12:731-46.
97. Giudice LC. Potential biochemical markers of uterine receptivity. *Hum Reprod* 1999;14:3-16.
98. Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL. Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod* 2002;17:213-8.
99. Jinhee Kim, Yiwa Chung, Heejeong Kim, et. al, The Tissue Distribution of Nesfatin-1/NUCB2 in Mouse *Dev Reprod*. 2014 Dec; 18(4): 301–309
100. Yiwa Chung, Jinhee Kim, Eunji Im, et al. Progesterone and 17 β -estradiol regulate expression of nesfatin-1/NUCB2 in mouse pituitary gland. *Peptides* 63 (2015) 4–9.

101. María F. Garcés, Natalia E. Poveda, Elizabeth Sanchez et. al, Regulation of Nucleobinding 2/Nesfatin-1 throughout rat pregnancy *Physiology & Behavior* 133 (2014) 216–222.
102. Arredondo F, Noble LS. Endocrinology of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med.* 2006;24:33–39.
103. Li SY, Song Z, Song MJ, et al. Impaired receptivity and decidualization in DHEA-induced PCOS mice. *Sci Rep.* 2016;6:38134.
104. Sadishkumar K, Sahoo JP, Sathyapalan T. Pregnancy in polycystic ovary syndrome. *Indian J Endocr Metab.* 2013;17:37–43.
105. Wang CY, Ding C. Research progress of insulin resistance and endometrial receptivity in patients with polycystic ovary syndrome. *Zhejiang Integr Med* 2012;22:155–158.
106. Lathi RB, Hess AP, Tulac S, et al. Dose-dependent insulin regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 in human endometrial stromal cells is mediated by distinct signaling pathways. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:1599–1606.
107. Li R, Wu J, He J, et al. Mice endometrium receptivity in early pregnancy is impaired by maternal hyperinsulinemia. *Mol Med Rep.* 2017;15:2503–2510.
108. Li M, Yang M, Zhou X, et al. Elevated circulating levels of irisin and the effect of metformin treatment in women with polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab.* 2015;100:3219.
109. Chang CL, Huang SY, Soong YK, et al. Circulating irisin and glucose-dependent insulinotropic peptide are associated with the development of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99:E2539–E2548.
110. Carvajal R, Rosas C, Kohan K, et al. Metformin augments the levels of molecules that regulate the expression of the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the endometria of hyperinsulinemic PCOS patients. *Hum Reprod.* 2013;28:2235–2244.
111. Li X, Cui P, Jiang HY, et al. Reversing the reduced level of endometrial GLUT4 expression in polycystic ovary syndrome: a mechanistic study of metformin action. *Am J Transl Res.* 2015;7:574–586.
112. Fornes R, Ormazabal P, Rosas C, et al. Changes in the expression of insulin signaling pathway molecules in endometria from polycystic ovary syndrome women with or without hyperinsulinemia. *Mol Med.* 2010;16:129–136.
113. Joanne Muter, Mohammad T. Alam, The Glycosyltransferase EOGT Regulates Adropin Expression in Decidualizing Human Endometrium *Endocrinology* 159: 994–1004, (2018)
114. Moller DE, Flier JS. Insulin resistance-mechanisms, syndromes, and implications. *N Engl J Med* 1991; 325:938.

115. P M Catalano, E D Tyzbir, N M Roman, S B Amini, E A Sims, Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 1991 Dec;165(6 Pt 1):1667-72.
116. Fisher, P.M., Sutherland, H.W. & Bewsher, P.D. The insulin response to glucose infusion in normal human pregnancy. *Diabetologia* 19, 15–20 (1980).
117. G I Bell, C F Burant, J Takeda, G W Gould. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem.* 1993 Sep 15;268(26):19161-4.
118. Metwally M, Ong KJ, Ledger WL, Li TC. Does high body mass index increase the risk of miscarriage after spontaneous and assisted conception? A meta-analysis of the evidence. *Fertil Steril* 2007.
119. Saleemah Abdul Majeed Omar, Alya Abdul-Rahman Sharef, Awara Ahmed Rashid. Does increased Body mass index increase the risk of recurrent pregnancy loss?. *World Family Medicine.* 2020; 18(3): 57-61
120. Weiss JL, Malone FD, Emig D, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, et al. Obesity, obstetric complications and cesarean delivery rate—a populationbased screening study. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:1091–7.
121. Cavalcante M B, Sarno M, Peixoto Alberto B, Júnior E A and Barini R. Obesity and recurrent miscarriage: A systematic review and meta-analysis. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2019.;45(1): 30–38.
122. Giannini DT, Kuschnir MCC, de Oliveira CL, Szklo M. Waist-to-height ratio as a predictor of C-reactive protein levels. *J Am Coll Nutr* 2017; 36: 624–630.
123. Klein S, Fontana L, Young VL et al. Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 2549–2557.
124. Sindhu S, Thomas R, Shihab P, Sriraman D, Behbehani K, Ahmad R. Obesity is a positive modulator of IL-6R and IL-6 expression in the subcutaneous adipose tissue: Significance for metabolic inflammation. *PLoS One* 2015; 10: e0133494.
125. Clark AM, Ledger W, Galletly C et al. Weight loss results insignificantly improvement in pregnancy and ovulation rates in anovulatory obese women. *Hum Reprod* 1995;10:2705e12.
126. Yunhui Wang, Huidan Zhao, Yan Li et al. Relationship between Recurrent Miscarriage and Insulin Resistance. *Gynecol Obstet Invest* 2011;72:245–251.
127. Li T, Huan S, Qun L, et al: Insulin resistance increases the risk of spontaneous abortion after assisted reproduction technology treatment. *J Clin Endocrin Metab* 2007;92:1430–1433.

128. Nawaz FH, Khalid R, Naru T, et al: Does continuous use of metformin throughout pregnancy improve pregnancy outcomes in women with polycystic ovarian syndrome? *J Obstet Gynaecol Res* 2008;34:832–837.
129. Khattab S, Mohsen IA, Foutouh IA, et al: Metformin reduces abortion in pregnant women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2006;22:680–684.
130. Jakubowicz DJ, Essah PA, Seppala M, et al: Reduced serum glycodelin and insulin-like growth factor-binding protein-1 in women with polycystic ovary syndrome during first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:833–839.
131. Glueck CJ, Sieve L, Zhu B, et al: Plasminogen activator inhibitor activity, 4G5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene and first-trimester miscarriage in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 2006;55:345–352.
132. Park KH, Zaichenko L, Brinkoetter M, Thakkar B, Sahin-Efe A, Joung KE, Tsoukas MA, Geladari EV, Huh JY, Dincer F, Davis CR, Crowell JA, Mantzoros CS. Circulating irisin in relation to insulin resistance and the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:4899–4907.
133. Yan Y, Bao S, Sheng S, Wang L, Tu W. Insulin resistance in patients with recurrent pregnancy loss is associated with lymphocyte population aberration. *Syst Biol Reprod Med*. 2017 Dec;63(6):397-404. doi: 10.1080/19396368.2017.1378936. Epub 2017 Oct 31. PMID: 29087729.
134. Zenclussen AC, Schumacher A, Laura M, ZenclussenWafula P, Volk HD. Immunology of pregnancy: cellular mechanisms allowing fetal survival within the maternal uterus. *Expert Rev Mol Med*. 2007; 9 p. 1-14.
135. Makriagiannis A, Zoumakis E, Kalantaridou C, Coutifaris C, Margioris AN, Coukos G, Rice KC, Gravansi A, Chrousos GP. Corticotropinreleasing hormone promotes blastocytes implantation and early maternal tolerance. *Nat Immunol*. 2001; 18 p. 367-391.
136. Crome SQ, Wang AY, Levings MK. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol*. 2010; 159 p. 109-119.
137. Garces MF, Poveda NE, Sanchez E, Sanchez AY, Bravo SB, Vazquez MJ, Dieguez C, Nogueiras R, Caminos JE (2014) Regulation of NucB2/Nesfatin-1 throughout rat pregnancy. *Physiol Behav* 133:216-222
138. Chung Y, Kim H, Im E, Kim P, Yang H. Th 17 Cells and Nesfatin-1 are associated with Spontaneous Abortion in the CBA/j × DBA/2 Mouse Model. *Dev Reprod*. 2Dec;19(4):243-52. doi: 10.12717/DR.2015.19.4.243. PMID: 26973976; PMCID: PMC4786486.)

