

Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Trombofili Mutasyonları

Genetic Thrombophilic Defects in Women with Recurrent Fetal Loss

Dr. Hale ŞAMLI,^a
Dr. Necat İMİRZALIOĞLU,^a
Dr. Asuman ÖZGÖZ,^a
Dr. Güleğül KÖKEN,^b
Dr. Serdar CEYLANER,^c
Dr. Gülay CEYLANER^c

^aTıbbi Genetik AD,
^bKadın Hastalıkları ve Doğum AD,
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi, Afyonkarahisar
^cGenetik Bölümü,
Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim
ve Araştırma Hastanesi, Ankara

*Bu çalışma, European Human Genetics
Conference (31 Mayıs-3 Haziran 2008,
Barselona, İspanya)'da sunulmuştur.*

*Bu çalışma, Afyonkocatepe Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Vakfı Projesi olarak
desteklenmiştir.*

Geliş Tarihi/Received: 25.01.2009
Kabul Tarihi/Accepted: 23.06.2009

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Hale ŞAMLI
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi,
Tıbbi Genetik AD, Afyonkarahisar
TÜRKİYE/TURKEY
halesami@gmail.com

ÖZET Amaç: Koagülasyon sisteminde aksaklığa neden olan genetik kusurların tekrarlayan gebelik kayıplarındaki önemi son dönemde daha iyi anlaşılmıştır. Bunlar arasında en sık ilişkilendirilen; FV Leiden (G1691A), Protrombin (G20210A) ve MTHFR (C677T) gen mutasyonlarıdır. Biz bu çalışmada, FV Leiden, Protrombin ve MTHFR mutasyonlarının habitüel abortus (HA)'lu kadınlardaki sıklığını ve gebelik kayıplarıyla olan ilişkilerini ortaya koymayı amaçladık. **Gereç ve Yöntemler:** Bu çalışmada iki ve üzerinde gebelik kaybı olan 110 kadın ve hiç gebelik kaybı olmayan, sağlıklı çocuk sahibi olan 30 kadın koagülasyon sisteminin düzenlenmesinde çok önemli rolü olan, FV Leiden (G1691A), Protrombin (G20210A) ve MTHFR (C677T) mutasyon sıklığı açısından araştırılmıştır. Detaylı anamnez alınan, pedigreleri çizilen ve klinik olarak gebelik kaybını açıklayan bir neden olmayan olgulardan elde edilen DNA örneklerinde PCR-RFLP yöntemi ile mutasyon incelemesi yapılmıştır. **Bulgular:** FV Leiden (G1691A) mutasyonu HA grubunda %13.6, kontrol grubunda %6.7, Protrombin (G20210A) mutasyonu HA grubunda %6.4, kontrol grubunda %6.7, MTHFR (C677T) mutasyonu HA grubunda %55.5, kontrol grubunda %53.3 olguda tespit edilmiştir. Mutasyonların bulunma sıklığına bakıldığında HA ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. **Sonuç:** Gebelik kaybı riskinin, spesifik bir mutasyondan çok trombofili ile ilgili gen mutasyonlarının kombine birikimine bağlı olabileceği düşünülmüştür. HA'lı kadınlarda daha fazla trombofili ile ilgili gen mutasyonunun prevalansının araştırılması bu olguların değerlendirilmesinde daha anlamlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Habitüel abortus; trombofili

ABSTRACT Objective: Recently, the importance of the genetic defects causing deficiency in the coagulation system is better understood. Among these, the most frequently related ones are FV Leiden (G1691A), Prothrombin (G20210A) and MTHFR (C677T) gene mutations. In the current study, we objected to investigate the frequency of the FV Leiden, Prothrombin and the MTHFR mutations in women with habitual abortion (HA) and their relations with pregnancy losses. **Material and Methods:** In the current study, 110 women with two or more miscarriages and 30 women without miscarriage and with healthy children were investigated for the mutation frequencies of FV Leiden, Prothrombin and MTHFR that have very important roles in the regulation of the coagulation system. Mutation investigation was performed by PCR-RFLP method in DNA samples obtained from the cases with detailed anamnesis and without a reason of miscarriage that can be explained clinically. **Results:** FV Leiden mutation was detected to be 13.6 % in the HA and 6.7% in the control group, Prothrombin mutation was detected to be 6.4% in the HA and 6.7% in the control group, MTHFR mutation was detected to be 55.5% in the HA and 53.3% in the control group. When the mutation existence frequencies were evaluated, no statistically significant difference was detected between the HA and the control group. **Conclusion:** The risk of pregnancy loss was thought to be related to the combined augmentation of the thrombophilic mutations rather than a specific mutation. Investigating the prevalence of more thrombophilic mutations in women with HA will be more significant.

Key Words: Abortion, habitual; thrombophilia

Yirminci gebelik haftasından önce, 500 gramdan daha az embriyo veya fetus ve eklerinin, tamamının ya da bir kısmının uterus kavitesi dışına atılması olayına abortus denilmektedir.¹ HA, birbirini izleyen en az iki ya da daha fazla gebeliğin 20. gebelik haftasından önce spontan olarak sonlanmasıdır.² HA hekim ve hasta açısından oldukça zor ve stresli bir sorun olup, üreme yaşındaki kadınların %5'inde görülmektedir.³ Klinik olarak yapılan çalışmalarda ardışık üç abortustan sonra dördüncünün olma olasılığı %30-50 olarak bildirilmektedir. Olasılık hesaplamalarına dayanan bazı çalışmalarda artan abortus sayısının bir sonraki gebeliğinde abortusla sonlanma ihtimalini artıracağı bildirilmektedir.^{4,5} HA nedenleri arasında çeşitli etiyolojik faktörler sayılmaktadır. Yapılan çalışmalarda yaklaşık olarak %7 kromozomal anomaliler, %10 anatomik sorunlar, %15 hormonal düzensizlikler, %6 açıklanamayan sebepler ve %55-62 koagülasyon protein/ platelet kusurları olarak bildirilmektedir. Gebelik kayıplarında plasentasyon bozukluğu ve plasenta damar yapısında mikrotübülüsler dikkat çekici ölçüde artmış olarak tespit edilmiştir. Koagülasyon ve fibrinolitik yolların çoğu embriyonun plasentasyonu ve trofoblastların invazyonu sırasında görev yapar. Prokoagülan faktörlerin düzeyindeki artış, doğal antikoagülanların düzeyindeki azalma ve fibrinolitikteki azalma gebelikte hiperkoagülatif durumun oluşmasına neden olmaktadır. Gebelikte özellikle ovulasyon, implantasyon ve plasentasyon aşamasında hemostatik sistem önemlidir. Fetoplasental dolaşımın sağlıklı olması gebeliğin devamlılığında temel unsurlardandır. Hemostatik sistemdeki gebelik boyunca oluşan değişiklikler işte bu çok önemli olan fetoplasental dolaşımın gerçekleşmesini sağlar.⁶

Faktör V geninin (FV) (1.kromozom q23-q25) 10. ekzonunda 1691. bazında oluşan G/A mutasyonuna "Faktör V Leiden" adı verilmiştir ve bu mutasyonlar içinde en iyi bilinen ve en yaygın olanıdır.⁷⁻¹¹ Bu mutasyon genin ürününün fonksiyon kaybına değil kazanımına neden olur. FV geni 10. ekzonunda 506. aminoasidi kodlayan kodonda guanin olan 1691. nükleotidin adenine dönüşmesi ile, arginin glutamine dönüşür.^{12,13} Bunun sonucu olarak FV'in doğal antikoagülan proteinC-proteinS

sistemine karşı duyarlılığı azalır ve aktif FV aktif protein C (APC) tarafından inaktive edilmeye karşı dirençli hale gelir.¹⁴⁻¹⁷ 1994 yılında Bertina, APC rezistansının en önemli nedeninin FV Leiden mutasyonu olduğunu açıklamıştır.¹⁸ Daha sonra APC rezistansının kalıtsal trombozda da en fazla rastlanan etken olduğu pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir.^{12,19-21} Otozomal dominant kalıtılan FV Leiden mutasyonu APC direncinin %90-95'inden sorumludur.²²⁻²⁴

Protrombin (Faktör II, FII) Geni 11. kromozomun p11-q12 bölgesinde yer alır.²⁵ Geninin 3'-UTR bölgesinde bulunan 20210. nükleotidde guanin yerine adenin geçmesiyle oluşan G20210A mutasyonunun plazma protrombin miktarının artmasına neden olduğu bilinmektedir.^{13,19-21} Bu mutasyonun tromboz riskini 2-4 kat artırdığı ve venöz tromboz için en yaygın ikinci kalıtsal risk faktörü olduğu bildirilmiştir.²⁶ Mutasyonun heterozigot olarak toplumda bulunma sıklığı %2-2.3 iken trombozlu hasta grubunda %6-6.2 ve ailede tromboz öyküsü olanlarda %18 olarak tespit edilmiştir.²⁷⁻²⁹

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) Geni 1. kromozomun p36.23-p34.3 bölgesinde yer alır. Dördüncü ekzon bölgesinde yer alan 677. baz olan sitozin yerine timin geçmesiyle oluşan mutasyon translasyon ürününde 226. sırada yer alan alanin yerine valinin geçmesiyle neticelenir.³⁰ Bu gen stoplazmik bir protein olan MTHFR enzimini kodlamaktadır. Enzim folat metabolizmasında önemli bir fonksiyona sahiptir. MTHFR geninde meydana gelen C677T mutasyonu enzim aktivitesini azaltmaktadır. Bu da 5-metiltetrahidrofolat seviyesinde azalmasına ve homosisteinin metiyonine dönüşmemesine ve bunun sonucunda plazma homosistein seviyesinin yükselmesine neden olur.³¹⁻³²

Literatürde FV, Protrombin ve MTHFR genlerinde yer alan mutasyon ve polimorfizmlerin gebeliğin devamlılığında önemli olan fetoplasental dolaşımda aksaklıklara neden olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur.³³⁻³⁹ Bazı çalışmalarda trombofili ile ilgili gen mutasyonları fetal ölüm, fetal gelişme geriliği ve preeklampsinin nedenleri ile ilişkilendirilirken diğer bazı çalışmalar bu görüşe katılmamakta, daha fazla mutasyon ve polimorfizmin çalışılmasını uygun görmekte dirler.⁴⁰⁻⁴⁴

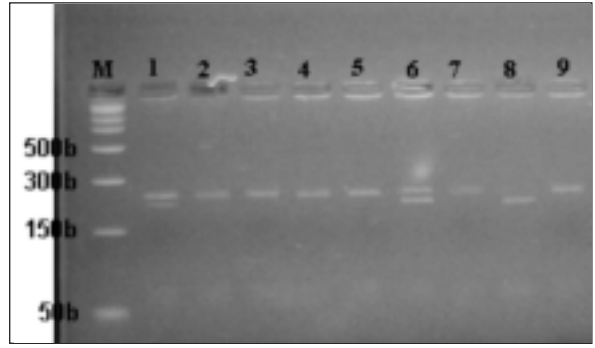
Biz bu çalışmada, FV Leiden (G1691A), Protrombin (G20210A) ve MTHFR (C677T) mutasyonlarının HA'lı kadınlardaki sıklığını ve gebelik kayıplarıyla olan ilişkilerini orataya koymayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmaya başlanmadan önce “Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu”ndan onay alınmıştır. Helsinki Deklarasyonu prensiplerine uygun olarak yapılan çalışmada tüm olgulardan “Bilgilendirilmiş Gönüllü Onay Belgesi” alınmıştır.

Çalışmaya klinik olarak gebelik kaybını açıklayan bir neden olmayan 20. gebelik haftasından önce 2 ve üzerinde abortus yapmış 110 kadından oluşan HA grubu ve gebelik kaybı olmayan, ölü doğumu olmayan, çocuk sahibi olan 30 sağlıklı kadından oluşan kontrol grubu dahil edildi. Olguların hepsinden detaylı anamnez alındı, pedigreleri çizildi ve fizik muayenesi yapıldı.

Olgulardan EDTA'lı tüplere alınan 2 mL periferik kan örneğinden genomik DNA izolasyonu yapıldı (*Puregene DNA izolasyon kiti*). Elde edilen genomik DNA lardan FV Leiden, Protrombin (G20210A) ve MTHFR (C677T) mutasyonlarını araştırmak için sırasıyla şu (F-5' TCA GGC AGG AAC AAC ACC 3')(R-5' GTT ACT TCA AGG ACA AAA TAC CTG TAA AGC T3'), (F-5' GCA CAG ACG GCT GTT CTC TT 3', R- 5' ATA GCA CTG GGA GCA TTG AAG C 3'), (F-5' TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA 3', R-5' AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG 3') primer dizileri kullanılarak, PCR (95°C, 5 dk. denatürasyon, 95°C, 15 sn annealing, 58°C, 1 dk ekstensiyon, 35 siklus) ile amplifiye edildi. PCR ürünleri amplifikasyonun kontrolü %2'lik agaroz jelde yapıldı. Daha sonra PCR ürünlerine HindIII ve HinfI ile enzim kesimi uygulandı. Enzim kesim ürünlerinin kontrolü %3'lük Nusieve agaroz jelde ve %10'luk Poliakrilamid Jel de yapıldı. FV Leiden için; homozigot normal; 241 bp tek bant, heterozigot mutant; 241 bp, 209 bp, 32 bp büyüklüğünde 3 bant, homozigot mutant; 209 bp, 32 bp büyüklüğünde 2 bant elde edildi (Resim 1). Protrombin (G20210A) için; homozigot normal; 506 bp büyüklüğünde tek bant, heterozigot mutant; 506 bp, 384 bp, 99 bp, 23 bp



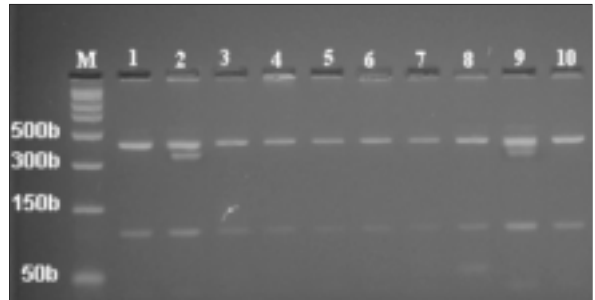
RESİM 1: FV Leiden 241 bp'lik amplifikasyon ürününün HindIII enzimi ile yapılan RFLP sonuçlarının %3'lük Nusieve agaroz jelde görüntülenmesi. M: Marker DNA, 1-9: Olgulara ait HindIII enzim kesim ürünleri. 1, 6: Heterozigot mutant, 8: Homozigot mutant, 2-5, 7, 9: Homozigot normal.

büyükliğinde 4 bant, homozigot mutant; 384 bp, 99 bp, 23 bp büyüklüğünde 3 bant elde edildi (Resim 2). MTHFR (C677T) için; homozigot normal; 198 bp, büyüklüğünde tek bant, heterozigot mutant; 198 bp, 175 bp, 23 bp büyüklüğünde 3 bant, homozigot mutant; 175 bp, 23 bp büyüklüğünde 2 bant elde edildi (Resim 3, Tablo 1).

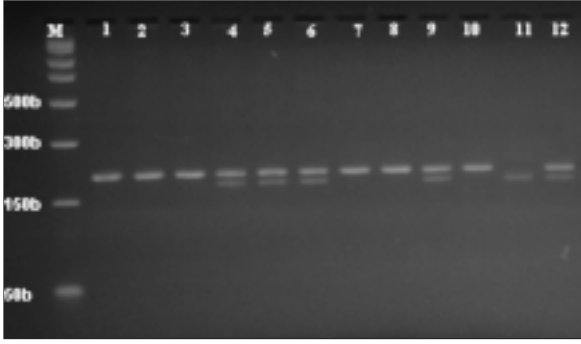
İstatistiksel analiz “*Statistical Package for Social Sciences*” programı kullanılarak yapılmıştır. Tüm veriler t-testi ile karşılaştırılmıştır. Değerlendirme Fisher'in ki-kare testi ile yapılmıştır.

BULGULAR

HA grubundaki olguların yaş ortalaması 29.6 iken kontrol grubunun yaş ortalaması 32.6'dır. Kontrol grubunun yaş ortalaması çalışma grubundan istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).



RESİM 2: Protrombin G20210A mutasyonu 506 bp'lik amplifikasyon ürününün HindIII enzimi ile yapılan RFLP sonuçlarının %3'lük Nusieve agaroz jelde görüntülenmesi. M: Marker DNA. 1-10: Olgulara ait HindIII enzim kesim ürünleri. 2 ve 9 nolu örnekler heterozigot mutasyonu olan, 1, 3-8, 10 homozigot normal olgulara ait ürünler.



RESİM 3: MTHFR C677T mutasyonu 198 bp'lik amplifikasyon ürününün Hinfl enzimi ile yapılan RFLP sonuçlarının %3'lük Nusieve agoroz jelde görün-tülenmesi. M: Marker DNA. 1-12: Olgulara ait Hinfl enzim kesim ürünleri. 4, 5, 6, 9, 12 nolu örnekler heterozigot mutasyonu olan, 11 nolu örnek homozigot mutasyonu olan, 1, 2, 3, 7, 8, 10 homozigot normal olgulara ait ürünler.

Yapılan pedigre incelemesinde; HA grubunda 27 (%24.5) kadının, kontrol grubunda ise 8 (%26.7) kadının akraba evliliği yaptığı tespit edilmiştir. Gruplar arasında akraba evliliği açısından istatistiksel fark yoktur ($p > 0.05$).

HA grubunda 31 (%28.2) olgunun canlı doğum ve 8 (%7.3)'ünün de ölü doğum yaptığı tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise olguların hepsinin canlı doğumu bulunurken, ölü doğum yapan yoktur. Kontrol grubu ile HA grubu arasında canlı doğum sayıları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken ($p < 0.05$), ölü doğum açısından iki grup arasında istatistiksel fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

PCR-RFLP yöntemi ile yapılan genetik incelemede; FV Leiden mutasyonu HA grubunda 15 (%13.6) olguda, kontrol grubunda 2 (%6.7) olguda, Protrombin (G20210A) mutasyonu HA grubunda 7 (%6.4) olguda, kontrol grubunda 2 (%6.7) olguda, MTHFR (C677T) mutasyonu HA grubunda 61 (%55.5) olguda, kontrol grubunda 16 (%53.3) olguda bulunmuştur. Gruplar arasında mutasyonların bulunma sıklığına bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0.05$) (Tablo 2).

HA grubunda FV Leiden ve MTHFR mutasyonlarını taşıyan ve taşımayan kadınlar arasında düşük ve ölü doğum sıklığı açısından aralarında fark bulunmazken, Protrombin mutasyonu taşıyan kadınlarda ölü doğum oranı bu mutasyonu taşımayanlardan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Tablo 3).

HA grubunda FV Leiden, Protrombin (G20210A) ve MTHFR (C677T) mutasyonu taşıyan ve taşımayan kadınlar arasında abortus sayısı bakımından anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p > 0.05$) (Tablo 4).

Birinci, ikinci ve üçüncü trimester gebelik kayıplarında FV Leiden mutasyonunun bulunma sıklığı farklı bulunmazken, Protrombin ve MTHFR mutasyonları birinci trimester gebelik kaybı olan kadınlarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde diğerlerinden yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 5).

TABLO 1: FV Leiden (G1691A), Protrombin (G20210A), MTHFR (C677T) mutasyonlarının PCR ürünlerin RFLP ile elde edilen bant boyları.

Mutasyon Adı	Homozigot Normal	Heterozigot Mutant	Homozigot Mutant
	Bant Sayısı ve Boyutu (bç)	Bant Sayısı ve Boyutu (bç)	Bant Sayısı ve Boyutu (bç)
FV Leiden (G1691A)	241	241	209
		209	32
		32	
Protrombin (G20210A)	506	506	384
		384	99
		99	23
		23	
MTHFR (C677T)	198	198	175
		175	23
		23	

bç: Baz çifti.

TABLO 2: HA ve kontrol grubunda FV Leiden (G1691A), Protrombin (G20210A), MTHFR (C677T) mutasyonu bulunma sıklığı.

Mutasyon Genotip	FV Leiden (G1691A)			Protrombin (G20210A)			MTHFR (C677T)		
	Wild Tip (GG) (n/%)	Heterozigot Mutant (GA) (n/%)	Homozigot Mutant (AA) (n/%)	Wild Tip (GG) (n/%)	Heterozigot Mutant (GA) (n/%)	Homozigot Mutant (AA) (n/%)	Wild Tip (CC) (n/%)	Heterozigot Mutant (CT) (n/%)	Homozigot Mutant (TT) (n/%)
HA (n= 110)	95 (%86.4)	12 (%10.9)	3 (%2.7)	103 (%93.6)	7 (%6.4)	0	49 (%44.5)	49 (%44.5)	12 (%10.9)
Kontrol (n= 30)	28 (%93.4)	2 (%6.7)	0	28 (%93.4)	2 (%6.7)	0	14 (%46.7)	14 (%46.7)	2 (%6.7)

TABLO 3: HA grubunda ölü doğum sayısı ile mutasyon bulunma sıklığı.

	FV Leiden (G1691A)		Protrombin (G20210A)		MTHFR (C677T)	
	Mutasyon Var (n= 15)	Mutasyon Yok (n= 95)	Mutasyon Var (n= 7)	Mutasyon Yok (n= 103)	Mutasyon Var (n= 61)	Mutasyon Yok (n= 49)
Canlı Doğum	4 (%26.7)	26 (%27.4)	3 (%42.9)	28 (%27.2)	17 (%27.7)	14 (%28.6)
Ölü Doğum	0	7 (%7.4)	2 (%28.6)	5 (%4.9)	3 (%4.9)	4 (%8.2)

p< 0.05

TABLO 4: HA grubunda abortus sayısı ile mutasyon bulunma sıklığı.

Abortus Sayısı	FV (G1691A)		Protrombin (G20210A)		MTHFR (C677T)	
	Mutasyon Yok	Mutasyon Var	Mutasyon Yok	Mutasyon Var	Mutasyon Yok	Mutasyon Var
2	38	9 (%19.1)	44	3(%)	21	47
3	30	2 (%6.3)	31	1	11	32
4	14	2 (%12.5)	14	2	7	16
5	6	0	6	0	6	6
6	5	1 (%16.7)	5	1	3	6
7	1	0	1	0	0	1
8	1	1 (%50)	2	0	1	2
Toplam	95	15 (13.6)	103	7	49	110

p> 0.05

TARTIŞMA

Kan koagülasyon sisteminin düzenli çalışması sağlıklı bir gebeliğin devamı için önemlidir. Çünkü sağlıklı bir gebelikte sağlıklı bir uteroplasental dolaşım olması mutlaklıdır.⁴⁵ Erken plasenta dekolmanı, fetal ölüm, fetal gelişme geriliği ve preeklampsinin nedenleri arasında en büyük yeri maternal-fetal dolaşımın tam olmaması almaktadır. Bunun da hemostaz ve vaskülarizasyon dağılımındaki anormalliklerle ilişkili olduğu bilinmektedir.⁴¹ Koagülasyon faktörleri olan protein C, protein S ve antitrombin III eksikliği yaygın bir koagülasyon problemidir.^{46,47} Koagülasyon sisteminde aksaklığa

neden olacak genetik kusurların önemi son dönemde daha iyi anlaşılmıştır. Bunlar arasında en sık ilişkilendirilen Faktör V, Protrombin ve MTHFR genlerinde yer alan bazı mutasyonlardır. Bu mutasyonların HA'lı Türk kadınlardaki sıklığını ortaya koymayı amaçlayan çalışmamızda HA'lı 110 ve abortus yapmamış, fertil 30 sağlıklı Türk kadın değerlendirilmiştir.

Otozomal resesif kalıtılan mutasyonların neden olabileceği erken gebelik kayıplarının dışlanabilmesi için her iki çalışma grubunun akraba evliliği insidansı yakın olacak şekilde gruplar oluşturulmuştur. Yüz on olguluk HA grubunda akraba evliliği yapan kadın sayısı 27 (%24.5) iken 30

TABLO 5: HA grubunda trimesterlere göre abortus sayıları ve mutasyon bulunma sıklığı.

	FV (G1691A)	Protrombin (G20210A)	MTHFR (C677T)
1. Trimester n= 110	15 (%13.6)	7 (%6.4)	61 (%55.5)
2. Trimester n= 16	2 (%12.5)	-	9 (%56.3)
3. Trimester n= 5	1 (%20)	-	1 (%20)

p< 0.05

n= Olgu sayısı

sağlıklı kadından oluşan kontrol grubunda 8 (%26.7) olduğu tespit edilmiştir. Aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p> 0.05).

FV Leiden mutasyonunun toplumdaki sıklığı heterozigot %5, homozigot %0.05 olarak bildirilmiştir.^{10,23,48} Türk toplumunda yapılan bir çalışmada FV Leiden mutasyon sıklığı %9.8 olarak bildirilmiştir.⁴⁹ Çalışmamızda ise HA grubunda bu mutasyonun sıklığı %13.6 (n= 15) bulunurken, kontrol grubunda %6.7 (n= 2) olarak bulunmuştur (Tablo 2). HA grubundaki mutasyon sıklığı kontrol grubundan daha yüksek yüzdeye bulunmakla birlikte aralarındaki fark istatistik olarak anlamlı değildir (p> 0.05). HA grubunda G/A genotip sıklığı %10.9 iken A/A genotip sıklığı %2.7'tir. Kontrol grubunda tespit edilen mutasyonların tümü ise G/A genotipindedir.

Pauer ve Aksoy da benzer hasta gruplarında yaptıkları çalışmalarda gruplar arasında mutasyon sıklığı açısından fark olmadığını bildirmişlerdir.^{50,51} Carp ve ark.nın vaka-kontrollü benzer çalışmasında mutasyon sıklığı %6.1, Tal J ve ark.nın çalışmasında ise bu oran %14 olarak bildirilmiştir.^{52,53}

Bu çalışmada HA grubunda FV Leiden mutasyonunun bulunma sıklığının gebelik kaybı sayısı ile olan ilişkisine bakıldığında mutasyonun azalan yüzdelerle sırasıyla sekiz, iki, altı, dört ve üç gebelik kaybında olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4).

Birçok çalışmada özellikle ikinci trimester gebelik kaybının olduğu hastalarda mutasyonun daha yüksek sıklıkta bulunduğu gösterilmiştir.^{4,50,51,54,55} Bu çalışmada FV Leiden mutasyonu üçüncü trimester gebelik kaybı olanlarda %20, birinci trimester gebelik kaybı olanlarda %13.6 ve ikinci trimester ge-

belik kaybı olan kadınlarda %12.5 oranında tespit edilmiş olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 5). Benzer sonuç Kutteh ve Aksoy'un vaka-kontrollü yaptıkları çalışmalarında da verilmiştir.^{51, 56} Pauer ve ark.nın çalışmasında da geç gebelik kayıplarında mutasyon sıklığının diğer trimester kayıplarından fazla olmakla birlikte anlamlı bulunmadığı bildirilmiştir.⁵⁷ Pek çok çalışmada FV Leiden mutasyonunun ikinci trimesterde daha yüksek bulunmasının oluşan koagülasyon problemlerinin uteroplasental dolaşımı bozmasıyla gebelik kayıplarına neden olduğunu bildirmekle birlikte sonuçlarımız bunu doğrulamadı.

Protrombin G20210A mutasyonu kalıtsal venöz trombozda önemli bir diğer risk faktörüdür. FV Leiden'den sonra en sık karşılaşılan mutasyondur. Mutasyonu taşımayanlarla heterozigot taşıyanlarda yapılan çalışmalarda plazma protrombin miktarında farklılık tespit edildiği bildirilmiştir. G/G genotiplilerde %1.05 U/mL, G/A genotipli bireylerde ise %1.32 U/mL olduğu, mutasyona bağlı plazma protrombin seviyesinde artış olduğu bildirilmiştir.^{13,58,59} Mutasyonun toplumda bulunma sıklığı %2-2.3 olarak bazı çalışmalarda bildirilmiştir.⁶⁰

Çalışmamızda protrombin (G20210A) mutasyonu HA grubunda 7 (%6.4) olguda tespit edilirken, kontrol grubunda 2 (%6.7) olguda tespit edilmiştir. Gruplar arasında Protrombin (G20210A) mutasyon bulunma sıklığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p> 0.05) (Tablo 1). HA ve kontrol grubunda tespit edilen mutasyonların hepsi G/A'dır. Farklı çalışma grupları tarafından yapılan çalışmalarda da HA kadınlarda mutasyon oranı kontrol grubundan farklı bulunmamıştır.⁶¹⁻⁶³

HA grubundaki 110 olgunun Protrombin mutasyonunu taşıyan 7 kadından 3 (%42.9)'ünün canlı doğumu ve 2 (%28.6)'sinin de ölü doğumu bulunurken, mutasyon taşımayan 103 kadının 28 (%27.2)'inde canlı doğum ve 5 (%4.9)'inde ölü doğum bulunmaktadır, canlı doğum yapma sıklığı açısından gruplar arasında anlamlı fark yokken (p> 0.05), ölü doğum yönünden mutasyon taşıyan ve taşımayanlar arasında anlamlı fark bulunmuştur (p< 0.05) (Tablo 3). Mutasyon taşıyan ve taşımayan kadınlardaki gebelik kaybı sayısına bakıldığında ise bir fark bulunmamıştır (Tablo 4).

Trimesterler arasında Protrombin mutasyonunun bulunma sıklığına bakıldığında birinci trimesterde gebelik kaybı olan kadınlarda %6.4 oranında mutasyon bulunurken diğer trimesterlerde mutasyon bulunmamıştır, bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

Kalıtsal trombofili nedenleri arasında yer alan Protrombin G20210A mutasyonu dolaşımdaki protrombin miktarının artışına neden olmaktadır.⁶⁴ Bu mutasyonla ilgili çalışmalar FV Leiden kadar fazla olmamakla birlikte son yıllarda dikkat çekici ölçüde artmıştır. Çalışmamızda tekrarlayan gebelik kaybı ve protrombin mutasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulamadık. Çalışma sonuçlarımız literatürde yer alan bazı çalışmalar ile paralellik göstermektedir.^{57,63,65}

Bu çalışmada da olduğu gibi, Protrombin G20210A mutasyonunun özellikle 12. gebelik haftasından önceki oluşan kayıplarda risk oluşturduğu ve kontrol grubuna göre 2-8 kat fazla sıklıkta bulunduğu bazı araştırmacılar tarafından bildirilirken, Kutteh ve ark. ise çalışmalarında erken gebelik kayıpları ve Protrombin mutasyonu sıklığı ile bir ilişki kuramamışlardır.^{39,66,65}

MTHFR enzimi folat metabolizmasında önemli bir göreve sahiptir.⁶⁷ MTHFR C677T mutasyonu sonucu olarak 5-metil tetrahidrofolat düzeyi azalmakta, 5,10-metilen tetrahidrofolat miktarı ve plazma homosistein düzeyi önemli oranda artmaktadır.^{31,32,67-69} Hiperhomosisteinemi tromboz, pek çok kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalık için risk oluşturmaktadır.⁷⁰

Çalışmamızda değerlendirilen HA'lı kadınların 61 (%55.5)'inde MTHFR (C677T) mutasyonu tespit edilmiştir, bunlardan 49 (%44.5)'ü C/T, 12 (%10.9)'si T/T genotipine sahiptir. Kontrol grubunda ise 16 (%53.3) olguda mutasyon tespit edilmiştir, bunlardan 14 (%46.7)'ü C/T, 2 (%6.7)'si T/T genotipine sahiptir. HA'lı hasta grubu ile kontrol grubu MTHFR mutasyonu bulunma sıklığı açısından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p \geq 0.05$) (Tablo 2). Mutasyonun homozigot bulunma sıklığı HA grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmakla birlikte her iki grup arasında

mutasyonun bulunma sıklığı açısından anlamlı bir fark tespit edilememiştir, benzer sonuçlar yapılan farklı çalışmalarda da bildirilmiştir.^{61,66,71-74} Nelen ve ark. ise MTHFR genindeki homozigotluğun HA riskini 3 kat artırdığını bildirmişlerdir.^{75,76} Bizim çalışmamızda da en yüksek homozigot mutasyon sıklığı MTHFR mutasyonunda tespit edilmiş olup, HA grubundaki sayısı kontrol grubundan daha yüksektir (Tablo 2). Bu mutasyonu taşıyan ve taşımayan kadınlardaki gebelik kaybı sayısına bakıldığında diğer iki mutasyonda olduğu gibi aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$) (Tablo 4). Trimesterler arasında MTHFR mutasyonu bulunma sıklığına bakıldığında en yüksek mutasyon sıklığı birinci trimesterde gebelik kaybı olan kadınlarda tespit edilmiştir (Tablo 5).

Çalışılan bu üç mutasyonun trombotik olayların riskini yükselttiği ve bunun sonucu olarak da HA'ya yatkınlık nedeni olduğuna dair çelişkili çalışmalar bulunmaktadır. Bu çelişki hasta ve kontrol grubu seçim kriterleri farklılıklarından ya da popülasyon farklılığından kaynaklanmış olabilir.^{34,38,54,63,72,77-79} İlk trimester gebelik kayıplarının %50'sinin sitogenetik anomalilerden kaynaklanıyor olması bu üçlü gen mutasyonunun bu trimester kayıplarındaki rolünün tam anlaşılmasına neden olmaktadır.⁸⁰

Tekrarlayan gebelik kayıplarının etiyolojisinde kazanılmış trombofilinin rolü kabul edilmiş olsada, kalıtsal trombofililerin ne ölçüde işe karıştığı tam net değildir.^{81,82} Kalıtsal trombofililerde en yaygın yapılan çalışmalar FV, Protrombin ve MTHFR mutasyon prevalansları ile ilgilidir.

Son yıllarda trombofili için FV Leiden, protrombin (G20210A) ve MTHFR (C677T) mutasyonları dışında farklı aşamalarda devreye giren ürünler ve bu ürünlere ait genler üzerinde çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Bilinen trombofili ile ilgili gen mutasyonlarına yenileri eklenmektedir. Bu mutasyonlar arasında FV (Y1702C ve H1299R), Faktör XIII V34L, β -fibrinojen-455G/A, PAI-1 4G/5G, HPA 1 a/b (L33P), MTHFR (A1298C). Bu mutasyonların koroner tromboz riskini 3-4 kat ar-

tırdığı bildirilmiştir. HA'lı kadınlarda kontrol grubuna göre bu mutasyonların en az 3 tanesinin %47 oranında daha fazla bulunduğu bildirilmiştir.^{61,83-85}

Bu çalışma ve benzer konulu yapılan diğer araştırma sonuçlarına bakıldığında bu üçlü gen mutasyonunun, tekrarlayan gebelik kayıplarının ne-

denini açıklamamada yetersiz olduğu ve gebelik kaybı riskinin, spesifik bir mutasyondan çok trombofili ile ilişkili genlere ait mutasyonların kombine birikimine bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle belkide HA'lı kadınlarda daha fazla trombofili ile gen mutasyonunun prevalansının araştırılması daha anlamlı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Cunningham FG, MacDonald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap L, Hanks GDV, et al. Reproductive Success and Failure In: Cunningham FG, Williams JW, eds. Williams Obstetrics. 20th ed. Norwalk: Appleton & Lange; 1997. p.579-607.
- Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, d'Addeda M, Cappucci G, Vecchione G, et al. Factor V Leiden is associated with repeated and recurrent unexplained fetal losses. *Thromb Haemost* 1997;77(5):822-4.
- Bianca S, Barrano B, Cutuli N, Indaco L, Ingegnesi C, Cataliotti A, et al. Recurrent pregnancy loss and inherited thrombophilia: who should be tested? *J Clin Pathol* 2008;61(10):1149-50.
- Warburton D, Fraser FC. Spontaneous abortion risks in man: data from reproductive histories collected in a medical genetics unit. *Am J Hum Genet* 1964;16:1-25.
- Carp HJ, Toder V, Mashiach S, Nebel L, Serr DM. Recurrent miscarriage: a review of current concepts, immune mechanisms, and results of treatment. *Obstet Gynecol Surv* 1990;45(10):657-69.
- Hellgren M. Hemostasis during pregnancy and puerperium. *Haemostasis* 1996;26 (Suppl 4):244-7.
- Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, et al. Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost* 1996;76(5):651-62.
- Cripe LD, Moore KD, Kane WH. Structure of the gene for human coagulation factor V. *Biochemistry* 1992;31(15):3777-85.
- Kane WH, Ichinose A, Hagen FS, Davie EW. Cloning of cDNAs coding for the heavy chain region and connecting region of human factor V, a blood coagulation factor with four types of internal repeats. *Biochemistry* 1987;26(20):6508-14.
- Zehnder JL, Hiraki DD, Jones CD, Gross N, Grumet FC. Familial coagulation factor V deficiency caused by a novel 4 base pair insertion in the factor V gene: factor V Stanford. *Thromb Haemost* 1999;82(3):1097-9.
- Akar N, Yilmaz E, Akar E, Deda G, Sipahi T. Factor V (His 1299 Arg) in young Turkish patients with cerebral infarct. *Haemostasis* 2000;30(3):118-22.
- Dere L, Philippeau F, Nighoghossian N, Trouillas P, Berruyer M. Postpartum cerebral venous thrombosis, congenital protein C deficiency, and activated protein C resistance due to heterozygous factor V Leiden mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;65(5):801-2.
- Zenz W, Bodó Z, Plotho J, Streif W, Male C, Bernert G, et al. Factor V Leiden and prothrombin gene G 20210 A variant in children with ischemic stroke. *Thromb Haemost* 1998;80(5):763-6.
- Bertina RM., Rosendaal FR. Venous thrombosis- The interaction of genes and environment. *N Engl J Med* 1998;338(25):1840-1.
- Simioni P, Prandoni P, Lensing AW, Scudeller A, Sardella C, Prins MH, et al. The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with an Arg506-->Gln mutation in the gene for factor V (factor V Leiden). *N Engl J Med* 1997;336(6):399-403.
- Bertina RM. Factor V Leiden and other coagulation factor mutations affecting thrombotic risk. *Clin Chem* 1997;43(9):1678-83.
- Franco RF, Reitsma PH. Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet* 2001;109(4):369-84.
- Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369(6475):64-7.
- Lensen R, Rosendaal F, Vandenbroucke J, Bertina R. Factor V Leiden: the venous thrombotic risk in thrombophilic families. *Br J Haematol* 2000;110(4):939-45.
- Gerhardt A, Scharf RE, Beckmann MW, Struve S, Bender HG, Pillny M, et al. Prothrombin and Factor V Mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. *N Engl J Med* 2000;342(6):374-9.
- Martinelli I, Bucciarelli P, Margaglione M, De Stefano V, Castaman G, Mannucci PM. The risk of venous thromboembolism in family members with mutations in the genes of factor V or prothrombin or both. *Br J Haematol* 2000;111(4):1223-9.
- Major DA, Sane DC, Herrington DM. Cardiovascular implications of the factor V Leiden mutation. *Am Heart J* 2000;140(2):189-95.
- Rosén SB, Sturk A. Activated protein C resistance--a major risk factor for thrombosis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35(7):501-16.
- Iniesta JA, Corral J, Fernández-Pardo J, González-Conejero R, Vicente V. Factor-V (Arg506 --> Gln) mutation in ischemic cerebrovascular disease. *Haemostasis* 1997;27(3):105-11.
- Royle NJ, Irwin DM, Koschinsky ML, MacGillivray RT, Hamerton JL. Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively. *Somat Cell Mol Genet* 1987;13(3):285-92.
- Friedline JA, Ahmad E, Garcia D, Blue D, Ceniza N, Mattson JC, et al. Combined factor V Leiden and prothrombin genotyping in patients presenting with thromboembolic episodes. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125(1):105-11.
- Kapur RK, Mills LA, Spitzer SG, Hultin MB. A prothrombin gene mutation is significantly associated with venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(11):2875-9.
- Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Gonçalves MS, Costa FF. Prevalence of the prothrombin gene variant (nt20210A) in venous thrombosis and arterial disease. *Thromb Haemost* 1997;78(6):1430-3.
- Stefano V, Martinelli I, Manucci MP, The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both Factor V Leiden and The G20210A prothrombin mutation. *N Engl J Med* 1999;341(11):801-6.
- Tonetti C, Burtscher A, Borjes D, Tulliez M, Zittoun J. Methylene tetrahydrofolate reductase deficiency in four siblings: A clinical, biochemical, and molecular study of the family. *Am J Med Genet* 2000;91(5):363-7.

31. Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y, Ben-Yehuda A, Selhub J, Babaey S, et al. Common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. *J Nutr* 1999;129(9):1656-61.
32. Goyette P, Rozen R. The thermolabile variant 677C->T can further reduce activity when expressed in cis with severe mutations for human methylenetetrahydrofolate reductase. *Hum Mutat* 2000;16(2):132-8.
33. Sarig G, Younis JS, Hoffman R, Lanir N, Blumenfeld Z, Brenner B. Thrombophilia is common in women with idiopathic pregnancy loss and is associated with late pregnancy wastage. *Fertil Steril* 2002;77(2):342-7.
34. Finan RR, Tamim H, Ameen G, Sharida HE, Rashid M, Almawi WY. Prevalence of factor V G1691A (factor V-Leiden) and prothrombin G20210A gene mutations in a recurrent miscarriage population. *Am J Hematol* 2002;71(4):300-5.
35. Reznikoff-Etiévan MF, Cayol V, Carbonne B, Robert A, Coulet F, Milliez J. Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutations are risk factors for very early recurrent miscarriage. *BJOG* 2001;108(12):1251-4.
36. Kovalevsky G, Gracia CR, Berlin JA, Sammel MD, Barnhart KT. Evaluation of the association between hereditary thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Arch Intern Med* 2004;164(5):558-63.
37. Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 2003;361(9018):901-8.
38. Rai R, Shlebak A, Cohen H, Backos M, Holmes Z, Marriott K, et al. Factor V Leiden and acquired activated protein C resistance among 1000 women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2001;16(5):961-5.
39. Alonso A, Soto I, Urgelles MF, Corte JR, Rodriguez MJ, Pinto CR. Acquired and inherited thrombophilia in women with unexplained fetal losses. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187(5):1337-42.
40. Dekker GA, de Vries JI, Doelitzsch PM, Huijgens PC, von Blomberg BM, Jakobs C, et al. Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173(4):1042-8.
41. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340(1):9-13.
42. Morrison ER, Miedzybrodzka ZH, Campbell DM, Haites NE, Wilson BJ, Watson MS, et al. Prothrombotic genotypes are not associated with pre-eclampsia and gestational hypertension: results from a large population-based study and systematic review. *Thromb Haemost* 2002;87(5):777-8.
43. Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, Pavone G, Paladini D, Martinelli P, et al. Lower birth-weight in neonates of mothers carrying factor V G1691A and factor II A(20210) mutations. *Haematologica* 2002;87(2):177-81.
44. Reznik R. Intrauterine growth restriction. *Obstet Gynecol* 2002;99(4):490-6.
45. Brigden ML. The hypercoagulable state. Who, how, and when to test and treat. *Postgrad Med* 1997;101(5):249-52, 254-6, 259-62.
46. Schmidt-Sarosi C, Schwartz LB, Lublin J, Kaplan-Grazi D, Sarosi P, Perle MA. Chromosomal analysis of early fetal losses in relation to transvaginal ultrasonographic detection of fetal heart motion after infertility. *Fertil Steril* 1998;69(2):274-7.
47. Younis JS. Thrombophilia and recurrent fetal loss-related? *Fertil Steril* 2000;73(3):652-4.
48. Braun A, Müller B, Rosche AA. Population study of the G1691A mutation (R506Q, FV Leiden) in the human factor V gene that is associated with resistance to activated protein C. *Hum Genet* 1996;97(2):263-4.
49. Herrmann FH, Koesling M, Schröder W, Altman R, Jiménez Bonilla R, Lopaciuk S, et al. Prevalence of Factor V Leiden mutation in various populations. *Genet Epidemiol* 1997;14(4):403-11.
50. Pauer HU, Neesen J, Schloesser M, Hinney B, Rauskolb R. Homozygous factor V Leiden mutation in a woman with multiple adverse pregnancy outcomes. *Arch Gynecol Obstet* 2000;264(3):164-5.
51. Aksoy M, Tek I, Karabulut H, Berker B, Soylemez F. The role of thrombophilia related to Factor V Leiden and Factor II G20210A mutations in recurrent abortions. *J Pak Med Assoc* 2005;55(3):104-8.
52. Carp H, Salomon O, Seidman D, Dardik R, Rosenberg N, Inbal A. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2002;17(6):1633-7.
53. Tal J, Schliamser LM, Leibovitz Z, Ohel G, Attias D. A possible role for activated protein C resistance in patients with first and second trimester pregnancy failure. *Hum Reprod* 1999;14(6):1624-7.
54. Brenner B, Sarig G, Weiner Z, Younis J, Blumenfeld Z, Lanir N. Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause. *Thromb Haemost* 1999;82(1):6-9.
55. Ridker PM, Miletich JP, Buring JE, Ariyo AA, Price DT, Manson JE, et al. Factor V Leiden mutation as a risk factor for recurrent pregnancy loss. *Ann Intern Med* 1998;128(12 Pt 1):1000-3.
56. Kutteh WH, Triplett DA. Thrombophilias and recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2006;24(1):54-66.
57. Pauer HU, Voigt-Tschirschwitz T, Hinney B, Burfeind P, Wolf C, Emons G, et al. Analyses of three common thrombophilic gene mutations in German women with recurrent abortions. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82(10):942-7.
58. Dubreuil Lastrucci RM, Dawson DA, Münster M. Development of an internal restriction control in the PCR detection of the prothrombin 20210A mutation. *Clin Lab Haematol* 1999;21(4):281-3.
59. Nguyen A. Prothrombin G20210A polymorphism and thrombophilia. *Mayo Clin Proc* 2000;75(6):595-604.
60. Morange PE, Barthet MC, Henry M, Fontanet H, Aillaud MF, Alessi MC, et al. A three-generation family presenting five cases of homozygosity for the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998;80(5):859-60.
61. Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutations are risk factors for recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 2006;55(5):360-8.
62. Dilley A, Benito C, Hooper WC, Austin H, Miller C, El-Jamil M, et al. Mutations in the factor V, prothrombin and MTHFR genes are not risk factors for recurrent fetal loss. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2002;11(3):176-82.
63. Wramsby ML, Sten-Linder M, Bremme K. Primary habitual abortions are associated with high frequency of factor V Leiden mutation. *Fertil Steril* 2000;74(5):987-91.
64. Castoldi E, Simioni P, Kalafatis M, Lunghi B, Tormene D, Girelli D, et al. Combinations of 4 mutations (FV R506Q, FV H1299R, FV Y1702C, PT 20210G/A) affecting the prothrombinase complex in a thrombophilic family. *Blood* 2000;96(4):1443-8.
65. Kutteh WH, Park VM, Deitcher S.R. Hypercoagulable state mutation analysis in white patients with early first-trimester recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 1999;71(6):1048-53.
66. Nelen WL, Blom HJ, Thomas CM, Steegers EA, Boers GH, Eskes TK. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. *J Nutr* 1998;128(8):1336-41.
67. Dobson AT, Davis RM, Rosen MP, Shen S, Rinaudo PF, Chan J, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C variants do not affect ongoing pregnancy rates following IVF. *Hum Reprod* 2007;22(2):450-6.

68. Bailey LB, Duhaney RL, Maneval DR, Kauwell GP, Quinlivan EP, Davis SR, et al. Vitamin B-12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. *J Nutr* 2002;132(7): 1872-8.
69. Rosenblatt DS. Methylenetetrahydrofolate Reductase. *Clin Invest Med* 2001;24(1):56-9.
70. Rady PL, Tying SK, Hudnall SD, Vargas T, Kellner LH, Nitowsky H, et al. Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR): The Incidence of Mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish Population. *Am J Med Genet* 1999;86(4):380-4.
71. Goodman CS, Coulam CB, Jeyendran RS, Acosta VA, Roussev R. Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? *Am J Reprod Immunol* 2006;56(4):230-6.
72. Pihusch R, Buchholz T, Lohse P, Rüksamen H, Rogenhofer N, Hasbargen U, et al. Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. *Am J Reprod Immunol* 2001;46(2):124-31.
73. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64(3):169-72.
74. Coppens M, Kaandorp SP, Middeldorp S. Inherited thrombophilias. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2006;33(3):357-74.
75. Blumenfeld Z, Brenner B. Thrombophilia-associated pregnancy wastage. *Fertil Steril* 1999;72(5):765-74.
76. Nelen WL, van der Molen EF, Blom HJ, Heil SG, Steegers EA, Eskes TK. Recurrent early pregnancy loss and genetic-related disturbances in folate and homocysteine metabolism. *Br J Hosp Med* 1997;58(10):511-3.
77. Foka ZJ, Lambropoulos AF, Saravelos H, Karas GB, Karavida A, Agorastos T, et al. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 2000;15(2):458-62.
78. Franco RF, Reitsma PH. Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet* 2001; 109(4):369-84.
79. Pauer HU, Neesen J, Hinney B. Factor V Leiden and its relevance in patients with recurrent abortions. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178(3):629.
80. Dulicek P, Chrobak L, Kalousek I, Pesavova L, Pecka M, Stransky P. Is factor V Leiden a risk factor for fetal loss? *Acta Med* 1999;42(3):93-6.
81. Regan L, Rai R. Thrombophilia and pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2002;55(1-2):163-80.
82. Deitcher SR, Park VM, Kutteh WH. Prothrombin 20210 G A mutation analysis in Caucasian women with early first trimester recurrent pregnancy loss. *Blood* 1998;92(Suppl 1):118b.
83. Baykal Y, Özet G, Kocabalkan F. [The risk factors related to venous thrombosis]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 1999;19(4):236-41.
84. Bojesen SE, Juul K, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Platelet glycoprotein IIb/IIIa homozygosity associated with risk of ischemic cardiovascular diseases and myocardial infarction in young men: the Copenhagen City Heart Study. *J Am Coll Cardiol* 2003;42(4):661-667.
85. Behague I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Arveiler D, Luc G, et al. Beta fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. The ECTIM Study. *Etude Cas-Temoins sur l'Infarctus du Myocarde. Circulation* 1996;93(3):440-9.