T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI ÖYKÜSÜ OLAN KADIN HASTALARDA GENETİK ETİYOLOJİNİN YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

FULYA DÜŞENKALKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakan GÜRKAN

EDİRNE-2022

Fulya DÜŞENKALKAN'ın hazırladığı "TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI ÖYKÜSÜ OLAN KADIN HASTALARDA GENETİK ETİYOLOJİNİN YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir yüksek lisans olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):	İmza
Prof. Dr. Hakan GÜRKAN	……
Doç. Dr. Selma DEMİR	……
Doç. Dr. Hilmi TOZKIR	……

Tez Savunma Tarihi: 23/12/2023

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Hakan GÜRKAN
Tez Danışmanı

……

Doç. Dr. Sinem YALÇINTEPE
İkinci Tez Danışmanı

……

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

……
Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

.... / .... / ....

Fulya DÜŞENKALKAN

Yüksek Lisans Tezi

Tekrarlayan Gebelik Kaybı Öyküsü Olan Kadın Hastalarda Genetik Etiyolojinin Yeni Nesil Dizi Analizi Yöntemi ile Araştırılması

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik

ÖZET

Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK), en az iki ardışık gebeliğin 20. gebelik haftasından önce istemsiz olarak uterin boşluktan atılması ile gebeliğin sonlanması durumudur. Üreme çağındaki kadınların yaklaşık %2'si TGK yaşamaktadır. TGK etiyolojisinde rol oynayan farklı nedenler olmakla birlikte, genetik faktörlerin (kalıtsal trombofili varyantları, tek gen mutasyonları ve kromozomal anomaliler) etkisi %2-5 oranında bildirilmiştir (Chackraborty vd., 2013; Dimitriadis vd., 2020). Ancak halen daha genetik etkiler tam olarak aydınlatılamamıştır.

Çalışmamızda, literatür bilgileri ışığında TGK ile doğrudan ilişkili olan ve ilişkili olduğu düşünülen 43 geni (*ACE, CBS, CPB2, CCDC39, CHD7, DNAH1, LHCGR, NLRP7, F10, F11, F12, F13A1, F13B, F2R, F3, F7, F8, F9, FGA, FGB, GP1BA, GP1BB, GP5, GP9, ITGA2, ITGB3, KLKB1, MTHFR, MTR, MTRR, PLAT, PLAUR, PLG, PROCR, SERPINE1, SERPINF1, TFPI, THBD, F2, F5, PROC, PROS1, SERPINC1)* içeren, tarafımızca tasarlanan çoklu gen paneli kullanılarak yeni nesil dizi analizi (NGS) teknolojisi ile hastalığın genetik etiyolojisi araştırıldı.

Trakya Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğine TGK şikâyeti ile başvuran 40 kadın hasta dahil edildi. Hastaların çalışmaya dahil edilme kriterleri: en az 3 kuşaktır Trakya Bölgesinde yaşıyor olmak, eşi ile akrabalık ilişkisi bulunmamak, 46,XX kromozom yapısına sahip

olmak, trombofili panelinde Faktör II (Protrombin) ve Faktör V Leiden varyantına sahip olmamak olarak belirlendi.

Çalışmamız sonucunda, çalışmış olduğumuz 40 kadın hastadan 32 tanesinde (%80) bir ve/veya daha fazla varyant saptandı. Bulgularımızdan altısı patojenik, üçü olası patojenik, otuz ikisi klinik önemi belirsiz ve yirmisi iyi huylu/olası iyi huylu varyant olarak bildirildi. Olası patojenik olarak saptanan *DNAH1* genindeki NM_015512.5:c.10123_10126dupCAGC (p.Leu3376ProfsTer6) ve *THBD* genindeki NM_000361.3:c.1335C>A (p.Cys445Ter) varyasyonları ve klinik önemi belirsiz olarak saptanan NM_181446.3(*FSHR)*:c.1127G>A (p.Cys376Tyr), NM_001312675.2(*F10)*:c.257-12C>G, NM_005957.5(*MTHFR)*:c.273A>C (p.Ile91Ile), NM_000313.4(*PROS1)*:c.574A>G (p.Met192Val), NM_000789.4(*ACE)*:c.2059-9T>A, NM_000233.4(*LHCGR)*:c.55_56insTGCCGC (p.Gln18_Pro19insLeuPro) ve NM_000133.4(*F9)*:c.177C>G (p.Asn59Lys) varyantları daha önce literatürde ve açık erişim sağlayan veri tabanlarında bildirilmediğinden novel (yeni) varyant olarak değerlendirildi.

Özetle; tekrarlayan gebelik kaybı hastalığının daha geniş bir örneklem grubunda, hedefe yönelik çoklu gen panelleri kullanılarak yeni nesil dizileme yöntemi ile çalışılması sonucunda klinik tanıya önemli bir katkı sağlayacağı ön görüsündeyiz.

Yıl : 2022

Sayfa Sayısı : 113

Anahtar Kelimeler : Tekrarlayan gebelik kaybı, yeni nesil dizi analizi

Master Thesis

Investigation of Genetic Etiology in Female Patients with a History of Recurrent Pregnancy Loss by New Generation Sequence Analysis Method

Trakya University Institute of Natural Sciences

Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

Recurrent pregnancy loss (RPL) is the termination of pregnancy by involuntary expulsion of at least two consecutive pregnancies from the uterine cavity before the 20th g midwifery week. Approximately 2% of women of reproductive age experience RPL. Although there are different causes that play a role in the etiology of RPL, the effect of genetic factors (hereditary thrombophilia variants, single gene mutations and chromosomal abnormalities) has been reported at a rate of 2-5% (Chackraborty et al., 2013; Dimitriadis et al., 2020). However, genetic effects are still not fully elucidated.

In our study, the genetic etiology of the disease was investigated with new generation sequence analysis (NGS) technology using the multi-gene panel designed by us, which includes 43 genes *(ACE, CBS, CPB2, CCDC39, CHD7, DNAH1, LHCGR, NLRP7, F10, F11, F12, F13A1, F13B, F2R, F3, F7, F8, F9, FGA, FGB, GP1BA, GP1BB, GP5, GP9, ITGA2, ITGB3, KLKB1, MTHFR, MTR, MTRR, PLAT, PLAUR, PLG, PROCR, SERPINE1, SERPINF1, TFPI, THBD, F2, F5, PROC, PROS1, SERPINC1)* that are directly and/or indirectly related to RPL.

40 female patients who applied to the outpatient clinic of Trakya University Hospital Medical Genetics Department Genetic Diseases Evaluation Center with TGK complaint were included. The criteria for the inclusion of patients in the study: to have lived in the Thrace Region for at least 3 generations, not related to their wife not to have

a relationship with their spouse, to have a chromosome structure of 46,XX, not to have Factor II and Factor V variant in the thrombophilia panel.

As a result of our study, one or more variants were detected in 32 of the 40 female patients (80%). Six of our results were pathogenic, three were likely pathogenic, thirty-seven variants of uncertain clinical significance, and twenty were benign/likely benign were reported.

Likely pathogenic variants in *DNAH1* (NM_015512.5:c.10123_10126dupCAGC (p.Leu3376ProfsTer6)) and *THBD* (NM_000361.3:c.1335C>A (p.Cys445Ter**))** genes and variants of uncertain clinical significance in the NM_181446.3(*FSHR)*:c.1127G>A (p.Cys376Tyr), NM_001312675.2(*F10)*:c.257-12C>G, NM_005957.5(*MTHFR)*:c.273A>C (p.Ile91Ile), NM_000313.4(*PROS1)*:c.574A>G (p.Met192Val), NM_000789.4(*ACE)*:c.2059-9T>A, NM_000233.4(*LHCGR)*:c.55_56insTGCCGC (p.Gln18_Pro19insLeuPro) ve NM_000133.4(*F9)*:c.177C>G (p.Asn59Lys) genes have not been previously reported in the literature and open access databases, so they were considered as "novel variant".

In summary, we anticipate that new generation sequencing method studies using targeted multi-gene panels with a larger sample group will make an important contribution to the clinical diagnosis of recurrent pregnancy loss disease.

Year : 2022

Number of Pages : 113

Keywords : Recurrent pregnancy loss, next-generation sequencing analysis

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim sürecimde kıymetli görüşlerini, tecrübelerini ve engin bilgilerini sabırla paylaşarak beni cesaretlendiren ve desteğini tüm samimiyeti ile her zaman hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Hakan GÜRKAN'a (Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.B.D) saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tıbbi Genetik A.B.D'nın değerli hocaları Doç. Dr. Sinem YALÇINTEPE, Doç. Dr. Selma DEMİR ve Öğr. Gör. Dr. Engin ATLI'ya,

Tez çalışmam ve yazma sürecimde daima yanımda olan canım arkadaşım Melisa ÖZÇELİK'e; bu zorlu dönemimde özveri ile çalışmama yardımcı olan çok değerli ekip arkadaşlarım Öğr. Gör. Drenushe ZHURİ, Uzm. Bio. Hazal SEZGİNER GÜLER, Cansu AYDIN, Muhamedsemi MEMEDİ, Tuba MARAŞ, M. Can ŞAHİN, Ceyhan ÜNLÜ'ye ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Trakya Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı bünyesindeki çalışanlara,

Sevgilerini ve desteklerini her zaman hissettiğim, her adımımda arkamda durarak daha da ileriye gidebilme cesareti veren canım annem ve babama; hayatıma en özel dokunuşları yapan, örnek aldığım biricik ablama ve gülüşüyle neşe kaynağım olan yeğenim Kıvanç'a teşekkür ederim…

Fulya DÜŞENKALKAN

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (TÜBAP) tarafından 2022/01 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET....iv
ABSTRACT....vi
TEŞEKKÜR....viii
İÇİNDEKİLER....ix
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ....xi
ŞEKİLLER DİZİNİ....xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ....xviii
BÖLÜM 1....1
GİRİŞ VE AMAÇ....1
BÖLÜM 2....3
GENEL BİLGİLER....3
2.1.Dişi Üreme Organları....3
2.2.Gametogenez ve Fertilizasyon....6
2.3.Tekrarlayan Gebelik Kaybı....11
2.4.Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi....29
2.5.ACMG-2015 Kriterleri....32
BÖLÜM 3....35
MATERYAL VE YÖNTEM....35
3.1.Materyal....35
3.2.Yöntem....39
BÖLÜM 4....53
BULGULAR....53
BÖLÜM 5....71

TARTIŞMA 71

BÖLÜM 6 79

SONUÇ 79

KAYNAKLAR 81

EKLER 89

ÖZGEÇMİŞ 96

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACE : Angiotensin I-Converting Enzyme

ACMG : American Collage of Medical Genetics

AMP : Association for Molecular Pathology

APC : Aktifleştirilmiş Protein C

APS : Antifosfolipid Sendromu

ASRM : Amerikan Üreme Tıbbı Derneği

B : İyi Huylu (Benign)

B12 : Kobalamin

CBS : Cystathionine Beta-Synthase

CCDC39 : Ciliary Dyskinesia

CHD7 : Chromodomain Helicase DNA-Binding Protein 7

CPB2 : Carboxypeptidase B2

CT : Threshold Cycle

ddNTP : Dideoksiribonükleozidtrifosfat

DNA : Deoksiribo nükleik asit

DNAH1 : Dynein, Axonemal, Heavy Chain 1

dNTP : Deoksiribonükleozidtrifosfat

dsDNA : Çift Sarmallı DNA (Double Stranded DNA)

ECPR : Endotelyal Hücre Protein C Reseptörü

ESHRE : Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği

ETOH : Etanol

F10 : Coagulation Factor X

F11 : Coagulation Factor XI

F12 : Coagulation Factor XII

F13A1 : Factor XIII, A1 Subunit

F13B : Factor XIII, B Subunit

F2 : Coagulation Factor II

F2R : Coagulation Factor II Receptor

F3 : Coagulation Factor III

F5 : Coagulation Factor V

F7 : Coagulation Factor VII

F8 : Coagulation Factor VIII

F9 : Coagulation Factor IX

FGA : Fibrinogen, A Alpha Polypeptide

FGB : Fibrinogen, B Beta Polypeptide

FISH : Floresan In Situ Hibridizayon

gDNA : Genomik DNA

GP Ia : Glycoprotein Ia

GP Ib : Glycoprotein Ib

GP IIa : Glycoprotein IIa

GP IIb/IIIa : Glycoprotein IIb/IIIa

GP IIIa : Glycoprotein IIIa

GP1BA : GlycoproteinIb, Platelet, Alpha Polypeptide

GP1BB : GlycoproteinIb, Platelet, Beta Polypeptide

GP5 : Glycoprotein V, Platelet

GP9 : Glycoprotein IX, Platelet

GPCR : G Protein Bağlı Reseptör

HCL : Hidroklorik Asit

HLA : İnsan Lökosit Antijeni (Human Leucocyte Antigen)

IgG : İmmünoglobülin G

IgM : İmmünoglobülin M

IL-6 : Interlökin 6

ITGA2 : Integrin, Alpha-2

ITGB3 : Integrin, Beta-3

ITIH4 : Alfa-tripsin inhibitörü ağır zincir H4

IGV : Integrative Genomics Viewer

IVA : Ingenuity Variant Analysis

KLKB1 : Kallikrein B, Plasma 1

LB : Olası İyi Huylu (Likely Benign)

LHCGR : Luteinizing Hormone/Choriogonadoptropin Receptor

LP : Olası Patojenik (Likely Pathogenic)

LRR : Lösince zengin tekrarlar (Leucine rich Repeat)

MAF : Minor Allel Frekansı

MHC : Major Histo-Uyumluluk Kompleksi

MTHFR : 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase

MTR : 5-Methyltetrahydrofolate-homocysteine S-Methyltransferase

MTRR : Methionine Synthase Reductase

NAD : Nikotinamid adenin dinükleotit

NaOH : Sodyum Hidroksit

NGS : Next Generation Sequencing (Yeni Nesil Dizileme)

NK : Doğal Öldürücü (Natural Killer)

NLRP7 : NLR Family, Pyrin Domain-Containing 7

P : Patojenik

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PGH : Primordial Germ Hücreleri

PLAT : Plasminogen Activator, Tissue

PLAUR : Plasminogen Activator Receptor, Urokinase-Type

PLG : Plasminogen

PROC : Protein C

PROCR : Protein C Receptor

PROS1 : Protein S

QCI : Qiagen Clinical Insight

rRNA : Ribozomal RNA

RT PCR : Real Time PCR (Eş Zamanlı PCR)

SERPINC1 : Serpin Peptidase Inhibitor, Clade C (Antithrombin), Member 1

SERPINE1 : Serpin Peptidase Inhibitor, Clade E (Nexin, Plasminogen Activator Inhibitor Type 1), Member 1

SERPINF1 : Serpin Peptidase Inhibitor, Clade F, Member 1

TFP1 : Tissue Factor Pathway Inhibitor

TGK : Tekrarlayan Gebelik Kaybı

THBD : Thrombomodulin

TÜBAP : Trakya Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi

VUS : Klinik Önemi Belirsiz (Variants of Uncertain Significance)

VWF : von Willebrand faktörü

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Dişi üreme sistemi diyagramı 6
Şekil 2.2. Gonada ulaşan PGH'lerinin zamana bağlı sayısal değişimi 7
Şekil 2.3. Oogenez 9
Şekil 2.4. Fertilizasyon 10
Şekil 2.5. TGK etiyolojik faktörleri 13
Şekil 2.6. Translokasyon çeşitleri 17
Şekil 2.7. Alternatif, bitişik-1 ve bitişik-2 ayrılma sonucunda oluşan gametler 18
Şekil 2.8. TGK'ya neden olan karyotip sonuçları, translokasyon örnekleri 19
Şekil 2.9. Dizileme teknolojileri kronolojik gelişimi 30
Şekil 2.10. Sanger sekans yöntemi iş akış basamakları 31
Şekil 3.1. Qiaseq Targeted DNA Custom Panel basamakları 40
Şekil 3.2. Qiaseq hedefli DNA panel yönteminin iş akışı 40
Şekil 3.3. NextSeq 500 yükleme kartuşu 48
Şekil 3.4. NextSeq 550 sistemi 48
Şekil 3.5. Biyoinformatik analiz basamakları 50
Şekil 3.6. Varyant filtrelemesi 51
Şekil 4.1. H1 numaralı hastanın IGV görüntüleri 60
Şekil 4.2. H3 numaralı hastanın IGV görüntüsü 63
Şekil 4.3. H5 numaralı hastanın IGV görüntüleri 64
Şekil 4.4. H6 numaralı hastanın IGV görüntüleri 65
Şekil 4.5. H9 numaralı hastanın IGV görüntüleri 66
Şekil 4.6. H11 numaralı hastanın IGV görüntüsü 67
Şekil 4.7. H13 numaralı hastanın IGV görüntüsü 67

Şekil 4.8. H26 numaralı hastanın IGV görüntüsü 68
Şekil 4.9. H30 numaralı hastanın IGV görüntüleri 69
Şekil 4.10. H33 numaralı hastanın IGV görüntüsü 70
Şekil 4.11. H37 numaralı hastanın IGV görüntüsü 70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. 2013 yılı Türkiye'deki gebelik kayıplarının yüzde dağılımları 12

Çizelge 2.2. Patojenik varyantların ACMG-15 kriterlerine göre sınıflandırılması..... 33

Çizelge 2.3. İyi huylu varyantların ACMG-15 kriterlerine göre sınıflandırılması 34

Çizelge 3.1. Kullanılan sarf malzemeler 37

Çizelge 3.2. Kullanılan cihazlar 38

Çizelge 3.3. DNA fragmentasyon PCR miksi komponent ve hacimleri 41

Çizelge 3.4. DNA fragmentasyon PCR koşulları 41

Çizelge 3.5. UMI ve indeksleme PCR miksi komponent ve hacimleri 42

Çizelge 3.6. Hedef zenginleştirme reaksiyon miksi komponent ve hacimleri 43

Çizelge 3.7. Hedef zenginleştirme PCR koşulları..... 44

Çizelge 3.8. Universal PCR amplifikasyon miksi komponent ve hacimleri 45

Çizelge 3.9. Universal Amplifikasyon PCR koşulları 45

Çizelge 3.10. SYBR Green PCR miksi bileşenleri ve hacimleri 46

Çizelge 3.11. Real-Time PCR koşulları 47

Çizelge 4.1. Hastaların gebelik kaybı sayıları ve yaşları 54

Çizelge 4.2. Saptanan varyantların dbSNP referans SNP (rs) kayıtları, ClinVar verileri, in siliko tahmin araçları analiz sonuçları ve ACMG-15 patojenite skorları 56

Çizelge 4.3. Çalışmada varyant saptanan genlerin OMIM verileri..... 60

BÖLÜM 1

GİRİŞ VE AMAÇ

Üreme çağındaki kadınların yaklaşık %20'sinin bir, %5'inin ise iki ya da daha fazla sayıda düşük yaptığı bildirilmiştir (Deniz, Baykuş ve Kavak, 2016). Gebelik kaybının ardışık olarak meydana gelen iki ya da daha fazla sayıda gebeliğin istemsiz olarak 20. haftadan önce ve 500 gramın altında embriyo veya fetüsün bir kısmının veya tamamının uterin boşluktan dışarı atılarak sonlanması durumu "tekrarlayan gebelik kaybı" olarak tanımlanmaktadır (Chakraborty vd., 2013). Gebelikte 12. hafta ve öncesinde olan kayıplar erken düşük, 12 ve 20. hafta arasında gerçekleşen kayıplar ise geç düşük olarak adlandırılmaktadır (Aksin, 2017).

Üreme çağındaki kadınların yaklaşık %2'sini etkilemekte olan tekrarlayan gebelik kaybı genetik (%2-5), endokrin (%15-60), anatomik, immünolojik (%5-15), çevresel ve enfeksiyona bağlı nedenlerle ortaya çıkabilen heterojen bir etiyolojiye sahip olmakla birlikte, büyük bir bölümü hala aydınlatılamamıştır (Aksin, 2017; Chakraborty vd., 2013; Kujovich, 2004). Bu nedenle tekrarlayan gebelik kaybı olgularında mümkün tüm tarama testleri gerçekleştirilse dahi çoğunlukla belirli bir etiyolojik faktör bildirilememektedir (Deniz vd., 2016).

Çalışmamızda en az üç kuşaktır Trakya bölgesinde yaşayan, sayısal ve yapısal kromozom anomalisi ve kalıtsal trombofili panelinde Faktör II (Protrombin) ve Faktör V Leiden varyantı olmayan, 20. gebelik haftasından önce, en az ardışık iki gebelik kaybı öyküsü bulunan kadın hastalarda, yeni nesil dizi analizi (NGS) yöntemi ile tarafımızca

tasarlanan 43 geni içeren çoklu gen panelinin araştırılması hedeflenmiştir. Çoklu gen paneline, literatürde tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkili olduğu veya olabileceği öngörülen, *ACE* (Angiotensin I-Converting Enzyme), *CBS* (Cystathionine Beta-Synthase), *CPB2* (Carboxypeptidase B2), *CCDC39* (Ciliary Dyskinesia), *CHD7* (Chromodomain Helicase DNA-Binding Protein 7), *DNAH1* (Dynein, Axonemal, Heavy Chain 1), *LHCGR* (Luteinizing Hormone/Choriogonadoptropin Receptor), *NLRP7* (NLR Family, Pyrin Domain-Containing 7), *F10* (Coagulation Factor X), *F11* (Coagulation Factor XI), *F12* (Coagulation Factor XII), *F13A1* (Factor XIII, A1 Subunit), *F13B* (Factor XIII, B Subunit), *F2R* (Coagulation Factor II Receptor), *F3* (Coagulation Factor III), *F7* (Coagulation Factor VII*), F8* (Coagulation Factor VIII), *F9* (CoagulationFactor IX), *FGA* (Fibrinogen, A Alpha Polypeptide), *FGB* (Fibrinogen, B Beta Polypeptide), *GP1BA* (GlycoproteinIb, Platelet, Alpha Polypeptide*), GP1BB* (GlycoproteinIb, Platelet, Beta Polypeptide), *GP5* (Glycoprotein V, Platelet), *GP9* (Glycoprotein IX, Platelet), *ITGA2* (Integrin, Alpha-2), *ITGB3* (Integrin, Beta-3), *KLKB1* (Kallikrein B, Plasma 1), *MTHFR* (5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase), *MTR (*5-Methyltetrahydrofolate-homocysteine S-Methyltransferase), *MTRR (*Methionine Synthase Reductase), *PLAT* (Plasminogen Activator, Tissue), *PLAUR (*Plasminogen Activator Receptor, Urokinase-Type), *PLG* (Plasminogen), *PROCR* (Protein C Receptor), *SERPINE1* (Serpin PeptidaseInhibitor, Clade E (Nexin, Plasminogen Activator Inhibitor Type 1), Member 1), *SERPINF1* (Serpin PeptidaseInhibitor, Clade F, Member 1), *TFPI* (Tissue Factor Pathway Inhibitor), *THBD* (Thrombomodulin), *F2* (Coagulation Factor II), *F5* (Coagulation Factor V), *PROC* (Protein C), *PROS1* (Protein S), *SERPINC1* (Serpin Peptidase Inhibitor, Clade C (Antithrombin), Member 1) genleri dâhil edildi.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Dişi Üreme Organları

Dişilerde genital organlar dış ve iç genital organları olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır ve bu organlar over hormonları östrojen ve progesteronun etkisi ile gelişmekte ve olgunlaşmaktadır.

2.1.1. Dış Genital Organlar

Dış genital organlar ve yapıları; mons pubis, labia major, labia minör, klitoris, vestibüler ampüller, Bartholin bezleri, vulva vestibül, Skene bezleri, üretra ve vajinal açıklıktan oluşmaktadır (Hoare ve Khan, 2021). Perinenin sahip olduğu kaslarla ve fasiyalarla desteklenen dış genital organlar vulvada yerleşik bulunmakta ve gebelik oluşumu için spermin geçişine izin vermektedir. Bunun yanı sıra enfeksiyon ajanlarına karşı bariyer oluşturmakta ve içeriye geçişlerini engellemektedir.

Mons pubis, kasık kemiği üzerinde yer alan, kasık saç çizgisinden klitorise kadar uzanan, yağ dokudan oluşan deriyle sarılı alandır. Mons pubis, cinsel birleşme esnasında destek görevi görmekle birlikte, feromon salgılayan yağ bezleri sayesinde cinsel çekiciliği uyarmaktadır (Hoare ve Khan, 2021).

Labia major yapılar (büyük dudaklar), vulval yarıkların lateral sınırlarını belirleyen, belirgin cilt kıvrımlarıdır. Labia minor yapılar (küçük dudaklar) ise klitoris ile başlayıp aşağı doğru devam eden kıvrımlardır. Cinsel uyarılma ile labia major ve labia minorun kan ile dolduğu bilinmektedir (Hoare ve Khan, 2021).

Klitoris, erkeklerde penise karşılık gelmektedir ve kadınlarda duyu organı olarak tanımlanmaktadır. Genel olarak glans klitoris ve klitoris gövdesi olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Korpuska vernöz, klitorisin altındaki doku, glans klitoris ile birleşmiş ve vulva dışına çıkıntılı kıvrımlar yapan erektil dokudur. Glans klitoris yaklaşık sekiz bin sinir tarafından innerve edildiği düşünülmekte ve perfüzyonu birçok kan damarı ile sağlanmaktadır (Hoare ve Khan, 2021).

Vestibüler ampuller yine erkeklerdeki penis ampulüne denk gelen, Korpus spongiozum olarak adlandırılan dokudan oluşan, klitoris ile yakın ilişki gösteren erektil bir doku türüdür. Vestibüler ampuller, klitorisin mediyal kenarından üretra ve vajinaya uzanmakta, daha sonra ayrışarak yine üretra ve vajinanın lateral sınırlarını belirlemektedir (Hoare ve Khan, 2021).

Vulva vestibülleri, klitorisin alt kısmı ile başlayan ve labia minorun arka kısmında biten pürüzsüz alandır. Vulva vestibülleri üretra ve vajinal açıklığın girişini içermektedir ve sınırları labia minor kenarları ile belirlenmiştir (Hoare ve Khan, 2021).

Bartholin bezleri (büyük vestibüler bezler), vajinal açıklığın arkası ve lateral uzantısında yerleşik iki bezdir. Bartholin bezinin fonksiyonu labia minor sınırlarına ve vajinaya mukus benzeri bir madde salgılayarak, vajinal lubrikasyonu sağlamaktır (Hoare ve Khan, 2021).

Skene’s bezleri (küçük vestibüler bezler), erkeklerdeki prostat bezlerine homologdur ve üretranın iki yanında yerleşik bulunmaktadır. Bu bezlerin fonksiyonu tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, Hoare ve Khan (2021), vajinal lubrikasyon ve antimikrobiyal idrar yolu enfeksiyonlarını önlemek için, Bartholin bezleri gibi bir madde salgıladığı düşüncesinden bahsetmektedir. Üretra, idrarın dışarı atılmasını sağlayan uzantıdır. Kadınlarda klitorisin hemen altında bulunmakta ve vajina açıklığının üstündeki vulva vestibülüne açılmaktadır.

Vajina, servikse bağlı kaslı ve esnek, uzunluğu 6 ila 8 santimetre arasında değişen fibromüsküler bir kanaldır. Vajinanın distal açıklığı hymen adı verilen ince bir zar ile

tamamen örtülüdür. Vajina cinsel birleşme sırasında spermin toplanmasını sağlayan hazne görevi görmektedir. Aynı zamanda vajina menstural döngüdeki kanamaların çıkış yoludur (Hoare ve Khan, 2021).

2.1.2. İç Genital Organlar

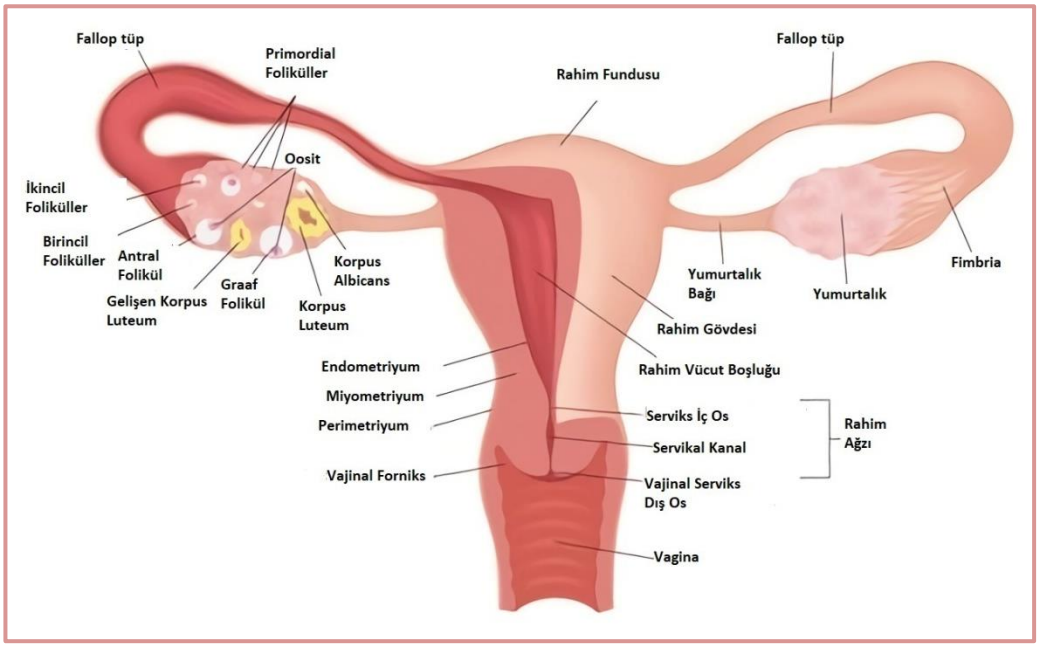
İç genital organları vagina, serviks, uterus, fallop kanalları, endometrium boşluğu, yumurtalıklardan oluşmakta ve döllenmiş yumurtayı taşıyacak ve doğum olayının gerçekleşmesine imkân tanıyacak şekilde pelvik kavitede yerleşik bulunmaktadır.

Vulva ile serviks arasında uzanan fibromüsküler tübüler yapıya vajina denmektedir (Graziottin ve Gambini, 2015). Vajina duvarlarında, genişleme ve esneme işlevleri için epitelyal katman mevcuttur (Yavagal, Farias, Medina ve Takacs, 2011). Vajinal duvar üç katmana ayrılmaktadır; 1) İç mukozal katman (Tunica Mucosa), 2) Orta kas tabakası (Tunica Muscularis) ve 3) Dış adventisyal katman. İç mukozal katman; lamina propria olarak bilinen bağ dokusuna gömülü şekilde, yüksek derecede zengin vasküler bağ dokusu üzerinde ve keratinize olmayan çok katlı bir epiteldir. Orta kas tabakası; uzunlamasına dış ve iç dairesel düz kas tabakasından oluşmaktadır. Son katman ise kollajen ve elastinden meydana gelmektedir (Yavagal vd., 2011).

Uterus, mesane ve rektum arasında konumlanmış, isthmus ile ayrılmış üst fibromüsküler gövde ve alt serviksten oluşan bir organdır (Yavagal vd., 2011). Uterus boşluğu alt tarafta vajina ile üst tarafta ise fallop tüpleri ile bağlantılıdır. Uterus yaşamın çeşitli evrelerinde şekil, boyut gibi anatomik ve fonksiyonel özellikleri bakımından farklılıklar göstermekte ve ilişkili değişiklikleri düzenlemektedir (Graziottin ve Gambini, 2015).

Fallop tüpleri, uterusun üst ucundan yumurtalıklara kadar uzanan, 1-interstisyel, 2-istmik, 3-ampullar ve 4-fimbriainfundibulumoluşan, siliyer kolumnar epitelyum ile kaplı tübüler yapılardır (Graziottin ve Gambini, 2015; Yavagal vd., 2011). Döllenme fallop tüplerinin dış 1/3'lük kısmında gerçekleşmektedir. Fallop duvarı seröz peritoneal, orta kaslı ve sütunlu, siliyer epitelli iç mukus tabakasından oluşmaktadır. Mukus tabaka barındırdığı silyer ve kas tabakasının hareketleri sayesinde döllenmiş yumurtayı uterus boşluğuna taşımaktadır.

Yumurtalıklar pelvisin yan duvarında yer alan, oval şeklindeki organdır. Uterus utero-ovarian ligament ile bağlanmaktadır. Her yumurtalık iç medulla ve foliküller stromadan oluşan dış kortekse sahiptir. Yumurtalık yüzeyi Waldeyer germinal epiteli ile kaplıdır ve altında korteks ile stromada konumlanmıştır. Ovaryumun medullasına doğru çok sayıda damar ile sarılmış diğer büyük olgun foliküller mevcuttur ve bunlar östradiol üretimini gerçekleştirmektedir. Yumurtalama sonrasında korpus luteum yeni bir döllenme gerçekleşmedikçe progesteron üretimi yapmaktadır. Aynı zamanda yumurtalığın iç kısmında bulunan leydig hücreleri, kadınlardaki testosteron, dehidroepiandrosteron ve androstenedion üretiminden sorumludur (Graziottin ve Gambini, 2015).



Şekil 2.1. Dişi üreme sistemi diyagramı

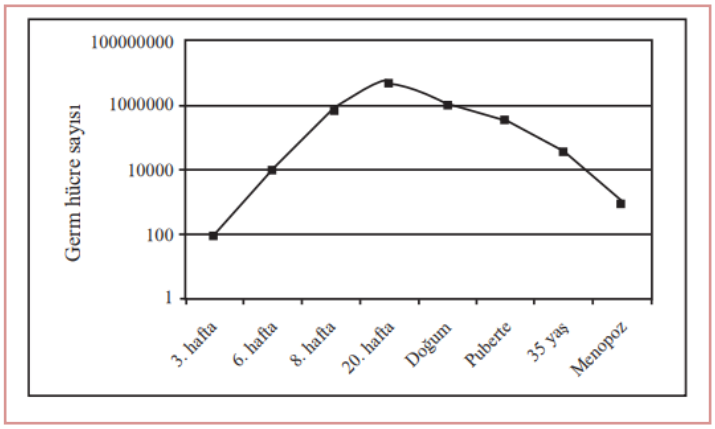
2.2. Gametogenez ve Fertilizasyon

Erkek ve dişi germ hücrelerinden gamet oluşumuna gametogenez denmektedir. Bu süreç erkek ve dişilerde farklı ilerlemektedir ve erkek için gamet oluşumuna spermatogenez, dişiler için ise "oogenez" adı verilmektedir. Spermatozoon ve oositin birleşmesi sonucu diploid hücrede zigot oluşumu, fertilizasyon (döllenme) olarak tanımlanmaktadır.

2.2.1. Oogenez

Eşey hücreleri gonad olarak adlandırılan eşey organlarında üretilmektedir. Dişi eşey hücreleri ovaryumlarda (yumurtalıklarda) oluşmaktadır ve bu sürece oogenez denmektedir. Oogenez, dişinin fetüs gelişiminden itibaren başlayan bir süreçtir, ardından duraksama gösterir ve ergenlik dönemi (puberte) ile menopoz dönemi arasında periyodik olarak devam eder.

Oositlerin temel öncüleri olarak bilinen primordial germ hücreleri (PGH) çeşitli moleküler sinyaller sonucunda gelişmekte ve yanıt olarak epiblast germ hücre fonksiyonlarını kazanmaktadır (Öktem ve Urman, 2011). PGH'leri gonada ulaştığında mitoz bölünme hızı ve sayısı artmaktadır (Şekil 2.2). 20. haftada en yüksek germ hücre sayısına ulaşmakta ve 28. haftada mitoz azalarak sonlanmaktadır. Germ hücre sayısı yeni doğan bireyde bir milyon; ergenlik dönemindeki bir bireyde ise yaklaşık 350.000-400.00'dir ve kalan hücrelerin sadece %1'i ovülasyona katılmaktadır (Gedikli, Özbek ve Demirci, 2013; Öktem ve Urman, 2011).

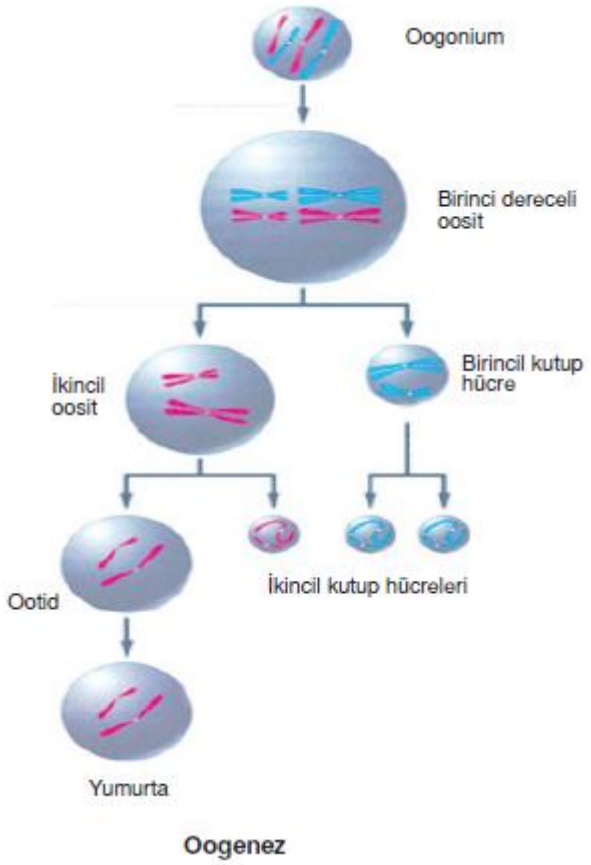


Şekil 2.2. Gonada ulaşan PGH'lerinin zamana bağlı sayısal değişimi (Öktem ve Urman, 2011)

Ovaryum içerisinde olgunlaşmamış halde bulunan oogonyumlar sürekli mitoz bölünme geçirerek çoğalmaktadır. Bu mitotik bölünme aktivitesi over rezervi ile ilişkilidir. Mayoz öncesi mitoz turu duraksayan hücre bölünmesi (inkomplet sitokinez) ve oogonialar aralarında sitoplazmik köprüler ile bağlanarak sinsisyum denen, mayoz

başlangıç sinyalinin iletimini sağlayan kitleler oluşturmaktadır (Öktem ve Urman, 2011). Çoğunlukla fetal gelişim sürecinin ilk üç ayının sonunda oogonyumlar, mayoz bölünmeye hazır formlarını yani primer oositleri oluşturmaya başlamaktadır. Primer oositler mayoz I'in profoz evresinden ergenlik dönemine kadar askıya alınmaktadır ve foliküller dişiler seksüel olgunluğa eriştiklerinde gelişmelerini tamamlamaktadır. Ancak bu foliküllerden çok azı dişi menstrual döngüsüne dâhil olarak ovüle olmaktadır.

Oositler mayoz I'i ovülasyon öncesinde tamamlamaktadır. Mayoz I sonucunda iki yeni hücre meydana gelmektedir: 1-Sekonder oosit: Bol sitoplazma içerir ve büyük yapılıdır, 2-Primer kutup hücresi: Sadece çekirdek içeren küçük bir hücredir. Ovülasyon sırasında mayoz II bölünmesi başlamaktadır ve metafaz evresine kadar sürmektedir. Metafazda duraklayan bölünme, sadece döllenme gerçekleşirse devam ederek mayoz II tamamlanmaktadır. Sekonder oosit mayoz bölünmesini tamamladığında bol miktarda sitoplazma içeren oosit ve daha az miktarda sitoplazma bulunduran küçük bir sekonder kutup hücresi oluşmaktadır. Sekonder oosit gibi, primer kutup hücreleri de mayoz geçirebilmekte ve iki sekonder kutup hücresi oluşturabilmektedir. Ancak sitoplazmanın dengeli dağılımı söz konusu olmadığından mayoz II sonunda oosit haricindeki sekonder kutup hücrelerinin her biri eriyerek kaybolmaktadır. Oositler ise farklılaşarak olgun ovumu (olgun yumurta) oluşturmaktadır.



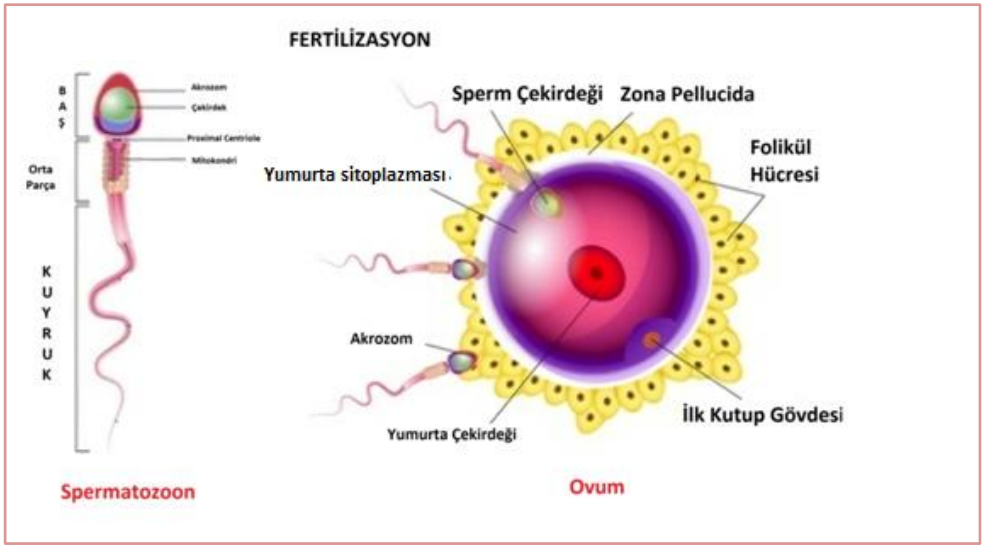
Şekil 2.3. Oogenez: Fetal dönem ile başlamaktadır. Puberte döneme kadar duraksama yaşanmakta ve puberte ile yeniden süreç işlemektedir. Menopoz evresine kadar periyodik olarak devam etmektedir.

2.2.2. Fertilizasyon

Fertilizasyon; sperm ve oositin fallop tüpü içerisinde bir dizi karmaşık etkileşim ile bir araya geldiği üremenin en temel biyolojik basamağıdır. Sperm ve yumurtanın birleşmesi birbirini takip eden, hücresel tanıma, hücresel enzim katalizli modifikasyonlar, hücre içi ve hücre arası membran füzyonları gibi çeşitli adımlardan oluşmaktadır.

Cinsel birleşme sonrası yaklaşık 300 milyon sperm vücut içerisine girmektedir. Bu spermlerden çoğu asidik ortamın etkisi ile ölürken, diğerleri kendilerini çevreleyen bir sıvı içerisindeki koruyucu elemanlar ile hayatta kalabilmektedir. Hayatta kalan spermler (yaklaşık %1'i) servikal mukus yardımıyla serviks içinden geçerek genital kanala girmektedir. Spermler fallop tüpüne kadar kendi hareket yetenekleri ile ilerlemekte, daha sonra epitel hücrelerin silleri aksi yönde dalgalanma oluşturarak sürece

katılmaktadır. Fallop tüpüne varan spermler isthmus bölgesine ulaştığında hızları düşmektedir ancak oositin sahip olduğu kümülüs hücreleri tarafından salgılanan kemotaktik maddeler sayesinde spermler yeniden hareket yeteneği kazanarak ampullaya yönelmektedir. Spermlerin uterusa uzanan yolculuğunda kimyasallar nedeniyle sperm başındaki zarlar değişikliğe uğrayarak sperme hiperaktivite yeteneği kazandırmakta ve yumurtaya daha hızlı ve agresif bir hareket ile ulaşmaktadır. Semen içeriğindeki milyonlarca spermden yalnızca yüzlercesi korona radyata çevrili ikincil oosite (sekonder oosite) ulaşmaktadır (Gedikli vd., 2013). Sperm zona pellucida yüzeyinde spesifik sperm reseptörlerine bağlanmaktadır. Spermin bu dış katmanı geçmesi için akrozom reaksiyonu gerçekleşmektedir. Akrozom reaksiyonu olarak bilinen bu olay bir takım sindirim enzimlerinin tetiklenmesi ve dışarı salınması sonucunda spermin katman içine geçişine olanak tanımaktadır. Zona pellucida ve yumurta hücre zarı arasında bulunan dar ancak sıvı hacmi bol olan alana temas eden ilk sperm yumurtayı döllemek üzere yumurta hücre zarına bağlanmaktadır. Dış zarların etkileşimi ve kaynaşması sonrasında sperm yumurta içine ulaşmaktadır ve bu olayı takiben yumurta zarında birtakım değişiklikler gerçekleşmektedir. Bu değişikliklerden biri de diğer spermlerin yumurtadan uzak kalmasını sağlayan kimyasalların üretilmesi sonucu zarın geçirgenliğinin ortadan kaldırmasıdır.



Şekil 2.4. Fertilizasyon

2.3. Tekrarlayan Gebelik Kaybı

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) tanımına göre gebelik kaybı (düşük); "28. gebelik haftasından önce ölen bebek" olarak tanımlanmaktadır. Anne-çocuk sağlığı ile ilgili çalışmalar gerçekleştiren March of Dimes kuruluşu kadınlardaki düşük oranını %10-15 olarak bildirmektedir (https://www.marchofdimes.org/find-support/topics/miscarriage-loss-and-grief). Gebelik kaybı bebeğin ölüm zamanına bağlı olarak geç ve erken olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Erken gebelik kaybı, gebeliğin ilk 12 haftasında meydana gelen; geç gebelik kaybı ise gebeliğin 12-28. haftaları arasında meydana gelen düşüklere denilmektedir.

Tekrarlayan gebelik kaybı ise (TGK), Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği (ESHRE) ve Amerikan Üreme Tıbbı Derneği'nin (ASRM) kılavuzlarında "Klinik olarak tanınan, ardışık olma şartı bulunmayan başarısız iki veya daha fazla gebelik" olarak tanımlanmaktadır (ASRM, 2018; ESHRE, 2018). Ancak tekrarlayan gebelik kaybının tanınabilmesi için, çalışmaların çoğunda ardışık olarak meydana gelen iki ya da daha fazla sayıda gebeliğin, istemsiz olarak 20. haftadan önce ve 500 gramın altında embriyo veya fetüsün bir kısmının veya tamamının uterin boşluktan dışarı atılarak sonlanması kriteri sunulmaktadır (Chakraborty vd., 2013).

2.3.1. Tekrarlayan Gebelik Kaybı İnsidansı

Literatürde, tekrarlayan düşükler ve spontan düşükler ile ilgili epidemiyolojik çalışmalar farklı şekillerde sunulmaktadır (Cramer, Lauren ve Wise, 2000). Ancak çoğunlukla popülasyonlar arası çeşitli prevalans oranları görüldüğünden, çalışmalar etnik kökene dayalıdır (Şahin, Ataç, Yılmaz ve Zeyneloğlu, 2009).

TGK, üreme çağındaki kadınların yaklaşık %3-5'ini etkileyen yaygın bir sağlık sorunudur. Bildirilen etiyolojik faktörlerin haricinde, TGK öyküsü bulunan çiftlerin neredeyse yarısında herhangi bir neden belirlenememiştir (Chakraborty vd., 2013; Dimitriadis vd., 2020).

Hacettepe Üniversitesi Nüfus Etütleri Enstitüsü'nün "2013 Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması (2013 TNSA)" ana raporlarında; 2003-2013 yıllarında 100 gebeliğin 14'ünün düşükle sonuçlandığı bildirilmiştir. Aynı raporda sunulan diğer bilgiler ışığında,

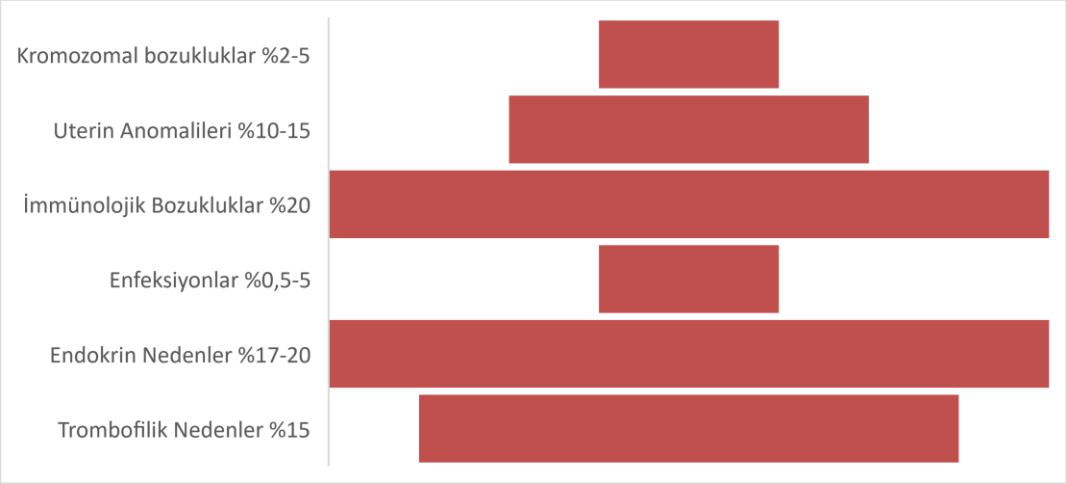
Türkiye'de, TGK yaşayan kadınların oranı Çizelge 2.1'de belirtilmiştir (Adalı, Koç ve Eryurt, 2014).

Çizelge 2.1. 2013 yılı Türkiye'deki gebelik kayıplarının yüzde dağılımları

Gebelik kaybı sayısı	Yüzde dağılımı
2	4.4
3	1.2
4	0.6
5+	0.4

2.3.2. Tekrarlayan Gebelik Kaybı Etiyolojisi

TGK, heterojen ve kompleks bir obstetrik komplikasyondur. Ebeveyn kromozomal anomalileri, maternal trombofilik bozukluklar ve uterin yapısal anomaliler gibi çok çeşitli nedenler tekrarlayan düşüklerle doğrudan ilişkiliyken, vakaların neredeyse %50'sinde patofizyoloji bilinmemektedir (Ford ve Schust, 2009). Bu nedenle açıklanamayan gebelik kayıplarının aydınlatılması için özellikle genetik nedenlerin araştırılması, hastalığın seyri ve etiyolojik etkilerinin anlaşılması için gereklidir.



Şekil 2.5. TGK etiyolojik faktörleri (Ford ve Schust, 2009)

2.3.2.1. Demografik Faktörler

Demografik faktörlerin incelenmesi için anne yaşı, etnisite ve hastalık ile ilgili soy ağacı analizleri göz önünde bulundurulmaktadır. Artan anne yaşı ile doğru oranda artış gösteren gebelik kaybı ilişkisi literatürde bildirilmiştir (Stephenson ve Kutteh, 2007). Aynı şekilde hastalığın epidemiyolojisi incelenirken sıklıkla popülasyon çalışmalarına başvurulduğu, aynı etnik kökene sahip bireyler arasında yapılan çalışma sonuçları ile verimli çıkarımlar yapıldığı bildirilmektedir (Cramer vd., 2000).

2.3.2.2. Endokrin Faktörler

Over disfonksiyonu, luteal faz defekti, hipotiroidi, hiperinsülinemi, androjen hormonlarının aşırılığı gibi hormonal bozuklukluklardan kaynaklanan hastalıklar düşük riskini attırmaktadır. Bağlı olarak TGK ile ilişkilendirilen bu hastalıklar, tanıda yardımcı olmakta ve tedavi için izlenmesi gereken yolları belirlemektedir. Bilinen bu endokrin faktörlere ek olarak gebelik kaybı yaşamış kadınlarda vitamin D düşüklüğü saptanmış ancak referans aralığa taşındığı takdirde doğum veya gebeliğin devamının sağlanması üzerinde tam bir etki kanıtlanmamıştır (Berkay ve Başaran, 2021; Gonçalves, Braga, Braga ve Marinho, 2018).

2.3.2.3. Anatomik Faktörler

Klinik olarak TGK tanısı almış çiftlerin yaklaşık %15'lik bir dilimi anatomik anormalikler nedeniyle gebelik kaybı yaşamaktadır. Anatomik faktörler Müllerian sistem bozukluklukları veya intrauterin yapışıklıklar, servikal yetmezlik, uterin leimyomları ve polipleri dahil olmak üzere geniş bir edinsel anomali grubunu içermektedir (Wold, Pham ve Arıcı, 2006). Temelde anatomik bozuklukların plasentasyonun yetersiz veya normal olmaması durumunu doğurmasına bağlı olarak düşüklerle sonuçlandığı düşünülmektedir (Ford ve Schust, 2009).

2.3.2.4. İmmünolojik Faktörler

Gebelik olayı fetüs ve anne arasındaki farklılıklara rağmen, anne vücudunun fetüsü yabancı olarak tanımadığı ve gelişimine izin verdiği sürece devam etmektedir. Annenin, fetüsün oluşmaya başladığı ilk andan, son anına kadar çeşitli immünolojik mekanizmalarla koruduğu kabul gören bir düşüncedir. Bu nedenle annenin yaşayacağı immünolojik aksaklıkların TGK ile ilişkili olduğu öngörülmektedir. Araştırmacıların da etiyolojik faktörlerin açıklanması açısından oldukça ilgi gösterdiği immünolojik faktörler için halen daha tanısal çalışma ve tedavi alanında ortak bir fikir kabul edilmemiştir (Gonçalves vd., 2018).

İmmünolojik bozukluklar arasında yer alan antifosfolipid sendromu (APS), TGK ile doğrudan ilişkilendirilen kötü obstetrik sonuçlar nedeniyle tanı ve tedavide takibe alınmalıdır (Vomstein vd., 2021). APS'nun %3-5 prevalans oranı ile trombofili için risk faktörü olduğu düşünüldüğünde; bir klinik ve bir laboratuvar kriteri ile tanı alması uygun görülmektedir:

- Klinik: Bir veya daha fazla tanı konulmuş vasküler tromboz epizodu ya da üç veya daha fazla ardışık gebelik kaybı bulunan komplikasyonlarda;
- Laboratuvar: Orta-yüksek seviyede seyreden IgG ve IgM antikorlarının pozitif plazma düzeyleri veya lupusantikoagülan pozitif plazma düzeyleri (Ford ve Schust, 2009).

TGK öyküsü bulunan çiftlerde insan lökosit antijeni (human leucocyte antigen, HLA) ile ilgili çalışmalar, farklı etki mekanizmaları olduğu düşünüldüğünden üç ana grupta gerçekleştirilmiştir;

1) TGK öyküsü olan çiftlerde HLA allel uyumluluğu çalışmaları,

2) TGK öyküsü bulunan kadınlarda HLA allel prevalans çalışmaları ve

3) TGK öyküsü olan çiftlerde HLA-C ve HLA-G allel çalışmaları.

HLA-C ve HLA-G, trofoblast üzerinde eksprese olan tek HLA genleridir ve HLA-G'nin sağlıklı gebelik için önemli olan sınırlı protein değişikliğine sahip olduğu bilinmektedir. Açıklanamayan TGK şikâyeti olan hastaların çoğunda, sitokin ve HLA gen varyasyonlarının etkili olduğu düşünülmektedir. Gebelikte HLA ve NK hücrelerindeki artış çok belirgindir ve bu unsurların gebeliğin oluşumunda da önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Annenin immünolojik sisteminin fetüsün gelişimine ve büyümesine izin vermesi için, sitokin ve bağışıklık hücrelerin doğru işlemesi büyük önem taşımaktadır. Buna bağlı olarak, bu yollarda oluşabilecek bozukluklar, gebeliğin ilerlemesine de engel teşkil edebilir. Bu gibi sebepler nedeniyle fetüsün reddedilmemesi için arka planda özel mekanizmalar çalışmaktadır. Major Histo-Uyumluluk Kompleksi (MHC) antijenlerinin, fetal trafoblast hücrelerinde ekprese edilmesi bu mekanizmalara örnek olarak verilebilir (Cecati, Giannubilo, Emanuelli, Tranquilli ve Saccucci, 2011; ESHRE, 2018; Yazdani vd., 2018).

2.3.2.5. Çevresel Faktörler

Alkol, günde >300 mg kafein ve sigara kullanımından; ağır kimyasallara maruziyete kadar uzanan bir değerlendirme gerektirmektedir.

2.3.2.6. Enfeksiyonlar

Enfeksiyonların (*listeria monocytogenes*, kızamıkçık, Herpes simpleks virüsü, Toxoplasma gondi, koksaki vb.) spontan düşük üzerinde rol oynadığı bilinmektedir (Berkay ve Başaran, 2021). Ancak enfeksiyöz ajanların TGK ile ilişkisi net olarak

bilinmemektedir ve etiyolojik faktörler arasında en seyrek (%0,5-5) gözlenen nedendir (Ford vd., 2009).

2.3.2.7. Genetik Faktörler

2.3.2.7.1. Kromozom Anomalileri

Kromozomal anomaliler, sporadik erken gebelik kayıplarının en sık nedeni olmakla birlikte, TGK'nın da önemli bir bölümünden sorumludurlar (Ocak, Özlü ve Özyurt, 2013). Temel olarak kromozom anomalileri; anöploidiler, inversiyonlar, translokasyonlar ve mozaikliği kapsamaktadır (Ford vd., 2009; Page ve Silver, 2016; Ward vd., 2000). Sitogenetik testler, TGK'nın genetik etiyolojisini tam anlamıyla açıklayamamaktadır. Ancak floresan in situ hibridizayon (FISH) gibi gelişen tekniklerle, sitogenetik analizlerdeki sınırlar ortadan kalmakta ve spontan ve tekrarlayan düşüklerdeki anöploidilerin rollerini daha iyi anlaşılmaktadır (Ward vd., 2000). Yapılan çalışmalar göstermektedir ki, erken gebelik kayıplarında genetik anomali saptama riski daha yüksektir (Page ve Silver, 2016). Kromozom anomalileri, birinci trimester spontan düşüklerin minimum %50'sinden, ikinci trimester spontan düşüklerin %5-10'undan sorumludur. Canlı doğumlarda ise %1'lik bir oranla sitogenetik anomaliler saptanmaktadır (Obut vd., 2011).

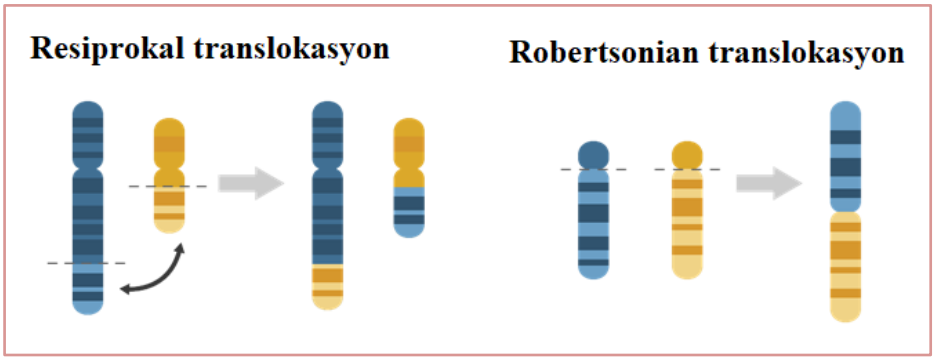
Kromozomal bozukluklar fetal kaynaklı olabildiği gibi maternal kaynaklı da olabilir. Literatürde fetal anomalilerin %56'sının trizomi (en sık 13, 15, 16, 22), %20'sinin poliploidi, %18'inin X monozomisi, %4'ünün dengesiz translokasyonlar olduğu bildirilmiştir (Ökten, Güneş, Kara, Tural, Yiğit ve Taşkın, 2007).

Anöploidi: Bir hücrede normalden daha az veya daha fazla sayıda kromozom bulunması olarak tanımlanmaktadır. Anöploidinin spontan düşüklerin %50'sine neden olduğu bildirilmiş ve buna bağlı olarak TGK'daki etkisi gün geçtikçe daha da fazla tanınmaktadır (Ward, 2000).

Anöploidinin gametogenez esnasında mayotik ayrılamama (non-disjunction) ya da anafaz evresinde duraksama/geri kalma sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bir kromozom fazlalığı trizomi, bir kromozomun tamamen silinmesi/kaybolması monozomi olarak bilinmektedir (Karkucak, 2016; Page ve Silver, 2016; Ward, 2000). Monozomi

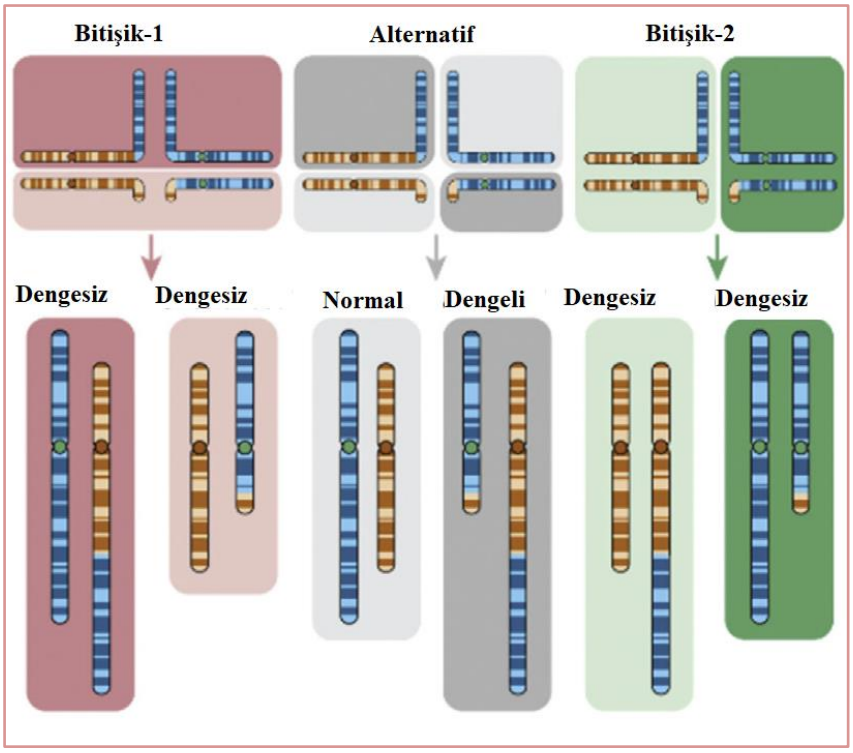
gebeliğin erken dönemlerinde neredeyse her zaman ölümle, trizomik sendromlar (down sendromu gibi) ise bazen doğumla sonuçlanmaktadır. Trizomi kaynaklı anöploidi vakalarında artan anne yaşı bilinen bir risk faktörüdür (Page ve Silver, 2016). Rubio vd. (2003) çalışmalarında, tüp bebek tedavisi uygulanan ve TGK öyküsü olan çiftlerde, aynı yaştaki kontrol grubuna kıyasla, daha fazla anormal embriyo oluşumuna sahip olduklarını göstermiştir (Rubio, Simon, Vidal, Rodrigo, Pehlivan, Remohi ve Pellicer, 2003).

Yapısal Kromozom Anomalileri (Translokasyonlar, İnversiyonlar ve Diğer Yeniden Düzenlenmeler): TGK'na neden olan en yaygın yapısal kromozomal anomali, translokasyonlardır. Translokasyonlar, iki kromozom arasındaki parça değişimi olarak tanımlanmaktadır: Karşılıklı parça değişimleri, resiprokal translokasyon, akrosentrik kromozomlar (13, 14, 15, 21, 22 numaralı kromozomlar) arasındaki translokasyonlar, Robertsonian translokasyon olarak adlandırılmaktadır.



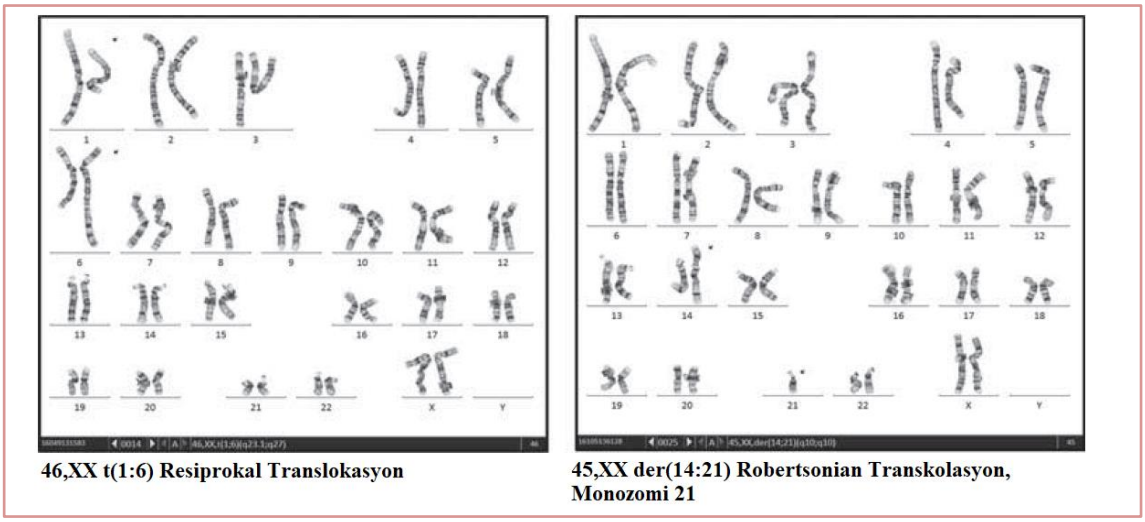
Şekil 2.6. Translokasyon çeşitleri

Resiprokal translokasyon taşıyıcılarında, kromozomda kazanç ya da kayıp olmadığı ve kritik öneme sahip bir geni içermediği sürece, normal fenotip gözlenmektedir. Taşıyıcı bireylerde mayoz esnasındaki bölünmeye bağlı olarak [alternatif, bitişik-I (adjacent-I), bitişik-II (adjacent-II)], normal, dengeli ya da dengesiz gametler oluşabilmektedir. Dengesiz gametlerin ortaya çıkması sonucunda hastanın TGK riski artmaktadır (Kaser, 2018; Nussbaum R. L., McInnes R. R. ve Willard H. F. 2019; 2016).



Şekil 2.7. Alternatif, bitişik-1 ve bitişik-2 ayrılma sonucunda oluşan gametler (Kaser, 2018).

Robertsonian translokasyonlar iki akrosentrik kromozomun (13, 14, 15, 21, 22) sentromere yakın bir noktadan kopması ve yeniden sentrik birleşme ile yeni bir metasentrik kromozom oluşturması olarak tanımlanmaktadır (https://tr.wikipedia.org/wiki/Translokasyon). Kısa kollar ise ayrı bir türev için birleşmekte, ancak takip eden bölünmeler ile kaybolmaktadır. Robertsonian translokasyon taşıyıcılarında da benzer şekilde tipik ayrılma kalıpları sonucunda dengeli veya dengesiz gametler oluşabilmektedir. Fakat literatür değerlendirmeleri göstermektedir ki, dengesiz bir gamet oluşumunu etkileyen önemli bir faktör translokasyon taşıyıcısının hangi ebeveyn kaynaklı olduğudur. Yapılan bir çalışmada, TGK şikâyeti olan çiftler için sitogenetik testler yapılmış ve Robertsonian translokasyonlar için segregasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Kromozom 21 içeren anomali durumlarında (13q21, 14q21q, 15q21q, 21q22q) taşıyıcı anne ise, dengesiz gamet oluşum riskinin %10 ila %15 arasında arttığı rapor edilmiştir (Boue ve Gallano, 1984; Kaser, 2018).



Şekil 2.8. TGK'ya neden olan karyotip sonuçları, translokasyon örnekleri (Page ve Silver 2016).

İnversiyonlar, kromozom üzerindeki bir parçanın koptuktan sonra 180˚ dönerek eski yerine tekrar yerleşmesi olarak bilinmektedir. Parçanın sentromeri içermesi durumunda "perisentrik", içermemesi halinde "parasentrik" olarak adlandırılmaktadır (https://tr.wikipedia.org/wiki/%C4%B0nversiyon). İnversiyonlar, translokasyonlara göre daha nadir gözlenmekle birlikte; yeniden düzenlemenin gerçekleştiği lokasyona bağlı olarak dengeli veya dengesiz gametler ile sonuçlanabilmektedir. Parasentrik inversiyonlar sonucunda oluşan yeniden düzenlemeler ciddi anomali ve spontan düşüklere neden olabilir. Ayrıca, perisentrik inversiyonlara göre dengesiz gametlerle daha sık sonuçlanmaktadır (Page ve Silver, 2016; Ward, 2000). Parasentrik inversiyon sonucunda oluşan dengesiz gamet, asentrik ya da disentrik olacağından, canlılık söz konusu olmamaktadır. Perisentrik inversiyon sebepli dengesiz gametler ise kısmi monozomi veya kısmi trizomi ile sonuçlanacağından canlılık gerçekleşebilmektedir (Kaser, 2018; Page ve Silver, 2016).

Diğer yapısal kromozom anomalileri (ring kromozomlar, insersiyonlar) nispeten daha nadir olsa da TGK hastalarında saptanmaktadır. Kaser'in TGK'nın genetik etiyolojisini incelediği ve kromozom anomalilerine yer verdiği çalışmasında, (Stephenson, Awartani ve Robinson'dan aktaran Kaser, 2018) bu olgu çalışması sonuçlarında TGK öyküsü olan 51 kromozom anomalili çiftin 1/51'inde ring kromozom, 3/51'inde ise insersiyon saptadıklarına yer vermiştir. (Kaser, 2018). Ring kromozomlar

ile ilgili çalışmalar vaka raporları ile literatürde yer almakta ancak TGK ile ilişkisini aydınlatmak için yeterli veri bulunmamaktadır (Kaser, 2018; Ward, 2000).

Çarpık X İnaktivasyonu (Skewed X İnaktivasyonu): Kadınlarda belli bir hücrede bulunan X kromozomlarından bir tanesi veya bir kısmı (X inaktivasyonundan kaçan bölgeler hariç) embriyonik dönemde inaktive edilmektedir. Genellikle rastgele gerçekleşen bu olay sonucunda iki X kromozomunun her biri, hücrelerin yarısında inaktif hale gelmektedir. Çarpık X inaktivasyonu, X kromozomlarından birinin diğerine tercih edilerek inaktive edilmesi olarak tanımlanabilir (Hogge, Prosen, Lanasa, Huber ve Reeves, 2007). Çarpık X inaktivasyonu iki X kromozomundan rastgele birinin seçilmesi ile gerçekleştiğinden, inaktive edilmeyen kromozom anormal gen/genler içeriyorsa klinik olarak hastalık gözlendiği bilinmektedir. TGK ile çarpık X inaktivasyonu iki nedenle ilişkilendirilmiştir:

1. İnaktive edilmemiş kromozom üzerinde hemizigot bir mutasyonun ekpresyonu sonucunda gerçekleşebilmektedir. Ancak bu fikri destekleyen yeterli sayıda bilgi bulunmamakta ve insan gebeliğinde henüz kanıtlanmamıştır.
2. X inaktivasyonu sırasında azalan embriyonik hücre sayısının sonucunda, çarpık X inaktivasyonunun gerçekleştiği düşünülmektedir. Azalmış hücre sayısı aynı zamanda gebeliğin kaybına da yol açmaktadır. Bağlı olarak TGK ile doğrudan bir ilişki sunmasa da çarpık X inaktivasyonunun artan bir risk olduğu kabul edilmektedir (Hogge vd., 2007; Page ve Silver, 2016).

Sınırlı Plasental Mozaisizm: Basit bir ifade ile plasenta karyotipi ile fetüs karyotipi arasındaki tutarsızlık olarak tanımlanabilir. Sınırlı plasental mozaisizmin TGK üzerindeki etkisi maliyet ve kısıtlı değerlendirme sorunlarından dolayı kapsamlı bir şekilde araştırılmamıştır. Mikrodizin ve yeni nesil dizileme maliyetleri azaldıkça, sınırlı plasental mozaisizmin TGK üzerindeki etkisini açıklayabilmek daha mümkün hale gelecektir (Page ve Silver, 2016).

2.3.2.7.2. Trombofilik Faktörler

Edinilmiş ya da kalıtsal olabilen, kanda pıhtılaşmaya yatkınlığın artması olarak tanımlanan bir hastalıktır. Trombofiliye en sık yatkınlık yaratan Faktör V Leiden (FV Leiden), protombin (Faktör 2) ve metilen tetra hidrofolat redüktaz (MTHFR) varyasyonları olarak bildirilmiştir (Diejomaoh, 2015).

Trombofilik bozukluklar, gebelik sürecinde venöz tromboz riskini ciddi oranda arttırmaktadır. Trombofiliye yatkınlık yaratan varyasyonlar, TGK öyküsü olan kadınlarda da venöz tromboz ve pulmoner emboli riskini arttırmaktadır. Literatürde TGK'nın antifosfolipid antikor sendromu kaynaklı olduğu ve buna bağlı olarak plasental damarlardaki tromboz gelişiminin asıl sorunu oluşturduğu bildirilmiştir. Ancak, etiyolojisi heterojen olan bu hastalık için, arka planda yanlış çalışmasından kaynaklanacak farklı mekanizmaların da var olduğu öngörülmektedir. Trombofilik bozuklukların TGK öyküsü bulunan kadınlarda, normal kadınlara göre 3-8 kat artan riskle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kujovich, 2004).

Kalıtsal (Herediter) Trombofili: TGK hastalarında ciddi obstetrik bulgularla seyreden kalıtsal trombofilik faktörler (Faktör V Leiden, Protrombin, MTHFR varyasyonları, Protein C, Protein S ve antitrombin eksikliği dâhil) bildirilmiştir (ESHRE, 2018).

Faktör V Leiden varyasyonu (1691G→A); Faktör V'i aktive eden Protein C'ye karşı yanıt eksikliği (aktive Protein C direnci) ile karakterizedir. Faktör V varyantı sonucunda trombin üretiminde ve kanın pıhtılaşma eğiliminde artış olmaktadır. Heterozigot varyasyonun (%5-8) tromboz riskini 4 ila 8 kat, homozigot varyasyonun (1/1600) tromboz riskini 80 kat arttırdığı bildirilmiştir. Sunulan vaka raporlarının çoğunda, nedeni açıklanamayan TGK hastası kadınlarda FV Leiden prevalansının yaklaşık %25-30 olduğu görülmektedir (Bradley, Palomaki, Bienstock, Varga, Scott, 2012; Kujovich, 2004; Şahin vd., 2009).

Protrombin (Faktör 2, G20210A); K vitamini varlığında karaciğerde üretilen tek zincirden oluşan glikoproteindir. Protrombin molekülü, FXa-Va kompleksi ile belirli pozisyonlardan kesilerek "Protrombin Fragman 1,2" oluşturmaktadır. Bu fragman kompleksinin, trombin ve plazma protrombinin aktive edilmesinde bir belirteç olduğu bilinmektedir. Trombin; trombositleri, protein C'yi ve FV, FVIII, FXI, FXIII genlerini

aktive etmekte, aynı zamanda fibrinojenin fibrine evrilmesini katalizlemektedir. Protrombin G20210A varyantını taşıyan bireylerin protrombin seviyeleri normalden yüksek saptanmaktadır. Protrombin G20210A varyantının, gebelerdeki tromboemboli oluşumlarının %17-20'sinden sorumlu olduğu ve taşıyıcı bireylerde tromboz riskinin 2 ila 8 kat oranında arttığı bildirilmiştir (Grandone vd., 2002; Obut, 2011). ESHRE'nin yayınladığı TGK Rehberi V.2'de; Protrombin G20210A varyasyonu ile TGK arasında bir ilişki olduğu, çeşitli vaka çalışmalarına dayalı kanıtlarla sunulmaktadır (ESHRE, 2018).

Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR); MTHFR geninde 677. Pozisyonda Timinin Sitozine dönüşümü sonucu meydana gelen varyant trombofili sebebi olarak değerlendirilmektedir. MTHFR 677T>C varyantının homozigot olması durumunda, hiperhomosisteinemi riski artmaktadır. Literatürde MTHFR 677T>C varyantının TGK ile zayıf bir ilişkisi olduğu, diğer trombofilik etkenlere kıyasla çok düşük risk oluşturduğu bildirilmiştir (Obut, 2011). TGK öyküsü bulunan kadınlarda, trombofilik nedenlerin araştırılması gerekli ise MTHFR için tarama önerilmektedir (ESHRE, 2018).

Protein C, karaciğerde sentezlemekte ve K vitaminine bağlı serum proteaz inhibitörü olarak çalışmaktadır. Protein C eksikliği, farklı populasyonlarda %0,15-0,8 oranında bildirilirken, venöz tromboemboliye sahip bireylerde %3-5 oranında bildirilmiştir (Kujovich, 2014; Raziel, Kornberg ve Friedler, 2001). Protein C eksikliğine sebep olduğu bilinen yüzden fazla mutasyon bilinmektedir. Bu mutasyonların bir kısmı Tip 1 Protein C eksikliğine, bir kısmı ise Tip 2 Protein eksikliğine neden olmaktadır. Tip 1 defekti, protein katlanmasındaki sorunlara neden olurken; Tip 2 defekti ise disfonksiyonel protein C oluşumuna sebep olmaktadır (Preston, 1996; Şık, Badoğlu, Kumbasar, Bilecan ve Akpak, 2018).

Protein S, nöroblastoma, böbrek hücreleri, testis, hepatosit ve endotelyal hücrelerde sentezlenen vitamin K bağımlı bir glikoproteindir. Kalıtsal Protein S eksikliğine bağlı tromboza yatkınlık oluşmaktadır. Protein S eksikliği, Tip 1, Tip 2 ve Tip 3 olarak sınıflandırılmaktadır. Tip 1 Protein S eksikliği, en yaygın görülen tipidir. S antijenleri, serbest S proteinleri ve S protein aktivitesi azalmaktadır. Tip 2, total ve serbest S protein normal, ancak fonksiyonu bozuktur. Tip 3'te ise serbest S protein düşük seviyede seyrederken, total S protein seviyesinin normal olduğu durumdur. Gebelik ile ilişkisi, C4b-Binding Protein ile oluşturduğu kompleksle açıklanmaktadır. Protein S,

Cb4-Binding Proteine bağlanarak komplemanı düzenlemektedir. Gebelikte Cb4 düzeyi arttığından Protein S serbest seviyeleri normalden yaklaşık yarısı kadar azalmaktadır. Bağlı olarak gebelikte gözlenen bazı sorunlara yol açmaktadır (Obut, 2011).

Antitrombin III (AT III) eksikliği; Genel popülasyondaki prevalansı 1/2000-5000 olarak bildirilmiştir. Karaciğerde sentezlenen AT III, serin proteaz inhibitör ailesinin üyesidir. Kalıtsal AT III eksikliğinden etkilenen bireylerin çoğu heterozigottur. İki tip AT III eksikliği bulunmaktadır: Tip 1en sık görülen tip olup, protein seviyelerinde ciddi azalmalar görülür. Tip 2'de ise protein seviyeleri normal seyreder ancak disfonksiyonel bir aktivite söz konudur. AT III eksikliği, ölü doğum ve abortus riskinin artışı sonucu, fetal kayıplar ile ilişkilendirilmiştir. (ESHRE, 2018; Kristoffersen, Petersen, Roraas ve Sandberg, 2017; Preston vd., 1996)

2.3.2.7.3. Tek Gen Bozuklukları

Tek gen bozuklukları, TGK için risk faktörü olabildiği gibi doğrudan nedeni de olabilir. TGK ile doğrudan ilişkili olduğu bilinen veya ilişkili olabileceği öngörülen aday genler aşağıda açıklanmıştır:

***ACE* (Anjiyotensin I-Dönüştürücü Enzim):** RAS dolaşım yolunda enzim aktiviteleri ile kan hacmini, homeostazını ve basıncını kontrol etmektedir. *ACE* geni, kromozom 17q23.3'te haritalanmıştır. 16. intronunda 287 baz çifti boyutunda bir fragmanın yerleşmesi ya da silinmesi ile plazma seviyesini ve doku spesifik aktivitesini etkilediği bildirilmiştir. Genin işlevsel olarak bozulması, bir takım trombotik bozukluğu da beraberinde getireceğinden, TGK gelişiminde önemli bir rol oynadığı öngörülmektedir (Howard vd., 1990).

***CBS* (Sistatinin Beta-Sentaz):** Transsülfürasyonun geri dönüşümü olmayan ilk basamağını katalize eden sistatiyonin beta sentazın kodlanmasından sorumludur. *CBS*'de oluşacak herhangi bir defektin otozomal resesif kalıtım özelliği gösteren homosistinüri (iki tip: B6'ya yanıt veren, B6'ya duyarsız), tromboz ve hiper homosisteinemiye sebep olduğu bilinmektedir. Homosistinüri tanılı kadınlar, gebelikleri boyunca gözlem altında tutulmakta ve mevcut hastalık tipine bağlı olarak B6 vitamin takviyesi önerilmektedir. Bu

hastalar aynı zamanda tromboembolizm riski taşıdığından, gebelik süresince ve sonrasında bireylerin yüksek risk altında olduğu bilinmektedir (Shan ve Kruger, 2001).

***CPB2* (Karboksipeptidaz B2):** Kromozom 13q14.13'te haritalanmıştır. *CPB2,* plazma fibrinoliz inhibitörü (TAFI) olarak da bilinmektedir. CPU (Karboksipeptidaz U) ve trombin ile aktive olmaktadır ve karaciğerde sentezlenmektedir. Plazminojenin bağlanması ve aktif hale gelmesi için elzem bir rolü olan fibrin C-terminal kalıntılarını ayrıştırarak fibrinoliz üzerinde güçlü bir etki yaratmaktadır (Koschinsky vd., 2001).

***F10* (Pıhtılaşma Faktörü 10, Pıhtılaşma Faktörü X):** Kromozom 13q34'te haritalanmış olup, otozomal resesif kalıtım özelliği gösteren F10 eksikliği ile ilişkilendirilmiştir. F10'un, pıhtılaşma sürecinde önemli bir görevi üstlenen serin proteaz olan F10A'nın zimojeni F10'u kodladığı bilinmektedir. İçsel yol veya dışsal yol ile aktive edilmektedir; F10A, FV ile kombine halde hareket ettiğinde pıhtılaşmanın efektör molekülünü oluşturmak adına protrombini aktif hale getirmektedir (Cooper vd., 1997).

***F11* (Pıhtılaşma Faktörü 11, Pıhtılaşma Faktörü XI):** Plazmada kininojen ile kovalent olmayan bağlarla bir kompleks oluşturarak dolaşan bir glikoproteindir. Otozomal dominant veya resesif kalıtım özelliğine sahip F11 eksikliği ile ilişkilendirilmiştir. *F11*, kromozom 4q35.2'de haritalanmıştır. F12A tarafından aktif bir proteaz olan F11A'ya dönüşümü gerçekleştirilmektedir. Kalsiyum varlığında F9'un F9A'ya evrilmesinde katalizör olarak görev almakta ve kan pıhtılaşmasına dâhil olmaktadır (Asakai vd., 1987).

***F12* (Pıhtılaşma Faktörü 12, Pıhtılaşma Faktörü XII):** F12 geni yaklaşık 12 kb uzunluğundadır ve 14 ekzon içermektedir. Herediter anjiyoödem ve F12 eksikliği ile karakterizedir.

F13A1 (Faktör 13 A1 Alt Birim) ve F13B (Faktör 13 B Alt Birim): Pıhtılaşma faktörü olan F13, kan pıhtılaşma evresinde aktive olur. Plazma faktörü XIII dört alt birime sahip olup; iki adet katalitik işleve sahip A, iki adet enzimatik işlevi olmayan B alt biriminden oluşmaktadır. *F13A1* geni, kan pıhtılaşmasının son enzimi olan faktör XIII'ün A birimini; F13B ise faktör XIII'ün B birimini kodlamaktadır (Takahashi, Takahashi ve Putnam, 1986).

F2R (Pıhtılaşma Faktörü II Reseptörü): Trombin reseptörü, 7-transmembran reseptör ailesinin diğer üyeleri ile yapısal olarak ilişkilidir ve çeşitli hücre tiplerinden

izole edilmiştir. Trombotik yanıtın düzenlenmesiyle yakından ilgilidir (Coughlin, Vu ve Hung, 1992). Riewald vd. (2002), aktive protein C'nin (612283), endotelyal hücreler üzerinde proteazla aktive olan reseptör-1'in (PAR1) bölünmesi için bir koreseptör olarak endotelyal hücre protein C reseptörünü (EPCR; 600646) kullandığını göstermiştir. Riewald vd. (2002), prototipik trombin reseptörünün, EPCR'ye bağlı APC sinyallemesi için hedef olduğu sonucuna vararak, bu reseptör kaskadının sepsisten korunmada bir rol oynadığını ortaya koymuştur (Riewald, Petrovan, Donner, Mueller ve Ruf, 2002).

***F3* (Pıhtılaşma Faktörü III):** Kan dolaşımının normal sürecinde dolaşımdan ayrılan fakat doku hasarı sonrasında açığa çıkabilen veya endotel hücrelerden ya da lökositlerden yeniden sentezlenebilen hücresel membran glikoproteinidir. Kan pıhtılaşmasının dışsal yolunu, Faktör VII ile teması sonucu başlatmaktadır. F3 üretildikten sonra bir takım enzimatik reaksiyonlar sonrası aktif faktör VII (FVIIA, F7A) kompleksine dönüşmektedir. Bu dönüşümün tüm ara basamakları tamamlandığında son olarak fibrin oluşumu, F9, F10 ve protrombin faktörlerinin aktivasyonu gerçekleşmektedir (Davie vd., 1991).

***F7* (Pıhtılaşma Faktörü VII):** Kan dolaşımının dışsal yolunda görev almakta ve pıhtılaşma faktörü VII'yi kodlamaktadır. Kan pıhtılaşmasının birincil basamağında, vasküler yaralanma üzerine aktif formuna bölünmektedir (Millar vd., 2000).

***F8* (Pıhtılaşma Faktörü VIII):** *Faktör 8* geni, kan pıhtılaşmasının aşamalarında görev alan büyük bir plazma glikoproteinini (pıhtılaşma faktörü VIII) kodlamaktadır. Faktör VIII çeşitli pıhtılaşma enzimleri ile aktive edilebilmektedir ve kendisi için koruyucu görevi olan von Willebrand faktörü (VWF) ile ilişki içerisindedir (Hoyer, 1994).

***F9* (Pıhtılaşma Faktörü IX):** *F9* geni, bir takım enzimatik düzenlemeler gerçekleşmeden aktive olmayan ve zimojen olarak dolaşımda bulunan pıhtılaşma faktörü IX'ü kodlamaktadır. Kan pıhtılaşmasında çeşitli etkileşimler kurarak faktör 10'un aktivasyonunu sağlamaktadır (Davie ve Fujikawa, 1975).

***FGA* (Fibrinojen, Bir Alfa Polipeptidi) ve *FGB* (Fibrinojen, B Beta Polipeptid):** Karaciğerde sentezlenen bir plazma glikoproteini olan fibrinojen, fibrinin çözünür öncüsüdür. Alfa (FGA), beta (FGB) ve gama (FGG) olarak sınıflandırılan üç alt birimden oluşmaktadır. Fibrinojenin sınırlı proteolizi sonucunda alfa ve beta zincirlerinin N-

terminal uçlarından fibrinopeptitler (A ve B) salınmaktadır. Bu enzim, arginin ve glisin arasındaki bağları bozarak glisinin her iki zincir üzerinde aminoasit olarak kalmasını sağlamaktadır. Çok sayıda türde dizilenen fibrinopeptitlerin fizyolojik bir role sahip olabileceği ve kan pıhtılaşmasında da lokal hemostaza yardımcı olabileceği bildirilmiştir. (Fu vd., 1992; Petzelbauer vd., 2005)

GP1BA (Glikoprotein Ib, Trombosit, Alfa Polipeptid) ve GP1BB (Glikoprotein Ib, Trombosit, Beta Polipeptid): Glikoprotein Ib, von Willebrand faktörü (VWF) için reseptör görevi gören bir trombosit yüzey membranıdır. Reseptör disülfit bağlar ile tutunan iki adet polipeptit zincirden (alfa zinciri ve beta zinciri) oluşmaktadır. *GP1BA* geni alfa birimini; *GP1BB* geni beta birimini kodlamaktadır (Lopez vd., 1998).

GP5 (Glikoprotein V, Trombosit) ve GP9 (Glikoprotein IX, Trombosit): *GP5* (İnsan trombosit glikoproteini V), VWF için reseptör oluşturan ve trombositlerin hasarlı vasküler yüzeylere yapışmasında aracı rol oynayan Ib-V-IX sisteminin bir üyesidir. *GP9* (Platet glikoprotein IX), insan trombositlerinin yüzeylerinde yerleşik membran glikoproteinleridir. VWF için reseptör olan GP Ib ile kovalent olmayan bir kompleks oluşturmaktadır (Lopez vd., 1998).

ITGA2 (İntegrin, Alfa 2) ve ITGB3 (İntegrin, Beta 3): *ITGA2* mega karyositler ve trombositlerin de dahil olduğu farklı hücre tiplerinde eksprese edilen bir membran glikoproteini alfa-2 integrini kodlamaktadır. GP Ia ve GP IIa ile kompleks oluşturarak kollajen reseptörlerinden biri olarak görev yapmaktadır. ITGB3 GP IIb/IIIa'nın beta alt birimi GP IIIa'yı kodlamaktadır (Noris vd., 2006)

KLKB1 **(Kallikrein B, Plasma 1):** Kallikrein apple domainleri (A1 ile A4), kininojene yüksek afinite ile enzimin bağlanmasını sağlamaktadır. TGK'nın biyobelirteç olarak bilinen ITI-H4'ün KLKB1 sayesinde IL-6 sinyal kaskadı yolağı ile düzenlenebileceği bildirilmiştir (Tait ve Fujikawa, 1986).

MTHFR (5,10-Metilentetrahidrofolat Redüktaz): MTHFR 5,10-metilentetrahidrofolatın 5-metiltetrahidrofolata dönüşümünü katalizlemektedir. 5-metiltetrahidrofolat homosisteinin metiyonine remetilasyonu için yardımcı bir substrattır.

MTR (5-Metiltetrahidrofolat-homosistein S-Metiltransferaz): Homosisteinin metiyonin oluşturması için remetilasyona uğraması sürecini MTR enzimi katalizlemektedir. Enzimin aktivasyonu için metilkobalamin veya B12 vitamini

gerekliliği bulunmaktadır (Li, Gulati, Baker, Lawrence, Brody, Banerjee ve Kruger, 1996).

MTRR (Metionin Sentaz Redüktaz): Metionin memelilerde esansiyel aminoasitler grubunda yer almaktadır. MTRR geni tarafından kodlanan bu enzim protein sentezinde görev almaktadır ve 1-karbon metabolizması olarak adlandırılan süreçte birincil elemandır. Aktif formunun S-adenosilmetiyonin olduğu bildirilmiştir ve birçok transmetilasyon reaksiyonunda rol aldığı bilinmektedir. Demetilasyonu sonucunda homosistein oluşmaktadır ve homosisteinin remetilasyonu için gerekli enzimlerle ilişkili çalışmaktadır (Leclerc, Wilson, Dumas ve Gravel, 1998).

PLAT (tPA, Plazminojen Aktivatör, Doku), PLG (Plazminojen), PLAUR (Plazminojen Aktivatör Reseptörü, Ürokinaz Tipi): PLAT doku plazminojen aktivatörüdür. tPA'nın ana işlevlerinden biri, proenzim plazminojeni, plazmine (PLG; 173350) parçalamak ve aktive etmektir, bu da fibrinolitik aktiviteden sorumludur. (Ny, Elgh ve Lund, 1984). *PLG* geni, PLAU ve PLAT aracılığı ile aktif enzim plazmine dönüştürülen PLG'yi kodlamaktadır. PLG fibrin pıhtılarını çözmekte temel görev almaktadır. Fibrinolotik sistemdeki önemli işlevi dışında, hücre göçünde, doku yenilenmesi ve yeniden şekillenmesinde, hücre dışı matris bozulmasında ve çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynamaktadır (Drew, Kaufman, Kombrinck, Danton, Daugherty, Degen ve Bugge, 1998). PLAUR hücre yüzeyi plazminojen düzenlemesinde rol oynayan ve takiben birçok önemli patojenik süreçte yer alan plazminojen aktivatör reseptörüdür (Huai vd., 2006).

PROCR (Protein C Reseptörü): Protein C, K vitaminine bağlı serin proteaz proenzimdir. PROCR'nin gram (-) sepsis etkilerini önleyebileceği bildirilmiştir. Protein C reseptörü kan pıhtılaşma sürecinde rol almaktadır ve bağlı olarak Protein C eksikliği sonucunda trombofili gözlenmektedir.

SERPINE1 (Serpin Peptidaz İnhibitörü, Clade E (Nexin, Plazminojen Aktivatör İnhibitörü Tip 1), Üye 1) ve SERPINF1 (Serpin Peptidaz İnhibitörü, Clade F, Üye 1): Plazminojen aktivatör inhibitörü-1'i (PLAT1) kodlayan *SERPINE1* geni, fibrinolizi negatif yönde düzenlemekle görevlidir. PLAT ve PLAU'u aktive ederek pıhtıların çözünmesini bozmaktadır (Mehta ve Shapiro, 2008). *SERPINF1* geni de serpin

gen ailesine üyedir. Serpin gen ailesinin bazılarının nörotrofik aktivite sergilemekte olduğu bildirilmiştir.

TFPI (Doku Faktörü Yolu İnhibitörü): Hemostaz ile ilişkili olduğu bilinen TFPI, doku faktörü-faktör 7A kompleksini inhibe ederek pıhtılaşmayı aşağı regüle eden bir proteini kodlamaktadır (Broze ve Miletich, 1987; Rao ve Rapaport, 1987).

THBD (Trombomodülin): *THBD* geni trombomodülini kodlamaktadır. Trombinin bu reseptöre bağlanması sonucunda substrat özgüllüğü değişmektedir ve antitrombotik faktör olarak işlev görmektedir. THBD kompleksinin PROC'yi trombinden bin kat hızlı bir şekilde aktive ettiği bildirilmiştir. Protein C'nin aktivasyonu sonucunda F5 ve F8 bozulmaktadır. Aynı zamanda THBD'nin trombinin prokoagülan fonksiyonlarını inhibe edebildiği, SERPINC1'in de inhibisyonuna yardımcı olabildiği bildirilmiştir (Anastasiou, Gialeraki, Merkouri, Politou ve Travlou, 2012; Esmon, 1987).

Faktör 2 (F2, Pıhtılaşma Faktörü II): F2 geni, pıhtılaşma faktörü II ve/veya protrombini kodlamaktadır. Protrombin, F10 tarafından trombine aktive edilmektedir. Bu sürecin gerçekleşmesi fosfolipidler, kalsiyum ve F5'in varlığına bağlıdır. Aktif haldeki trombin enziminin tromboz ve hemostazda önemli rolleri bulunmaktadır (Lancellotti ve Cristofaro, 2009).

Faktör 5 (F5, Pıhtılaşma Faktörü V): F5 geni, az aktive edilen ya da hiç aktive edilmeden dolaşan pıhtılaşma faktörü V'i kodlamaktadır. FV, trombin tarafından FVa'ya dönüştürülmektedir ve bu hali pıhtılaşma sürecinde temel bir protein olarak çalışmaktadır (Cripe, Moore ve Kane, 1992; Kane ve Davie, 1986).

PROC (Protein C): Pıhtılaşma sürecinde önleyici bir rol üstlenen PROC, trombin/trombomodulin kompleksi sayesinde aktifleştirilmiş protein C'ye (APC) bölünmektedir. APC, F5 ve F8'in aktive edilmiş formlarını parçalayarak proteaz görevini üstlenmektedir (Clouse ve Comp, 1986; Foster ve Davie, 1984).

PROS1 (Protein S): PROS aktive protein C'ye enzimatik olmayan kofaktör görevi yapmaktadır. Bu sayede kan pıhtılaşmasını önlemektedir. PROS plazma proteinidir ve iki farklı formda bulunmaktadır: 1- Aktif form (fonksiyonel) ve 2- C4BPA kompleks haldeki aktif olmayan form (Dahlback ve Stenflo, 1981).

SERPINC1 (Serpin Peptidaz İnhibitörü, Klade C (Antitrombin), Üye 1): Antitrombin III pıhtılaşma proteinazlarının en mühim inhibitörüdür. Trombin aktivitesini düzenleyerek pıhtı oluşumunu kontrol etmektedir (Rosenberg ve Bauer, 1987). Kalıtsal antitrombin III (AT3D) eksikliği venöz tromboembolizmin gelişimi için bir risk faktörü oluşturmaktadır (Lane, Olds ve Thein, 1994).

CCDC39 (Karıştırılmış Bobin Alan İçeren Protein 39): Siliyer aksonemlerde lokalize halde bulunan CCDC39, iç dinamin kollarının ve dinamın düzenleyici kompleksin bir arada doğru çalışması için gereklidir (Merveille vd., 2011).

CHD7 (Kromodomain Helikaz DNA-Bağlayıcı Protein 7): CHD7 transkripsiyonel düzenleyici olarak görev almaktadır. Ek olarak rRNA biyogenezinde de rol oynadığı bildirilmiştir (Zentner vd., 2010).

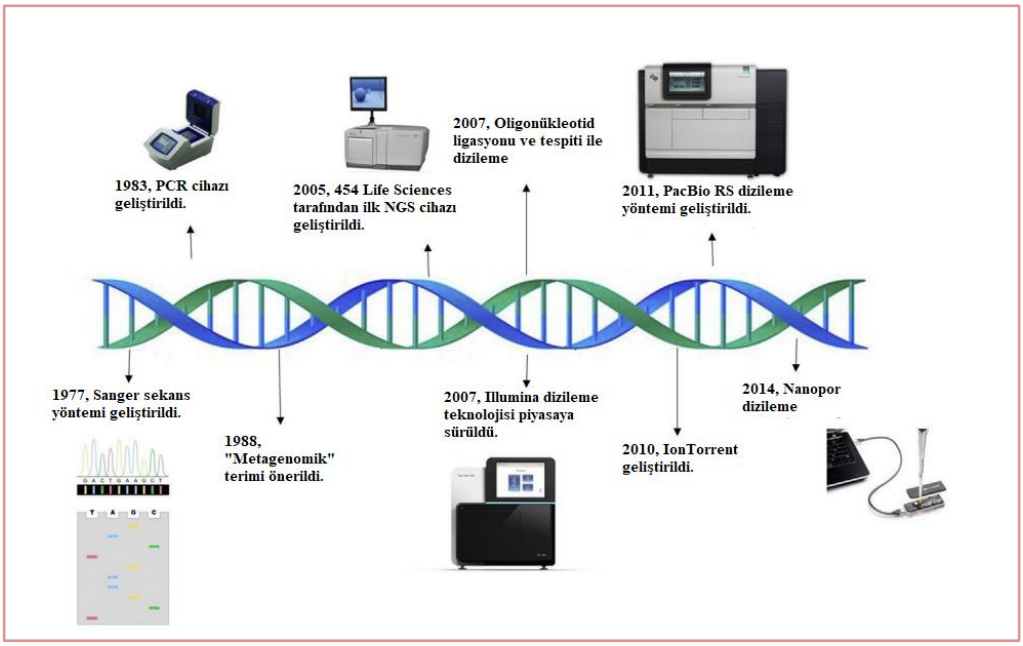
DNAH1 (Dynein, Aksonemal, Ağır Zincir 1): Motor protein kompleksleri olarak çalışmaktadır (Chapelin, Duriez, Magnino, Goossens, Escudier ve Amselam, 1997).

LHCGR (Lüteinizici Hormon/Koriyogonadotropin Reseptörü): G protein-bağlı reseptörlerin (GPCR) alt ailesine üye olan *LHCGR*, lösince zengin tekrar bölgeleri içermektedir. LRR tekrarı içermesi nedeniyle, GPCR (LGR) ailesi olarak adlandırılmaktadır (Ascoli, Fanelli ve Segaloff, 2002).

NLRP7 (NLR Ailesi, Pirin Alan İçeren 7): CATERPILLER olarak bilinen geniş protein ailesinin alt ailelerinden birini oluşturan sitoplazmik bir proteinlerdir. Çoğunlukla kısa NALP ve PYD alanı, ek olarak NACHT ve NACHT ile ilişkide olan NAD ile C-terminalde lösince zengin tekrar bölgeleri bulunmaktadır (Tschopp, Martinon ve Burns, 2003).

2.4. Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi

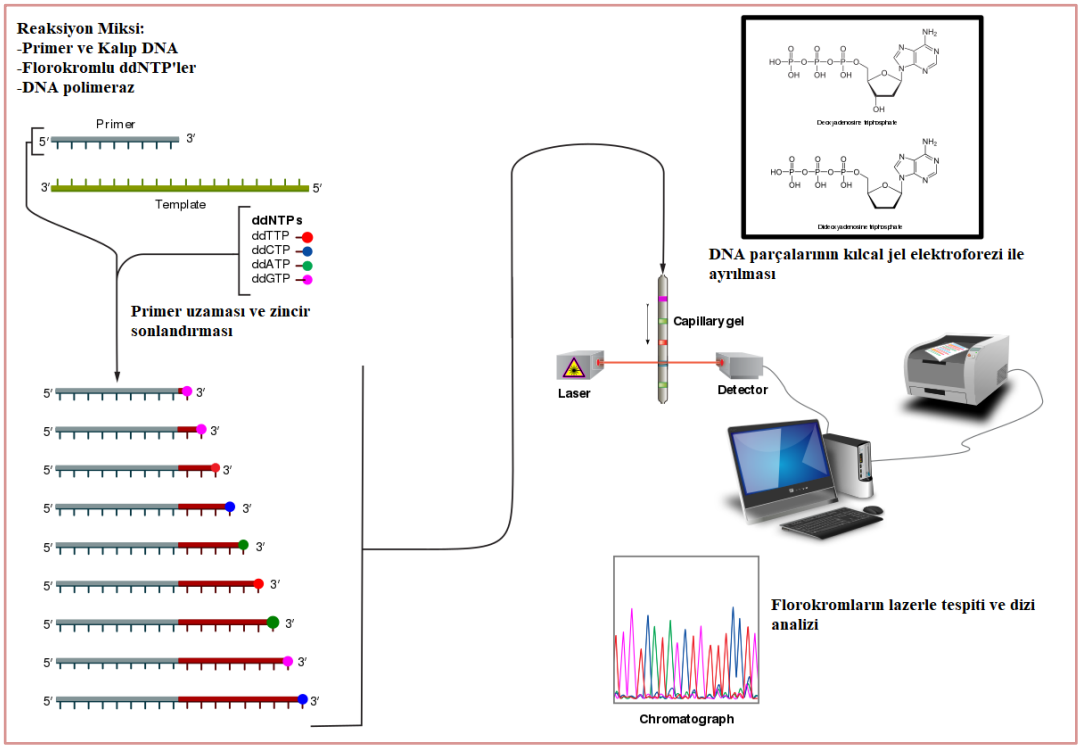
Dizileme teknolojisi araştırmalar ve yoğun çabalar sayesinde son on yılda önemli ölçüde kapasiteni arttırmış, hızlanmış ve maliyeti gittikçe düşmüştür.



Şekil 2.9. Dizileme teknolojileri kronolojik gelişimi

DNA dizileme yöntemleri 1970'li yıllarda, iki farklı grup tarafından geliştirilmeye başlanmıştır. 1977'de ilk olarak Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılmaya dayalı dizileme yönteminin keşfinden sonra Sanger, Nicklen ve Coulson'ın dideoksinükleotitlerle zincir sonlandırma temeline dayanan dizileme yöntemi bulunmuştur (Shendure, Balasubramanian, Church, Gilbert, Rogers, Schloss ve Waterson, 2017). Maxam-Gilbert teknolojisi, DNA dizisindeki bazların çeşitli kimyasallarla değiştirilmesine ve bu bölgelerden zincirin kırılmasına dayanmaktadır (Maxam ve Gilbert, 1977). Sanger, Nicklen ve Coulson'ın geliştirmiş olduğu teknoloji (Sanger sekanslama, Sanger dizileme) ise dNTP (deoksiribonükleozidtrifosfat) ve ddNTPP'ler (dideoksiribonükleozidtrifosfat) kullanılarak zincirin uzatılması ve rastgele noktalarda sonlanmasına dayanmaktadır. Floresan kimyasallarla işaretlenmiş ddNTP'ler sayesinde dizileme gerçekleştirilmektedir (Sanger, Nicklen ve Coulson,1977). Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılmaya dayalı geliştirdikleri yöntem, yoğun kimyasal kullanımı nedeniyle Sanger dizilemeye kıyasla daha az tercih edilmiştir. Sanger dizilemenin popülaritesi günümüzde de devam etmekte ve halen altın standart olarak kabul görmektedir. Ancak Sanger dizileme yönteminin okuma uzunluğunun kısa olması, yüksek maliyet ve uzun zaman gerektirmesi gibi dezavantajları nedeniyle; hızlı, kolay kullanım sunan, ucuz ve doğru veri çıkışı

beklentisini karşılayacak yeni nesil dizileme teknolojilerinin geliştirilmesi ihtiyaç duyulmuştur (Van Dijk, Auger, Jaszczyszyn ve Thermes, 2014).



Şekil 2.10. Sanger sekans yöntemi iş akış basamakları

Yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing, NGS), yüksek verimli dizileme olarak da bilinmektedir. NGS teknolojileri, milyonlarca rastgele küçük DNA fragmentlerinin (parçalarının) kütüphaneler oluşturularak aynı anda dizilenmesine dayanmaktadır (Behjati ve Tarpey, 2013). Geleneksel dizileme yöntemlerine kıyasla NGS teknolojisi çok sayıda örnek çalışma, düşük maliyetle yüksek verim sağlama, yüksek hassasiyetle çalışma ve kısa sürede sonuç alma gibi imkânlar tanımaktadır. NGS, DNA fragmentlerinin eş zamanlı olarak dizilenmesinin yüksek okuma derinliği ile başardığından varyasyonlar daha güvenilir sunulmaktadır (Park ve Kim, 2016). Sağlamış olduğu bu avantajlar, NGS'in çok geniş bir klinik ve uygulama yelpazesinde kullanılmasını kaçınılmaz hale getirmektedir. NGS kullanılarak tüm genom dizileme, tüm ekzom (protein kodlayan bölgeler) dizileme, mitokondriyal DNA dizileme, hastalıkla doğrudan ilişkili olan ya da ilişkisi olduğu düşünülen aday genlerin bulunduğu hedefli

gen panelleri ile spesifik dizileme, de-nova dizileme, metilasyon analizleri, gen ekspresyon analizleri vb. yapılabilmektedir. Tüm bu uygulama alanları; nadir genomik varyantların belirlenmesi, etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamış hastalıkların belirlenmesi/tanımlanması, kanser araştırmaları, prenatal genetik tanı konulması gibi çok çeşitli çalışmaların yürütülmesine imkân sağlamaktadır (Yohe ve Thyagarajan, 2017). Aynı zamanda NGS teknolojisi hastalıkların iyi anlaşılarak erken teşhis konması, hastalık seyrinin takibi, tedavi seçimlerinin doğru yapılması ve tüm bunları takiben geniş kapsamlı genetik danışma sunulması için ciddi önem taşımaktadır (Morey, Fernández-Marmiesse, Castiñeiras, Fraga, Couce ve Cocho, 2013).

2.5. ACMG-2015 Kriterleri

Teknolojinin gelişmesi ile bilimsel çalışmalar sonucunda verilerin daha kısa sürelerde, düşük maliyetler ile elde edilmesi ve bilim dünyasına kazandırılması gerçekleşmektedir. Ancak büyük verilerin değerlendirilmesi ve yorumlanması da çok karmaşık bir süreç olarak karşımıza çıkmaktadır. 2015 yılında American Collage of Medical Genetics (ACMG), Association for Molecular Pathology (AMP) ve College of American Pathologist ortaklığı ile klinisyenler ve klinik laboratuvar yöneticilerinden oluşan bir araştırmacı grubu, toplanan tüm girdiler ile sekans verilerinin yorumlanmasını standardize eden bir kılavuz yayımladı. Kılavuzdaki bilgiler genetik testlerin çeşitliliğini karşılayacak şekilde, tek genleri, genotiplemeyi, panelleri, ekzom ve tüm genom dahil değerlendirmeyi kapsamaktadır. Kılavuz varyantları “patojenik (P), olası patojenik (LP), klinik önemi belirsiz (VUS), olası iyi huylu (LB) ve iyi huylu (B)” terimleri ile tanımlamaktadır. (Richards vd., 2015). Patojenik ve iyi huylu sınıflandırmanın ayrıntılı algoritması sırası ile Çizelge 2.2 ve Çizelge 2.3’te gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Patojenik varyantların ACMG-15 kriterlerine göre sınıflandırılması (Richards, 2015)

Patojenite Kanıtı	Kategori
Çok güçlü	**PVS1:** Fonksiyon kaybı oluşturan hastalık mekanizmasında bulunan bir genin boş varyantı (anlamsız, çerçeve kayması…)
Güçlü	**PS1:** Nükleotit değişikliği dışında önceden bilinen bir patojenik varyant ile aynı amino asit değişikliği **PS2:** Hastalık için tanı almış ancak aile öyküsü bulunmayan hastalarda de-novo **PS3:** Gen veya ürününde zararlı bir etkiyi destekleyen fonksiyonel çalışmalar **PS4:** Varyantın etki ettiği bireylerdeki prevalansının kontrollere göre önemli düzeyde artması
Orta	**PM1:** İyi huylu bir varyant yokken fonksiyonel/mutasyonel alanda bulunma **PM2:** Popülasyon veri tabanlarında görülmemesi veya çok düşük frekansta bildirilmesi **PM3:** Resesif kalıtım gösteren hastalıklarda, patojenik bir varyantla beraber farklı allellerde bulunması **PM4:** Tekrarlı olmayan bir bölge veya stop-loss olarak tanımlanan varyantların çerçeve içi silme/eklemelerinin sonucu protein uzunluğunda değişiklik **PM5:** Daha önce yanlış anlamlı varyasyonun tanımlandığı bir aminoasitte yeni yanlış anlamlı varyant değişikliği **PM6:** Anne-baba teyidi yapılmadan de novo kabul edilmesi
Destekleyici	**PP1:** Hastalığa neden olduğu bilinen varyantın birden fazla aile üyesinde tanımlanması **PP2:** Düşük oranda iyi huylu yanlış anlamlı varyant bulunması ve bu varyantların yaygın bir hastalığa neden olduğu bilinmesi **PP3:** Birden fazla sayısal kanıt dizisi bulunması **PP4:** Fenotip ve aile öyküsü değerlendirmesi tek bir genetik etiyoloji için spesifik **PP5:** Güvenilir kaynaklarda varyantın güncel dönemde patojenik olarak bildirilmesi fakat laboratuvarın bağımsız değerlendirmesi için bir kanıt yok

Çizelge 2.3. İyi huylu varyantların ACMG-15 kriterlerine göre sınıflandırılması (Richards, 2015)

Patojenite Kanıtı	Kategori
Güçlü	**BA1/BS1:** Minör allel frekansı (MAF), beklenenden yüksek olması **BS2:** Yetişkin sağlıklı bireyin erken yaşta tam penetrasyon beklenmesi, homozigot, heterezigot veya hemizigot için gözlenmesi **BS3:** Yapılmış in-vivo ve iv-vitro çalışmaların protein fonksiyonunu etkilemediğini göstermesi **BS4:** Varyantın diğer aile bireylerinde gözlenmemesi
Destekleyici	**BP1:** Yalnızca kırpma (kesme) hatalarından kaynaklanan bir hastalık geninde yanlış anlamlı varyant **BP2:** Tam penetran baskın bir gendeki bozuklukta patojenik bir varyantın trans gözlenmesi **BP3:** Tanımlanmış bir işlevi olmayan tekrarlanan bölgelerde çerçeve içi ekleme/silmeler **BP4:** Çoklu hesaplama kanıtları **BP5:** Hastalık üzerinde başka bir moleküler temeli olan seçeneğin bir vakada bulunduğu varyant **BP6:** Güvenilir kaynaklarda varyantın güncel dönemde iyi huylu olarak bildirilmesi fakat laboratuvarın bağımsız değerlendirmesi için bir kanıt yok **BP7:** Splicing mekanizmasında hiçbir etkisi bulunmayan ve aminoasit değişikliği yapmayan varyant

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Hasta Grubunun Belirlenmesi

Çalışmamıza Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğine TGK şikâyeti ile başvuran 40 kadın hasta dâhil edildi.

Hastalarımız en az iki spontan gebelik kaybı şikâyeti ile polikliniğimize başvurmuştur. Laboratuvar bulguları ve aile ağaçları standart bir forma kaydedilmiştir.

Hastaların çalışmaya dâhil edilme kriterleri;

1. En az 3 kuşaktır Trakya Bölgesinde yaşamaları,
2. Sayısal ve yapısal kromozom anomalisi bulunmaması,
3. Trombofili panelinde FII (Protrombin) ve FV Leiden homozigot mutant varyantı olmaması,
4. En az ardışık iki gebelik kaybı öyküsü bulunması.

Hastaların çalışmaya dâhil edilmeme kriterleri;

1. Sayısal ve yapısal kromozom anomalisi bulunması,
2. Hastalar arasında akrabalık ilişkilerinin bulunması,
3. Trombofili panelinde FII (Protrombin) ve FV Leiden heterozigot ve homozigot mutant varyantı olması,

4. İkiden az gebelik kaybı bulunması.

3.1.2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (BİGOF)

Hasta ve yakınlarına çalışma hakkında bilgilendirmeler sözlü ve yazılı olarak yapılmıştır. Çalışmaya dâhil edilen hastalardan bilgilendirilmiş gönüllü olur formları imzalatılarak yazılı onay alınmıştır *(Ek 1).*

3.1.3. Etik Kurul ve TÜBAP Onayı

Çalışmamız için gerekli etik kurul onayı 12.07.2021 tarihinde Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 16/02 karar numaralı ve TÜTF-BAEK 2021/328 protokol kodlu belge ile alındı *(Ek 2).*

Çalışmamızın, Trakya Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2022/01 proje numarası ile; 08.02.2022 tarihinde oy birliği ile desteklenmesine karar verilmiştir.

3.1.4. Kullanılan Sarf Malzemeleri ve Cihazları

Çalışmamız süresince kullanılan sarf malzemeler Çizelge 3.1, cihazlar Çizelge 3.2'de ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Çizelge 3.4. Kullanılan sarf malzemeler

SARF MALZEME
EZ1 DNA Blood İzolasyon Kiti (Qiagen, Hilden, Almanya)
1.5 ml LoBind tüp (Eppendorf, Hamburg, Almanya)
0.2 ml PCR Tüp (Axygen Biosciences, Union City, ABD)
Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD)
QubitAssay Tüp (Thermo Fisher Scientific, ABD)
15 ml'lik Falkon Tüp (Isolab)
50 ml'lik FalkonTüp (Isolab)
%99.9Ethanol (Isolab)
NextSeq 500/550 MidOutput Kit v2.5 (300 Cycles)
MiseqReagent Kit v3 (600 Cycle)
HibridizasyonBuffer (HT1)
Distile su (Qiagen, Almanya)

Çizelge 3.5. Kullanılan cihazlar

CİHAZ	CİHAZ
EZ1 Advanced XL Otomatize Nükleik Asit İzolasyon Cihazı (Qiagen, Hilden, Almanya)	SensquestThermalCycler (PCR Cihazı) (Labcyler, Hilden, Almanya)
NanoDrop (NanoDrop 2000C, Thermo Fisher Scientific, ABD)	AppliedThermalCycler (PCR Cihazı) (ThermoFisherScientific, Amerika Birleşik Devletleri)
Santrifüj (Thermo Fisher Scientific, ABD)	Qubit 4 Fluorometer (ThermoFisherScientific, Amerika Birleşik Devletleri)
Vorteks (LMS, Tokyo, Japonya)	QIAgility (Qiagen, Hilden, Almanya)
0.2-10, 2-20, 20-100, 100-1000 ul pipet (Eppendorf, Hamburg, Almanya)	Real-Time PCR (Qiagen, Rotor-Gene Q, Almanya)
Çok kanallı pipet (2-20ul) (Eppendorf, Hamburg, Almanya)	MiSeqPersonalSequencingSystem (Illumina, Cambridge, İngiltere)
DynaMag-2 Magnet (ThermoFisherScientific, ABD)	NextSeq 550 SequencingSystem (Illumina, Cambridge, İngiltere)
DynaMag-96 Side (ThermoFisherScientific, Amerika Birleşik Devletleri)	AppliedBiosystem 3500 Sanger Sekans Dizileme Cihazı (AppliedBiosystem, Kaliforniya, ABD)
+4 Soğuk Blok (Qiagen, Hamburg, Almanya)	

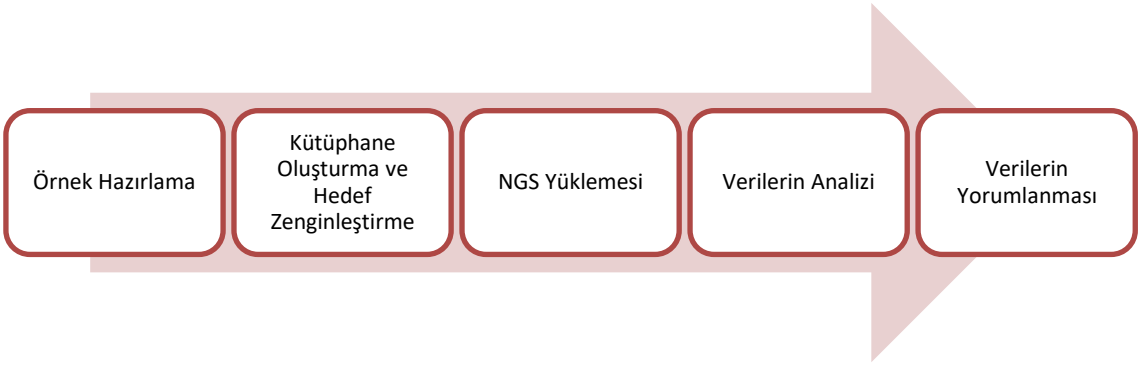
3.2. Yöntem

Çalışmamızın laboratuvar uygulamaları Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezinde yapılmıştır.

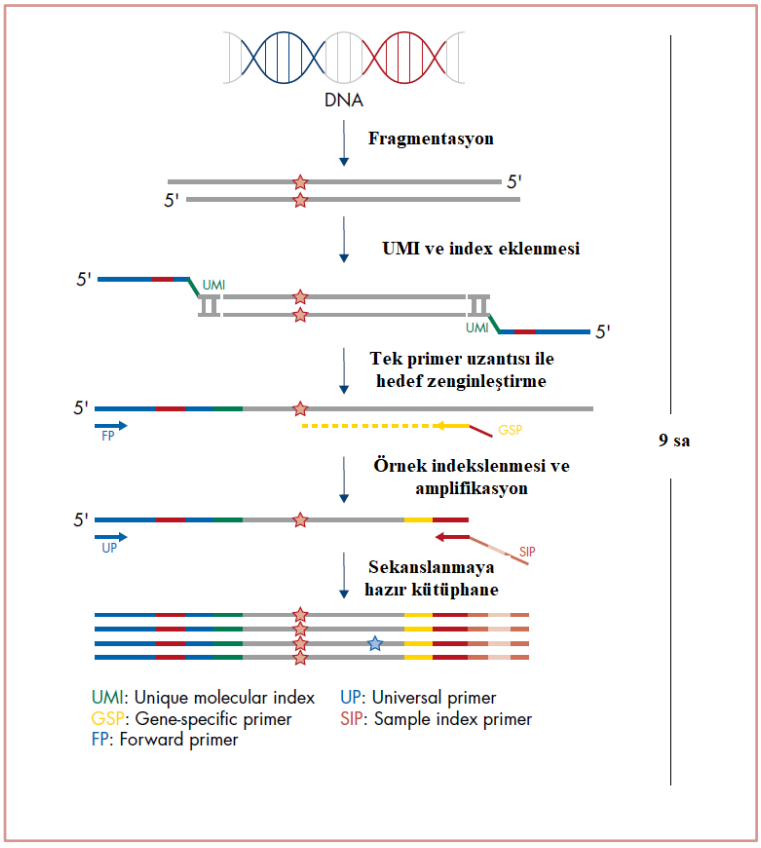
Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğine TGK şikâyeti ile başvuran kadın hastalardan 2 ml periferik kan örneği alındı. Alınan periferik kan örnekleri "EZ1 DNA Blood İzolasyon Kiti" kullanılarak EZ1 Advanced XL otomatize izolasyon cihazında, protokolde belirtildiği gibi 200 µl periferik kandan 100 µl final hacimli gDNA olacak şekilde çalışıldı. İzole edilen gDNA'ların saflık dereceleri ve konsantrasyonları NanoDrop cihazı kullanılarak belirlendi. Konsantrasyon için minimum değer 20 µl/ng kabul edildi. İzole edilen gDNA'lara her bir hasta için farklı laboratuvar kodları tanımlandı ve hasta hakları ile etik kurallara uygun şekilde -20˚C'lik derin dondurucularda muhafaza edildi.

Çalışmamız için literatür taraması PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/), ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) ve Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) üzerinden yapılmış olup, değerlendirmeler sonucunda tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkili olan ve ilişkili olduğu düşünülen 43 gen belirlendi. Bu genlerin kodlama yapan tüm bölgelerini içeren primerler tasarlandı.

Çalışmamız için sekanslanması hedeflenen genlerin kütüphanelerinin elde edilmesi için, izole edilen gDNA'lar ile *ACE*, *CBS*, *CPB2*, *CCDC39*, *CHD7*, *DNAH1*, *LHCGR*, *NLRP7*, *F10*, *F11*, *F12*, *F13A1*, *F13B*, *F2R*, *F3*, *F7*, *F8*, *F9*, *FGA*, *FGB*, *GP1BA*, *GP1BB*, *GP5*, *GP9*, *ITGA2*, *ITGB3*, *KLKB1*, *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *PLAT*, *PLAUR*, *PLG*, *PROCR*, *SERPINE1*, *SERPINF1*, *TFPI*, *THBD*, *F2*, *F5*, *PROC*, *PROS1*, *SERPINC1* genlerinin bulunduğu "Qiaseq Targeted DNA Custom Panel" yöntemi kullanılarak çalışıldı. Uygulanan protokolün tüm adımları Şekil 3.1'de, iş akışı Şekil 3.2'de özetlenmiştir.



Şekil 3.1. Qiaseq Targeted DNA Custom Panel basamakları



Şekil 3.2. Qiaseq hedefli DNA panel yönteminin iş akışı

İzole edilmiş gDNA'lar, protokolde belirtildiği üzere Qubit dsDNA HS Assay kiti (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak Qubit 4 florometre (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) cihazı ile ölçüldü. gDNA konsantrasyonları 10-40 ng aralığında olacak şekilde ayarlandı. >40 ng olan gDNA'lar dilüe edilerek uygun aralığa getirildi. Konsantrasyonları ayarlanan gDNA'lardan 16.75 µl PCR tüplerine eklendi. DNA fragmentasyonu için Çizelge 3.3'te yer alan reaktifler, belirtilen hacimlerde DNA'ların üzerine eklendi.

Çizelge 3.6. DNA fragmentasyon PCR miksi komponent ve hacimleri

REAKTİF	HACİM
10X Fragmentasyon Buffer	2.5 µl
FERA Solüsyonu	0.75 µl
Fragmentasyon Enzimi	5 µl
10-40 ng gDNA	16.75 µl
TOPLAM	**25 µl**

Fragmentasyon PCR koşullarını içeren program başlatıldı ve hazırlanan örnekler +4˚C'ye getirilmiş thermal cycler'a yerleştirildi.

Çizelge 3.7. DNA fragmentasyon PCR koşulları

4˚C	**32˚C**	**72˚C**	**4˚C**
1 dakika	24 dakika	30 dakika	1 dakika

Fragmentasyon PCR'ının bitmesi ile örnekler hemen +4˚C soğuk bloklar üzerine alındı. UMI ve Index ekleme aşamasına geçildi. İlk olarak adapter ligasyonu için Çizelge 3.5'te yer alan bileşenler eklendi. Örnekler kısa süreli vorteks ve spin işleminden sonra 20˚C'de 15 dakika boyunca inkübe edildi.

Çizelge 3.8. UMI ve indeksleme PCR miksi komponent ve hacimleri

Komponent	**Hacim**
Fragmente DNA miksi	25 µl
5X Ligasyon Buffer	10 µl
ILN7## Adaptörü	2.8 µl
DNA Ligase	5 µl
Ligasyon Solüsyonu	7.2 µl
TOPLAM	**50 µl**

PCR cihazından alınan UMI ve ILN7## indekslerinin bağlandığı DNA'lar temizlenmek üzere QIAseq Bead'ler (manyetik boncuklar) ile muamele edildi. 50 µl hacimli örnekler 1,5 ml'lik DNA lobind tüplere aktarıldı ve üzerine 50 µl nukleaz içermeyen su, 100 µl manyetik boncuk eklendi. Pipetaj işlemi ile homojen hale getirildikten sonra 10 dakika boyunca manyetik stant üzerinde bekletildi. Süre sonunda manyetik boncuklara bağlanan DNA'lar, manyetik standa doğru toplandı ve dipte kalan berrak süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Çalışmaya manyetik stant üzerinde devam edildi. Tüplere 200 µl %80'lik etanol eklendi. Tüpler manyetik stant üzerinde hafifçe döndürülerek boncuklara bağlanmış DNA'ların yıkanması sağlandı. Dipte kalan süpernatant uzaklaştırıldı. Etanol ile yıkama işlemi tekrar edildi ve ETOH'un tamamen uzaklaşması sağlandı. Etanolden uzaklaştırılmış boncuklar manyetik stant üzerinde 10 dakika boyunca kurumaya bırakıldı. Tüpler manyetik stanttan alınarak 52 µl nukleaz içermeyen su ile dilüe edildi. Pipetaj işlemi ile solüsyon homojen hale getirildi ve yeniden

berrak bir süpernatant elde edene kadar manyetik stant üzerine alındı. Elde edilen süpernatant1.5ml'lik temiz DNA lobind tüpüne aktarıldı. Üzerine 50 µl manyetik boncuk eklenerek pipetaj yapıldı, önce 5 dakika oda ısısında ve ardında 5 dakika manyetik stant üzerinde inkübasyona bırakıldı. Manyetik boncuklara bağlanan örnekler, standın bulunduğu yönde toplandıktan sonra süpernatant dikkatli bir şekilde atıldı. Taze hazırlanmış 200 µl %80'lik etanol ile yıkama işlemi iki kere tekrarlandı. Yıkama işlemi sonrasında alkolün tamamen uzaklaştırılması için oda ısısında 10 dakika bekletildi. Manyetik stant üzerindeki tüplere 12 µl nükleaz içermeyen su eklendi. Homojen olana kadar pipetaj işlemi ile nukleaz içermeyen su ve boncuklar karıştırıldı. Manyetik stant üzerinde süpernatant berraklaşana kadar bekletildi ve ardından 9.4 µl süpernatant temiz bir PCR tüpüne aktarıldı.

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra, hedef zenginleştirme aşamasına geçildi. Bu basamakta ilgili genleri içeren sentetik oligonükleotidler kullanıldı. Çizelge 3.6'te yer alan reaktifler belirtilen hacimlerde eklendi.

Çizelge 3.9. Hedef zenginleştirme reaksiyon miksi komponent ve hacimleri

Komponent	**Hacim**
Hedef kütüphane	9.4 µl
5x TEPCR buffer	4µl
Qiaseq targeted DNA panel	5µl
IL Forward Primer	0.8µl
HotStarTaq DNA Polimeraz	0.8µl
TOPLAM	**20 µl**

Çizelge 3.7’te belirtilen PCR koşullarında program başlatıldı.

Çizelge 3.10. Hedef zenginleştirme PCR koşulları

Denatürasyon						
95˚C	98˚C	98˚C	65˚C	72˚C	4˚C	4˚C
13 dk	2 dk	15 sn	15dk	5 dk	5 dk	∞
		6 döngü		**1 döngü**		

PCR bittiğinde tüm PCR ürünleri 1.5 ml’lik lobind tüpe aktarıldı. Üzerine 80 µl nükleaz içermeyen su ve 100 µl manyetik boncuk eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. Oda ısısında 5 dakika inkübe edildikten sonra manyetik standa alındı ve boncukların süpernatant ile ayrılması beklendi. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Stant üstündeki tüplere 200 µl %80’lik etanol ilave edildi, tüpler stant üzerinde döndürülerek boncuklar yıkandı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve ardında etanol ile yıkama işlemi tekrar edildi. 10 dakika boyunca alkolün tamamen uzaklaşması sağlandı. Stanttan alınan tüplere 16 µl nükleaz içermeyen su ilave edildi, pipetaj yapılarak karıştırıldı. Tüpler manyetik standa yeniden yerleştirildi.

Universal PCR amplifikasyonu için, liyofilize halde bulunan ve birbirinden tamamen farklı olan IL-S5## indeksler her bir hastaya farklı indeks kullanılacak şekilde ayarlandı. 13.4 µl süpernatant tüplerden alındı ve strip tüplerde planlanan IL-S5## indeksleri ile birleştirildi. Universal PCR amplifikasyonu için gerekli reaktifler Çizelge 3.8’de belirtilen hacimde kullanıldı.

Çizelge 3.11. Universal PCR amplifikasyon miksi komponent ve hacimleri

Reaktif	Hacim
Temizlenmiş hedef zenginleştirilmiş DNA örnekleri	13.4 µl
5X UPCR Buffer	4 ul
HotstarTaq DNA Polymerase	1 µl
Nükleaz içermeyen su	1.6 ul
TOPLAM	**20 µl**

Çizelge 3.9'deki Universal Amplifikasyon PCR koşulları ayarlanarak PCR başlatıldı.

Çizelge 3.12. Universal Amplifikasyon PCR koşulları

Denatürasyon						
95˚C	98˚C	98˚C	68˚C	72˚C	4˚C	4˚C
13 dk	2 dk	15 sn	2 dk	5 dk	5 dk	∞
		20 döngü		**1 döngü**		

Elde edilen PCR ürünleri 1.5 ml'lik lobind tüpe alındı ve 80 µl nükleaz içermeyen su, 100 µl manyetik boncuk eklendi. Pipetaj işlemi ile karışım homojen hale getirildi. 5 dakika oda ısısında, 5 dakika manyetik stant üzerinde inkübe edilen örneklerin manyetik boncukları ile süpernatantı ayrıştı. Berrak haldeki süpernatant uzaklaştırıldı. Boncukların üzerine 200 µl %80'lik etanol ilave edildi, tüpler manyetik stant üzerinde birkaç kez döndürülerek boncukların temizlenmesi sağlandı ardından süpernatant atıldı. Aynı işlem

bir kez daha tekrarlandı. Süpernatant atıldıktan sonra manyetik stant üzerinde 10 dakika bekletilerek alkolün tamamen uzaklaştırılması sağlandı. Tüplere 32 µl nükleaz içermeyen su konuldu ve pipetaj yapılarak boncuk ile homojen hale getirildi. Homojen hale gelen karışımın bulunduğu tüpler manyetik standa yerleştirildi, süpernatant berraklaşana kadar bekletildi ve 28 µl alınarak temiz PCR tüpüne aktarıldı. Hazırlamış olduğumuz kütüphaneler, çalışmaya devam edene kadar -20˚C derin dondurucuda saklandı.

Hazırlanan kütüphanelerin kantitasyonu için QIAseq Library Quant Assay Kit kullanıldı ve çalışma Rotor-Gene Real-Time PCR cihazında gerçekleştirildi. Kütüphane örnekleri 1/50, 1/5.000 ve 1/50.000 dilüsyon serileri elde edilecek şekilde seyreltildi. Kit içerisinde mevcut olan ILM DNA standart için de 5 ayrı seri dilüsyon hazırlandı. Çizelge 3.10'da yer alan reaktifler kullanılarak PCR miski hazırlandı.

Çizelge 3.13. SYBR Green PCR miksi bileşenleri ve hacimleri

Reaktif	**Hacim**
Primer mix (10 uM)	0.8 µl
SYBR Green ROX Fast Mastermix	10 µl
Nükleaz içermeyen su	6.7 µl
TOPLAM	**17.5µl**

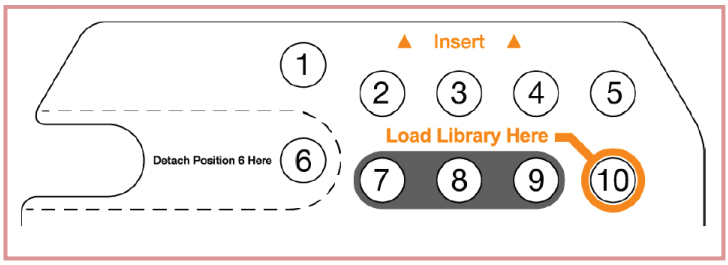
Hazırlanan miks tüplere 17.5 µl olacak şekilde dağıtıldı. Her tüp içerisine, 2.5 µl dilüe edilmiş standartlardan sırası ile üçer tekrar eklendi. NTC (Non template control, su kontrol) da üçer tekrar konuldu. 1/5.000 ve 1/50.000 dilüe edilmiş kütüphaneler sırayla eklendi, Rotor-Gene Real-Time PCR cihazına yüklemesi yapıldı. PCR protokolü Çizelge 3.11'da açıklanmıştır.

Çizelge 3.14. Real-Time PCR koşulları

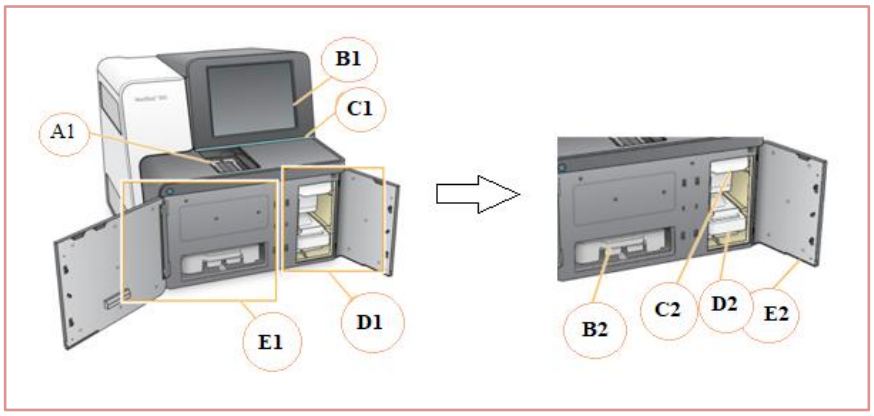
95˚C	**95˚C**	**68˚C**	**65˚C**	**60˚C**
10 dk	15 sn	5 sn	5 sn	60 sn*
1 döngü	**30 döngü**			
***30. döngü sonunda floresan ışıma için veri toplanmaktadır.**				

PCR bittiğinde cihazın 'Green' kanalından analiz gerçekleştirildi. Analiz için dilüe edilmiş örneklerin CT (Threshold cycle, reaksiyona girdiği döngü) değerleri not edildi. Elde edilen CT değerleri nM birimine dönüştürüldü ve kütüphane kantitasyonu tamamlandı.

Qiaseq panel ile hazırlanan örnekler dizilenmesi için nükleaz içermeyen su ile 4 nM olarak bildirilen protokol konsantrasyonuna indirildi. 4nM örneklerin her birinden 5 µl alınarak tep bir tüpte kütüphane hazırlandı. Denatürasyon için kullanılmak üzere 0.2 N NaOH hazırlandı. 5 µl4 nM örnek ve 5 µl 0.2 N NaOH pipetaj ile karıştırıldı. Oda ısısında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Denatürasyonun sonlandırılması için 5 µl pH=7 ve 200 nM Tris HCL (Hidroklorik asit) eklendi. Ayrı bir eppendorf tüpe 985 µl Hibridizasyon Buffer (HT1) alındı ve üzerine final hacmi 15 µl (5 µl 4nM kütüphane + 5 µl 0,2 N NaOH + 5 µl 200mM Tris HCL) olan kütüphane eklendi. İşleme pipetaj ile devam edildi ve sonucunda 20 pM kütüphane hazırlandı. Temiz ve yeni bir eppendorf tüpe 1203 µl HT1 eklendi ve 20 pM kütüphaneden 97 µl ilave edildi, pipetaj ile karıştırıldı. Kütüphanelerin yüklenmesi basamağında temiz 1.5 ml'lik eppendorf tüp içerisinde 1994 µl HT1 ve 6 µl 100 µM Read 1 Primer homojen olana kadar karıştırıldı. Hazırlanan karışımın tamamı, NextSeq kartuşunun 7 numaralı kuyusuna aktarıldı. 1.5 pM olarak hazırlanmış örneğin tamamı da NextSeq kartuşunun 10. pozisyonundaki kuyucuğa yüklendi (Şekil 3.3). NextSeq 500 cihazına NextSeq Flowcell, NextSeq kartuş, NextSeq buffer ve atık kutusu yerleştirildi ve dizileme çalışması (Şekil 3.4) başlatıldı.



Şekil 3.3. NextSeq 500 yükleme kartuşu



Şekil 3.4. NextSeq 550 sistemi (A: Görüntüleme bölümü, B: Dokunmatik ekran, C: Durum gösterge çubuğu, D: Buffer bölmesi, E: Reaktif bölmesi, B1: Reaktif kartuşu, C1: Buffer kartuşu, D2: Kullanılmış (atık) reaktif bölümü)

3.2.1. Verilerin Biyoinformatik Analizi

Yeni nesil dizileme çalışmalarından FASTQ, BAM, BAI ve VCF formatında dosyalar elde edilmektedir. FASTQ dosyaları ham verilerin olduğu, işlenmemiş büyük verileri bulundurur. BAM dosyaları, referans diziye hizalanmış sekans dizilerinin olduğu dosyalardır. BAİ dosyaları, BAM formatındaki verilerin indeks bilgilerini içeren dosyalardır. VCF dosyaları ise varyantların isimlendirildiği dosya türüdür.

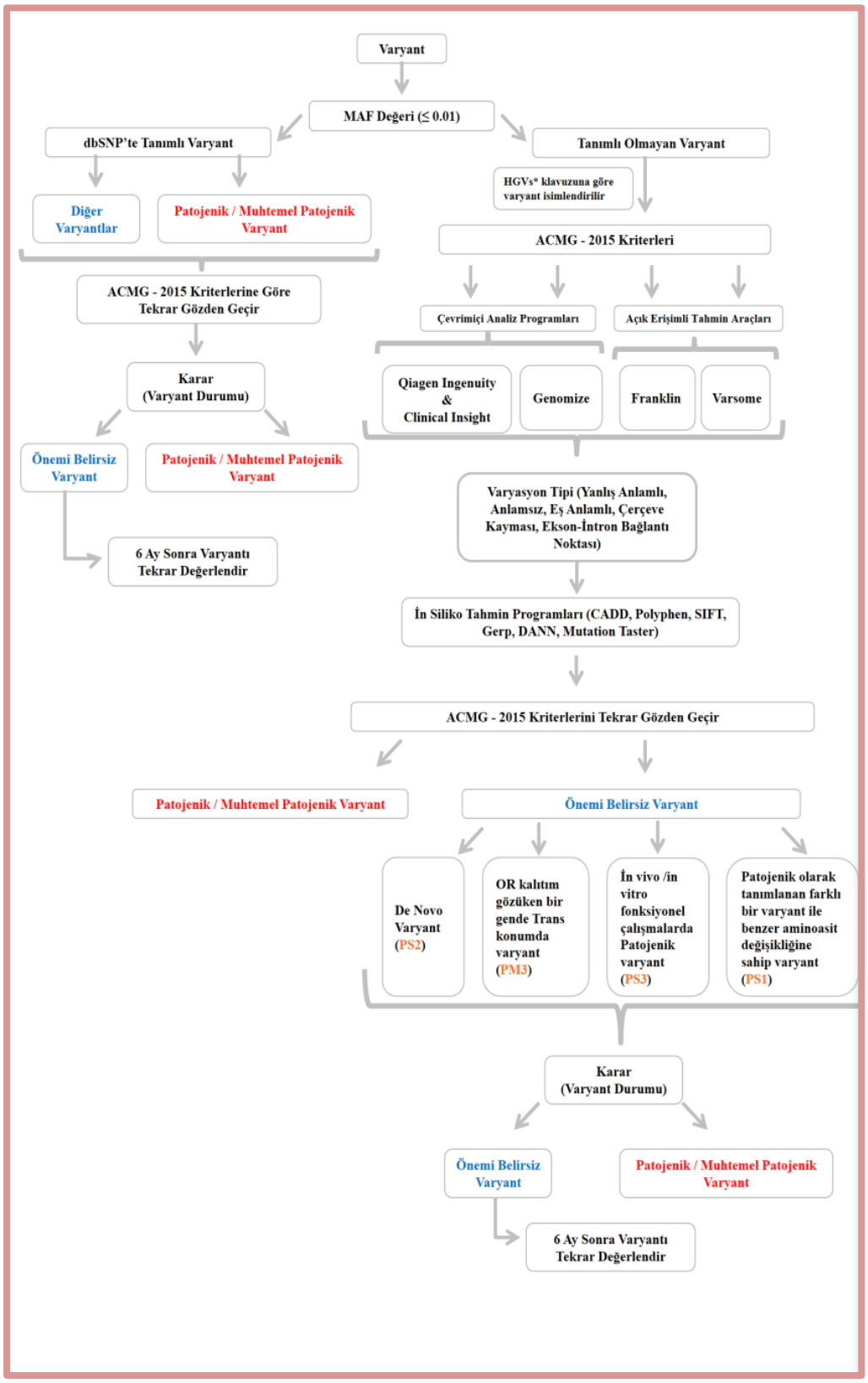
Çalışmamızdan elde ettiğimiz FASTQ verileri, analiz için uygun olan BAM formatına dönüştürüldü. Her bir örneğe ait veriler referans genom (Hg19/GRCh37) ile hizalanarak karşılaştırıldı. Biyoinformatik yorumlama için Qiagen Ingenuity Variant Analysis (IVA) ve Qiagen Clinical Insight (QCI) analiz programları kullanıldı. IVA ve QCI haricinde hedefli genlerin nükleotit dizilimleri Integrative Genomics Viewer-Broad Institute (IGV) programında da incelendi.

BAM dosyaları IVA ve QCI yazılımlarına aktarıldığında ilk olarak kalite skorlama filtreleri değerlendirildi. Kabul edilen kalite skorlarını karşılayan örnekler kullanılarak varyasyon tespiti ve değerlendirilmesi gerçekleştirildi. IVA ve QCI biyoinformatik analiz programlarında referans dizi ile örnek arasındaki sapmalar ve farklılıklar, bu varyasyonların patojenitesi ile ilgili sunulan ön bilgiler farklı açık erişimli veri tabanları kullanılarak yorumlandı.

Mevcut varyantların kalıtım paterni ve patojenitesi ClinVar, Franklin by Genoox, VarSome (The Human Genomic Community), MAF, dbSNp, GenomAD ve OMIM veri tabanlarında tarandı ve değerlendirildi. İn-siliko analizleri gerçekleştirmek için ise Mutation Taster, SIFT, PolyPhen, DANN, CADD ve Gerp skor verileri göz önünde bulunduruldu.



Şekil 3.5. Biyoinformatik analiz basamakları



Şekil 3.6. Varyant filtrelemesi (Eker, 2022)

Özgün tasarlanmış gen panelinde yer alan genler NextSeq 550 sistemi kullanılarak dizilendi. Elde edilen verilerin analizleri Illumina NextSeq-550 Software ve QIAGEN Clinical Insight (QCI) Interpret yazılımlarında ve görsel değerlendirmeleri IGV_2.3.8 programında tamamlandı. Ancak NGS çalışma prensibinden kaynaklanan teknik kısıtlamalar nedeni ile;

-GC nükleotitlerince zengin bölge mutasyonları,

-Segmental delesyon ve duplikasyonlar,

-Homopolimer bölge mutasyonları,

-Kompleks yeniden düzenlemeler görülememektedir. Kullanılan protokol ekzonik bölgelerin değerlendirilmesine yönelik tasarlandığından derin intronik mutasyonlar da belirlenememektedir.

BÖLÜM 4

BULGULAR

Çalışmamıza Ekim 2021-Eylül 2022 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğine TGK şikâyeti ile başvuran, eşi ile akrabalık ilişkisi bulunmayan, karyotip analizi normal, trombofili panelinde FII (Protrombin) ve FV Leiden homozigot mutant varyantı olmayan ve en az üç kuşak Trakya bölgesinde yaşadığını bildiren 40 kadın hasta dahil edildi. Hastaların yaşları 23-39 aralığındaydı ve ortalaması 31,88 olarak hesaplandı. Çalışmaya dahil edilen kadınların gebelik kaybı sayısı 2 ila 7 arasında değişmekteydi (Çizelge 4.1).

TGK'nın genetik etiyolojisi hakkında yapılan literatür taraması sonucunda, TGK ile doğrudan ilişkili olan ve ilişkisi olduğu düşünülen 43 gene (*ACE, CBS, CPB2, CCDC39, CHD7, DNAH1, LHCGR, NLRP7, F10, F11, F12, F13A1, F13B, F2R, F3, F7, F8, F9, FGA, FGB, GP1BA, GP1BB, GP5, GP9, ITGA2, ITGB3, KLKB1, MTHFR, MTR, MTRR, PLAT, PLAUR, PLG, PROCR, SERPINE1, SERPINF1, TFPI, THBD, F2, F5, PROC, PROS1, SERPINC1)* özgü tarafımızca tasarlanmış "Qiaseq Targeted DNA Custom Panel" yöntemi kullanılarak hasta örnekleri çalışıldı.

Çizelge 4.15. Hastaların gebelik kaybı sayıları ve yaşları

NO	GK SAYISI	YAŞ	NO	GK SAYISI	YAŞ
H1	4	31	**H21**	2	31
H2	3	30	**H22**	7	31
H3	2	36	**H23**	2	38
H4	2	30	**H24**	2	26
H5	4	32	**H25**	2	34
H6	2	30	**H26**	3	31
H7	3	35	**H27**	2	36
H8	3	27	**H28**	2	28
H9	2	25	**H29**	2	31
H10	2	27	**H30**	2	23
H11	2	34	**H31**	2	35
H12	3	38	**H32**	2	29
H13	2	34	**H33**	3	31
H14	2	30	**H34**	4	36
H15	2	28	**H35**	2	25
H16	2	39	**H36**	3	23
H17	2	35	**H37**	6	25
H18	2	32	**H38**	2	24
H19	4	36	**H39**	2	31
H20	2	29	**H40**	2	37
	YAŞ ORTALAMASI	:		**31,88**	

Çalışmaya dahil edilen hastaların NGS verileri 43 gen için ≥96 kaplam yüzdesine sahipti. Hedeflenen gen bölgelerinin "Unique moleculer identifiers (UMI, Eşsiz moleküler tanımlayıcılar)" indeks kaplamı ise ≥10x ile ≥30x değerlendirmesinde

ortalama ≥99 olarak kaydedildi. Saptanan varyantların ön analizinde okuma derinliği en az 20 olarak filtrelendi.

Hastalarımızın NGS verileri belirlenen kalite parametleri açısından yeterli olarak değerlendirildikten sonra Bölüm 3'te anlatılan biyoinformatik analiz aşamaları her bir hasta için uygulandı. Analizlerin tamamlanmasının ardından çalışılan 40 hastamızın 32'sinde (%80) bir ve/veya daha fazla ilişkili varyant saptandı. Paneldeki 43 genden 25 tanesinde (~%58) toplamda 61 varyant belirlendi.

ACMG-15 kriterlerine göre saptanan varyantların 6'sı patojenik, 3'ü olası patojenik, 32'si klinik önemi belirsiz ve 20'si iyi huylu/olası iyi huylu olarak değerlendirildi (Çizelge 4.2). Saptanan NM_015512.5(*DNAH1)*:c.10123_10126dupCAGC (p.Leu3376ProfsTer6), NM_000361.3(*THBD):*c.1335C>A (p.Cys445Ter), NM_181446.3(*FSHR)*:c.1127G>A (p.Cys376Tyr), NM_001312675.2(*F10)*:c.257-12C>G, NM_005957.5(*MTHFR)*:c.273A>C (p.Ile91Ile), NM_000313.4(*PROS1)*:c.574A>G (p.Met192Val), NM_000789.4(*ACE)*:c.2059-9T>A, NM_000233.4(*LHCGR)*:c.55_56insTGCCGC (p.Gln18_Pro19insLeuPro) ve NM_000133.4(*F9)*:c.177C>G (p.Asn59Lys) varyantları, daha önce literatürde rapor edilmediği için novel (tanımlanmamış, yeni) varyant olarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre olası patojenik ve patojenik olarak değerlendirilen varyantlara sahip 9 hastamızın birinde saptanan iki varyant hastalık fenotipi ile uyumlu bulundu. Bu doğrultuda özgün tasarlanmış gen panelinin klinik tanıya katkı oranı %11,1 olarak hesaplandı (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.2. Saptanan varyantların dbSNP referans SNP (rs) kayıtları, ClinVar verileri, in siliko tahmin araçları analiz sonuçları ve ACMG-15 patojenite skorları

NO	GEN	TRANSKRİPT	HGVSc	dbSNP	ClinVar	Varsome	Franklin	ACMG-15
H1	*CBS*	NM_001178009.3	c.1316G>A	rs756467921	VUS	LP	LP	PM2, PM1, PP2
	*FSHR**	NM_181446.3	c.1127G>A			VUS	VUS	PM2, PP3
H2	***NORMAL***							
H3	*F10**	NM_001312675.2	c.257-12C>G			LB	VUS	PM2, BP7
	NLRP2	NM_017852.5	c.152A>G	rs746141394		VUS	VUS	PM2
H4	*MTHFR*	NM_005957.5	c.665C>T	rs1801133	İlaç yanıtı	B	B	PP3, BA1, BS2, BP6
H5	*SERPINC1*	NM_000488.4	c.236G>A	rs121909552	LP	LP	P	PM1, PP2, PM2
	*THBD**	NM_000361.3	c.1335C>A			LP	LP	PVS1, PM2
H6	*CBS*	NM_000071.3	c.833T>C	rs5742905	P	P	P	PM1, PP2
	*DNAH1**	NM_015512.5	c.10123_10126dupCAGC			LP	LP	PVS1, PM2
	DNAH1	NM_015512.5	c.10216G>A	rs201752275	LB	B	B	BS1, BS2, BP6
H7	*FGB*	NM_005141.5	c.1204G>A	rs200792588		VUS	VUS	PM2
	MTHFR	NM_005957.5	c.665C>T	rs1801133	İlaç yanıtı	B	B	PP3, BA1, BS2, BP6
H8	*CHD7*	NM_017780.4	c.6401A>G	rs753361097		LB	VUS	PM2, PP2, BP4
	F10	NM_000504.4	c.747+11G>A	rs376728587	VUS	LB	VUS	PM2, BP7

	MTHFR	NM_005957.5	c.665C>T	rs1801133	İlaç yanıtı	B	B	PP3, BA1, BS2, BP6
H9	*CBS*	NM_000071.3	c.833T>C	rs5742905	P	P	P	PM1, PP2, PP3, PP5
	MTHFR	NM_005957.5	c.665C>T	rs1801133	İlaç yanıtı	B	B	PP3, BA1, BS2, BP6
	*LHCGR**	NM_000233.4	c.55_56insTGCCGC			VUS	VUS	PM2, PP2, BP4
	F7	NM_000131.4	c.67G>A	rs138470706		LB	VUS	PM2, BP4
	FSHR	NM_181446.3	c.374+8C>T	rs764505936	İlaç yanıtı	LB	VUS	PP3, BA1, BS2, BP6
H10	*PLAT*	NM_033011.4	c.493+8G>A	rs8178764		LB	LB	PM2, BS2, BP4
H11	*MTHFR**	NM_005957.5	c.273A>C			LB	VUS	PM2, BP7
	MTHFR	NM_005957.5	c.665C>T	rs1801133	İlaç yanıtı	B	B	PP3, BA1, BS2, BP6
H12	*MTHFR*	NM_005957.5	c.665C>T	rs1801133	İlaç yanıtı	B	B	PP3, BA1, BS2, BP6
H13	*CBS*	NM_000071.3	c.833T>C	rs5742905	P	P	P	PM1, PP2, PP3, PP5
	MTHFR	NM_005957.5	c.665C>T	rs1801133	İlaç yanıtı	B	B	PP3, BA1, BS2, BP6
H14	*MTRR*	NM_002454.3	c.1453C>T	rs1021117864		LB	VUS	PM2
H15	***NORMAL***							
H16	*MTHFR*	NM_005957.5	c.665C>T	rs1801133	İlaç yanıtı	B	B	PP3, BA1, BS2, BP6
H17	*ACE*	NM_000789.4	c.3226G>T	rs534480370	VUS	VUS	VUS	PM2, BS2
	FGA	NM_000508.5	c.2570G>C	rs376940583		VUS	VUS	PM2, PP3
	KLKB1	NM_001318394.2	c.901G>A	rs145972257		LB	VUS	PM2

	MTHFR	NM_005957.5	c.665C>T	rs1801133	İlaç yanıtı	B	B	PP3, BA1, BS2, BP6
H18	*MTHFR*	NM_005957.5	c.665C>T	rs1801133	İlaç yanıtı	B	B	PP3, BA1, BS2, BP6
H19	*KLKB1*	NM_001318394.2	c.403G>A	rs372296815		VUS	VUS	PM2
	MTHFR	NM_005957.5	c.665C>T	rs1801133	İlaç yanıtı	B	B	PP3, BA1, BS2, BP6
H20	*F5*	NM_000130.5	c.2223C>A	rs201087308		LB	VUS	PM2, BP4
	MTHFR	NM_005957.5	c.665C>T	rs1801133	İlaç yanıtı	B	B	PP3, BA1, BS2, BP6
H21	*DNAH1*	NM_015512.5	c.9814C>T	rs200784189	VUS	LB	VUS	BS1
H22	*MTHFR*	NM_005957.5	c.665C>T	rs1801133	İlaç yanıtı	B	B	PP3, BA1, BS2, BP6
H23	*F7*	NM_019616.4	c.739+15_739+51dupA >ACCACTCTCCCCT GTCCGACCGCGGTG CTGGGTGGGTG	rs761017695		VUS	VUS	PM1
H24	*F11*	NM_000128.4	c.325+5G>T	rs372102736	VUS	VUS	VUS	PM2, PP3
	MTHFR	NM_005957.5	c.665C>T	rs1801133	İlaç yanıtı	B	B	PP3, BA1, BS2, BP6
H25	***NORMAL***							
H26	*DNAH1*	NM_015512.5	c.8885A>C	rs199602894	VUS	LB	VUS	PM2, BP6
	F8	NM_000132.4	c.396A>C	rs137852388	P	VUS	P	PM1, PP2, PM2, PP3, PP5
	MTHFR	NM_005957.5	c.665C>T	rs1801133	İlaç yanıtı	B	B	PP3, BA1, BS2, BP6
H27	*ACE*	NM_000789.4	c.2641+15C>T	rs746616857		LB	VUS	PM2, BP7
	MTRR	NM_002454.3	c.346C>A	rs202110383	VUS	LB	VUS	BS1

H28	*MTHFR*	NM_005957.5	c.665C>T	rs1801133	İlaç yanıtı	B	B	PP3, BA1, BS2, BP6
H29	*DNAH1*	NM_015512.5	c.867G>T	rs1203655427		LB	VUS	PM2, BP7
	MTHFR	NM_005957.5	c.665C>T	rs1801133	İlaç yanıtı	B	B	PP3, BA1, BS2, BP6
H30	*ACE**	NM_000789.4	c.2059-9T>A			VUS	VUS	PM2, PP3
	*F9**	NM_000133.4	c.177C>G			VUS	VUS	PM2, PP3, PP2
	MTHFR	NM_005957.5	c.665C>T	rs1801133	İlaç yanıtı	B	B	PP3, BA1, BS2, BP6
H31	***NORMAL***							
H32	***NORMAL***							
H33	*ACE*	NM_000789.4	c.3108C>A	rs142947404	VUS	LB	VUS	PM2, BP4
	*PROS1**	NM_000313.4	c.574A>G			VUS	VUS	PM2, PP2
H34	***NORMAL***							
H35	*FGB*	NM_005141.5	c.794C>T	rs6054	VUS	VUS	VUS	PM2, PP5, BP6
H36	***NORMAL***							
H37	*CBS*	NM_000071.3	c.833T>C	rs5742905	P	P	P	PM1, PP2
H38	***NORMAL***							
H39	*NLRP7*	NM_001127255.1	c.2146C>G	rs104895550		VUS	VUS	PM2
	DNAH1	NM_015512.5	c.8885A>C	rs199602894	VUS	LB	VUS	PM2, BP6
	MTRR	NM_002454.3	c.1021G>A	rs74790259	VUS	LB	VUS	BS1
H40	*PROCR*	NM_006404.5	c.337C>T	rs146420040		LB	VUS	PM2, PP3

- P: Patojenik, LP: Olası patojenik, VUS: Klinik önemi belirsiz, LB: Olası iyi huylu, B: İyi huylu
- (*) Novel (yeni) varyant

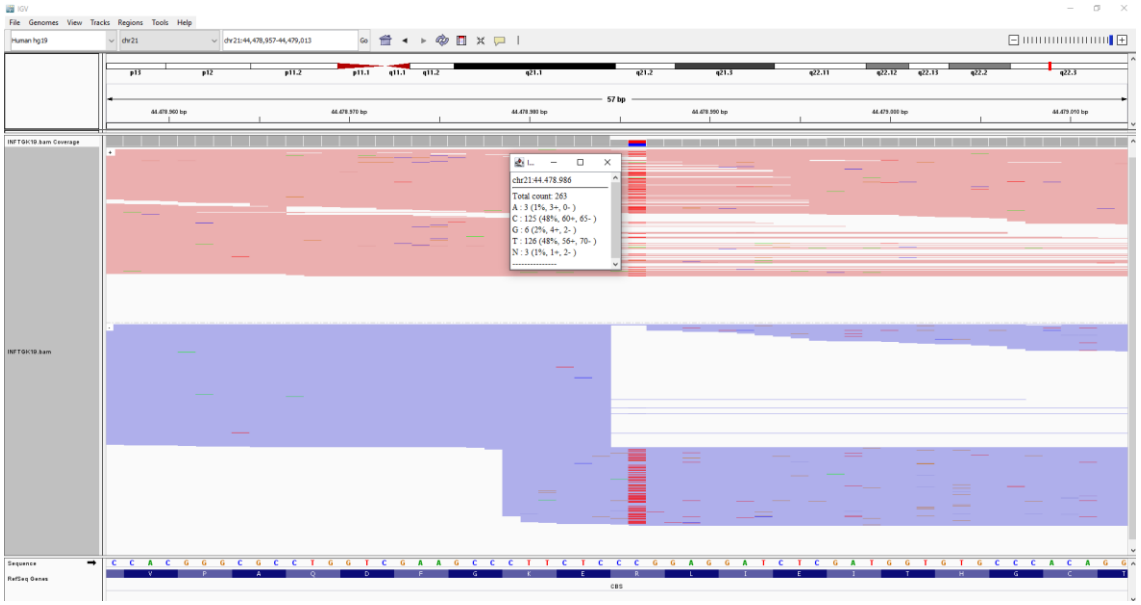
Çizelge 4.3. Çalışmada varyant saptanan genlerin OMIM verileri

GENLER	OMIM FENOTİPİ	MIM NUMARASI	KALITIM
ACE	1. Renal tubular dysgenesis 2. {Microvascular complications of diabetes 3} 3. {Stroke, hemorrhagic}	1. 267430 2. 612624 3. 614519	1. OR 2. - 3. -
CBS	1. Homocystinuria 2. B6-responsive and nonresponsive types	1. 236200 2. 236200	1. OR 2. OR
CHD7	1. CHARGE syndrome 2. Hypogonadotropic hypogonadism 5 with or without anosmia	1. 214800 2. 612370	1. OD 2. OD
DNAH1	1. ?Ciliary dyskinesia, primary, 37 2. Spermatogenic failure 18	1. 617577 2. 617576	1. OR 2. OR
F10	1. Factor X deficiency	1. 227600	1. OR
F11	1. Factor XI deficiency	1. 612416	1. OR/OD
F5	1. Factor V deficiency 2. Thrombophilia 2 due to activated protein C resistance 3. {Budd-Chiari syndrome} 4. {Pregnancy loss, recurrent, susceptibility to, 1} 5. {Stroke, ischemic, susceptibility to} 6. {Thrombophilia, susceptibility to, due to factor V Leiden}	1. 227400 2. 188055 3. 600880 4. 614389 5. 601367 6. 188055	1. OR 2. OD 3. OR 4. OD 5. Multifaktöriyel 6. OD
F7	1. Factor VII deficiency 2. {Myocardial infarction, decreased susceptibility to}	1. 227500 2. 608446	1. OR 2. -
F8	1. Hemophilia A 2. Thrombophilia 13, X-linked, due to factor VIII defect	1. 306700 2. 301071	1. X'e bağlı resesif 2. -
F9	1. Hemophilia B 2. Thrombophilia 8, X-linked, due to factor IX defect, {Deep venous thrombosis, protection against} 3. {Warfarin sensitivity}	1. 306900 2. 300807 3.301052	1. X'e bağlı resesif 2. X'e bağlı resesif 3. X'e bağlı
FGA	1. Afibrinogenemia, congenital 2. Amyloidosis, familial visceral 3. Dysfibrinogenemia, congenital / Hypodysfibrinogenemia, congenital	1. 202400 2. 105200 3. 616004	1. OR 2. OD 3.-
FGB	1. Afibrinogenemia, congenital / Hypofibrinogenemia, congenital 2. Dysfibrinogenemia, congenital	1. 202400 2. 616004	1. OR 2. -

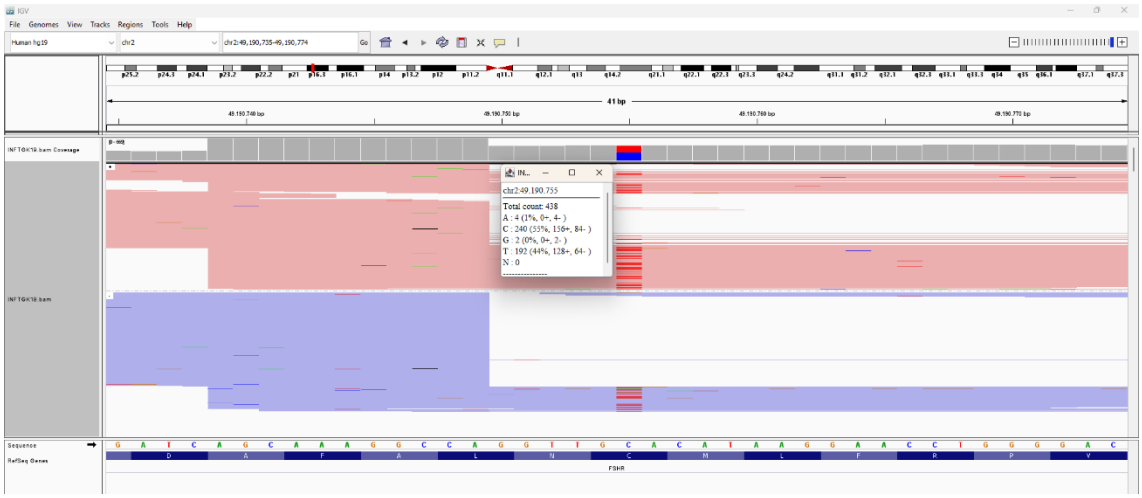
FSHR	1. Ovarian dysgenesis 1 2. Ovarian hyperstimulation syndrome 3. Ovarian response to FSH stimulation	1. 233300 2. 608115 3. 276400	1. OR 2. OD 3. OR
KLKB1	1. Fletcher factor (prekallikrein) deficiency	1. 612423	1. OR
LHCGR	1. Leydig cell adenoma, somatic, with precocious puberty 2. Leydig cell hypoplasia with hypergonadotropic hypogonadism / Leydig cell hypoplasia with pseudohermaphroditism / Luteinizing hormone resistance, female 3. Precocious puberty, male	1. 176410 2. 238320 3. 176410	1. - 2. OR 3. OD
MTHFR	1. Homocystinuria due to MTHFR deficiency 2. {Neural tube defects, susceptibility to} 3. {Schizophrenia, susceptibility to} / {Thromboembolism, susceptibility to}	1. 236250 2. 601634 3. 181500	1. OR 2. OR 3. OD
MTRR	1. Homocystinuria-megaloblastic anemia, cbl E type 2. {Neural tube defects, folate-sensitive, susceptibility to}	1. 236270 2. 601634	1. OR 2. OR
NLRP2	1. -	1. -	1. -
PLAT	1. Hyperfibrinolysis, familial, due to increased release of PLAT / Thrombophilia, familial, due to decreased release of PLAT	1. 612348	1. -
SERPINC1	1. Thrombophilia 7 due to antithrombin III deficiency	1. 613118	1. OR/OD
THBD	1. Thrombophilia 12 due to thrombomodulin defect 2. {Hemolytic uremic syndrome, atypical, susceptibility to, 6}	1. 614486 2. 612926	1. - 2. OD
PLG	1. Angioedema, hereditary, 4 2. Dysplasminogenemia, Plasminogen deficiency, type I	1. 619360 2. 217090	1. OD 2. OR
PROS1	1. Thrombophilia 5 due to protein S deficiency, autosomal dominant 2. Thrombophilia 5 due to protein S deficiency, autosomal recessive	1. 612336 2. 614514	1. OD 2. OR
NLRP7	1. Hydatidiform mole, recurrent, 1	1. 231090	1. OR
PROCR	1. -	1. -	1. -

Çalışmamızda patojenik, olası patojenik ve novel olarak değerlendirilen varyantlara sahip hastalara (H1, H3, H5, H6, H9, H11, H13, H26, H30, H33 ve H37) ait Integrative Genomics Viewer (IGV) analiz görüntüleri Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de yer almaktadır.

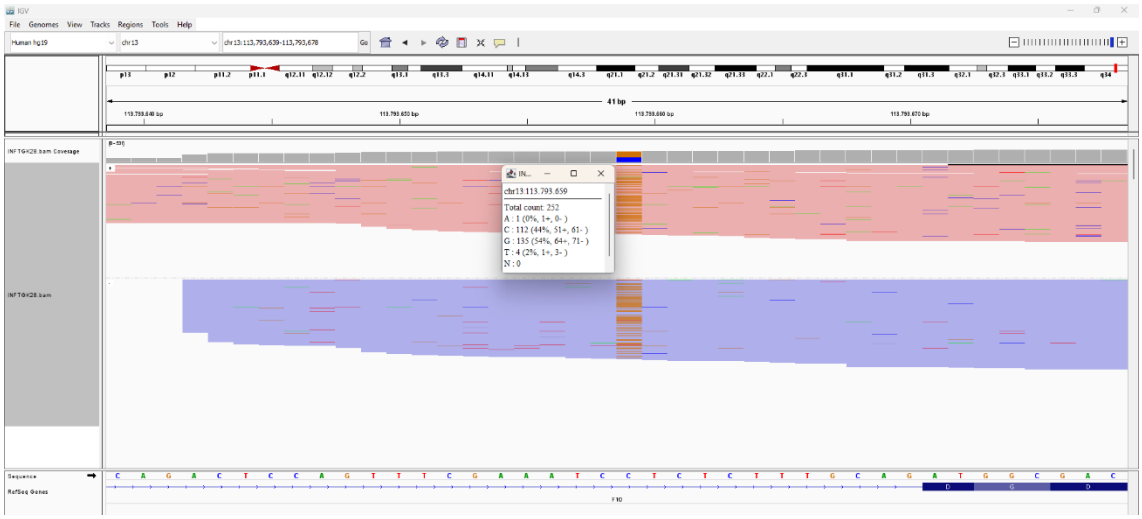
a)



b)

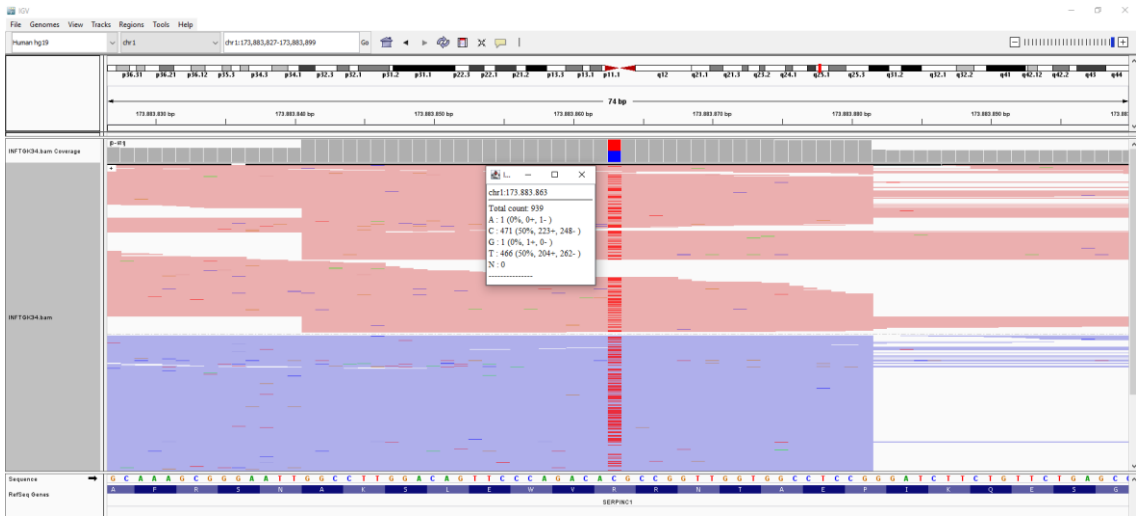


Şekil 4.1. H1 numaralı hastanın (a) heterozigot, NM_001178009.3(*CBS*):c.1316G>A (p.Arg439Gln) varyantı ve (b) heterozigot, NM_181446.3(*FSHR*):c.1127G>A (p.Cys376Tyr) – *novel* varyantı IGV görüntüleri

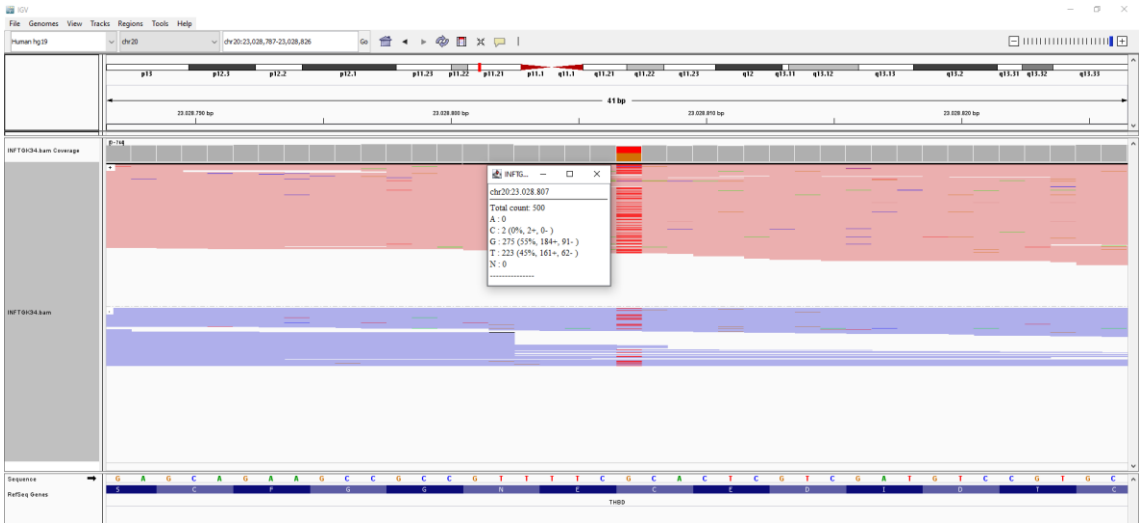


Şekil 4.2. H3 numaralı hastanın heterozigot, NM_001312675.2(*F10*):c.257-12C>G – *novel* varyantı IGV görüntüsü

a)



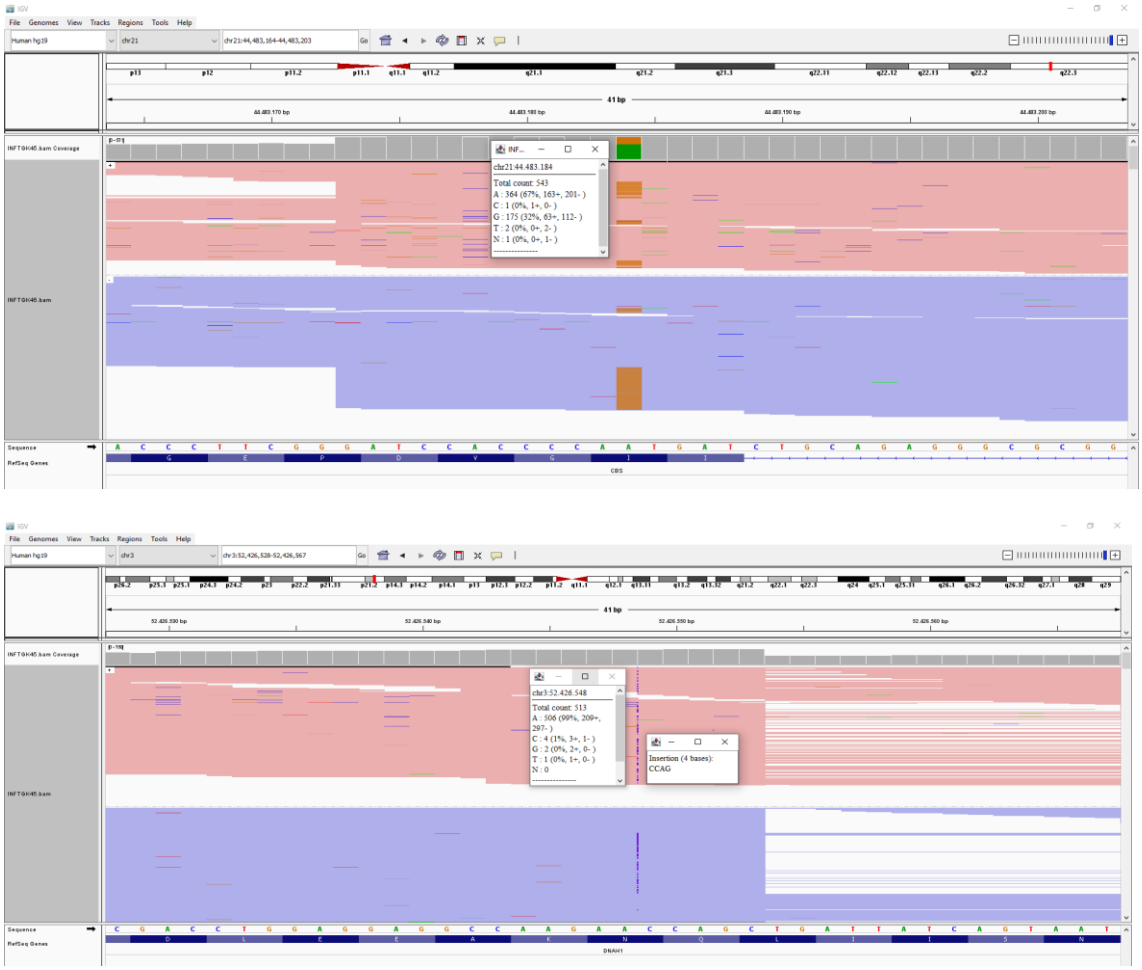
b)



Şekil 4.3. H5 numaralı hastanın a) heterozigot, NM_000488.4(*SERPINC1*):c.236G>A (p.Arg79His) ve b) heterozigot, NM_000361.3(*THBD*): c.1335C>A (p.Cys445Ter) – *novel* varyantlarına ait IGV görüntüleri

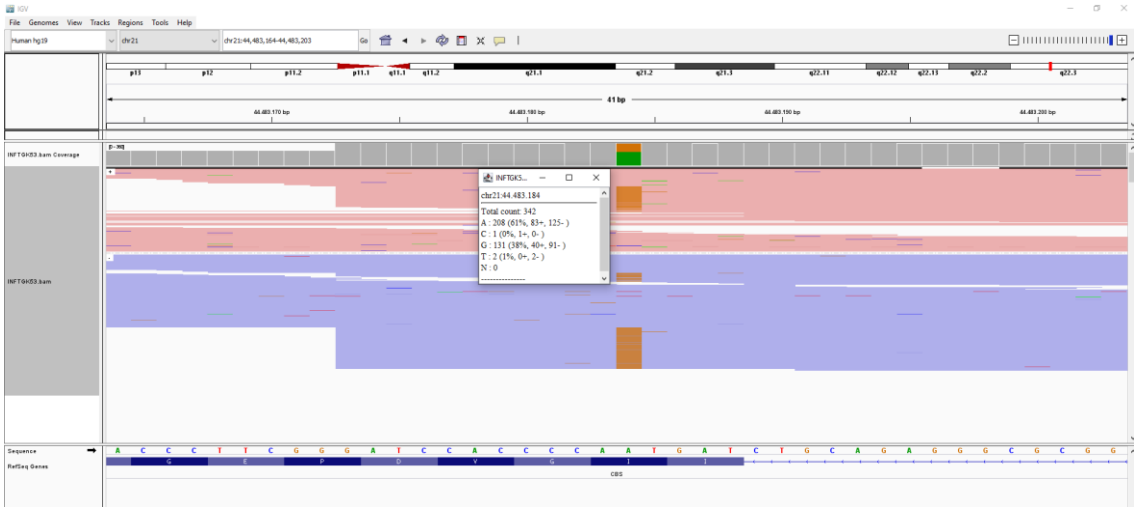
a)

b)

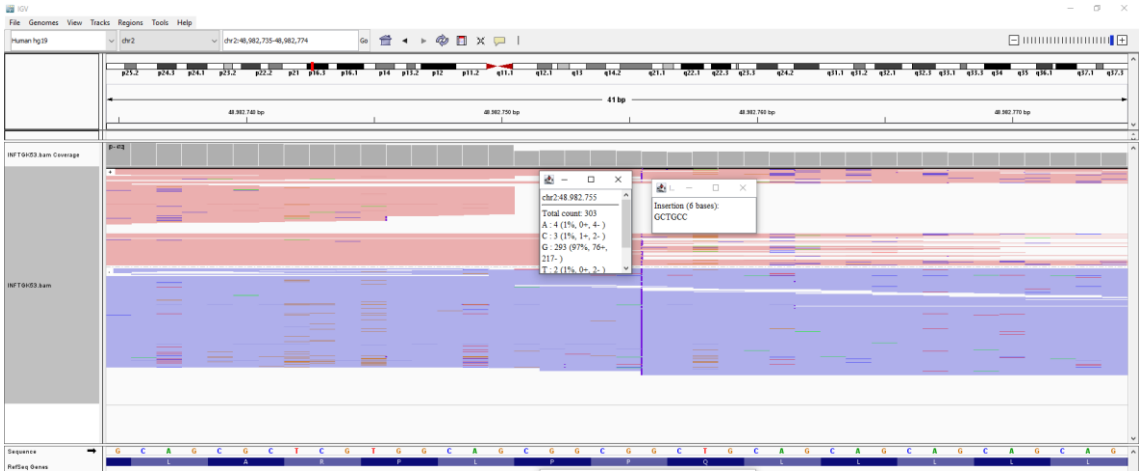


Şekil 4.4. H6 numaralı hastanın a) heterozigot, NM_000071.3(*CBS*):c.833T>C (p.Ile278Thr) ve b) heterozigot, NM_015512.5(*DNAH1*):c.10123_10126dupCAGC (p.Leu3376ProfsTer6) - *novel* varyantlarına ait IGV görüntüleri

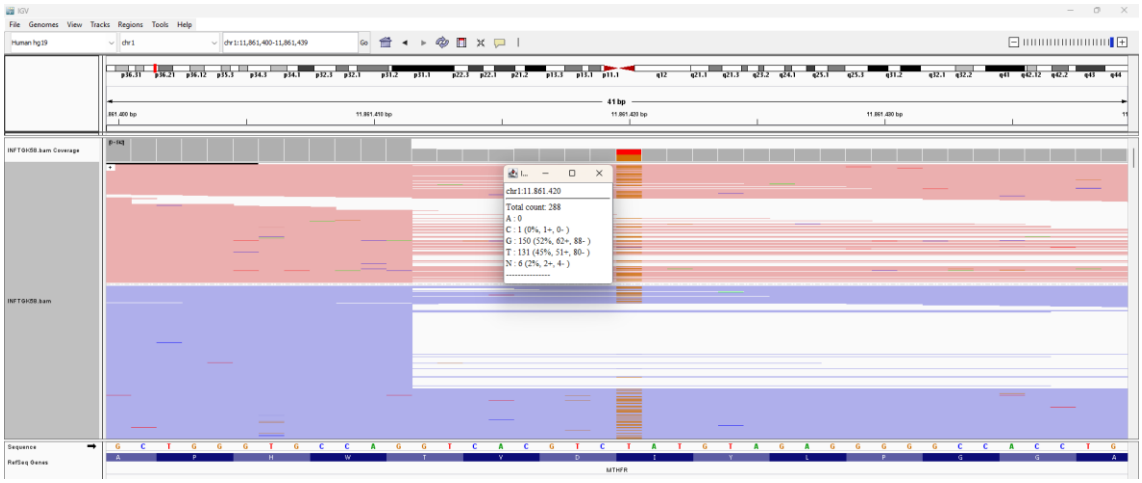
a)



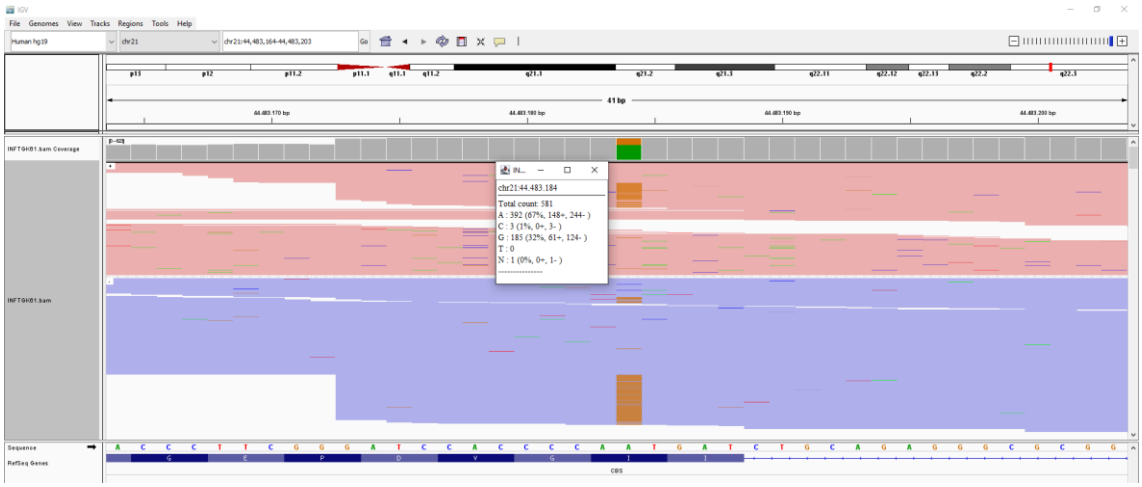
b)



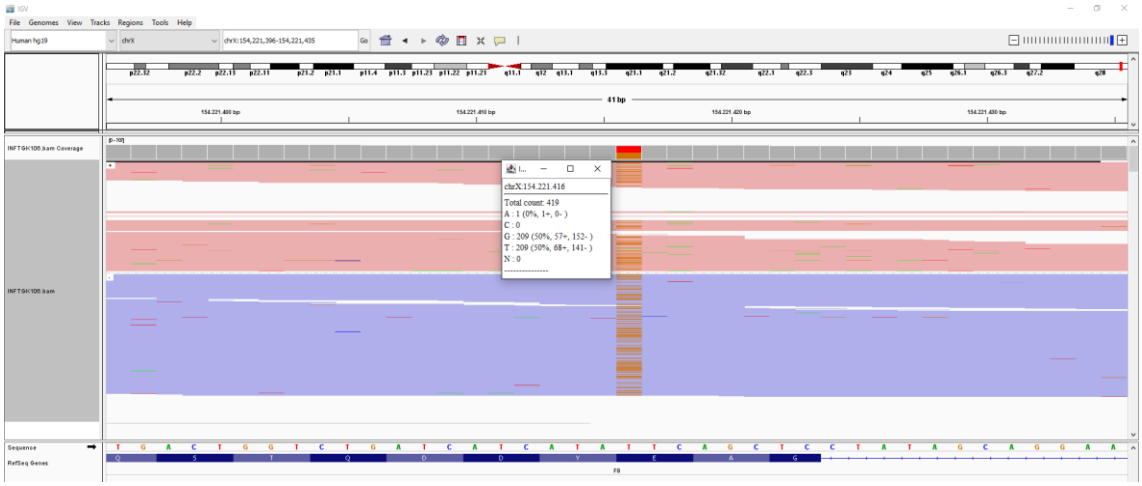
Şekil 4.5. H9 numaralı hastanın a) heterozigot, NM_000071.3(*CBS*):c.833T>C (p.Ile278Thr) ve b) heterozigot, NM_000233.4(*LHCGR*):c.55_56insTGCCGC (p.Gln18_Pro19insLeuPro) - *novel* varyantlarına ait IGV görüntüleri



Şekil 4.6. H11 numaralı hastanın heterozigot, NM_005957.5(*MTHFR*):c.273A>C (p.Ile91Ile) – *novel* varyantına ait IGV görüntüsü



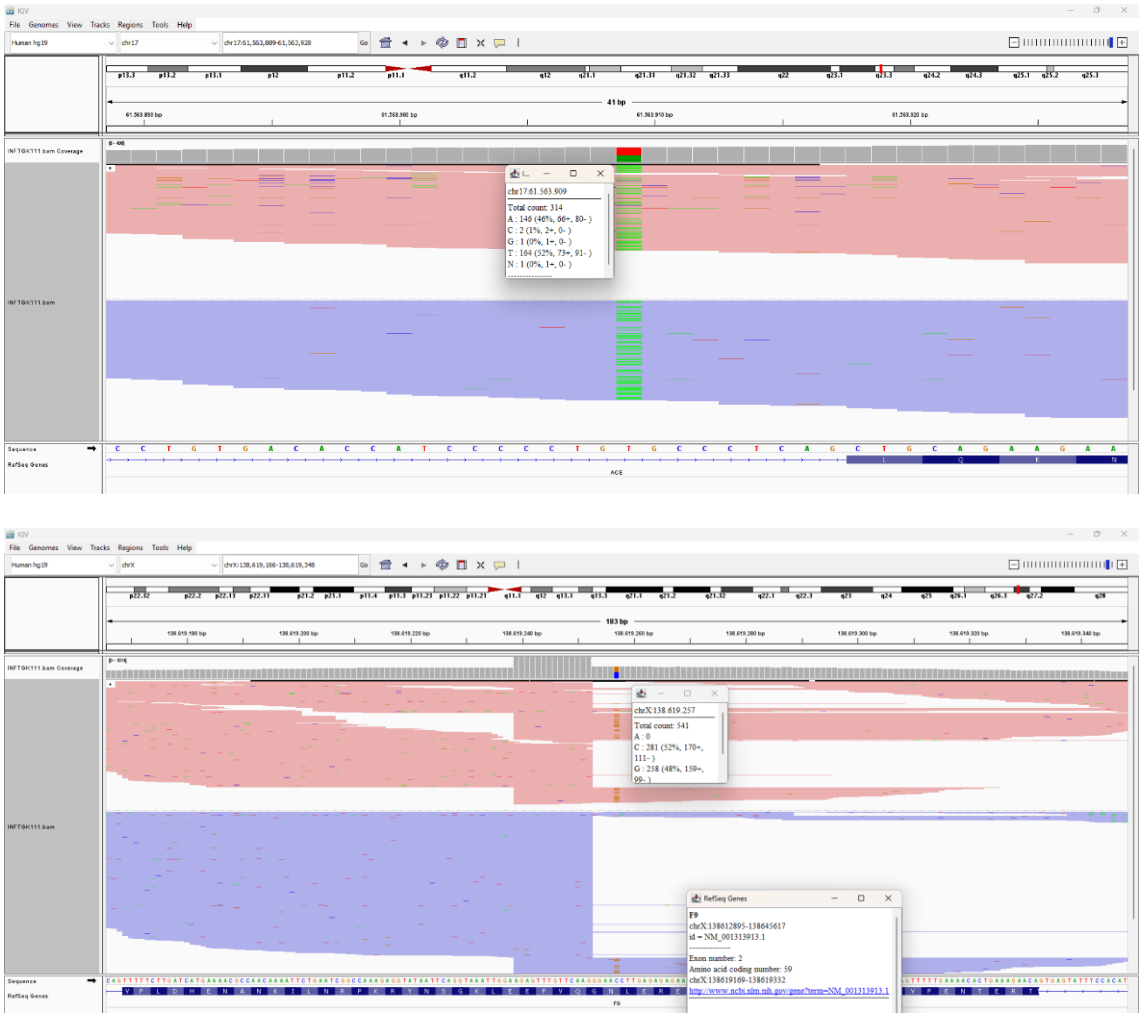
Şekil 4.7. H13 numaralı hastanın heterozigot, NM_000071.3(*CBS*):c.833T>C (p.Ile278Thr) varyantına ait IGV görüntüsü



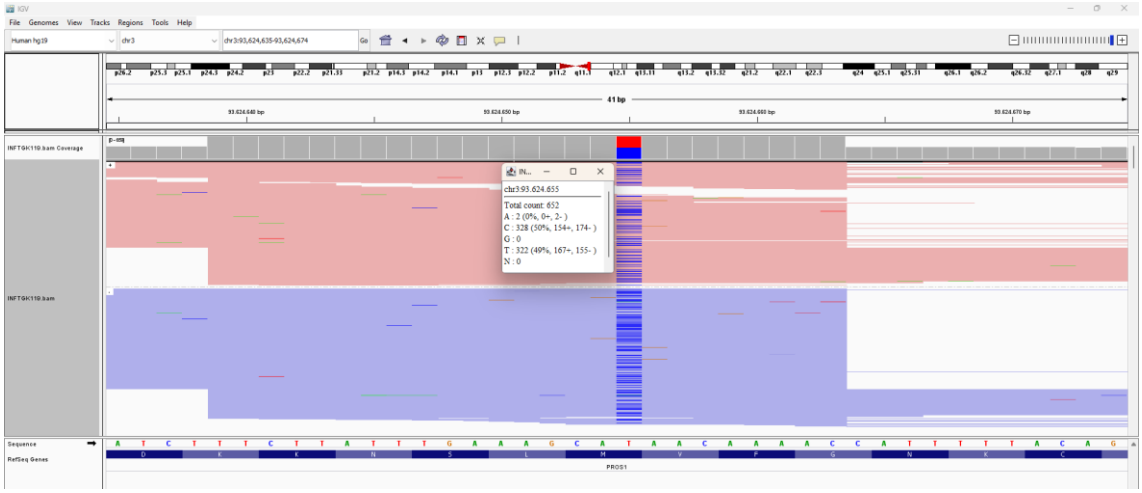
Şekil 4.8. H26 numaralı hastanın heterozigot, NM_000132.4(*F8*):c.396A>C (p.Glu132Asp) – *novel* ait IGV görüntüsü

a)

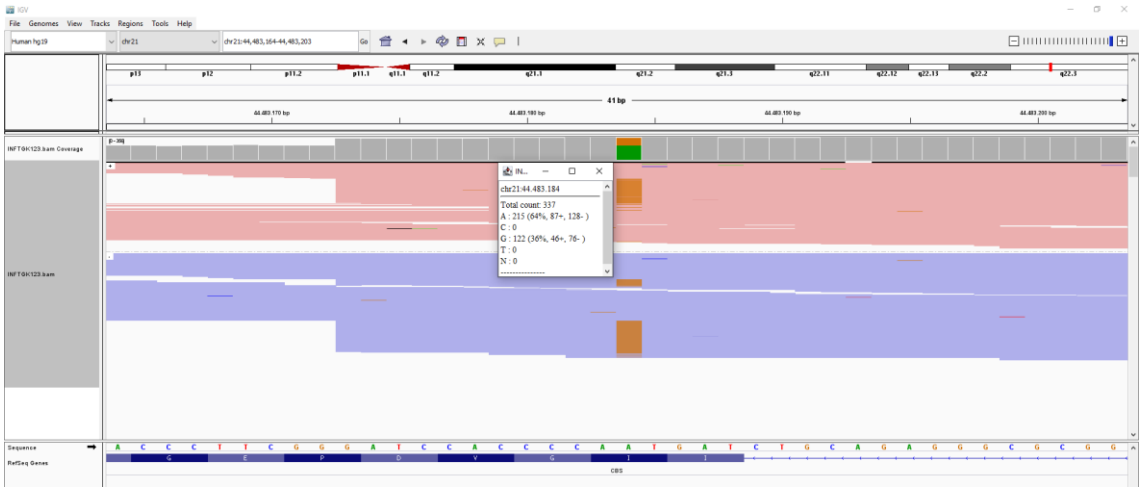
b)



Şekil 4.9. H30 numaralı hastanın a) heterozigot NM_000789.4(*ACE*):c.2059-9T>A - *novel* ve b) heterozigot, NM_000133.4(*F9*):c.177C>G (p.Asn59Lys) - *novel* varyantlarına ait IGV görüntüleri



Şekil 4.10. H33 numaralı hastanın heterozigot, NM_000313.4(*PROS1*):c.574A>G (p.Met192Val) - *novel* varyantına ait IGV görüntüsü



Şekil 4.11. H37 numaralı hastanın heterozigot, NM_000071.3(*CBS*):c.833T>C (p.Ile278Thr) varyantı ait IGV görüntüsü

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

TGK, uluslararası hastalık tanı ve tedavi rehberlerinde en az üç spontan gebeliğin veya en az iki ardışık gebeliğin 20. gebelik haftası öncesinde ve 250 gramın altındaki fetüsün uterin boşluktan atılarak sonlanması olarak tanımlanmaktadır. TGK üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık olarak %2'sini etkilemekle beraber, şikâyeti olan hastaların yarısına yakın bir kısmında henüz neden açıklanamamaktadır (Krishnaswamy ve Arora; 2019). Gebelik kayıplarının arka planında çeşitli mekanizma ve faktörlerin etkileri olduğu bilinmekle birlikte, idiyopatik grubuna dahil edilen, sebebi açıklanamayan TGK'nın genetik faktörler ile kontrol edildiği ön görülmektedir. TGK üzerinde genetik etiyoloji %3-5 oranında bildirilse de henüz tam anlamı ile aydınlatılamamıştır. Bu sebeple, genetik nedenlerin açıklığa kavuşturulması hastalığın tanı ve tedavi sürecinde önemli bir ilerleme sağlayacaktır.

Bu bağlamda çalışmamızda, TGK öyküsü olan kadın hastalarda genetik etiyolojinin NGS teknolojisi kullanılarak çoklu özgün gen panelleri sayesinde araştırılması amaçlanmıştır. Bu hedef doğrultusunda çalışmamızda tasarlamış olduğumuz 43 geni içeren özgün çoklu gen paneli (daha önce TGK ile ilişkisi bildirilmiş olan çalışma sonuçlarının (literatürler) ve TGK ile dolaylı ilişkisi olabileceği öngörülen aday genlerin de dahil edildiği) NGS teknolojisi kullanılarak çalışıldı.

Çalışmaya dahil edilen 40 hastanın 32'sinde (%80) bir ve/veya birden fazla varyant saptadık. Yapılan biyoinformatik analiz sonucunda 6 patojenik (*CBS* geninde iki,

F8 ve *SERPINC1* genlerinde bir), 3 olası patojenik (*CBS, THBD* ve *DNAH1* genlerinde bir), 32 VUS (*FSHR, F10, NLRP2, FGB, CHD7, LHCGR, F7, FSHR, MTHFR, MTRR, ACE, FGA, KLKB1, F5, DNAH1, F11, F9, PROS1* ve *PROCR* genlerinde) ve 20 iyi huylu/olası iyi huylu olmak üzere toplam 61 varyant saptadık.

Literatürde preeklampsi ile ilişkili olan *CBS* geni varyantları, gebelik kayıpları için de risk faktörü olarak bildirilmiştir. Kim vd.'leri (1997), c.833T>C (p.Ile278Thr) varyantının da içinde bulunduğu, *CBS* genindeki farklı varyantları barındıran maya sistemlerinin, sisteinsiz standart besiyerlerinde koloni haline gelmediklerini ve CBS enziminin önemli bir etkisinin olduğunu göstermiştir. Bautista vd.'leri (2018), Kim vd.'lerinin çalışmalarında bildirmiş oldukları mutasyonları referans alarak Meksikalı kadınlarda *CBS* polimorfizmlerinin preeklampsi ile ilişkisini araştırmıştır. Çalışma sonucunda preeklampsi ile *CBS* varyantları arasındaki bağlantı, ikili bağlantı dengesizliği grafiği ile açıklanmış olup, c.833T>C (p.Ile278Thr) varyantının kesin bilgi sunamadığı bildirilmiştir. NGS yöntemi ile kapsamlı kadın infertilitesinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise, *CBS* geni TGK ile ilişkili genler arasında bildirilmiştir (Bautista vd., 2018; Kim vd., 1997; Patel vd., 2018). Çalışmamızda *CBS* geninde patojenik ve olası patojenik olarak bildirilen iki farklı varyant saptadık. H1'de saptamış olduğumuz heterozigot, NM_001178009.3(*CBS*):c.1316G>A (p.Arg439Gln) varyantı dbSNP veri tabanında rs756467921 numarası ile tanımlanmış ve global allel frekansı 0.000023 (GnomAD_exome) olarak bildirilmiştir. H6, H9, H13 ve H37 numaralı hastalarımızda saptadığımız, patojenik olarak değerlendirilen heterozigot, NM_000071.3(*CBS*):c.833T>C (p.Ile278Thr) varyantı dbSNP veri tabanına rs5742905 numaralı ile tanımlanmış olup, global allel frekansı 0.006061 (ALFA) olarak bildirilmiştir.

SERPINC1 genindeki olası değişikliklerin, antitrombin (AT) aktivitesinde nasıl etki gösterdiği açıklanmış olup, AT ekspresyonunu ve fonksiyonunu azaltan varyasyonların venöz tromboembolizm (VTE) için güçlü kalıtsal risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Rogenhofer vd. 2014). Kraft vd.'leri (2017), homozigot antitrombin eksikliği olan 22 gebede AT eksikliğini araştırdıkları çalışmalarında, AT eksikliğinin erken doğum ve gebelik kaybıyla yüksek derecede alakalı olduğunu bildirmiştir (Kraft vd, 2017). Guerra-Shinohara vd.'leri (2012), 117 TGK öyküsü olan hasta ve 264 sağlıklı doğurgan kadını dahil ettikleri çalışmalarında, *SERPINC1* geninin de dahil olduğu bir dizi

gende, tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) TGK ile ilişkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar çalışma sonucunda *SERPINC1* genindeki varyantların TGK riskini arttırdığını rapor etmişlerdir (Guerra-Shinohara vd., 2012). Çalışmamızda H5 numaralı hastada saptamış olduğumuz heterozigot, NM_000488.4(*SERPINC1*):c.236G>A (p.Arg79His) varyantı, dbSNP veri tabanında rs121909552 numarası ile kayıtlı olup, global allel frekansı 0.000095 (GnomAD_exome) olarak bildirilmiştir. NM_000488.4(*SERPINC1*):c.236G>A (p.Arg79His) varyantı ClinVar ve HGMD veri tabanlarında rapor edilmemiştir. ACMG-2015 kriterlerini dikkate alarak NM_000488.4(*SERPINC1*):c.236G>A (p.Arg79His) varyantı ile ilgili yapmış olduğunuz in-siliko tahmin analizi sonucunda, varyantın patojenik / olası patojenik olarak değerlendirilebileceği sonucuna vardık.

THBD geni çeşitli biyolojik süreçlerin işleyişi ile ilişkilendirilmekte ve TGK için aday gen olarak tanımlanmaktadır. Quintero-Ronderos vd.'leri (2017), 262 TGK öyküsü olan hasta ve sağlıklı kontrol grubunda *THBD* genini dizilemiş ve *THBD* varyantlarının TGK ile ilişkisini güçlendiren sonuçlar bildirmişlerdir (Quintero-Ronderos vd., 2017). 94 TGK öyküsü olan hasta ve 169 sağlıklı kontrolün dahil edildiği, *THBD* geninin de yer aldığı hemostaz ile ilişkili bir gen grubundaki polimorfizmlerin etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, *THBD* geni varyantının TGK riskinde artışa sebep olduğu rapor edilmiştir (Cao vd., 2017). Çalışmamızda H5 numaralı hastamızda *THBD* geninde heterozigot, NM_000361.3:c.1335C>A (p.Cys445Ter) varyantını saptadık. NM_000361.3:c.1335C>A (p.Cys445Ter) varyantı dbSNP, ClinVar ve HGMD veri tabanlarında bildirilmemiş olup, novel (yeni) varyant olarak değerlendirildi. Yapmış olduğumuz in siliko analiz soncunda, ACMG-2015 kriterlerine göre PVS1, PM2 skorlarını alan NM_000361.3(*THBD*):c.1335C>A (p.Cys445Ter) varyantını ile patojenik olarak değerlendirdik. OMIM veri tabanında *THBD* geni otozomal resesif kalıtım gösteren "#614486 Trombomodulin defektine bağlı trombofili 12" fenotipi ile ilişkili olduğundan hastamız "taşıyıcı" olarak değerlendirildi.

DNAH1 geninin, OMIM veri tabanında siliyer diskinezi (# 617577) fenotipi ile kesin olmayan bir ilişkisinin olabileceği bildirilmiş olup, fenotipin klinik özeti kadın infertilitesini de kapsayan geniş bir spektrumda sunulmuştur. İnfertilite ve TGK ile ilgili genetik danışma ve teşhis için mevcut kılavuzların özetlendiği bir literatürde *DNAH1*

geni, kalıcı akciğer hasarından kısırlığa kadar ilerleyen bir dizi klinik semptomla tanımlanmış birincil siliyer diskinezi fenotipi ile ilişkilendirilmiş olup, TGK ve kadın infertilitesinde tanı koyma ve genetik danışma süreçlerinde değerlendirilmesi önerilmiştir. (Wyrwoll, Rudnik-Schöneborn ve Tüttelmann, 2021). Bir başka olgu sunumunda ise birincil siliyer diskinezi tanısı olan iki kız kardeşte ve etkilenmemiş 10 aile bireyinde *DNAH1* geni dizilenmiş ve sadece iki kız kardeşte yeni homozigot bir varyant rapor edilmiştir. Bu sonuç doğrultusunda araştırmacılar *DNAH1* genindeki varyasyonların primer siliyer diskinezide rol oynayabileceğini, tüm genlerin dışlandığı hastalarda potansiyel katkısının göz önünde bulundurulması gerektiğini bildirmiştir (Imtiaz, Allam, Ramzan ve Al-Sayed, 2015). H6 numaralı hastamızda saptamış olduğumuz heterozigot, NM_015512.5(*DNAH1*):c.10123_10126dupCAGC (p.Leu3376ProfsTer6) varyantı dbSNP, ClinVar, HGMD veri tabanlarında ve literatürde rapor edilmemiş olup, novel (yeni) varyant olarak değerlendirildi. NM_015512.5(*DNAH1*):c.10123_10126dupCAGC (p.Leu3376ProfsTer6) varyantı ile ilgili yapmış olduğumuz in-siliko analiz sonucunda, ACMG-2015 kriterlerine PVS1, PM2 skorları alarak, olası patojenik olarak değerlendirildi. OMIM veri tabanında DNAH1 geni otozomal resesif kalıtım gösteren "#617577 ? Siliyer diskinezi, birincil, 37" fenotipi ile ilişkili bulunduğundan hastamız "taşıyıcı" olarak değerlendirildi.

OMIM veri tabanında "Luteinize edici hormon direnci, kadın / Hipergonadotropik hipogonadizm ile Leydig hücre hipoplazisi/ Psödohermafroditizm ile Leydig hücre hipoplazisi" (#238320) fenotipleri ile ilişkilendirilmiş ve otozomal resesif kalıtıldığı bildirilmiştir (Berthezène, Forest, Grimaud, Claustrat ve Mornex, 1976). Luteinizan hormon (LH), rol aldığı biyolojik süreçlerde önemli etkilere sahiptir. Bu sebeple LH resöptöründe meydana gelen anormallikler, kusurlu folikülojenez, amenore, infertilite, kısmi yumurtalık yetmezliği gibi klinikleri ile ilişkilendirilmiştir (Latronico vd., 1996). Latronico vd.'leri (1998), *LHCGR* geninde saptamış oldukları varyantı, hem oligomenore, infertilite kliniği olan 46,XX kız hastada ve 46,XY Leydig hücre hipoplazisi ve psödohermafroditizm kliniği olan erkek kardeşinde tanımlamıştır (Latronico, Chai, Arnhold, Liu, Mendonca ve Segaloff, 1998). Toledo vd.'leri (1996), iki kardeşinde (46,XY) Leydig hücre hipoplazisi, kendisinde ise hipergonadotropik hipogonadizme bağlı amenore şikâyeti olan 21 yaşındaki hastayı (46,XX) çalışmalarına dahil etmiştir.

Hastanın yapısal olarak overleri normal değerlendirilmiştir. Hastaya yapılan hCG enjeksiyonu ilgili değerlerde bir değişikliğe sebep olmadığından LH'na karşı tam yumurtalık direncini düşünülmüş ve *LHCGR* genine özgü yapılan DNA dizisi analizi sonucunda, iki erkek kardeş ile hastada aynı varyantın saptandığı rapor edilmiştir. Kültüre edilmiş insan embriyonik böbrek 293 hücrelerinde mutant LH reseptörünün in vitro değerlendirmesi yapılmış ve tüm analizler kadınlarda birincil amenore nedeni olarak LH direncinin varlığını ortaya koymuştur. H9 numaralı hastamızda saptamış olduğumuz heterozigot, NM_000233.4(*LHCGR*):c.55_56insTGCCGC (p.Gln18_Pro19insLeuPro) varyantı dbSNP, ClinVar ve HGMD veri tabanlarında rapor edilmemiş olup, yapılan in siliko analizler sonucunda ACMG-2015 kriterlerine göre PM2, BP3 skorlarını alarak klinik önemi belirsiz olarak değerlendirildi.

TGK'nın, arka planında muhtemel pro-trombotik bir durumla ilişki olduğu düşünülmektedir (Romagnuolo vd., 2018). *F8* geni kan pıhtılaşma sürecinde rol almasının yanı sıra gendeki mutasyonların hemofili A ve X'e bağlı trombofiliye sebep olduğu bilinmektedir (Manucci ve Tuddenham, 2001; Simioni vd., 2021). İki veya daha fazla gebelik kaybı bulunan 53 hasta ve en az bir canlı doğumu olan 47 sağlıklı olguyu kapsayan bir çalışmada, %64,15 oranında trombofilik defekt saptanmıştır. Çalışma sonucunda yüksek F8 düzeyinin gebelik komplikasyonları ile güçlü bir ilişkisi olduğu bildirilmiştir (Jayasree ve Joydeb, 2011). H26 numaralı hastamızda, *F8* geninde, heterozigot, NM_000132.4:c.396A>C (p.Glu132Asp) varyantını saptadık. dbSNP veri tabanında rs137852388 numarası ile kayıtlı olan varyantın global allel frekansı 0.000181 (GnomAD) olarak bildirilmiştir. ClinVar veri tabanında mevcut olan kanıtlarda fikir ayrılığı görülse de güncel çalışmaların mevcut varyantı olası patojenik/patojenik olarak bildirdiği kaydedilmiştir. Yaptığımız in siliko analizlerde ACMG-2015 kriterlerine göre PM1, PP2, PM2, PP3 VE PP5 skorları alan varyant tarafımızca patojenik olarak değerlendirildi.

Yeni nesil dizileme teknolojileri hassas veriler sunarken, eş zamanlı olarak klinik önemi belirsiz (VUS) varyantların sayısında da artış görülmektedir. Duzkale vd.'leri (2013) genetik varyantları değerlendirmek üzerine sistematik bir yaklaşımı bilim dünyası ile paylaşmış olup, saptanan varyantın klinik önemini üç aşamada değerlendirmeyi önermişlerdir: 1) Varyantın genin işlevinde değişikliğe sebep olması/olmaması, 2) İşlevsel değişikliğin hastalık veya farklı bir fenotip oluşturması/oluşturmaması, 3) İlişkili

hastalık veya fenotipin hastanın spesifik kliniği ile ilişkili olması/olmaması. Özellikle VUS olarak bildirilen varyantların üç boyut içinde değerlendirilmesinin bilgilendirici olacağını öngörmüşlerdir (Duzkale vd., 2013). Araştırmalar tarafından yapılan biyoinformatik analizlerde oldukça hızlı ve çok sayıda varyantın saptanması nedeniyle, VUS varyantların belirli zaman aralıkları ile (altı ay) in siliko analizlerinin tekrar edilerek yeniden değerlendirmesi önerilmektedir. Çalışmamızda *FSHR, F10, NLRP2, FGB, CHD7, F7, MTRR, LHCGR, ACE, FGA, KLKB1, F5, DNAH1, F11, F9, PROS1*, *NLRP7* ve *PROCR* genlerinde toplam 32 VUS varyant saptadık. *FSHR*:c.1127G>A, *FGA*:c.2570G>C, *ACE*:c.2059-9T>A, *LHCGR:*c.55_56insTGCCGC ve *F9*:c.177C>G varyantları, bu güne kadar literatürde ve açık erişimli veri tabanlarında rapor edilmemiş olması nedeniyle novel (yeni) varyant olarak değerlendirildi.

H1 numaralı hastamızda saptamış olduğumuz heterozigot, *FSHR*:c.1127G>A varyantı, açık erişimli veri tabanlarında ve literatürde bildirilmemiş olması nedeniyle novel olarak değerlendirildi. Aynı zamanda ilgili varyant, ACMG-2015 kriterleri dikkate alınarak in siliko tahmin araçlarında VUS olarak değerlendirildi. OMIM veri tabanında *FSHR* geni otozomal resesif kalıtım özelliği gösteren "# 233300 Yumurtalık disgenezisi 1" ve "# 276400 FSH stimülasyonuna yumurtalık yanıtı" ve otozomal dominant kalıtım özelliği gösteren "# 608115 Yumurtalık hiperstimülasyon sendromu" fenotipleri ile ilişkilendirilmiştir. Dört gebelik kaybı öyküsü olan hastanın ikinci gebeliği in vitro fertilizasyon (IVF) yöntemi ile planlanmış ancak gebelik başarısız olmuştur. Daha sonraki iki gebeliği normal birliktelik ile gerçekleşmiş olmasına rağmen düşük ile sonuçlanmıştır. Hastamızda saptamış olduğumuz VUS varyantın fenotipe etkisini ön görebilmek amacıyla aile segregasyonu planlandı.

H3 numaralı hastamızda saptamış olduğumuz heterozigot, *F10*:c.257-12C>G varyantını, açık erişimli veri tabanlarını, literatürü ve ACMG-2015 kriterlerini dikkate alınarak VUS ve novel olarak değerlendirdik. OMIM veri tabanında *F10* geni otozomal resesif kalıtım özelliği gösteren "# 227600 Faktör X eksikliği" fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Hastamız ilgili varyant açısından heterozigot genotipe sahip olması nedeniyle "taşıyıcı" olarak değerlendirildi.

H9 numaralı hastamızda saptanan heterozigot, *LHCGR*:c.55_56insTGCCGC varyantı açık erişimli veri tabanlarında ve literatürde rapor edilmemiş olması nedeniyle

novel olarak değerlendirildi. ACMG-2015 kriterleri dikkate alınarak yapılan in siliko analiz sonucunda ilgili varyant VUS olarak değerlendirildi. *LHCGR* geni OMIM veri tabanında kadın cinsiyetle ilişkili olarak otozomal resessif kalıtım özelliği gösteren "# 238320 Luteinizan Hormon Direnci, kadın" fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. İlgili varyant açısından hastamız, heterozigot genotipe sahip olması nedeniyle "taşıyıcı" olarak değerlendirildi.

H11 numaralı hastamızda saptamış olduğumuz heterozigot, *MTHFR*:c.273A>C varyantı dbSNP, ClinVar gibi açık erişimli veri tabanlarında ve güncel literatürde rapor edilmemiş olması nedeniyle novel varyant olarak değerlendirildi. *MTHFR*:c.273A>C varyantı, yapmış olduğumuz in siliko analiz sonucunda, ACMG-2015 yönergesine göre PM2, BP7 skorlarını alarak VUS varyant olarak değerlendirildi. OMIM veri tabanında *MTHFR* geni otozomal resessif kalıtım özelliği gösteren # 236250 MTHFR eksikliğine bağlı Homosistinüri" fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. *MTHFR*:c.273A>C varyantının hastamızda heterozigot olarak kalıtılmış olması nedeniyle fenotipe etkisi beklenmemekte olup, hastamızın bu varyant için "taşıyıcı" olarak değerlendirilmesine karar verildi.

H30 numaralı hastamızda saptanan heterozigot, *F9*:c.177C>G ve heterozigot, *ACE*:c.2059-9T>A varyantları, bugüne kadar açık erişimli veri tabanlarında ve literatürde rapor edilmemiş olması nedeniyle novel olarak değerlendirildi. *F9*:c.177C>G varyantı, ACMG-2015 yönergesi dikkate alınarak yapılan in siliko analiz sonucunda VUS olarak değerlendirildi. X kromozomal resessif (XLR) kalıtım özelliği gösteren *F9* geni varyantları, "# 306900 Hemofili B", "# 300807 Trombofili 8, X'e bağlı, faktör IX defekti nedeniyle" ve "# 300807 Derin ven trombozuna karşı koruma" fenotipleri ile ilişkilendirilmiştir. Hastanın öyküsünde hemofili B ile ilişkili bulgular olmaması nedeniyle ailesinde segregasyon analizi yapılması planlandı. *ACE*:c.2059-9T>A varyantı da, ACMG-2015 yönergesi dikkate alınarak yapılan in siliko analiz sonucunda VUS olarak değerlendirildi. *ACE* geni OMIM veri tabanında kalıtım kalıbı otozomal resessif olarak bildirilmiş olan "# 267430 Renal tubuler disgenezi" fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Hastamızın *ACE*:c.2059-9T>A varyantını heterozigot olarak kalıtmış olması nedeniyle, "taşıyıcı" olarak değerlendirilmesine karar verildi.

H33 numaralı hastamızda ACMG-2015 kriterlerine göre VUS olarak değerlendirilen heterozigot, *PROS1*:c.574A>G varyantı, güncel literatür bilgileri ve açık erişimli veri tabanlarına ait veriler dikkate alınarak novel olarak da değerlendirildi. *PROS1* geni OMIM veri tabanında otozomal dominant kalıtım özelliği gösteren "# 612336 Protein S eksikliğine bağlı trombofili 5" ve otozomal resesif kalıtım özelliği gösteren "# 614514 Protein S eksikliğine bağlı trombofili 5" fenotipleri ile ilişkilendirilmiştir. Hastanın soy geçmişinde trombofili öyküsünün olması dikkate alınarak ailesinde segregasyon analizi planlandı.

BÖLÜM 6

SONUÇ

Çalışmamızda, sebebi açıklanamayan TGK'nın genetik etiyolojisinde tasarlamış olduğumuz özgün çoklu gen panelini NGS yöntemi ile çalışılarak, klinik tanı ve tedaviye katkısının araştırılması amaçladık.

Trakya Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğine, TGK öyküsü ile başvurmuş ve çalışmaya dahil edilme kriterler ile uyumlu 40 kadın hasta çalışmaya dahil edildi.

Açık erişimli veri tabanlarında ve literatürde, TGK ile doğrudan ilişkili olan ve ilişkili olabileceği bildirilen, *ACE, CBS, CPB2, CCDC39, CHD7, DNAH1, LHCGR, NLRP7, F10, F11, F12, F13A1, F13B, F2R, F3, F7, F8, F9, FGA, FGB, GP1BA, GP1BB, GP5, GP9, ITGA2, ITGB3, KLKB1, MTHFR, MTR, MTRR, PLAT, PLAUR, PLG, PROCR, SERPINE1, SERPINF1, TFPI, THBD, F2, F5, PROC, PROS1, SERPINC1* genlerinde saptanan varyantların patojenitesi ile TGK fenotip-genotip ilişkisi değerlendirildi.

Çalışmaya dahil edilen 40 kadın hastanın en az ardışık iki gebelik kaybı öyküsü vardı. Hastalar arasında akrabalık ilişkisi yoktu, 46,XX normal karyotipe sahiptiler ve F2 (protrombin, G20210A), F5 Leiden varyantları açısında wild type (normal) allele sahiptiler. Çalışmamızda 40 hastanın 32'sinde (%80), 43 genin 25'inde (~%58) bir ve/veya daha fazla, toplamda 61 varyant saptandı. ACMG-2015 kriterleri dikkate alınarak değerlendirilen varyantların 6'si patojenik, 3'ü olası patojenik, 32'si klinik önemi belirsiz

ve 20'si iyi huylu/olası iyi huylu olarak saptandı. *SERPINC1* (H5), *CBS* (H6, H9, H13 ve H37) ve *F8* (H26) genlerinde bir patojenik; *CBS* (H1), *THBD* (H5) ve *DNAH1* (H6) genlerinde bir olası patojenik; *NLRP2* (H3), *CHD7* (H8), *LHCGR* (H9), *MTHFR* (H11), *FGA* (H17), *F5* (H20), *F11* (H24), *F9* (H30), *PROS1*(H33), *NLRP7* (H39) ve *PROCR* (H40) genlerinde bir; *FSHR* (H1 ve H9), *F10* (H3 ve H8), *FGB* (H7 ve H35), *F7* (H9 ve H23) ve *KLKB1* (H17 ve H19) genlerinde iki; *MTRR* (H39, H14 ve H27) ve *DNAH1* (H21, H26, H29 ve H39) genlerinde üç; *ACE* (H17, H27, H30 ve H33) geninde dört adet VUS; *MTHFR* (H4, H7, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17, H18, H19, H20, H22, H24, H26, H28, H29 ve H30), *DNAH1* (H6) ve *PLAT* (H10) genlerinde birer adet iyi huylu varyant saptandı.

Çalışmamızda saptanan NM_015512.5(*DNAH1)*:c.10123_10126dupCAGC (p.Leu3376ProfsTer6), NM_000361.3(*THBD):*c.1335C>A (p.Cys445Ter), NM_181446.3(*FSHR)*:c.1127G>A (p.Cys376Tyr), NM_001312675.2(*F10)*:c.257-12C>G, NM_005957.5(*MTHFR)*:c.273A>C (p.Ile91Ile), NM_000313.4(*PROS1)*:c.574A>G (p.Met192Val), NM_000789.4(*ACE)*:c.2059-9T>A, NM_000233.4(*LHCGR)*:c.55_56insTGCCGC (p.Gln18_Pro19insLeuPro) ve NM_000133.4(*F9)*:c.177C>G (p.Asn59Lys) varyantları literatürde ve açık erişimli veri tabanlarında bugüne kadar rapor edilmeyen yeni (novel) varyantlar olarak değerlendirildi. Novel varyantlar in siliko tahmin araçları kullanılarak (Varsome, Franklin, Clinical Insight) ACMG-2015 yönergesine göre değerlendirildi. Çalışmamızda saptanan VUS ve novel varyantların, altı aylık zaman dilimlerinde açık erişimli veri tabanlarında patojeniteleri açısından yeniden değerlendirilmesi planlandı. Novel varyantların de novo olması durumunda, ACMG-2015 yönergesine göre PS2 skoru alarak, olası patojenik olarak sınıflandırılabileceklerini öngörerek hastalarımızda aile segregasyon analizleri planlandı.

KAYNAKLAR

Adalı, T., Koç, İ., & Eryurt, M. A., (2014). Düşükler ve Ölü Doğumlar. 2013 Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması (pp.95-104), Ankara: Elma Teknik Basım Matbaacılık Ltd. Şti.

Aksin, Ş. (2017). Tekrarlayan gebelik kayıpları. *Van Tıp Dergisi*, *24*(4), 410-414.

Anastasiou, G., Gialeraki, A., Merkouri, E., Politou, M., & Travlou, A. (2012). Thrombomodulin as a regulator of the anticoagulant pathway: implication in the development of thrombosis. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, *23*(1), 1-10.

Asakai, R., Davie, E. W., & Chung, D. W. (1987). Organization of the gene for human factor XI. *Biochemistry*, *26*(23), 7221-7228.

Ascoli, M., Fanelli, F., & Segaloff, D. L. (2002). The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocrine reviews*, *23*(2), 141-174.

Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*, *98*(6), 236-238.

Berkay, E. G., & Basaran, S. (2021). New Approaches To Explaınıng The Etıology In Recurrent Pregnancy Losses. *Journal of Istanbul Faculty of Medicine*, *84*(1), 135-145.

Berthezène, F., Forest, M. G., Grimaud, J. A., Claustrat, B., & Mornex, R. (1976). Leydig-cell agenesis: a cause of male pseudohermaphroditism. *New England Journal of Medicine*, *295*(18), 969-972.

Boue, A., & Gallano, P. (1984). A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1356 prenatal diagnoses. *Prenatal diagnosis*, *4*(7), 45-67.

Bradley, L. A., Palomaki, G. E., Bienstock, J., Varga, E., & Scott, J. A. (2012). Can Factor V Leiden and prothrombin G20210A testing in women with recurrent pregnancy loss result in improved pregnancy outcomes? Results from a targeted evidence-based review. *Genetics in medicine*, *14*(1), 39-50.

Broze, G. J., & Miletich, J. P. (1987). Characterization of the inhibition of tissue factor in serum. *Blood*, *69*(1), 150-155.

Cao, Y., Zhang, Z., Xu, J., Yuan, W., Wang, J., Huang, X., ... & Du, J. (2013). The association of idiopathic recurrent pregnancy loss with polymorphisms in hemostasis-related genes. *Gene*, *530*(2), 248-252.

Cecati, M., Giannubilo, S. R., Emanuelli, M., Tranquilli, A. L., & Saccucci, F. (2011). HLA-G and pregnancy adverse outcomes. *Medical hypotheses, 76*(6), 782-784.

Chakraborty, P., Goswami, S. K., Rajani, S., Sharma, S., Kabir, S. N., Chakravarty, B., & Jana, K. (2013). Recurrent pregnancy loss in polycystic ovary syndrome: role of hyperhomocysteinemia and insulin resistance. *PLoS One, 8*(5), e64446.

Chapelin, C., Duriez, B., Magnino, F., Goossens, M., Escudier, E., & Amselem, S. (1997). Isolation of several human axonemal dynein heavy chain genes: genomic structure of the catalytic site, phylogenetic analysis and chromosomal assignment. *Febs Letters*, *412*(2), 325-330.

Clouse, L. H., & Comp, P. C. (1986). The regulation of hemostasis: the protein C system. *New England Journal of Medicine*, *314*(20), 1298-1304.

Cooper, D. N., Millar, D. S., Wacey, A., Pemberton, S., & Tuddenham, E. G. (1997). Inherited factor X deficiency: molecular genetics and pathophysiology. *Thrombosis and haemostasis*, *78*(07), 161-172.

Coughlin, S. R., Vu, T. K., Hung, D. T., & Wheaton, V. I. (1992). Characterization of a functional thrombin receptor. Issues and opportunities. *The Journal of clinical investigation*, *89*(2), 351-355.

Cramer, D. W., & Wise, L. A. (2000). The epidemiology of recurrent pregnancy loss. *In Seminars in reproductive medicine*, *18*(4), 331-34

Cripe, L. D., Moore, K. D., & Kane, W. H. (1992). Structure of the gene for human coagulation factor V. *Biochemistry*, *31*(15), 3777-3785.

Dahlbäck, B., & Stenflo, J. (1981). High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C4b-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *78*(4), 2512-2516.

Davie, E. W., & Fujikawa, K. (1975). Basic mechanisms in blood coagulation. *Annual review of biochemistry*, *44*(1), 799-829.

Davie, E. W., Fujikawa, K., & Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*, *30*(43), 10363-10370.

Dayhoff, M. O. (Ed.). (1972). Atlas of protein sequence and structure. *National Biomedical Research Foundation*.

de León Bautista, M. P., Romero-Valdovinos, M., Zavaleta-Villa, B., Martínez-Flores, A., & Olivo-Díaz, A. (2018). Association of cystathionine β-synthase gene polymorphisms with preeclampsia. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, *24*(9), 285S-293S.

Deniz, R., Baykuş, Y., & Kavak, E. Ç. (2016). Tekrarlayan erken gebelik kayıplarına yaklaşım. *Kafkas Tıp Bilimleri Dergisi*, *6*(2), 130-137.

Diejomaoh, M. F. (2015). Recurrent spontaneous miscarriage is still a challenging diagnostic and therapeutic quagmire. *Medical principles and practice*, *24*(1), 38-55.

Dimitriadis, E., Menkhorst, E., Saito, S., Kutteh, W. H., & Brosens, J. J. (2020). Recurrent pregnancy loss. *Nature reviews disease primers*, *6*(1), 1-19.

Drew, A. F., Kaufman, A. H., Kombrinck, K. W., Danton, M. J. S., Daugherty, C. C., Degen, J. L., & Bugge, T. H. (1998). Ligneous conjunctivitis in plasminogen-deficient mice. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 91*(5), 1616-1624.

Duzkale, H., Shen, J., McLaughlin, H., Alfares, A., Kelly, M. A., Pugh, T. J., ... & Lebo, M. (2013). A systematic approach to assessing the clinical significance of genetic variants. *Clinical genetics, 84*(5), 453-463.

Eker, D., Gurkan, H., Karal, Y., Yalcintepe, S., Demir, S., Atli, E., & Karasalihoglu, S. T. (2022). Investigating the Genetic Etiology of Pediatric Patients with Peripheral Hypotonia Using the Next-Generation Sequencing Method. *Global Medical Genetics, 9*(3), 200-207.

Eshre Guideline Group on RPL, Bender Atik, R., Christiansen, O. B., Elson, J., Kolte, A. M., Lewis, S., ... & Goddijn, M. (2018). ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Human reproduction open, 2018*(2), hoy004.

Esmon, N. L. (1987, October). Thrombomodulin. In Seminars in thrombosis and hemostasis.*13*(4), 454-463.

Ford, H. B., & Schust, D. J. (2009). Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev. Obstet., 2*(2):76-83.

Foster, D., & Davie, E. W. (1984). Characterization of a cDNA coding for human protein C. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 81*(15), 4766-4770.

Fu, Y., Weissbach, L., Plant, P. W., Oddoux, C., Cao, Y., Liang, T. J., ... & Grieninger, G. (1992). Carboxy-terminal-extended variant of the human fibrinogen alpha subunit: a novel exon conferring marked homology to. beta. and. gamma. subunits. *Biochemistry, 31*(48), 11968-11972.

Gedikli, S., Özbek, E., & Demirci, T. (2013). Fertilizasyonun moleküler temeli. *Van Tıp Dergisi, 20*(4), 294-301.

Gonçalves, D. R., Braga, A., Braga, J., & Marinho, A. (2018). Recurrent pregnancy loss and vitamin D: A review of the literature. *American Journal of Reproductive Immunology, 80*(5), e13022.

Grandone, E., Brancaccio, V., Colaizzo, D., Sciannamé, N., Pavone, G., Di Minno, G., & Margaglione, M. (2002). Preventing adverse obstetric outcomes in women with genetic thrombophilia. *Fertility and sterility, 78*(2), 371-375.

Graziottin, A., & Gambini, D. (2015). Anatomy and physiology of genital organs–women. *Handbook of Clinical neurology, 130*, 39-60.

Guerra-Shinohara, E. M., Bertinato, J. F., Bueno, C. T., da Silva, K. C., de Carvalho, M. H. B., Francisco, R. P. V., ... & Morelli, V. M. (2012). Polymorphisms in antithrombin and in tissue factor pathway inhibitor genes are associated with recurrent pregnancy loss. *Thrombosis and haemostasis, 108*(10), 693-700.

Hansda, J., & Roychowdhury, J. (2012). Study of thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India, 62*(5), 536-540.

Hoare, B. S., & Khan, Y. S. (2021). Anatomy, abdomen and pelvis, female internal genitals. *In StatPearls Publishing*.

Hogge, W. A., Prosen, T. L., Lanasa, M. C., Huber, H. A., & Reeves, M. F. (2007). Recurrent spontaneous abortion and skewed X-inactivation: is there an association?. *American journal of obstetrics and gynecology, 196*(4), 384-e1.

Howard, T. E., Shai, S. Y., Langford, K. G., Martin, B. M., & Bernstein, K. E. (1990). Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. *Molecular and Cellular Biology, 10*(8), 4294-4302.

Hoyer, L. W. (1994). Hemophilia a. *New England Journal of Medicine, 330*(1), 38-47.

Huai, Q., Mazar, A. P., Kuo, A., Parry, G. C., Shaw, D. E., Callahan, J., ... & Huang, M. (2006). Structure of human urokinase plasminogen activator in complex with its receptor. *Science, 311*(5761), 656-659.

Inversiyon, (2022, 29 Temmuz). Vikipedi Özgür Ansiklopedi. Erişim tarihi 20 Mart 2022, https://tr.wikipedia.org/wiki/%C4%B0nversiyon

Imtiaz, F., Allam, R., Ramzan, K., & Al-Sayed, M. (2015). Variation in DNAH1 may contribute to primary ciliary dyskinesia. *BMC medical genetics, 16*(1), 1-6.

Kane, W. H., & Davie, E. W. (1986). Cloning of a cDNA coding for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 83*(18), 6800-6804.

Karkucak M. (2016). Kromozom anomalileri ve fertilite problemleri. *Androloji Bülteni, 18*(64): 33–39.

Kaser, D. (2018). The status of genetic screening in recurrent pregnancy loss. *Obstetrics and Gynecology Clinics, 45*(1), 143-154.

Kim, C. E., Gallagher, P. M., Guttormsen, A. B., Refsum, H., Ueland, P. M., Ose, L., ... & Kruger, W. D. (1997). Functional modeling of vitamin responsiveness in yeast: a common pyridoxine-responsive cystathionine β-synthase mutation in homocystinuria. *Human molecular genetics, 6*(13), 2213-2221.

Koschinsky, M. L., Boffa, M. B., Nesheim, M. E., Zinman, B., Hanley, A. J. G., Harris, S. B., ... & Hegele, R. A. (2001). Association of a single nucleotide polymorphism in CPB2 encoding the thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) with blood pressure. *Clinical genetics, 60*(5), 345-349.

Kraft, J., Sunder-Plassmann, R., Mannhalter, C., Quehenberger, P., Tews, G., Langer, M., & Pabinger, I. (2017). Women with homozygous AT deficiency type II heparin-binding site (HBS) are at high risk of pregnancy loss and pregnancy complications. *Annals of hematology, 96*(6), 1023-1031.

Krishnaswamy, P., & Arora, R. (2020). Recurrent pregnancy loss. *InnovAiT, 13*(7), 402-408.

Kristoffersen, A. H., Petersen, P. H., Røraas, T., & Sandberg, S. (2017). Estimates of within-subject biological variation of protein C, antithrombin, protein S free, protein S activity, and activated protein C resistance in pregnant women. *Clinical Chemistry, 63*(4), 898-907.

Kujovich, J. L. (2004). Thrombophilia and pregnancy complications. *American journal of obstetrics and gynecology, 191*(2), 412-424.

Lancellotti, S., & De Cristofaro, R. (2009, June). Congenital prothrombin deficiency. *In Seminars in thrombosis and hemostasis*, *35*(4), 367-381.

Lane, D. A., Olds, R. J., & Thein, S. L. (1994). Antithrombin III: summary of first database update. *Nucleic acids research, 22*(17), 3556.

Latronico, A. C., Anasti, J., Arnhold, I. J., Rapaport, R., Mendonca, B. B., Bloise, W., ... & Chrousos, G. P. (1996). Testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone–receptor gene. *New England journal of medicine, 334*(8), 507-512.

Latronico, A. C., Chai, Y., Arnhold, I. J., Liu, X., Mendonca, B. B., & Segaloff, D. L. (1998). A homozygous microdeletion in helix 7 of the luteinizing hormone receptor associated with familial testicular and ovarian resistance is due to both decreased cell surface expression and impaired effector activation by the cell surface receptor. *Molecular Endocrinology, 12*(3), 442-450.

Leclerc, D., Wilson, A., Dumas, R., Gafuik, C., Song, D., Watkins, D., ... & Gravel, R. A. (1998). Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 95*(6), 3059-3064.

Li, Y. H., & Marren, A. (2018). Recurrent pregnancy loss. *Australian journal of general practice, 47(*7), 432-436.

Li, Y. N., Gulati, S., Baker, P. J., Brody, L. C., Banerjee, R., & Kruger, W. D. (1996). Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Human molecular genetics, 5*(12), 1851-1858.

López, J. A., Andrews, R. K., Afshar-Kharghan, V., & Berndt, M. C. (1998). Bernard-Soulier syndrome. *Blood, 91*(12), 4397-4418.

Mannucci, P. M., & Tuddenham, E. G. (2001). The hemophilias—from royal genes to gene therapy. *New England Journal of Medicine, 344*(23), 1773-1779.

Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 74*(2), 560-564.

Mehta, R., & Shapiro, A. D. (2008). Plasminogen activator inhibitor type 1 deficiency. *Haemophilia, 14*(6), 1255-1260.

Merveille, A. C., Davis, E. E., Becker-Heck, A., Legendre, M., Amirav, I., Bataille, G., ... & Amselem, S. (2011). CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs. *Nature genetics, 43*(1), 72-78.

Millar, D., Kemball-Cook, G., McVey, J., Tuddenham, E., Mumford, A., Attock, G., ... & Cooper, D. (2000). Molecular analysis of the genotype-phenotype relationship in factor VII deficiency. *Human genetics, 107*(4), 327-342.

Morey, M., Fernández-Marmiesse, A., Castiñeiras, D., Fraga, J. M., Couce, M. L., & Cocho, J. A. (2013). A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. *Molecular genetics and metabolism, 110*(1-2), 3-24.

Noris, P., Guidetti, G. F., Conti, V., Ceresa, I. F., Di Pumpo, M., Pecci, A., ... & Balduini, C. L. (2006). Autosomal dominant thrombocytopenias with reduced expression of glycoprotein Ia. *Thrombosis and haemostasis*, *95*(03), 483-489.

Nussbaum R. L., McInnes R. R. & Willard H. F. (2019). Thompson&Thompson Tıbbi Genetik (Sekizinci Baskı). Mehmet Alikaşifoğlu (Ed.). Klinik Sitogenetik ve Genom Analiz Prensipleri (s. 57-74). Ankara:Güneş Tıp Kitabevi.

Ny, T., Elgh, F., & Lund, B. (1984). The structure of the human tissue-type plasminogen activator gene: correlation of intron and exon structures to functional and structural domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *81*(17), 5355-5359.

Obut, M., EVSEN, M. S., Soydinç, H. E., Sak, M. E., OZLER, A., Fidanboy, M., ... & GUL, T. (2013). Evaluation of etiologic causes of recurrent pregnancy loss. *Journal of Turkish Society of Obstetrics and Gynecology*, *10*(2), 67-71.

Ocak, Z., Özlü, T., & Ozyurt, O. (2013). Association of recurrent pregnancy loss with chromosomal abnormalities and hereditary thrombophilias. *African health sciences*, *13*(2), 447-452.

Oosit. Vikipedi Özgür Ansiklopedi. Erişim tarihi 17 Mart 2022, https://tr.wikipedia.org/wiki/Oosit

Öktem, Ö., & Urman, B. (2011). Over hayat döngüsünü anlamak. *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi, 8*(2), 71-82.

Ökten, G., Güneş, S., Kara, N., Tural, Ş., YİĞİT, S., & TAŞKIN, E. (2007). Tekrarlayan Düşükleri Olan Çiftlerde Kromozom Anomalileri. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, *24*(3), 90-94.

Page, J. M., & Silver, R. M. (2016). Genetic causes of recurrent pregnancy loss. *Clinical obstetrics and gynecology*, *59*(3), 498-508.

Park, S. T., & Kim, J. (2016). Trends in next-generation sequencing and a new era for whole genome sequencing. *International neurourology journal*, *20*(2), 76.

Patel, B., Parets, S., Akana, M., Kellogg, G., Jansen, M., Chang, C., ... & Puig, O. (2018). Comprehensive genetic testing for female and male infertility using next-generation sequencing. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *35*(8), 1489-1496.

Petzelbauer, P., Zacharowski, P. A., Miyazaki, Y., Friedl, P., Wickenhauser, G., Castellino, F. J., ... & Zacharowski, K. (2005). The fibrin-derived peptide Bβ15–42 protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury. *Nature medicine*, *11*(3), 298-304.

Preston, F. E., Rosendaal, F. R., Walker, I. D., Briet, E., Berntorp, E., Conard, J. A., ... & Van Der Meer, F. J. M. (1996). Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *The Lancet*, *348*(9032), 913-916.

Quintero-Ronderos, P., Mercier, E., Gris, J. C., Esteban-Perez, C., Moreno-Ortiz, H., Fonseca, D. J., ... & Laissue, P. (2017). THBD sequence variants potentially related to recurrent pregnancy loss. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *15*(1), 1-5.

Rao, L. V., & Rapaport, S. I. (1987). Studies of a mechanism inhibiting the initiation of the extrinsic pathway of coagulation.

Raziel, A., Friedler, S., Schachter, M., Ron-El, R., Kornberg, Y., & Sela, B. A. (2001). Hypercoagulable thrombophilic defects and hyperhomocysteinemia in patients with recurrent pregnancy loss. *American Journal of Reproductive Immunology, 45*(2), 65-71.

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine, 17*(5), 405-423.

Riewald, M., Petrovan, R. J., Donner, A., Mueller, B. M., & Ruf, W. (2002). Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science, 296*(5574), 1880-1882.

Rogenhofer, N., Bohlmann, M. K., Beuter-Winkler, P., Würfel, W., Rank, A., Thaler, C. J., & Toth, B. (2014). Prevention, management and extent of adverse pregnancy outcomes in women with hereditary antithrombin deficiency. *Annals of hematology, 93*(3), 385-392.

Romagnuolo, I., Attanasio, M., Cozzolino, M., Paladino, E., Castaman, G., Coccia, M. E., & Fatini, C. (2018). Thrombin potential and traditional coagulation assay: are they useful in exploring recurrent pregnancy loss risk?. *Blood Coagulation & Fibrinolysis, 29*(2), 160-166.

Rosenberg, R. D., & Bauer, K. A. (1987). Thrombosis in inherited deficiencies of antithrombin, protein C, and protein S. *Human Pathology, 18*(3), 253-262.

Rubio, C., Simon, C., Vidal, F., Rodrigo, L., Pehlivan, T., Remohi, J., & Pellicer, A. (2003). Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Human Reproduction, 18*(1), 182-188.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences, 74*(12), 5463-5467.

Shan, X., Dunbrack Jr, R. L., Christopher, S. A., & Kruger, W. D. (2001). Mutations in the regulatory domain of cystathionine β–synthase can functionally suppress patient-derived mutations in cis. *Human molecular genetics, 10*(6), 635-643.

Shendure, J., Balasubramanian, S., Church, G. M., Gilbert, W., Rogers, J., Schloss, J. A., & Waterston, R. H. (2017). DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature, 550*(7676), 345-353.

Simioni, P., Cagnin, S., Sartorello, F., Sales, G., Pagani, L., Bulato, C., ... & Castoldi, E. (2021). Partial F8 gene duplication (factor VIII Padua) associated with high factor VIII levels and familial thrombophilia. *Blood, 137*(17), 2383-2393.

Stephenson, M., & Kutteh, W. (2007). Evaluation and management of recurrent early pregnancy loss. *Clinical obstetrics and gynecology, 50*(1), 132-145.

Şahin, F. İ., Ataç, B., Yılmaz, Z., & Zeyneloğlu, H. B. (2009). Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Trombofili Mutasyon Sıklıkları. *Erciyes Medical Journal/Erciyes Tip Dergisi, 31*(2).

Şık, B. A., Badoğlu, B., Kumbasar, S., Bilecan, S., & AKPAK, Y. K. (2018). THE RELATIONSHIP BETWEEN BAD OBSTETRIC HISTORY AND THROMBOPHILI. *International Journal of Health Services Research and Policy, 3*(1), 1-9.

Tait, J. F., & Fujikawa, K. (1986). Identification of the binding site for plasma prekallikrein in human high molecular weight kininogen. A region from residues 185 to 224 of the kininogen light chain retains full binding activity. *Journal of Biological Chemistry, 261*(33), 15396-15401.

Takahashi, N., Takahashi, Y., & Putnam, F. W. (1986). Primary structure of blood coagulation factor XIIIa (fibrinoligase, transglutaminase) from human placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 83*(21), 8019-8023.

Translokasyon. Vikipedi Özgür Ansiklopedi. Erişim tarihi 2 Nisan 2022, https://tr.wikipedia.org/wiki/Translokasyon

Tschopp, J., Martinon, F., & Burns, K. (2003). NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nature reviews Molecular cell biology, 4*(2), 95-104.

Van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. Trends in genetics, 30(9), 418-426.

Vomstein, K., Herzog, A., Voss, P., Feil, K., Goeggl, T., Strowitzki, T., ... & Kuon, R. J. (2021). Recurrent miscarriage is not associated with a higher prevalence of inherited and acquired thrombophilia. *American Journal of Reproductive Immunology, 85*(1), e13327.

Ward, K. J. (2000). Genetic factors in recurrent pregnancy loss. *In Seminars in reproductive medicine*, 18(4), 425-432.

Wold, A. S. D., Pham, N., & Arici, A. (2006, February). Anatomic factors in recurrent pregnancy loss. *In Seminars in reproductive medicine, 24*(1), 25-32.

Wyrwoll, M. J., Rudnik-Schöneborn, S., & Tüttelmann, F. (2021). Genetic counseling and diagnostic guidelines for couples with infertility and/or recurrent miscarriage. *Medizinische Genetik, 33*(1), 3-12.

Yavagal, S., De Farias, T. F., Medina, C. A., & Takacs, P. (2011, May). Normal vulvovaginal, perineal, and pelvic anatomy with reconstructive considerations. *In Seminars in plastic surgery 25*(2), 121-129.

Yazdani, N., Shekari Khaniani, M., Bastami, M., Ghasemnejad, T., Afkhami, F., & Mansoori Derakhshan, S. (2018). HLA-G regulatory variants and haplotypes with susceptibility to recurrent pregnancy loss. *International Journal of Immunogenetics, 45*(4), 181-189.

Yohe, S., & Thyagarajan, B. (2017). Review of clinical next-generation sequencing. *Archives of pathology & laboratory medicine, 141*(11), 1544-1557.

Zentner, G. E., Hurd, E. A., Schnetz, M. P., Handoko, L., Wang, C., Wang, Z., ... & Scacheri, P. C. (2010). CHD7 functions in the nucleolus as a positive regulator of ribosomal RNA biogenesis. *Human molecular genetics, 19*(18), 3491-3501.

EKLER

Ek-1

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bir araştırma projesine davet edilmektesiniz. Bu araştırmanın yürütülmesi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun …… tarih ve …….. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Araştırmaya katılmaya karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını anlamanız çok önemlidir.

Araştırmaya katılım tamamen gönüllülük ilkesine bağlı olup katılmayı reddetmeniz herhangi bir cezaya ya da elde edilecek herhangi bir yararın kaybedilmesine kesinlikle yol açmayacaktır.

Aynı şekilde araştırmaya katılmayı kabul ettikten sonra da araştırmanın herhangi bir yerinde hiçbir neden göstermeksizin herhangi bir zarar ya da elde edilmesi beklenen bir yarar kaybına yol açmadan araştırmadan çekilebilirsiniz.

Araştırma kapsamında yapılan işlemlerin mali giderleri araştırmacılar ya da destekleyici (AÇIK AD…….) tarafından karşılanacak olup size ya da sosyal güvenlik kurumunuza hiçbir mali yük getirmeyecektir.

Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun ve araştırmaya katılmak isteyip istemediğinize karar vermek için lütfen biraz düşünün.

- **Araştırmanın bilimsel adı:** Tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan kadın hastalarda genetik etiyolojinin yeni nesil dizi analizi yöntemi ile araştırılması
- **Araştırmanın anlaşılabilir basit adı:** Tekrarlayan gebelik kaybı şikâyeti olan kadın hastalarda düşüğe sebep olması muhtemel genlerdeki değişikliklerin araştırılması
- **Sorumlu Araştırmacının adı ve görev yeri:** Prof. Dr. Hakan GÜRKAN, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, 22030, EDİRNE
- **Araştırmanın amacı:** Tekrarlayan gebelik kaybına neden olabilecek genlerin araştırılması
- **Araştırmanın niteliği (klinik, laboratuvar, epidemiyolojik, tez çalışması vb.):** Yüksek lisans tez çalışması
- **Araştırmanın başlama tarihi ve öngörülen süresi:** 01.08.2021 – 1 yıl

- **Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı:** 40
- **Araştırma sırasında uygulanacak olan invaziv yöntemler dahil olmak üzere gönüllüye uygulanacak yöntem, girişim ve tedavilerin tümü:** Bu araştırma amacıyla sizden rutin tetkikleriniz esnasında ön kolunuzdan fazladan iki tüp (5 ml) daha kan alınacaktır.
- **Araştırmanın deneysel kısımları:** Araştırmada doğrudan hasta üzerinde bir deneysel çalışma yapılmayacaktır. Hastadan alınmış olan kan örneği ile belirli genler NGS yöntemi ile araştırılacaktır.
- **Farklı uygulama ve girişimler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığı:** Yok.

  Katılımcının araştırmaya dahil edilme nedeni: En az ardışık iki gebelik kaybı öyküsüne sahip olmak, en az 3 kuşaktır Trakya Bölgesinde yaşıyor olmak, eşi ile akrabalık ilişkisi bulunmamak, 46,XX kromozom yapısına sahip olmak, trombofili panelinde Faktör II (Protrombin) ve Faktör V Leiden varyantına sahip olmamak.
- **Araştırmadan doğrudan gönüllü için beklenen yarar:** Gönüllünün kendisi için beklenen bir yarar bulunmamaktadır.
- **Gönüllünün sorumlulukları:** Araştırmaya dahil olma tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Gönüllünün herhangi bir sorumluluğu bulunmamaktadır. Gönüllü dilediği zaman araştırmadan ayrılabilir.
- **Gönüllünün (araştırma hamilelerde veya lohusalarda yapılacaksa ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının da) maruz kalabilecekleri riskler veya rahatsızlıklar:** Araştırmaya belirtilmiş olan bireyler dahil edilmeyecektir.
- **Risklere karşı alınan önlemler:** Gönüllüden kan alımı esnasında oluşabilecek morarma, vb. durumlara karşı buz uygulaması yapılacaktır.
- **Gönüllüye alternatif olarak uygulanabilecek olan diğer yöntemler ve bunların olası yarar ve zararları:** Gönüllüye alternatif olarak uygulanabilecek farklı bir yöntem bulunmamaktadır.

- **Araştırmaya bağlı olarak bir zarar oluştuğunda verilecek tazminat ve sağlanacak tedaviler:** Bulunmamaktadır.
- **Gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler:** Bulunmamaktadır.
- **Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler:** Gönüllü dilediği zaman hür iradesi ile araştırmadan ayrılabilir.
- **Araştırma sonunda gönüllülere bilgi verilecek mi?** Evet
- **Gönüllülerin araştırma hakkında, kendileri hakkında ya da araştırmayla ilgili herhangi bir beklenmedik olay hakkında daha fazla bilgi edinebilmesi için temasa geçebileceği kişi ve kendisine günün 24 saatinde erişebileceği telefon numarası:** Prof. Dr. Hakan GÜRKAN, 0533 218 80 05
- **Gönüllülerden elde edilecek olan biyolojik materyallerin hangi amaçlarla kullanılacağı:** Gönüllülerden elde edilecek olan periferik venöz kan yapılması planlanan araştırma kapsamında kullanılacaktır.

- **Gönüllülerden elde edilecek olan biyolojik materyaller üzerinde genetik araştırma yapılabilmesi için onay:**

☐ **Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.**

☐ **İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.**

☐ **Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.**

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Yukarıda açıkça tanımlanan çalışmanın ne amaçla, kimler tarafından ve nasıl gerçekleştirileceği anlayabileceğim bir ifade ile bana anlatıldı.

Bu araştırmadan elde edilen bilgilerin bana ve başka insanlara sağlayacağı yararlar bana anlatıldı.

Araştırma sırasında meydana gelebilecek riskler ve rahatsızlıklar bana anlayabileceğim bir dille anlatıldı.

Araştırma sırasında oluşabilecek zarar durumunda gerçekleştirilecek işlemler bana anlatıldı.

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ve haklarım konusunda 24 saat bilgi alabileceğim bir yetkilinin adı ve telefonu bana verildi.

Araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik ve testler ile tıbbi bakım hizmetleri için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyeceği bana anlatıldı.

Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.

Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.

Sorumlu araştırmacı / hekime haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmediğimi ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum.

Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı / hekim ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmalim nedeniyle, benim onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabileceğini biliyorum.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun gerekli gördüğünde, gizliliğimin korunması ilkesine uygun olarak, araştırma konusuyla ilişkili orijinal tıbbi kayıtlarıma doğrudan erişimde bulunabileceğini biliyorum

İlgili yasal düzenlemeler gereğince kimliğimi ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanmayacağı; araştırma sonuçlarının bilimsel toplantılarda sunulabileceği ya da yayınlanabileceği, ancak, bu tür durumlarda kimliğimin kesin olarak gizli tutulacağı bana açıklandı.

Araştırma konusuyla ilgili olarak, çalışmaya devam etme isteğimi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde bana ya da yasal temsilcime zamanında bilgilendirme yapılacağı bana açıklandı.

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu adlı metni kendi anadilimde okudum.

Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım.

Yukarıda konusu belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı.

Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu'nun tam imzalı bir kopyasını aldım.

- ***Gönüllünün; (El yazısı ile)***

Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

.....

.....

Tarih:

- ***Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için; (El yazısı ile)***

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

.....

.....

Tarih:

- ***Açıklamaları yapan araştırmacının***

Unvanı, Adı- Soyadı: (El yazısı ile)

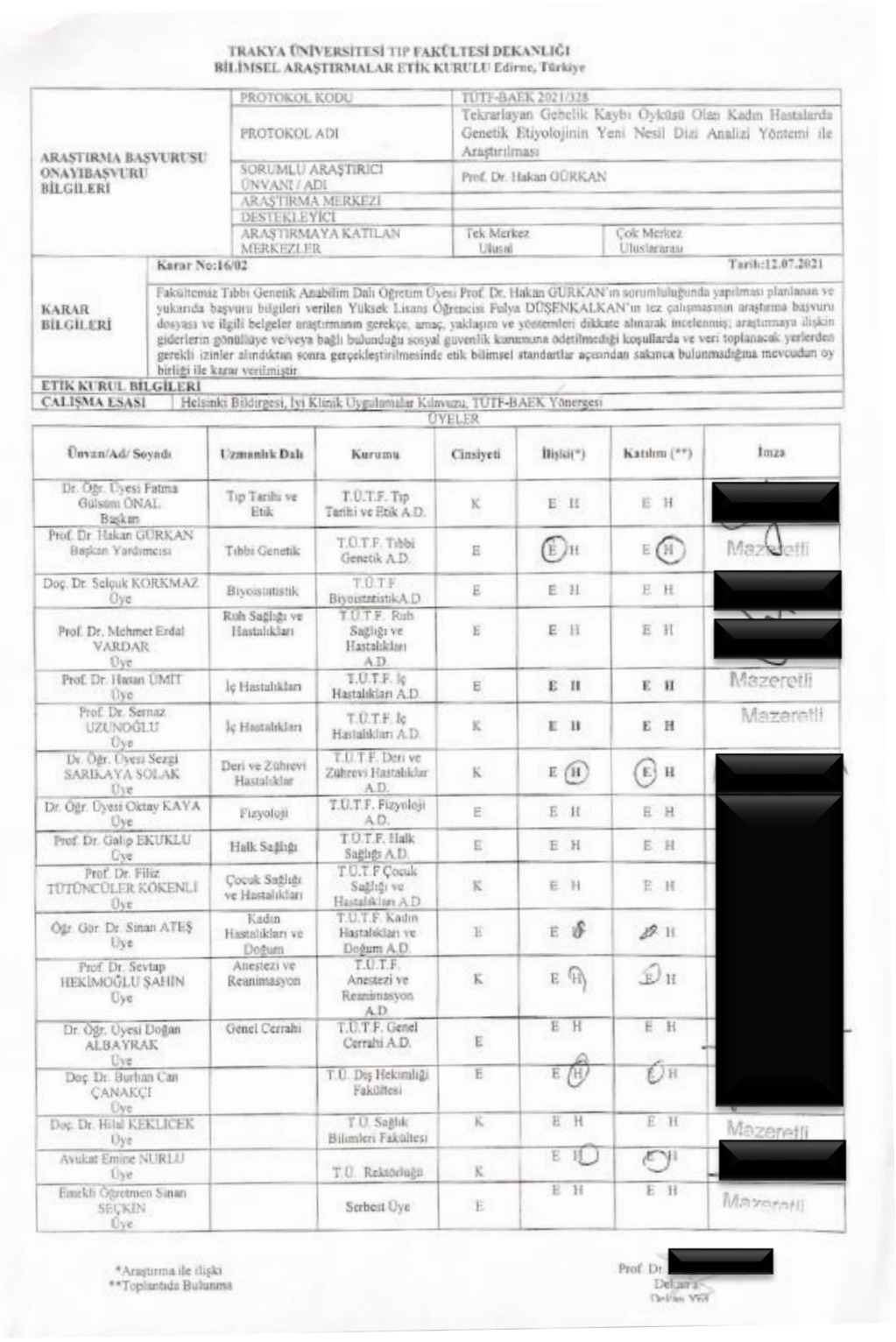
Görev yaptığı bölüm:

İmzası:

Tarih:

Ek-2

Etik Kurul Formu



TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2021/328	
	PROTOKOL ADI	Tekrarlayan Gebelik Kaybı Öyküsü Olan Kadın Hastalarda Genetik Etiyolojinin Yeni Nesil Dizi Analizi Yöntemi ile Araştırılması	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof. Dr. Hakan GÜRKAN	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:16/02**		**Tarih:12.07.2021**
	Fakültemiz Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hakan GÜRKAN'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Fulya DÜŞENKALKAN'ın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi		

ÜYELER

Ünvan/Adı/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Dr. Öğr. Üyesi Fatma Gülsüm ÖNAL Başkan	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E H	E H	[redacted]
Prof. Dr. Hakan GÜRKAN Başkan Yardımcısı	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	(E) H	E (H)	Mazeretli
Doç. Dr. Selçuk KORKMAZ Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	E	E H	E H	[redacted]
Prof. Dr. Mehmet Erdal VARDAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	[redacted]
Prof. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Prof. Dr. Sernaz UZUNOĞLU Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	K	E H	E H	Mazeretli
Dr. Öğr. Üyesi Sezgi SARIKAYA SOLAK Üye	Deri ve Zührevi Hastalıklar	T.Ü.T.F. Deri ve Zührevi Hastalıklar A.D.	K	E (H)	(E) H	[redacted]
Dr. Öğr. Üyesi Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E H	E H	[redacted]
Prof. Dr. Galip EKUKLU Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Filiz TÜTÜNCÜLER KÖKENLİ Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	E H	E H	
Öğr. Gör. Dr. Sinan ATEŞ Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E [redacted]	[redacted] H	
Prof. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E (H)	(E) H	
Dr. Öğr. Üyesi Doğan ALBAYRAK Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	
Doç. Dr. Burhan Can ÇANAKÇI Üye		T.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi	E	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. Hilal KEKLİCEK Üye		T.Ü. Sağlık Bilimleri Fakültesi	K	E H	E H	Mazeretli
Avukat Emine NURLU Üye		T.Ü. Rektörlüğü	K	E H	(E) H	[redacted]
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	Mazeretli

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. [redacted]
Dekan a.
Dekan Yrd.

ÖZGEÇMİŞ

Lisans eğitimimi, Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik bölümünde tamamladım. 2020-2021 yılları arasında Kırklareli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İş Sağlığı ve Güvenliği bölümünde tezsiz yüksek lisans programını bitirdim. 2020 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik bölümünde yüksek lisans eğitimime başladım.