

Muş İlinde Tekrarlayan Gebelik Kayıpları İle Mthfr C677t ve A1298c ve Pai-1 4g/5g Polimorfizmleri Arasındaki İlişki ve Alel Frekansları

Association between Recurrent Pregnancy Losses and Mthfr C677t and A1298 and Pai-1 4g/5g Polymorphisms and Allele Frequencies in Muş

Banu BAYRAM¹, Çetin KILIÇÇI², Sedat BOZARI², Harun ÖNLÜ², Fezan ŞAHİN³

¹ Muş Alparslan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muş

² Özel Muş Şifa Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Muş

³ Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Eskişehir

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada plazminojen aktivator inhibitör tip-1 geni 4G/5G ile metilentetrahidrofolat redüktaz geni C677T ve A1298C polimorfizmlerinin Muş ilinde tekrarlayan gebelik kayıpları ile arasındaki ilişkinin belirlenmesi ve alel frekanslarının saptanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Genomik DNA tekrarlayan gebelik kayıpları olan 34 hasta ve 34 sağlıklı kontrolün kan örneklerinden izole edilmiştir. DNA *PAI-1* geni 4G/5G polimorfizmi için 4G ve 5G spesifik primerler ile amplifiye edilerek, *MTHFR* geni C677T ve A1298C polimorfizmleri için PCR-RFLP yöntemi uygulanarak agaroz jel elektroforezinde UV transillüminatör ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Hasta ve kontrol grupları arasında *PAI-1* geni 4G/5G ve *MTHFR* geni C677T ve A1298C polimorfizmleri alel frekansları açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Genotip dağılımı açısından bakıldığında ise *PAI-1* geni 4G/5G ve *MTHFR* geni A1298C polimorfizmleri hasta ve kontrol grupları arasında farklılık göstermemiştir. *MTHFR* geni 677 homozigot mutantlığı (TT) ise sadece hasta grubunda, heterozigot mutantlık (CT) ise sadece kontrol grubunda tespit edilmiş olmasına ve istatistiksel açıdan da anlamlı bir farklılık göstermesine rağmen tekrarlayan gebelik kayıplarının ortaya çıkmasında bir role sahip olarak gözükmemektedir.

Sonuç: Sonuç olarak Muş ilinde *PAI-1* geni 4G/5G ve *MTHFR* geni A1298C polimorfizmlerinin tekrarlayan gebelik kayıpları için bir risk olmadığını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Tekrarlayan Gebelik Kayıpları, *MTHFR*, C677T, A1298C, *PAI-1* 4G/5G, Polimorfizm

ABSTRACT

Aim: In this study it was aimed to determine the association between plasminogen activator inhibitor type 1 gene (*PAI-1*) 4G/5G and methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphisms with recurrent pregnancy losses and the allele frequencies in Mus city.

Materials and Methods: Genomic DNA was isolated from blood samples of 34 patients with recurrent pregnancy losses and 34 healthy controls. DNA was amplified with 4G and 5G specific primers for detection of *PAI-1* gene 4G/5G polymorphism and PCR-RFLP technique was used to analyze *MTHFR* gene C677T and A1298C polymorphisms. Products were assessed with UV transilluminator by being exposed to agarose gel electrophoresis.

Results: The frequencies of the *PAI-1* gene 4G/5G and *MTHFR* gene C677T and A1298C alleles in the patient group were similar to control group. According to the genotype distribution of *PAI-1* gene 4G/5G and *MTHFR* gene A1298C polymorphisms there was no significant difference between patient and control group. *MTHFR* gene 677 (TT) homozygote mutation has been detected only in patients and (CT) heterozygote mutation only in the control group, despite a statistically significant difference between patient and control groups, this polymorphism does not seem to play a role in the occurrence of recurrent pregnancy loss.

Conclusion: As a result of the study we may assert that *PAI-1* 4G/5G and *MTHFR* A1298C and C677T polymorphisms are not risk factors for recurrent pregnancy losses in Mus city.

Key Words: Recurrent Pregnancy Loss, *MTHFR*, C677T, A1298C, *PAI-1* 4G/5G, Polymorphism

GİRİŞ

Tekrarlayan gebelik kayıpları 20. gebelik haftasından önce arka arkaya gerçekleşen üç ve üzerinde spontan düşük olarak tanımlanmakta ve tüm gebeliklerin %1-5 kadarında görülmektedir (1,2). Etiyolojisinde genetik, endokrin, anatomik, immünolojik, enfeksiyona bağlı ve çevresel nedenler yer alır (1,3,4).

Genetik faktörlerden metilentetrahidrofolat redüktaz (*MTHFR*) geni C677T ve A1298C ile plazminojen aktivator inhibitör tip-1 (*PAI-1*) geni 4G/5G polimorfizmleri tekrarlayan gebelik kayıpları için risk faktörü olarak ifade edilmektedir. *PAI-1* fibrinolitik sistem inhibitörlerinden olup, 4G homozigotluğu sonucu enzim konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak fibrinolitik aktivite bozulur ve trombotik olaylara yatkınlık artar (5,6). *MTHFR* ise homosistein metabolizması için gereklidir. *MTHFR* gen mutasyonları *MTHFR* aktivitesinin azalmasına neden olarak plazmada folat konsantrasyonunda düşmeye ve homosistein konsantrasyonunda artmaya dolayısıyla tromboembolizm ve ateroskleroza atkılığa sebep olmaktadır. Kanda homosistein düzeyinin yükselmesi ise nöral tüp defekti, fetal kayıp, plasental abrupsiyon ve plasental enfarkt riskini artırır (7,8).

Bazı çalışmalarda üç ve daha fazla tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlar arasında *PAI-1* geni 4G/5G ve *MTHFR* geni C677T ve A1298C polimorfizmi mutant homozigot varyantların frekansının yüksek olduğu ifade edilirken (9-13), diğerlerinde bu polimorfizmler ile gebelik kayıpları arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır (14-16).

Elbette gen havuzları, yaşam biçimi, popülasyonlar arasında gen-çevre etkileşimlerindeki çeşitlilik her popülasyonda genotiplere benzer şekilde yansımamaktadır (17). Bu nedenle bu çalışmada Muş ilinde *PAI-1* geni 4G/5G ve *MTHFR* geni C677T ve A1298C polimorfizmleri alel frekanslarının ve bu polimorfizmler ile tekrarlayan gebelik kayıpları arasında bir ilişkinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Grubu

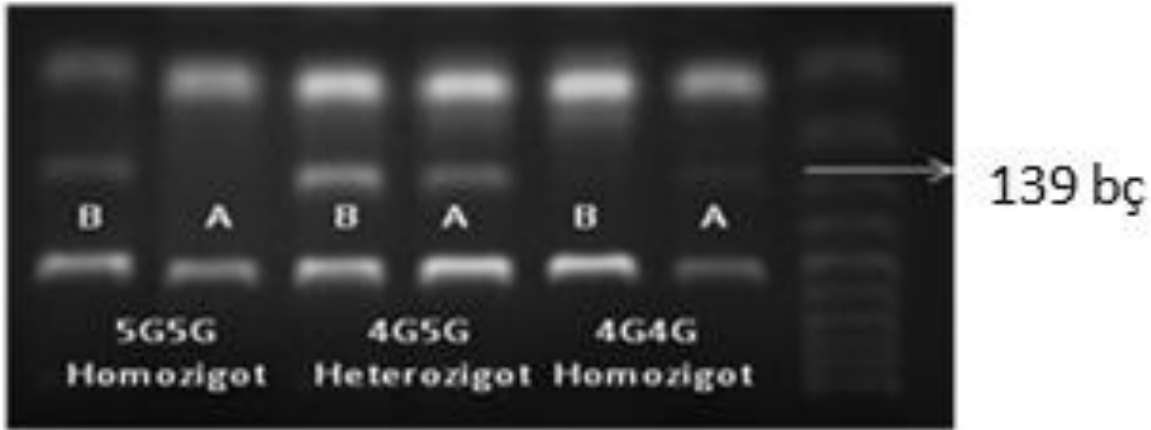
Bu çalışmaya, Özel Muş Şifa hastanesine tekrarlayan gebelik kayıpları için başvuran 20. gebelik haftasından önce, 3 veya daha fazla spontan düşük yapmış yaş ortalaması 28,06±1.04 34 hasta dahil edildi. Kontrol grubu ise en az 2 canlı doğumu olan, düşük öyküsü bulunmayan yaş ortalaması 28,6±0,72 kadınlardan oluşturuldu. Bu çalışma için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi etik kurulu tarafından onay alınmış, ayrıca her hasta çalışma hakkında bilgilendirilerek olur belgesi imzalatılmıştır.

DNA İzolasyonu

Hasta ve kontrollere ait genomik DNA'lar periferik kandan DNA izolasyon kiti (Vivantis, Malesia) prosedürüne uygun olarak izole edildi ve +4 oC'de saklandı.

PAI-1 geni 4G/5G polimorfizmi genotip tayini

PAI-1 geni 4G/5G baz çiftini içeren gen bölgesini çoğaltmak üzere, 0,5 µl DNA, 10X PCR Buffer, 0,2 mmol/L dNTP karışımı, 1,25 U Taq polimeraz, 12 pmol 4G veya 5G spesifik primer, 12 pmol downstream primer, 12 pmol upstream primer içeren 25 µl PCR karışımında thermal cyler cihazında (Amplifitronyx 4, USA) amplifiye edildi. Kullanılan primer dizileri 5G aleli için, 5'-GTC TGG ACA CGT GGG GG-3', 4G aleli için, 5'-GTC TGG ACA CGT GGG GA-3', downstream primer için, 5'-TGC AGC CAG CCA CGT GAT TGT CTA G-3' ve upstream primer için, 5'-AAG CTT TTA CCA TGG TAA CCC CTG GT-3' şeklindedir. Amplifikasyon için reaksiyon karışımı 94°C'de 1 dk, 54°C'de 30 sn ve 72°C'de 40 sn'den oluşan 35 döngüye tabi tutuldu. PCR ürünü oluşan fragmentlerin ayırımı için % 2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. 139 bç bant 4G ve 5G alelini tanımladı. Buna göre 4G primeri ile 139 bç bant verip 5G primeri ile 139 bç bant vermeyen örnekler homozigot 4G genotipli, 5G primeri ile 139 bç bant verip 4G primeri ile 139 bç bant vermeyen örnekler homozigot 5G genotipli, her iki primer ile 139 bç bant verenler ise heterozigot 4G/5G genotipli olarak belirlendi (Şekil 1).



Şekil 1. PAI-1 geni 4G/5G Polimorfizmi Jel Görüntüsü (A) 4G primer ile PCR ürünleri (B) 5G primer ile PCR ürünleri

MTHFR geni C677T polimorfizmi genotip tayini

MTHFR geni 677. baz çiftini içeren gen bölgesini çoğaltmak üzere, 5 µl DNA, 10X PCR Buffer, 0,2 mmol/L dNTP karışımı, 1,25 U Taq polimeraz, 10 pmol spesifik F ve R primer içeren 50 µl PCR karışımında thermal cycler cihazında (Amplitrionyx 4, USA) amplifiye edildi. Kullanılan primer dizileri 5'- AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG- 3' ve 5'- TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA- 3' şeklindedir. Amplifikasyon için reaksiyon karışımı 94oC' de 1 dk, 63oC' de 1 dk ve 72oC' de 1 dk'dan oluşan 40 döngüye tabi tutuldu. Elde edilen 198 bç'lik PCR ürünlerinden 10 µl'si 1 ünite Hinf I enzimi (Vivantis) ile 1 saat 37oC' de kesime bırakıldı. Kesim sonrası oluşan ürün fragmentlerin ayırımı için % 3'lük agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. Buna göre 198 bç'lik fragment elde edilenler 677 CC, 198 ve 175 bç' lik fragment elde edilenler 677 CT ve 175 bç'lik fragmentler elde edilenler ise 677 TT olarak belirlendi (Şekil 2).

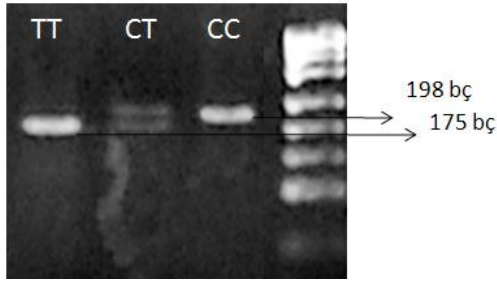
MTHFR geni A1298C polimorfizmi genotip tayini

MTHFR geni 1298. baz çiftini içeren gen bölgesini çoğaltmak üzere, 5 µl DNA, 10X PCR Buffer, 0,2 mmol/L dNTP karışımı, 1,25 U Taq polimeraz, 10 pmol F ve R

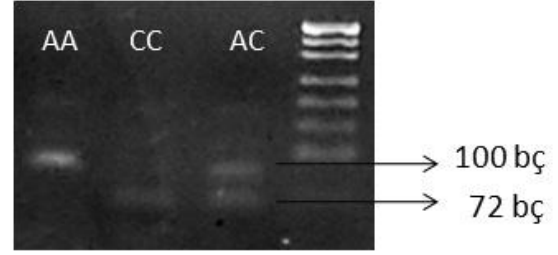
spesifik primer içeren 50 µl PCR karışımında thermal cycler cihazında (Amplitrionyx 4, USA) amplifiye edildi. Kullanılan primer dizileri 5'- CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA C- 3' ve R: 5'- CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG- 3' şeklindedir. Amplifikasyon için reaksiyon karışımı 94oC' de 1 dk, 63oC' de 1 dk ve 72oC' de 1 dk'dan oluşan 40 döngüye tabi tutuldu. Elde edilen 128 bç'lik PCR ürünlerinden 10µl'si, 1 ünite Mbo II enzimi (Vivantis) ile 1 saat 37oC' de kesime bırakıldı. Kesim sonrası oluşan ürünler fragmentlerin ayırımı için % 3'lük agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. Buna göre 100 bç'lik fragmentlere sahip olanlar 1298 AA; 100 ve 72 bç'lik fragmentlere sahip olanlar 1298 AC ve 72 bç'lik fragmentlere sahip olanlar 1298 CC olarak belirlendi (Şekil 3).

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi için SPSS 15.0 paket programı kullanılmıştır. Genotip dağılımlarının hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırılması için Pearson χ^2 yöntemi uygulanmıştır. P değeri 0.05'ten küçük olanlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.



Şekil 2. MTHFR geni C677T Polimorfizmi Jel Görüntüsü



Şekil 3. MTHFR geni A1298C Polimorfizmi Jel Görüntüsü

BULGULAR

Hasta ve kontrol grupları arasında, *PAI-1* geni 4G/5G ve *MTHFR* geni C677T ve A1298C polimorfizmleri alel frekansları açısından bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 1). Genotip dağılımları karşılaştırıldığında ise *PAI-1* geni 4G/5G ve *MTHFR* geni A1298C polimorfizmleri

açısından hasta grubu ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p>0,05$). *MTHFR* geni C677T polimorfizmi genotip dağılımına bakıldığında ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu belirlendi ($p<0,05$). Gruplar arasındaki genotip dağılımları Tablo 2’de gösterilmiştir.

Polimorfizm tipi	Hasta allel (n=34)	Kontrol allel (n=34)	p değeri
<i>PAI-1</i> 4G/5G			
4G	42 (%61,76)	36 (%52,94)	>0,05
5G	26 (%38,24)	32 (%47,06)	
<i>MTHFR</i> C677T			
T	6 (%91,18)	11 (%16,2)	>0,05
C	62 (%88,82)	57 (%83,8)	
<i>MTHFR</i> A1298C			
C	39 (%53,35)	34 (%50)	>0,05
A	29 (%42,65)	34 (%50)	

Tablo1. Hasta ve kontrol grubu arasındaki *PAI-1* geni 4G/5G *MTHFR* geni C677T ve A1298C gen polimorfizmlerinin alel frekansları

Polimorfizm tipi	Hasta # (n=34)	Kontrol # (n=34)	p değeri
<i>PAI-1</i> 4G/5G			
4G/4G	16	11	>0,05
4G/5G	10	14	
5G/5G	8	9	
<i>MTHFR</i> C677T			
T/T	3	0	<0,05
C/T	0	11	
C/C	31	23	
<i>MTHFR</i> A1298C			
C/C	3	6	>0,05
A/C	23	22	
A/A	8	6	

Tablo 2. Hasta ve kontrol grubu arasındaki *PAI-1* geni 4G/5G *MTHFR* geni C677T ve A1298C gen polimorfizmlerinin genotip dağılımları

TARTIŞMA

Son yıllarda, tekrarlayan gebelik kayıpları ile genetik polimorfizmler arasındaki ilişkileri ortaya koyan pek çok genetik çalışma bulunmaktadır. Ancak tekrarlayan gebelik kayıplarının patogeneğinde bu polimorfizmlerin etkisine ilişkin veriler çelişkiler içermektedir. Bu çelişkiler, çalışmaya dahil edilen araştırma ve kontrol grubu olgu sayıları ile bu grupları oluşturan bireylerin seçim kriterlerinin değişkenlik göstermesini ve ayrıca etnik ve coğrafik dağılımdaki farklılıklardan dolayı alel frekansları arasındaki çeşitliliği açıklamaktadır. Bu nedenle biz de bu çalışmada, Muş ilindeki tekrarlayan düşük olgularında *PAI-1* geni 4G/5G ve *MTHFR* geni C677T ve A1298C polimorfizmleri arasında bir ilişki olup olmadığını ve alel frekanslarını belirlemeyi amaçladık.

Çalışmamız sonucunda hasta ve kontrol grubu bireyleri arasında *PAI-1* geni 4G/5G ve *MTHFR* C677T ve A1298C polimorfizmleri alel frekansları açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Kontrol grubu bireylerimizde bu polimorfizmlere ait alel frekansları Türk popülasyonuna ilişkin prevalans ile uygunluk göstermiştir (2, 7,17-20).

Genotipler açısından hasta ve kontrol grubunu karşılaştırdığımızda ise *PAI-1* geni 4G/5G ve *MTHFR* A1298C polimorfizmleri genotip dağılımlarının gruplar arasında bir farklılık göstermediğini tespit ettik. Bizim bulgularımızla uyumlu olarak Dossenbach-Glaninger ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada *PAI-1* geni 4G/5G polimorfizminin

Avusturya popülasyonunda tekrarlayan düşük olgularında bir risk faktörü olmadığını belirtmiştir (16). Halbuki Ghosh ve arkadaşlarının Hindistan, Bucholz ve arkadaşlarının Alman popülasyonunda yapmış oldukları çalışmalarda *PAI-1* geni 4G/5G polimorfizmi 4G genotipinin tekrarlayan düşük olgularında önemli olduğu vurgulanmıştır (12,13). Tepeli ve arkadaşları Eskişehir ilinde Türk popülasyonunda yapmış oldukları

çalışmada *MTHFR* geni C667T ve A1298C polimorfizmlerinin tekrarlayan düşük kayıpları için bir risk oluşturmadığını, gruplar arasında genotipler ve alel frekansları açısından bir fark bulunmadığını belirtmişlerdir (2). Bu bulgular bizim bulgularımıza benzerlik gösterebilir, Muş ilinde *MTHFR* geni C677T polimorfizmi gruplar arasında genotipler açısından farklılık göstermiştir. 677 TT mutantlığı 34 hasta bireyden üçünde görülmüş ancak kontrol grubunda rastlanılmamıştır. 677 CT heterozigotluğuna ise sadece kontrol grubunda rastlanılmıştır. Bu bulgular her ne kadar istatistiksel olarak anlam ifade ediyor olsa da tekrarlayan gebelik kayıpları için bir risk faktörü olarak gözükmemektedir. Vetriselvi ve arkadaşlarının Hindistan'da, Carp ve arkadaşlarının İsrail'de yapmış oldukları çalışmada da tekrarlayan gebelik kayıpları ile *MTHFR* geni C677T polimorfizmi arasında bir ilişki olmadığı belirtilmiştir (21,22). Bazı çalışmalarda ise, *MTHFR* C677T homozigot TT varyantına sahip bireylerde homosistein düzeylerinin çok yükseldiği ve bu artışın tekrarlayan gebelik kayıpları ile anlamlı düzeyde ilişkili olduğu bildirilmiştir (9,23,24). Son yıllarda yapılan meta-analiz verileri de tekrarlayan gebelik kayıpları ile C677T varyantı arasında herhangi bir ilişki olmadığı yönündedir (7,25,26).

Hohlagschwandtner ve arkadaşları trombofilik 6 polimorfizmi kombine olarak inceledikleri çalışmada *MTHFR* geni A1298C ve C677T polimorfizmleri alel ve genotip frekanslarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığını, yine tüm genler kombine olarak ele alındığında da kontrol grubuna göre anlamlı farklılığın bulunmadığını bildirmişlerdir (27). Buna karşılık, 10 trombofilik gen polimorfizmi ile tekrarlayan gebelik kayıpları arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda, yine *MTHFR* A1298C ve

C677T polimorfizmleri alel ve genotip frekanslarının kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermediği, ancak tüm genlerin homozigot mutasyon prevelansları birlikte değerlendirildiğinde tekrarlayan gebelik kaybı olan kadınlarda toplam homozigot mutasyon oranının ileri düzeyde arttığı öne sürülmüştür (28,29). Sonuç olarak, Muş ilinde çalışmamıza dahil edilen tekrarlayan gebelik kayıplarında *PAI-1* geni 4G/5G ve *MTHFR* geni C677T ve A1298C

polimorfizmlerinin tek başına risk faktörü olmadığı saptanmıştır. Ancak polimorfizm çalışmalarının geniş popülasyonlarda daha anlamlı sonuçlar verdiği gözönünde bulundurulduğunda hasta sayısının artırılması gerektiğine ve tekrarlayan düşük kayıplarında risk faktörü olarak öne sürülmüş diğer gen polimorfizmlerinin de çalışmaya dahil edilerek kombine olarak değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Alataş E. Tekrarlayan gebelik kayıplarında tanı ve tedavinin yönlendirilmesi. *TJD Uzmanlık Sonrası Eğitim Dergisi*, 2004; 6:19-25.
2. Tepeli E, Müslümanoğlu HM, Uludağ A, et al. Eskişehir ilinde idiopatik tekrarlayan gebelik kayıpları ile metilentetrahidrofolat redüktaz (*MTHFR*) C677T ve A1298C polimorfizmleri arasındaki ilişki. *Osmangazi Tıp Dergisi*, 2007; 29(1):1-11.
3. Oral D, Alp MN, Budak T. Ailesel Resiprokal Translokasyon Olgusu ve Tekrarlayan Düşükler. *Dicle Tıp Dergisi*, 2006; 33(3):182-184.
4. Balcı A, Yirmibeş M, Bal F, et al. Ailesel Resiprokal Translokasyon Olgusu ve Tekrarlayan Düşükler. *Perinatoloji Dergisi*, 1996; 4(4):218-219.
5. Bagos PG. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G and 5,10-methylene-tetrahydrofolate reductase C677T polymorphisms in polycystic ovary syndrome. *Molecular Human Reproduction*, 2009; 15(1):19-26.
6. Karadeniz M, Erdoğan M, Berdeli A, et al. 4G/5G polymorphism of *PAI-1* gene and *ALu-repeat* I/D polymorphism of *TPA* gene in Turkish patients with polycystic ovary syndrome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2007; 24:412-418.
7. Gökosmanoğlu F, Cinemre H, Bilir C. Habituel abortus nedeniyle takip edilen iki olguda *MTHFR* defekti. *Perinatoloji Dergisi*, 2008; 16(1):31-35.
8. Orio F, Palomba S, Di Biase S, et al. Homocysteine levels and C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase in women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2003; 88(2):673-679.
9. Nelen WL, Blom HJ, Streeers EA, et al. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta analysis. *Fertility and Sterility*, 2000; 74:1196-9.
10. Sarig G, Younis JS, Hoffman R, Lanir N, Blumenfeld Z, Brenner B. Thrombophilia is common in women with idiopathic pregnancy loss and is associated with late pregnancy wastage. *Fertil Steril*, 2002 Feb;77(2):342-7.
11. Quere I, Bellet H, Hoffet M, Janbon C, Mares P, Gris JC. A woman with five consecutive fetal deaths: case report and retrospective analysis of hyperhomocysteinemia prevalence in 100 consecutive women with recurrent miscarriages. *Fertil Steril*, 1998, 69:152-54.
12. Ghosh K, Shetty S, Vora S. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G gene polymorphism in women with fetal loss. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2009 ;107(2):159-60.
13. Bucholz T, Lohse N, Rogenhofer N, et al. Polymorphisms in the *ACE* and *PAI-1* genes are associated with recurrent spontaneous miscarriages. *Human Reproduction*, 2003; 18(11):2473-2477.

14. Foka ZJ, Lambropoulos AF, Saravelos H, et al. Factor V leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reproduction*, 2000 ;15(2):458-62.
15. Makino A, Nakanishi T, Sugiura-Ogasawara M, et al. No association of C677T methylenetetrahydrofolate reductase and an endothelial nitric oxide synthase polymorphism with recurrent pregnancy loss. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2004 ;52(1):60-6.
16. Dossenbach-Glaninger A, Trotsenburg M, Dossenbach M, et al. Plasminogen activator inhibitor I 4G/5G polymorphism and coagulation factor XIII Val34Leu polymorphism: impaired fibrinolysis and early pregnancy loss. *Clinical Chemistry*, 2003; 49(7):1081-1086.
17. Gunes HV, Cosan DT, Ata N, et al. Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 Gene 4G/5G Polymorphism Is Associated with Hypertensive Patients in Turkish Population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 2010 ; 14(3):303-305.
18. Sazcı A, Ergul E, Kaya G, et al. Genotype and allele frequencies of the polymorphic methylenetetrahydrofolate reductase gene in Turkey. *Cell Biochemistry and Function*, 2005 ;23(1):51-4.
19. Kucukarabaci B, Gunes HV, Ozdemir G, et al. Investigation of Association between Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 (PAI-1) Gene 4G/5G Polymorphism Frequency and Plasma PAI-1 Enzyme Activity in Patients with Acute Stroke. *Genetic Testing*, 2008 ;12(3): 443-451.
20. Cosan D, Kurt E, Kurt H, et al. Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 (PAI-1) Gene 4G/5G Polymorphism In Patients With Asthma In Turkish Adult Patients With Asthma. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 2009 ;13(4): 543-546.
21. Vettriseli V, Vijayalakshmi K, Paul SFD, et al. ACE and MTHFR gene polymorphisms in unexplained recurrent pregnancy loss. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 2008 ; 34(3):301-306.
22. Carp H, Salomon O, Seidman D, et al. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Human Reproduction*, 2002 ;17(6):1633-1637.
23. Kim NK, Choi YK, Kang MS, et al. Influence of combined methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and thymidylate synthase enhancer region (TSE) polymorphisms to plasma homocysteine levels in Korean patients with recurrent spontaneous abortion. *Thrombosis Research*, 2006 ; 117:653-58.
24. Lissak A, Sharon A, Fruchter O, et al. Polymorphism for mutation of cytosine to thymine at location 677 in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with recurrent early fetal loss. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 1999 ;181(1):126-30.
25. Rey E, Kahn SR, David M, et al. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet*, 2003 ;361:901-908.
26. Ren A, Wang J. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 2006 ;86(6):1716-22.
27. Hohlagschwandtner M, Unfried G, Heinze G, et al. Combined thrombophilic polymorphisms in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Fertility and Sterility*, 2003 ;79(5):1141-8.
28. Goodman CS, Coulam CB, Jeyendran RS, et al. Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? *American Journal of Reproductive Immunology*, 2006 ;56(4):230-6.
29. Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, et al. Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutations are risk factors for recurrent miscarriage. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2006 ;55(5):360-8.