



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Tekrarlayan gebelik kayıplarında FAS ve FASLG polimorfizmlerinin TaqMan SNP genotiplendirme yöntemi ile belirlenmesi

Detection of FAS and FASLG polymorphisms with TaqMan SNP genotyping assays in recurrent miscarriage

Mustafa Ertan Ay¹, Özlem İzci Ay¹, Kenan Çevik¹, Gurbet Doğru¹, Fatma Söylemez¹, Filiz Evşen Çayan², Mehmet Emin Erdal¹

¹Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, ²Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Mersin, Turkey

Cukurova Medical Journal 2019;44(4):1303-1309.

Abstract

Purpose: The aim of this study was to investigate the role of Fas cell surface death receptor (FAS) and FAS ligand genes (FASLG) polymorphisms in the etiology of recurrent miscarriage.

Materials and Methods: In a case-control study, genomic DNA was obtained from 70 patients and 70 healthy controls. Detected with real time PCR, genotype distributions and allelic frequencies of polymorphisms of FAS -670 A>G, FAS-1377 G>A, FASLG -124 A>G genes were compared between the groups.

Results: In this study, FASLG -124 A>G polymorphisms were associated with an increased risk of recurrent miscarriage whereas FAS -670 A>G and -1377 G>A genotypes conferred no risk. For the FASLG -124 A>G polymorphisms, the likelihood of disease in patients with A allele was 3.94 times higher than those without A allele.

Conclusion: Our findings suggest that the -124 A>G polymorphism in the FASLG gene related with apoptosis may contribute to susceptibility to recurrent miscarriage in the Turkish women.

Keywords: Apoptosis, Recurrent miscarriage, FAS, FASLG, Polymorphisms

Öz

Amaç: Bu çalışmada apoptotik uyarıcı Fas hücre yüzey ölüm reseptörü (FAS) ve FAS ligandı genleri (FASLG) polimorfizmlerinin tekrarlayan gebelik kaybı (TGK) etiolojisindeki yeri araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Bu vaka-kontrol çalışmasında, TGK tanısı almış 70 kadın ve kontrol grubu olarak 70 kadından genomik DNA izole edildi. Her iki gruptaki FAS -670 A>G, FAS -1377 G>A ile FASLG -124 A>G polimorfizmlerinin genomik dağılımı ve allel frekansları real-time PCR yöntemi ile belirlenerek karşılaştırıldı.

Bulgular: Çalışmamızda, FASLG -124 A>G polimorfizmi için TGK ve kontrol gruplarının genotip frekans farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Ancak FAS -670 A>G ve FAS-1377 G>A genotipleri ile TGK arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir ilişki saptanmadı. FASLG -124 A>G polimorfizmi için A allelini taşıyanlarda hastalığın görülme olasılığı A allelini taşımayanlara göre 3,94 kat daha yüksek bulundu.

Sonuç: Bulgularımız, apoptozla ilişkili FASLG -124 A>G polimorfizminin TGK oluşumuna katkısı olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Apoptoz, Tekrarlayan gebelik kaybı, FAS, FASLG, Polimorfizm

GİRİŞ

Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK) üreme çağındaki kadınlar için belki de en önemli tıbbi sorunlardan biridir. Yirminci gebelik haftasından önce meydana gelen 500 g fetal ağırlığın altında arka arkaya 2 ya da

daha fazla gebeliğin sporadik olarak sonlanması ve birden fazla canlı doğum olmaması şeklinde tanımlanan TGK, gebe kadınların %0,5-1'ini etkilemektedir¹.

TGK'ye neden olan etkenler; endokrin, anatomik, immünolojik, enfeksiyöz, trombofilik, çevresel ve

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Mustafa Ertan Ay, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Turkey E-mail: ertanay@mersin.edu.tr

Geliş tarihi/Received: 07.02.2019 Kabul tarihi/Accepted: 03.04.2019 Çevrimiçi yayın/Published online: 15.09.2019

genetik etkenlerdir. Endokrin etkenler arasında erken gebelik döneminde plasenta oluşumundan önce korpus luteumdan yetersiz progesteron sentezlenmesi ile oluşan luteal faz defekti², hipo/hipertroidi³, tip II diyabet⁴, hiperprolaktinemi⁵ ve polikistik over sendromu⁶ yer almaktadır. Gebelik kaybı riskini arttıran uterustaki anatomik anormallikler ise konjenital uterin malformasyonları (*unikorni uterus*, *didelfis uterus*, *uterin septum vb.*), uterin leiomyomlar, uterin adezyonlar ve küretaj sonrası intrauterin adezyonlardır. Tekrarlayan gebelik kaybı olgularında uterin anomali görülme sıklığı %6-7'dir⁷. TGK etiolojisinde yer alan immunolojik etkenler; otoimmün veya alloimmün etkenlerdir. Antinükleer antikor, antitiroid antikor ve sistemik lupus eritamatozis (SLE) olgularının gebelik kayıplarından sorumlu antifosfolipid antikor, TGK'ye neden olan otoimmün etkenlerdir⁸. Normal gebelik sürecinde embriyonik dokulardaki paternal orijinli antijenlere karşı maternal immün yanıt oluşumu da (alloimmün yanıt) fetusun rejeksiyonuna neden olabilmektedir⁹. TGK'de enfeksiyonların etkisi tam olarak bilinmemekle birlikte, servisit, kronik veya tekrarlayan vajinit ve pelvis enfeksiyonlarında riskin arttığına yönelik çalışmalar bulunmaktadır¹⁰. Son yıllarda edinsel ve herediter trombofililer de TGK etkenleri arasında gösterilmektedir. Özellikle aktive protein kinaz C rezistansı, protrombin mutasyonları, hiperhomosisteinemi ile protein S, C ve antitrombin III eksiklikleri; pıhtılaşma bozukluklarına ve tromboz oluşumuna neden olmalarından dolayı TGK nedenleri arasında sayılmaktadır¹¹. TGK'ye neden olan çevresel faktörler arasında sigara ve alkol kullanımı ile kafein ilk üç sırayı almaktadır¹².

TGK'ye neden olan genetik ve moleküler etkenler ise son yıllarda birçok araştırmaya konu olmaktadır. Olguların %30'unda saptanan kromozomal sayısal (trizomiler, monozomiler) ve yapısal yeniden düzenlenimler (delesyon, duplikasyon vb.) genetik etkenlerin ilk sırasında yer almaktadır¹³. İlk gebelik kaybı sonrası kromozomal anomali saptanan olguların daha sonraki gebeliklerinde de kromozomal anomaliye bağlı düşük olasılığı artmaktadır. TGK'lerin %3-5'ine ise anne ya da baba adayında bulunan dengeli kromozomal değişimler yol açmaktadır. Bu olgularda anne ve baba fenotipik olarak normaldir. Ancak dengeli kromozomal değişimin mayoz bölünme sırasında gamet hücrelerine dengesiz bir şekilde ayrışımı ile anormal kromozom içeriğine sahip gametler oluşabilmektedir. Bu tür gametlerden köken alan fetuslar ise gebelik kaybı olarak karşımıza çıkabilmektedir¹.

Kromozomal değişimlerin yanı sıra hemoglobinopati, alfa talasemi gibi bazı tek gen hastalıklarında da spontan gebelik kayıpları görülebilmektedir¹³.

Apoptoz, çok hücreli organizmaların gelişimi ve hücrel farklılaşması sırasında meydana gelen fizyolojik, programlanmış hücre ölümüdür. İlk kez 1972 de Kerr, Wylie ve Currie tarafından tanımlanan apoptoz; nekrozun aksine inflamasyon gelişmeyen, RNA, protein sentezi ve enerjiye ihtiyaç duyan ve genlerle düzenlenen bir hücrel olaydır¹⁴. Temel mekanizma, DNA hasarı gibi patofizyolojik koşullar ve oksidatif stres gibi çeşitli hücre içi ve dışı sinyaller yoluyla gen düzeyinde kodlanan apoptotik mekanizmaların aktive edilmesi ve hücrenin kendini yok etmesidir¹⁵. Apoptozun uyarılmasında çeşitli hücre içi moleküller ve bunlarla ilgili hücrel süreçler yer almaktadır. Bunlar arasında; büyüme faktörlerinin eksikliği, sitokinler, hücre içi kalsiyum artışı, Tümör Nekroz Faktör (*TNF*), Transforme edici Büyüme Faktörü-beta (*TGF-β*), *FAS/FAS Ligand* sisteminin aktivasyonu, DNA hasarı sonucunda *p53* tümör baskılayıcı gen aktivasyonu, viral-bakteriyel enfeksiyonlar ve glukokortikoidler yer almaktadır. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçlar ve hipoksi gibi nekroza neden olan etkenler de apoptozu tetikleyebilmektedir¹⁶.

FAS; TNF ailesi üyesi bir hücre yüzey reseptörüdür. Yapısında ölüm bölgesi (*death domain*) bulunduran FAS proteini, apoptozun fizyolojik düzenleyicisidir. Ligandı FASLG ile etkileşime giren FAS proteini, aralarında Fas ile ilişkili ölüm bölgesi protein (*FADD*), kaspaz 8 ve kaspaz 10'un bulunduğu sinyal kompleksinin oluşumuna olanak sağlar. Kompleksteki kaspazların kendi kesimlerini uyarması (otoprotolitik işleme) ile aşağı kaspaz yolu (*downstream* kaspaz yolu) aktive edilir ve apoptoz gerçekleşir. FAS reseptörü aktive olmuş immün sistem hücrelerinde (T hücreleri, B hücreleri, *natural killer*-NK hücreleri ve makrofaj) çok yüksek düzeyde eksprese edilirler. FAS Ligand (FASLG) ise TNF ile ilişkili bir membran proteini olup NK hücreleri, aktive T hücreleri ve immün olmayan hücrelerde eksprese edilmektedir. Temel görevi FAS reseptörüne bağlanarak apoptozun uyarılmasıdır. Çeşitli araştırmalar *FAS* ve *FASLG* genlerindeki bazı tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) genin ekspresyonunu değiştirdiğini belirtmektedir. Benzato ve ark. *FAS -670 A>G* polimorfizmi saptanan tekrarlayan gebelik kaybı olgularında genin ekspresyonunun azaldığını göstermiştir¹⁴. *FAS* ve *FASLG*'nin fetal sitotrofoblastlarda ve plasentanın

maternal desidual hücrelerinde eksprese edildiği bilinmektedir¹⁷. Bu çalışmaya konu olan *FAS* -670 A>G, *FAS* -1377 G>A polimorfizmleri genin promotör bölgesindeki fonksiyonel polimorfizmlerdir. *FAS* -670 A>G, SP1 (*stimulatory protein 1*) transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesinde yer alır¹⁸. SP1; hedef genlerin promotör bölgelerindeki GC-zengin dizilere bağlanan çinko-parmak motifli bir transkripsiyon faktörüdür. Hücre farklılaşması, hücre büyümesi, apoptoz, immün yanıt, DNA hasarına cevap ve kromatin yeniden düzenlenmesi gibi birçok hücrenel süreçte aktive edici veya baskılayıcı işlevleri vardır. *FAS* -1377 G>A polimorfizmi ise STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgesindedir. STAT1'ler; sitokinler veya büyüme faktörleri tarafından aktive edildikten sonra heterodimer ya da homodimer halinde nükleusa geçerek birçok genin transkripsiyon aktivatörü olarak işlev gören proteinlerdir. *FASLG* IVS2nt-124 A>G intron polimorfizmi ise *FASLG* geninin transkripsiyonel aktivasyonu ve ekspresyonu ile ilişkilidir¹⁹.

Fetal doku ve plasentada eksprese edildiği gösterilen, trofoblastlarda bozulmuş ekspresyon ve apoptoza neden olduğu saptanan, *FAS* ve *FASL* genlerinin bozulmuş işlevleri ile gebelik kaybına yol açabileceği düşünülebilir. Literatürde TKG olgularındaki *FAS* ve *FASLG* gen polimorfizmlerini araştıran kısıtlı sayıda çalışma ve birbiriyle çelişen sonuçlar bulunmaktadır. Bu çalışmada *FAS* ve *FASL* genlerinin işlevlerinin bozulmasına neden olduğu bilinen *FAS* -670 geni A>G, -1377 G>A ile *FASLG* geni -124 A>G polimorfizmlerinin, TKG etiolojisindeki rolü araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Tekrarlayan gebelik kaybı olgularında *FAS* ve *FASLG* gen polimorfizmlerinin araştırıldığı bu çalışmada, hasta ve kontrol gruplarının oluşturulması Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirildi. Moleküler biyolojik analizler ise Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışmanın etik kurul onayı Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 21.01.2009 tarihinde B.30.2.MEÜ.0.20.05.04/14 sayılı karar ile alınmıştır.

Hasta grubunun oluşturulmasında tekrarlayan gebelik kaybına neden olabilen kromozomal, anatomik,

metabolik, hormonal, enfeksiyöz, otoimmün ve trombofilik etkenler dışlama kriteri olarak kullanıldı. Çalışmaya rutin histerosalpingografi veya sonohisterografi, parental kromozom analizi yapılan ve antikardiyolipin antikorları (IgG ve IgM), lupus antikoagulan ve tiroid uyarıcı hormon düzeyleri belirlendikten sonra klinik açıdan nedeni belirlenemeyen tekrarlayan gebelik kaybı tanısı almış 70 kadın ve kontrol grubu olarak sağlıklı ve öyküsünde gebelik kaybı olmayan ve en az iki çocuk sahibi olan 70 sağlıklı kadın dahil edildi. Diyabet ve inflamatuvar hastalıklar gibi kronik hastalığı olanlar ile sigara, alkol ve uzun süreli ilaç kullanımı olanlar her iki gruptan da dışlandı. Tekrarlayan gebelik kaybı hasta grubunun yaş ortalaması 29.04, ortalama gebelik kaybı sayısı 3.275 (min=2, max=8, SD=1.4841) olarak belirlendi. Kontrol grubunun yaş ortalaması ise 30.88 olarak saptandı. Çalışmaya ait etik kurul onayı, Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından verilmiştir. Her iki gruptaki kadınlardan çalışmaya katılmayı kabul ettiklerine dair bilgilendirilmiş onam alındı.

Genotiplendirme

Tekrarlayan gebelik kaybı hasta grubu ve kontrol grubu bireylerinden 7-8 ml periferik kan örneği alındı ve 1 ml, % 2'lik EDTA içeren 15 ml'lik santrifüj tüplerine konuldu. DNA eldesi Miller'in tuz çöktürme yöntemine göre gerçekleştirildi. *FAS* -670 A>G, *FAS* -1377 G>A, ve *FASLG* IVS2nt-124 A>G tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) önceden dizayn edilmiş *TaqMan* SNP Genotyping Assays ve *The Assays-on-Demand* SNP Genotyping Kit (*Applied Biosystems*) kullanılarak Real-Time PCR (*ABI Prism* 7500, *Applied Biosystems*, Foster City, CA) yöntemi ile saptandı. Çalışmaya konu olan *FAS* -670 A>G, *FAS* -1377 G>A ve *FASLG* IVS2nt-124 A>G SNP'lerinin, Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) tarafından belirlenmiş, özdeş bir genomik konuma eşlenen bir SNP grubuna (veya kümesine) atanan tanımlama etiketleri (rs numarası) sırasıyla rs180068, rs2234767 ve rs5030772'dir.

PCR ampifikasyonları üretici firmanın belirlediği protokole göre gerçekleştirildi. Kısaca; 25µl'lik reaksiyon karışımı: 12.5µl 2X *TaqMan* Universal PCR Master Mix (*Applied Biosystems*) ile karıştırılan 30 ng DNA ve 1.25 µl içerisinde 900 nm primer ile 200 nm MGB *TagMan* prob olan ve üretici tarafından geliştirilen SNP Genotyping Assay Reagent (*FAS* -670 A>G, rs1800682 için katalog no: C_9578811_10; *FAS* -1377 G>A, rs2234767 için C_12123966_10 ve

FASLG geni IVS2nt -124 A>G, rs5030772 için C_32334221_10, Applied Biosystems) içermektedir. Reaksiyon koşulları; 60 °C'de 1 dk ve 95 °C'de 10 dk pre-inkübasyon sonrası 40 döngüde 95 °C'de 15 sn, 60 °C'de 1 dk olacak şekilde uygulandı. Elde edilen amplifikasyon eğrileri SDS 2.0.3 Software for Allelic discrimination (Applied Biosystems) programı kullanılarak değerlendirildi.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel değerlendirmede gruplar arasındaki yaş farklılıklarının belirlenmesi için bağımsız örnekler t testi, hastalık ve genotipler arasındaki ilişkinin belirlenmesinde ise ki-kare testi kullanıldı. İstatistiksel analizler SPSS v.11.5 paket programı ile yapıldı ve $p < 0,05$ ise sonuçlar anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Yapılan istatistiksel analiz sonucu kontrol grubunun yaş ortalaması ile hasta grubunun yaş ortalaması arasında fark olmadığı belirlendi ($p=0.180$). Hasta ve kontrol gruplarında saptanan FAS -670 A>G, FAS geni -1377 G>A ve FASLG geni -124 A>G polimorfizmlerine ait genotip ve allel frekansları tablo 1 de verilmiştir. Tüm genotiplerin hasta ve kontrol gruplarında Hardy-Weinberg dengesinde olduğu görüldü.

Tablo 1. FAS ve FASLG polimorfizmi için genotip ve allel frekanslarının gruplar arasındaki dağılımı.

	Hasta n(%)	Kontrol n(%)	p
<i>FAS -670 A>G</i>			
AA	18(25.7)	17(24.3)	0.943
AG	38(54.3)	40(57.1)	
GG	14(20)	13(18.6)	
A Alleli	74(52.9)	74(52.9)	1.00
G Alleli	66(47.1)	66(47.1)	
<i>FAS -1377 G>A</i>			
GG	55(78.6)	46(65.7)	0.090
GA	15(21.4)	24(34.3)	
AA	0	0	
G Alleli	125(89.3)	116(82.9)	0.169
A Alleli	15(10.7)	24(17.1)	
<i>FASLG -124 A>G</i>			
AA	56(80)	35(50)	0.001
AG	13(18.6)	32(45.7)	
GG	1(1.4)	3(4.3)	
A Alleli	125(89.3)	102(72.9)	0.001
G Alleli	15(10.7)	38 (27.1)	

FAS -670 A>G polimorfizmi için yapılan genotiplendirme çalışması sonucunda hasta ve kontrol grubundaki GA genotip frekanslarının (sırasıyla %54,3 ve %57,1) GG ve AA genotip frekanslarına göre daha yüksek olduğu saptandı. FAS -670 polimorfizmi için genotip dağılımı bakımından gruplar arasında istatistiksel fark görülmedi ($p=0,943$). Hasta ve kontrol gruplarındaki A allel frekansları ile G allel frekansları arasında istatistiksel olarak fark olmadığı görüldü ($p=1.00$).

Yapılan istatistik değerlendirme sonucunda FAS geni -1377 G>A polimorfizmi için hasta ve kontrol gruplarının her ikisinde de GG genotipinin frekansının yüksek olduğu görüldü (sırasıyla %78.6 ve %65.7). Her iki grupta da AA genotipine rastlanmadı. Gruplar arasında FAS -1377 G>A polimorfizmi için istatistiksel fark saptanmadı ($p=0.090$). G allel frekansının her iki grupta da A allel frekansından daha yüksek olduğu ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0.001$). Ancak gruplar arasında G allel frekansları yönünden istatistiksel olarak fark olmadığı saptandı ($p=0.169$).

FASLG -124 A>G polimorfizmi için genotipler değerlendirildiğinde AA genotipinin hem hasta hem de kontrol grubunda AG ve GG genotiplerinden daha yüksek frekansta olduğu görüldü (sırasıyla %80 ve %50). *FASLG -124 A>G* polimorfizmi genotip frekansları için hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir istatistiksel fark olduğu tespit edildi ($p=0,001$). Yine her iki grupta da A allelinin G allele göre daha yüksek frekansta görüldüğü ve gruplar arasındaki A allel frekansları yüksekliğinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.001$). *FASLG -124* polimorfizmi için genotipi AA ve AG olan bireyler, A allelini taşıdıklarından hastalığın görülme olasılığı A allelini taşımayanlara göre 3,94 kat daha yüksek bulundu ($p < 0,001$) (tablo 2).

Tablo 2. Genotipler arasındaki allel frekans farklılıklarının hastalık riski üzerine etkisi.

	OO	GA	p
<i>FAS -670</i>			
GG-GA	1.14	0.4722-2.7216	0.7790
GG-AA	1.01	0.3724-2.7776	0.9736
GA-AA	1.11	0.5019-2.4752	0.7899
<i>FAS -1377</i>			
GG-GA	1.91	0.8994-4.0689	0.0920
<i>FASLG -124</i>			
AA-AG	3.94	1.8224-8.5118	<0.001
AA-GG	4.80	0.4801-47.985	0.1817
AG-GG	1.22	0.1159-12.820	0.8691

OO: Olasılıklar oranı=Odds oranı, GA: Güven aralığı

TARTIŞMA

Bu çalışmada *FAS* -670 A>G, *FAS* -1377 G>A ve *FASLG* -124 A>G polimorfizmlerinin TGK ile ilişkisini araştırdık. Hipotezimizle uyumlu olarak, sonuçlarımız *FASLG* -124 A>G polimorfizminin TGK ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca TGK hastalarından *FASLG* -124 A>G polimorfizmi için A allelini taşıyanların, taşımayanlara göre daha yüksek riske sahip olduğu söylenebilir. Bununla birlikte, *FAS* -670 A>G ve *FAS* -1377 G>A polimorfizmlerinin TGK için risk faktörü olmadığı belirlendi. TGK'na neden olan apoptotik moleküllerdeki genetik değişimler birçok araştırmaya konu olmaktadır. Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız Mersin bölgesindeki Türk TGK hastalarında *FAS* ve *FASLG* genlerindeki polimorfizmlerin araştırıldığı ilk çalışmadır.

Apoptoz yoluyla hücre ölümü embriyonun invazyonu ve immün toleransı için önemli hücrel olaylardan biridir. Bu nedenle gebelik sırasında trofoblastlardaki normal olmayan apoptoz spontan düşüklere yol açabilmektedir. Embriyo endometriuma invaze olduğunda blastosit varlığına cevap olarak apoptoza uğrayabilmektedir. Özellikle *FAS* ve *FASLG* geni ekspresyonel değişimleri ve bu değişime neden olan polimorfizmler TGK hastalarının koryonik villüslerinde yapılan çalışmada gösterilmiştir²⁰. Sun ve ark. (2005) *FAS* -1377 G>A and *FAS* -670 A>G polimorfizmlerinin aktive T lenfositlerde *FAS* geni ekspresyonunu azalttığını göstermiştir²¹. Azalmış *FAS* ekspresyonu, trofoblastların immün sistem tarafından kendinden olan olarak tanınmasına ve fetal invazyona engel olabilmektedir. *FAS* genindeki değişimlerin gebelikle ilişkili diğer komplikasyonlarda da (preeklamps, preterm membran ruptürü vb.) rolü olduğu bilinmektedir^{22,23}. Bu nedenle, *FAS* ve *FASLG* geninin fonksiyonel varyantları, apoptoz mekanizmalarındaki normal dışı işlevlerinden dolayı tekrarlayan gebelik kayıplarına neden olabilecek etkenler arasında gösterilebilir.

Literatürde TGK olgularında *FAS* ve *FASLG* gen polimorfizmlerini araştıran kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Nair ve ark., tekrarlayan erken gebelik kaybı olgularında yaptıkları çalışmada *FAS* -670 A>G polimorfizminin hastalıkla ilişkili olmadığını ancak *FAS* -1377 G>A polimorfizmi için AA ve GA genotiplerinin erken gebelik kayıpları için risk faktörü olabileceğini gösterdi²⁴. Açıklanamayan TGK tanısı almış kadınlarda yapılan başka bir çalışmada ise *FAS* -670 A>G polimorfizminin TGK için risk faktörü

olmadığı saptandı¹⁴. Son olarak 2018 yılında Han ve ark. tarafından yapılan çalışmada Koreli kadınlarda hem *FAS* -670 hem de *FAS* -1377 polimorfizminin TGK için risk faktörü olmadığını yayınladı²⁵. Sonuçlarımız *FAS* -670 A>G polimorfizmi için her üç çalışmadaki sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Ancak Nair ve ark.'nın *FAS* -1377 G>A verileri ile çalışmamızda²⁴. Bu polimorfizmin TGK için risk faktörü olup olmadığını araştırdığı başka çalışma literatürde henüz yoktur. *FAS* -1377 polimorfizminin diğer hastalıklar ile ilişkisi konusunda da çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Örneğin Sibley ve ark. akut myeloid lösemi hastalarında *FAS* -1377 polimorfizmini hastalıkla ilişkili bulmuşken, Mehta ve ark. herhangi bir ilişki saptamamıştır^{18,26}. Bu tür çelişkilerin popülasyonlar arasındaki genetik farklılıklardan köken alabileceği düşünülebilir. TGK ve *FAS* -1377 polimorfizmi arasındaki olası ilişkinin daha büyük hasta ve kontrol gruplarında ve farklı popülasyonlarda çalışılarak açıklığa kavuşturulması gerekmektedir.

Romatoid artrit hastalarında genin ekspresyonunu azalttığı gösterilen *FASLG* IVS2nt-124 A>G intron polimorfizmi, fonksiyonel bir polimorfizmdir¹⁹. Ancak diğer *FAS* ve *FASLG* gen polimorfizmlerinde olduğu gibi literatürde farklı hastalıklarda çelişkili sonuçlar bildirilmektedir. 2018 yılında Huang ve arkadaşları yaptıkları meta-analiz ile kas-iskelet dejenerasyonu (osteoartrit, romatoid artrit vb.) hastalarında *FASLG* -124 polimorfizminin risk faktörü olmadığını belirtmektedir²⁷. Aplastik anemi hastalarında yapılan bir çalışmada ise *FASLG* -124 polimorfizmi ile hastalık arasında ilişki olduğu tanımlanmaktadır²⁸. Çalışmamızdan elde edilen verilere göre *FASLG* -124 polimorfizmi ile TGK arasında sıkı bir ilişki vardır. Ayrıca A allelini taşıyan bireylerin TGK riski 3.94 kat daha fazladır. Literatürde daha önce TGK ile *FAS*/*FASLG* sistemi ilişkisini araştıran çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. Bu nedenle *FASLG* -124 polimorfizmi ile TGK arasında saptadığımız ilişki apoptozun TGK etiolojisindeki rolünü belirlemeye katkı sağlayacaktır.

Araştırmamızın kısıtlayıcı yanları arasında; hasta ve kontrol gruplarımızdaki örnek sayıları ve *FAS*/*FASLG* gen ekspresyonlarının çalışılmaması olması sayılabilir. Ancak; TGK'larının moleküler ve genetik temeli tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Gametogenezen başlayarak, embriyonik ve fetal gelişim basamaklarındaki tüm hücrel ve metabolik süreçlerin işleyişinin ve kontrol mekanizmalarının TGK'na neden olabileceği potansiyeli yönünden

moleküler düzeyde aydınlatılmasına gereksinim vardır. Bu süreçlerden en önemlilerinden biride apoptozdur. Apoptozda rol oynayan *FAS/FASLG* gen polimorfizmlerinin TGK etiolojisindeki rolünü araştırdığımız çalışma sonuçlarımızın literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, bu çalışmada TGK ve sağlıklı kontrol grubu arasında *FAS -670* ve *FAS -1377* polimorfizm prevalansları arasında fark olmadığını ancak *FASLG -124* polimorfizminin TGK için risk faktörü olabileceğini bulduk. *FAS* ve *FASLG* genetik polimorfizmlerinin TGK'da bir risk faktörü olarak belirlenmesi için çeşitli populasyonlarda ve büyük örnek gruplarında yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Teşekkür

Çalışmaya katılan hasta ve kontrol grubundaki bireylere, değerli katkılarından dolayı Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı çalışanlarına ve istatistik analizlerin yapıldığı Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'na teşekkür ederiz.

Yazar Katkıları: Çalışma konsepti/Tasarımı: MEA, ÖA; Veri toplama: MEA, KÇ, GD, FS; Veri analizi ve yorumlama: MEA, ÖA, MEE, FEÇ; Yazı taslağı: MEA; İçeriğin eleştirel incelenmesi: ÖA, MEE; Son onay ve sorumluluk: MEA, ÖA, KÇ, GD, FS, FEÇ, MEE; Teknik ve malzeme desteği: FEÇ; Süpervizyon: MEA, ÖA; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan yazılı onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Author Contributions: Concept/Design : MEA, ÖA; Data acquisition: MEA, KÇ, GD, FS; Data analysis and interpretation: MEA, ÖA, MEE, FEÇ; Drafting manuscript: MEA; Critical revision of manuscript: ÖA, MEE; Final approval and accountability: MEA, ÖA, KÇ, GD, FS, FEÇ, MEE; Technical or material support: FEÇ; Supervision: MEA, ÖA; Securing funding (if available): n/a.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support

KAYNAKLAR

1. Silver RM, Branch DW. Sporadic and recurrent pregnancy loss. In Clinical Obstetrics: The Fetus and the Mother (Eds Reece AE, Hobbins J):143-160. Oxford, Blackwell Publishing, 2007.
2. Porter TF, Scott JR. Evidence-based care of recurrent miscarriage. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2005;19:85-101.
3. Rushworth FH, Backos M, Rai R, Chilcott IT, Baxter N, Regan L. Prospective pregnancy outcome in untreated recurrent miscarriers with thyroid autoantibodies. Hum Reprod. 2000;15:1637-9.
4. Mills JL, Simpson JL, Driscoll SG. HICHD-DIEP Study: incidence of spontan abortion among normal women with insülin dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. N Engl J Med. 1988;319:1617-23.
5. Gurbuz B, Yalti S, Ficicioglu C, Ozden S, Yildirim G, Sayar C. Basal hormone levels in women with recurrent pregnancy loss. Gynecol Endocrinol. 2009;17:317-21.
6. Rai R, Backos M, Rushworth F, Regan L. Polycystic ovaries and recurrent miscarriage reappraisal. Hum Reprod. 2000;15:612-5.
7. Homer HA, Li TC, Cooke ID. The septate uterus: a review of management and reproductive outcome. Fertil Steril. 2000;73:1-14.
8. Marder W, Littlejohn EA, Somers EC. Pregnancy and autoimmune connective tissue diseases. Best Pract Res Clin Rheumat. 2016;30:63-80
9. Clifford K, Flanagan AM, Regan L. Endometrial CD56+ natural killer cells in women with recurrent miscarriage: A histomorphometric study. Hum Reprod. 1999;14:2727-30.
10. Ralph SG, Rutherford AJ, Wilson JD. Influence of bacterial vaginosis on on conception and miscarriage in the first trimester: Cohort study. BMJ. 1999;319:220-3.
11. Adelberg A, Kuller J. Thrombophilias and recurrentmiscarriage. Obstet Gynecol Survey. 2002;57:703-9.
12. Klinea J, Tang A, Levin B. Smoking, alcohol and caffeine in relation to two hormonal indicators of ovarian age during the reproductive years. Maturitas. 2016;90:115-122.
13. Wapner RJ, Lewis D. Genetics and metabolic causes of stillbirth. Sem Perinat. 2002;26:70-4.
14. Banzato PC, Daher S, Traina E, Torloni MR, Gueuvoghlian-Silva BY, Puccini RF et al. FAS and FAS-L genotype and expression in patients with recurrent pregnancy loss. Reprod Sci. 2013;20:1111-5.
15. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol. 2007;35:495-516.
16. Budihardjo I, Oliver HLM. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annu Rev Cell Dev Biol. 1999;15:269-90.
17. Abrahams V, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. Mol Hum Reprod. 2004;10:55-63.
18. Sibley K, Rollinson S, Allan JM et al. Functional *FAS* promoter polymorphisms are associated with increased risk of acute myeloid leukemia. Cancer Res. 2003;63:4327-30.
19. Mohammadzadeh A, Pourfathollah AA, Tahoori MT, Daneshmandi S, Langroudi L, Akhlaghi M. Evaluation of apoptosis-related gene Fas (CD95) and

- FasL (CD178) polymorphisms in Iranian rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int.* 2012;32:2833-6.
20. Choi HK, Choi BC, Lee SH, Kim JW, Cha KY, Baek KH. Expression of angiogenesis- and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy loss patients. *Mol Reprod Dev.* 2003;66:24-31.
 21. Sun T, Zho Y, Li H, Han X, Shi Y, Wang L et al. FASL -844 C polymorphism is associated with increased activation-induced T cell death and risk of cervical cancer. *J Exp Med.* 2005;202:967-74.
 22. Ciarmela P, Boschi S, Bloise E, Marozio L, Benedetto C, Castellucci M et al. Polymorphisms of *FAS* and *FAS* ligand genes in preeclamptic women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010;148:144-6.
 23. Fuks A, Parton LA, Polavarapu S, Netta D, Strassberg S, Godi I et al. Polymorphism of Fas and Fas ligand in preterm premature rupture of membranes in singleton pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193:1132-6.
 24. Nair RR, Khanna A, Sing K. Association of FAS -1377 G>A and FAS -670 A>G functional polymorphisms of FAS gene of cell death pathway with recurrent early pregnancy loss risk. *J Reprod Immun.* 2012;93:114-8.
 25. Han AR, Choi YM, Hong MA, Kim JJ, Lee SK, Yang KM et al. Fas and FasL genetic polymorphisms in women with recurrent pregnancy loss: a case-control study. *Hum Fertil.* 2018;20:1-6.
 26. Mehta PA, Gerbing RB, Alonzo TA, Elliott JS, Zamzow TA, Combs M et al. FAS Promoter polymorphism: Outcome of childhood Acute Myeloid Leukemia. A children's Oncology Group Report. *Clin Cancer Res.* 2008;14:7896-9.
 27. Huang D, Xiao J, Deng X, Ma K, Liang H, Shi D et al. Association between Fas/FasL gene polymorphism and musculoskeletal degenerative diseases: a meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2018;19:137.
 28. Rehman S, Saba N, Naz M, Ahmed P, Munir S, Sajjad S et al. Single-nucleotide polymorphisms of FAS and FASL genes and risk of idiopathic aplastic anemia. *Immunol Invest.* 2018;47:484-91.