

*Araştırma:*

## Tekrarlayan gebelik kaybı olan hastalarda trombofili mutasyon sıklığının değerlendirilmesi

Suna Özdemir<sup>1</sup>, Osman Balcı<sup>2</sup>, Halime Göktepe<sup>2</sup>, Hüseyin Görkemli<sup>2</sup>, Elmas Taşçı<sup>2</sup>, Hasan Acar<sup>3</sup>

Selçuk Üniversitesi, <sup>1</sup>Selçuklu Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum, <sup>2</sup>Meram Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum, <sup>3</sup>Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalları, Konya

**Amaç:** Çalışmada daha önce en az üç tane gebelik kaybı olan hastalarda bazı trombofilik faktörlerin sıklığının sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlandı. **Yöntem:** Çalışmaya 2005-2009 yılları arasında kliniğimize başvuran toplam 301 hasta alındı. Bu hastalar iki gruba ayrıldı. Grup 1 daha önce üç veya daha fazla 20 haftanın altında gebelik kaybı olan 251 hastadan oluştu. Grup 2 daha önce en az 1 tane sorunsuz gebeliği olan ve hiç düşük yapmamış 50 kadın hastayı kapsadı. Tüm kadınlar Faktör V Leiden (FVL), protrombin (G20210A) ve metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) C677T varlığı açısından PCR-RFLP yöntemi ile test edildi. Veriler istatistiksel açıdan ki-kare testi, student-t ve Mann-Whitney testleri kullanılarak analiz edildi. **Bulgular:** Her iki grubun yaş ortalaması benzer olarak saptandı. Her üç trombofilik faktör heterozigot ve homozigot olarak incelendi. Değerlendirme sonucunda her üç mutasyon FVL, protrombin, MTHFR bölgesi için de çalışma ve kontrol arasında anlamlı olarak fark tespit edilemedi ( $p>0.05$ ). Çalışma grubunda 134 (% 53.3) hastada, kontrol grubunda ise 23 (% 46) hastada en az bir trombofilik faktör saptandı. Protrombin homozigot mutasyon her iki grupta da bulunamadı. FVL homozigot mutasyon kontrol grubundaki hiçbir hastada tespit edilmedi. **Sonuç:** Çalışmadan elde edilen veriler FVL, protrombin ve MTHFR mutasyonları ile tekrarlayan gebelik kayıpları arasında anlamlı bir ilişki olmadığını desteklemektedir.

Anahtar kelimeler: Tekrarlayan gebelik kaybı; Trombofili; Mutasyon

### Evaluation of the frequency of thrombophilic mutations in patients with recurrent pregnancy loss

**Objective:** The present study was undertaken to evaluate the frequency of some thrombophilic factors in patients with recurrent pregnancy loss (RPL) by comparing with healthy controls. **Methods:** A total of 301 patients admitted to our clinic between 2005-2009 was included in this study. These patients were divided into two groups. Group 1 consisted of 251 patients with at least three pregnancy loss < 20 week. Group 2 included 50 women with at least one uneventful pregnancy and no previous history of miscarriage. All women were tested for Factor V Leiden (FVL), prothrombin (G20210A), and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutations. Data were analyzed using chi-square and student-t tests. **Results:** The mean age in each group was similar. Thrombophilic factors were investigated as heterozygote and homozygote mutations. Similar prevalences of FVL, prothrombin and MTHFR mutations were found in both groups ( $p>0.05$ ). At least one inherited thrombophilic factor was detected in 134 (53.3%) women in the study group, and 23 (46%) women in controls. Prothrombin homozygote mutation was not determined in both groups. FVL homozygote mutation was not found in controls. **Conclusion:** The results of the present study suggest that there is no significant relation between RPL and the mutations of FVL, prothrombin and MTHFR.

Key words: Recurrent pregnancy loss; Thrombophilia; Mutation

### Genel Tıp Derg 2010;20(3):93-97

Yazışma adresi. Dr.Suna Özdemir, Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Konya

E-posta: snmstf@yahoo.com

Tekrarlayan gebelik kaybı (TGK) en az üç veya daha fazla 20 haftadan önce gerçekleşmiş gebelik sonlanmaları olarak tanımlanır (1,2). Amerikan Üreme Tıbbi Derneği (ASRM) tarafından yapılan

yeni tanımlamalara göre ise bu sayı en az iki veya daha fazla düşük olarak değiştirilmiştir ve hastaların 2 düşükten sonra tekrar yeni bir travma yaşamaması için araştırılma yapılmasını önerilmiştir (3-5). TKG yaklaşık olarak % 2-5 hastayı etkileyen önemli bir durumdur. Düşükleri olan hastalarda bir sonraki düşük riski toplumdaki diğer bireylere göre artmıştır. Daha öncesinde fark edilmiş iki kayıp takip eden gebelikteki düşük riski % 24, üç kayıptan sonraki risk ise % 30 olarak hesaplanmıştır (6,7). Geçmişte üç kayıptan sonra düşük olasılığının hızlı bir biçimde arttığı düşünülürken artık üç düşükten sonra düşük riskinin hemen hemen %30-40'dan fazla yükselmediği tespit edilmiştir (4).

Altta yatan pek çok neden bulunmakla birlikte TKG olgularının % 50'sinde belirgin bir neden bulunamamaktadır ve hiçbir tedavi uygulanmasa dahi bu olguların % 70-75'inin daha sonra başarılı bir gebelik elde etmeleri dikkat çekicidir (8). TKG'nın etyolojisinde genetik, anatomik, endokrin, enfeksiyon, çevresel ve immünolojik faktörler yer almaktadır (9,10). Koagülasyon ve immünolojik faktörler gebeliğin devamında da önemli bir yer tutarlar. Trombofil hastanın tromboza eğilimini artıran bir olay olup uteroplasental damarlarda trombozlarla seyreden durum oluşturmakta bunun da fetomaternal beslenmeyi etkileyerek intrauterin gelişme geriliği, abortus, dekolman plasenta ve düşüklere neden olduğu düşünülmektedir. Trombofilik bozuklukların kanama bozuklarına göre daha fazla TKG'na neden olduğu rapor edilmiştir (10). Gebelik kaybı ile arasında ilişki düşünülen kalıtsal trombofilik faktörlerin başında faktör V Leiden (FVL), metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) C677T, protrombin gen G20210A mutasyonları ile protein C-S ve antitrombin-3 eksiklikleri gelmektedir. Bu konuda çok sayıda araştırma yapılmış olmakla birlikte çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. Çalışmamızda daha önce üç veya daha fazla gebelik kaybı olan hastalarda bazı trombofilik faktörlerin (FVL, MTHFR, protrombin) sıklığının ve bunların gebelik kayıplarıyla ilişkisinin araştırılması amaçlandı.

## Yöntem

Çalışmamıza Ocak 2005-Aralık 2009 yılları arasında Selçuk üniversitesi Meram Tıp Fakültesi hastanesine başvuran toplam 301 kadın dahil edildi. Hastalar iki

gruba ayrılarak incelendi. Çalışma grubu (grup 1) 20. gebelik haftasında önce üç veya daha fazla gebelik kaybı olan, kendisinde tromboemboli veya herhangi bir sistemik hastalık öyküsü olmayan 251 hastadan oluştu. Kontrol grubu (grup 2) ise daha önce en az bir tane sorunsuz gebeliği olan sağlıklı 50 hastayı kapsadı. Çalışmaya katılacak olan bireylerin hepsi tekrarlayan gebelik kayıplarının araştırılması için veya rutin kontroller için kliniğimize başvuran hastalardı. Hepsine bilgi verildi, onayları alındı. Çalışma grubunun yaşları 19-42, kontrol grubunun ise 20-39 arasında değişmekteydi. Kendisinde veya eşinde tesbit edilen karyotip anomalisi olan çiftlerle, uterin anormallikleri, immünolojik, sistemik (diabetes, tiroid, lupus) hastalıkları olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Kontrol grubunda da daha önce gerçekleşmiş abortus öyküsü olan hastalar çalışmaya alınmadı. Hastalardaki eski düşük öykülerine yönelik bulgu olarak pozitif gebelik testi, gebelik kesesi veya fetusun izlendiği ultrasonografi görüntüleri göz önüne alındı. Hastaların yaşları, gravida, parite ve abortus sayıları ile abortus haftaları kaydedildi. Tüm bu hastalar FVL, MTHFR C677T ve protrombin gen G20210A mutasyonlarının varlığı açısından test edildi. Tüm mutasyonlar her bir faktör için heterozigot ve homozigot olarak araştırıldı.

## Genetik analiz

Çalışma ve kontrol grubuna ait bütün hastalardan 2 ml EDTA'lı tüpe periferik kan örneği alındı. Kan örneklerinden spin-column yöntemi ile DNA izolasyonu yapıldı. Her bir bireyden izole edilen DNA örneklerine multipleks PZR yöntemi ile PZR ürünleri elde edildi. Elde edilen PCR ürünlerstrip yöntemi (revers hibridizasyon) için ticari kit (NLM, İtalya) kullanıldı. Elde edilen bulgulara göre her bir bireyin her bir bölgesi için normal, heterozigot ve homozigot mutant allelik formları ortaya kondu.

Veriler ortalama  $\pm$ SD ve yüzde olarak ifade edildi. Veri analizi SPSS programında ki-kare ve student-t testleri kullanılarak yapıldı. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

Hastaların demografik ve klinik özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Grup 1'in ortanca gravida sayısı 4 (3-11) iken kontrol grubunda 2 (1-5) olarak tespit edildi ve arada istatistiksel olarak anlamlı fark vardı

(p<0.001). Bununla birlikte, parite sayısı grup 2’de 2 (1-5) iken, grup 1’de 1 (0-4) olarak saptandı ve arada istatistiksel fark elde edildi (p<0.001).

Genetik mutasyonların gruplar içindeki dağılımı Tablo 2’de gösterilmiştir. MTHFR açısından bakıldığında, grup 1’de MTHFR heterozigot mutasyon 105 (% 41.8) hastada, grup 2’de ise 17 (% 34) hastada saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p=0.34). Benzer şekilde MTHFR homozigot mutasyon açısından da her iki grup arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (p=0.33). Diğer bir trombofilik faktör olan FVL heterozigot mutasyon çalışma grubunda 43 (% 17.1) hastada, kontrol grubunda ise 6 (% 12) hastada tespit edildi ve bu mutasyon açısından gruplar benzer sıklığa sahipti (p=0.28). FVL homozigot mutasyon çalışma grubunda sadece 3 (% 1.1) hastada saptanırken, kontrol grubundaki kadınların hiçbirisinde bu mutasyon tespit edilmedi (p=0.17). Bununla birlikte protrombin heterozigot mutasyon çalışma grubunda sadece 6 (% 2.3) hastada tespit edilmesine rağmen, homozigot mutasyon bu gruptaki hiçbir hastada bulunamadı. Protrombin heterozigot ve homozigot mutasyonlardan hiç biri grup 2’deki kadınlarda saptanmadı. Son olarak her iki grup içinde en az bir mutasyona sahip hastaların oranı grup 1’de % 53.3 (134 hasta), grup 2’de % 46 (23 hasta) olarak bulundu ve oranlar istatistiksel açıdan benzerdi (p=0.46).

*Tablo 1. Grupların demografik ve klinik özellikleri*

	Grup 1 (n=251)	Grup 2 (n=50)	P değeri
Yaş (yıl/SD)*	28.9±5.5 (19-42)	30.1±5.7 (20-39)	0.46
Gravida	4 (3-11)	2 (1-5)	<0.001**
Parite	1 (0-4)	2 (1-5)	<0.001**
Abortus	3.8±1.3 (3-11)	-	-
Abortus haftası	12.4±2.3 (6-18)	-	-

\*SD, standart sapma, \*\*İstatistiksel olarak anlamlı

*Tablo 2. Gruplar arasında trombofilik faktörlerin sıklığının dağılımı.*

Faktör	Grup 1 (n=251)	Grup 2 (n=50)	P
En az bir faktöre sahip vaka	134 (%53.3)	23 (% 46)	0.46
MTHFR Heterozigot	105 (%41.8)	17 (%34)	0.34
MTHFR Homozigot	19 (%7.5)	6 (%12)	0.33
FVL Heterozigot	43 (%17.1)	6 (%12)	0.28
FVL Homozigot	3 (%1.1)	-	0.39
Protrombin Heterozigot	6 (%2.3)	-	0.17
Protrombin Homozigot	-	-	-

MTHFR; Metilen tetrahidrofolat redüktaz, FVL; Faktör V Leiden

## Tartışma

Tekrarlayan gebelik kaybının etyolojisinde çok çeşitli faktörler suçlanmış olmasına rağmen vakaların yaklaşık %50’sinde belirgin bir neden ortaya konamamaktadır. Koagülasyon ve immunolojik faktörler sağlıklı bir gebeliğin devamında çok önemli bir yere sahiptir. Koagülasyona yol açan trombofilik faktörlerde TGK etyolojisinde önceden beri araştırılmış ve değişen sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan çalışmamızda en sık araştırılan trombofilik faktörlerin başında gelen MTHFR, FVL ve protrombin mutasyonlarının TGK ile ilişkisini araştırıldı ve her üç faktörün mutasyonu bakımından çalışma ve kontrol grubu arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Gebelik esnasında prokoagülan faktörlerin düzeyleri belirgin ölçüde değişir, ve faktör II (protrombin), VII, VIII, X ve XII düzeyleri belirgin olarak artar. Protein C seviyeleri gebelik sırasında stabil seyrederken, aktive protein C rezistansında artış söz konusudur. Gebelikte gözlenen koagülasyona yatkınlığa karşılık fetomaternal yüzde kanın akışkanlığının sağlanacağı hemostatik önlemler alınır. Trofoblastik invazyon sayesinde yeterli fetal beslenme temin edilmeye çalışılır, fakat bu ince damarlarda olan tromboz artışı ise fetüste gelişme geriliğinden, intrauterin ölüme kadar değişen farklı tablolarla karşımıza çıkar. Trombozun artması ise trombofilik olarak tanımlanır ve TGK vakalarında trombofilik araştırılmaktadır. Bunlar içinde en çok araştırılanlar FVL, MTHFR C677T ve protrombin 20210A mutasyonlarıdır. Yapılan çok sayıda çalışmada farklı sonuçlar rapor edilmiştir (9, 11-14). Bizim çalışmamızda da araştırılan bu üç gen mutasyonunun heterozigot ve homozigot formları açısından TGK ile trombofilik arasında anlamlı bir ilişki gösterilememiştir.

Hiperhomosisteineminin arteriyel ve venöz trombozlara yol açarak fetomaternal bölgedeki damarların trombozunda rol oynadığı düşünülmektedir. Homosistein yüksekliğinin özellikle erken kayıplarda etkili olduğu yapılan çalışmalarda ileri sürülmüştür. Benzer şekilde, Nelen ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptığı bir metaanalizde hiperhomosisteineminin erken gebelik kayıpları ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır (15). Yapılan başka bir çalışmada ise üç ve daha fazla düşükleri olan 101 hastada MTHFR C677T ve

MTHFR A1298C mutasyonları ile oluşan hiperhomosisteinemi ile TGK arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır (14). Yine ülkemizde yapılan bir başka çalışmada iki ve daha fazla düşüğü olan 205 hasta grubunda MTHFR C677T mutasyonları ile TGK arasında artmış bir risk tespit edilememiştir (16). Bizim çalışmamızda da son araştırmayı destekleyen benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Protrombin geni promotor bölgesindeki Prt G20210A mutasyonu protrombinin fazla aktive olmasına neden olur ve bunun sonucunda da venöz trombozlar gözlenebilir. Yapılan bir çalışmada başlangıçta venöz tromboemboli öyküsü olan bayanların %13-17'sinde bu mutasyonun olduğu ve hamilelik sırasında da bu mutasyon taşıyıcılarında %0.5 oranında gerçek pıhtılaşma riski olduğu bildirilmiştir (17). TGK riskini artırdığını öne süren çalışmalar olmakla birlikte (7) bizim çalışmamızda da Mtiraoui ve ark. tarafından yapılan çalışmayı destekler şekilde protrombin G20210A mutasyonunun TGK riskini artırmadığı izlenmiştir (18). Buna karşılık Rey ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları bir metaanalizde de (19) protrombin gen mutasyonun tekrarlayan birinci trimester kayıplarını ve geç tekrar etmeyen fetal kayıp oranını artırdığı rapor edilmiştir.

FVL mutasyonu en sık saptanan kalıtsal koagülopatidir (20). FVL'nin protein-C tarafından inaktive edilen bölgesindeki nokta mutasyonu sonucu tromboza eğilim olur. Tek başına FVL mutasyonunun % 25-48 gibi farklı oranlarda TGK'na neden olabileceği farklı çalışmalarda belirtilmiştir (2,21). Kutteh ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada ise herhangi bir anlamlı ilişki tespit edilememiştir (22). FVL mutasyonu tespit edilen gebelerde başka gebelik komplikasyonları; ciddi preeklampsi, fetal trombofiliye bağlı fetal tromboz ve fetal ölüm görülebilmektedir (19,23,24). Rey ve ark. 2003 yılında yaptıkları bir metaanalizde FVL mutasyonunun erken ve geç TGK ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (19). Yapılan diğer metaanalizde de bu mutasyonun tekrarlayan 2. ve 3. trimester gebelik kayıpları, preeklampsi ve intrauterin gelişme geriliği ile kuvvetli oranda ilişkili olduğu ifade edilmiştir (25). Bununla birlikte ilk trimester gebelik kaybı ile ilişki gösterilememiştir (25).

Birden fazla mutasyon birlikteliğinin olması ile TGK arasındaki bağlantı için de farklı çalışmalarda farklı

sonuçlar bildirilmiştir. Sotiriadis ve ark. yaptıkları çalışmada FVL, FV A1299H, protrombin G20210A, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C mutasyonlarının birlikteliğinin TGK riskini artırmadığını vurgulamışlardır (26). Mevcut çalışmamızda da en az bir mutasyona sahip hasta oranı çalışma grubunda % 53.3 iken, kontrol grubunda bu oran % 46 olarak saptandı ve diğer faktörlerde olduğu gibi arada istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı.

Sonuç olarak mevcut çalışmanın sonuçları tekrarlayan gebelik kayıpları ile MTHFR, FVL ve protrombin gen mutasyonları arasında anlamlı bir ilişki olmadığı yönündeki görüşü desteklemektedir. Özellikle protrombin mutasyonunun çalışma grubunda ihmal edilecek düzeyde saptanması bu mutasyonun rutin taramada yer almasının tekrar sorgulanması gerektiğini ortaya koymaktadır.

## Kaynaklar

1. Dawood F, Farquharson R, Quenby S. Recurrent miscarriage. *Curr Obstet Gynecol* 2004;14:247-53.
2. Crosignani PC, Rubin BL. Recurrent spontaneous miscarriage. The recommendations of the ESHRE workshop on recurrent spontaneous miscarriage held in Anacapri. *Hum Reprod* 1991;6:609-10.
3. American Society of Reproductive Medicine (ASRM). Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2008; 90:S60.
4. Warburton D, Fraser FC. Spontaneous abortion risks in man: data from reproductive histories collected in a medical genetic unit. *Am J Hum Genet* 1964; 16:1-25.
5. Coulam CB. Epidemiology of recurrent spontaneous abortion. *Am J reprod Immunol* 1991; 26:23-7.
6. Regan L, Braude PR, Trembath PL. Influence of post reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *BMJ* 1989;299:541-5.
7. Clifford K, Rai R, Regan L. Future pregnancy outcome in unexplained first trimester miscarriage. *Hum Reprod* 1997;12:387-9
8. Plachor M, Junca AM, Mandelbaum J, de Grouchy J, Salat-Baroux J, Cohen J. Chromosome investigations in early life. II. Human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1987; 2:29-35.
9. Carp H, Salomon O, Seidman D, Dardik R, Rosenberg N, Inbal Aida. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2002; 17: 1633-37.
10. Bick RL, Hoppensteadt D. Recurrent miscarriage syndrome and infertility due to blood coagulation protein/platelet defects: A review and update. *Clin App Thromb Hemost* 2005;11:1-13.

11. 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 Reprod* 2000; 15: 458- 62.
12. Pauer HU, Voig-Tschitschwitz T, Hinney B, Burfeind F, Wolf C, Emons G, et al. Analyzes of three common thrombophilic gene mutations in German women with recurrent abortions. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82: 942- 7.
13. Kujovich JL. Thrombophilia and pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:412- 24.
14. Tepeli E, Müslümanoğlu MH, Uluç A, Atlı E, Uzun D , Artan S. Eskişehir ilinde idiopatik tekrarlayan gebelik kayıpları ile Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) C677T ve A1298C polimorfizmleri arasındaki ilişki. *Osmangazi Tıp Derg* 2007; 29:1-11.
15. Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2000; 74:1196-9.
16. Şahin FI, Ataç B, Yılmaz Z, Zeyneloğlu HB. Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Trombofilik Mutasyon Sıklıkları. *Erciyes Tıp Derg* 2009;31:104-9.
17. Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Cappucci G, Brancaccio V, et al. Genetic susceptibility to pregnancy-related venous thromboembolism: roles of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1324-8.
18. Mtırroui N, Borgi L, Hizem S, Nsiri B, Finan RR, Gris JC, et al. Prevalence of antiphospholipid antibodies, factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A mutations in early and late recurrent pregnancy loss. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; ;119:164-70.
19. Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet*. 2003; 361:901-8.
20. Dizon-Townson DS, Nelson LM, Jang H, Varner MW, Ward K. The incidence of the factor V Leiden mutation in an obstetric population and its relationship to deep vein thrombosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1997; 176:883-6.
21. 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; 342-7.
22. Kutteh WH, Park VM, Deitcher SR. Hypercoagulable state mutation analysis in white patients with early first- trimester recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 1998; 71: 1048-53.
23. Kupfermanc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1997;340:9-13. Erratum in: *N Engl J Med* 1999;341:384.
24. Thorarensen O, Ryan S, Hunter J, Younkin DP. Factor V Leiden mutation: an unrecognized cause of hemiplegic cerebral palsy, neonatal stroke, and placental thrombosis. *Ann Neurol*. 1997;42:372-5.
25. Dudding TE, Attia J. The association between adverse pregnancy outcomes and maternal factor V Leiden genotype: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 2004;91:700-11.
26. Sotiriadis A, Vartholomatos G, Pavlou M, Kolaitis N, Dova L, Stefos T, et al. Combined thrombophilic mutations in women with unexplained recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 2007; 57:133- 41.