



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων  
Ιατρική Σχολή  
Χειρουργικός Τομέας  
Μαιευτική – Γυναικολογική Κλινική  
Διευθυντής: Καθηγητής Ε. Παρασκευαΐδης

# **Μοριακή, Βιοχημική και Γενετική Διευρέυνση Καθ' Έξιν Αποβολών**

**Αλέξανδρος Σωτηριάδης**  
**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (N 5343/2, άρθρο 202, παράγραφος 2)



Ημερομηνία αίτησης του κ. Σωτηριάδη Αλέξανδρου: 29-11-2001

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 458<sup>α</sup>/22-1-2002

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Στέφος Θεόδωρος Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Αγνάντη Νίκη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Λώλης Δημήτριος Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 560<sup>α</sup>/21-6-2005

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής**

Επιβλέπων

Στέφος Θεόδωρος Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Αγνάντη Νίκη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Παρασκευαΐδης Ευάγγελος Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 3-6-2002

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 596<sup>α</sup>/12-12-2006**

Αγνάντη Νίκη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Παρασκευαΐδης Ευάγγελος Καθηγητής Μαιευτικής- Γυναικολογίας Ιατρικής σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Στέφος Θεόδωρος Αναπληρωτής Καθηγητή Μαιευτικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καλανταρίδου Σοφία Επίκουρος Καθηγήτρια Μαιευτικής –Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Πασχόπουλος Μηνάς Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σύρρου Μαρίκα Επίκουρη Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας- Ιατρικής Γενετικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 22-12-2006

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Επαμεινώνδας Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας



## Αφιερώσεις

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω από καρδιάς τα μέλη της επταμελούς επιτροπής, τα οποία γνώρισα ως δασκάλους, εκτίμησα ως συναδέλφους, και αισθάνομαι σήμερα φίλους. Ο κ. Στέφος με ενέπνευσε να ασχοληθώ με τη Μαιευτική και με πρόετρεψε να εισέλθω στην έρευνα. Ο κ. Παρασκευαΐδης με υποστήριξε σε όλη τη μακριά πορεία αυτής της έρευνας. Η κα. Αγνάπη αποτέλεσε πάντοτε πηγή έμπνευσης και πρότυπο επιστημονικού κύρους. Αισθάνομαι ευτυχής που είχα την πολύτιμη κλινική βοήθεια και συμβουλή των κκ. Ζηκόπουλου, Σύρρου και Πασχόπουλου, με τους οποίους ελπίζω να συνεργαστώ και στο μέλλον. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους κκ. Βαρθολομάτο και Κολαΐτη και την κ Ντόβα απο το Εργαστήριο Αιματολογίας και τη Μονάδα Μοριακής Βιολογίας του ΠΠΓΝΙ για την πολύτιμη συμβολή τους με την πραγματοποίηση όλων των μοριακών εξετάσεων και των δοκιμασιών πηκτικότητας.

Ευχαριστώ τον κ. Ματθαίο Παύλου, ο οποίος με την ακατάπαυστη κλινική φροντίδα και το υψηλό ιατρικό του ήθος βοήθησε δεκάδες ασθενείς στη δύσκολη αυτή στιγμή της ζωής τους και δούλεψε με ζήλο στην έρευνα.

Είχα τη σπάνια τύχη να συναντήσω ένα άτομο με το οποίο σχεδιάσαμε και υλοποιήσαμε όλο αυτό το έργο, η οποία ήταν πάντοτε παρούσα σε κάθε απορία, δυσκολία, ανάγκη και αμφιβολία και μου έδωσε πάντοτε λύσεις. Ευχαριστώ από καρδιάς τη φίλη μου Σοφία Καλανταρίδου,.

Ευχαριστώ επίσης τη Γραμματέα της Κλινικής, κα. Ρήγα, για την υποστήριξή της στα τελικά στάδια της διατριβής.

Η σύντροφός μου Βαλεντίνη έζησε μαζί μου όλη την εμπειρία αυτής της διατριβής, ιδιαίτερα δε τις δύσκολες στιγμές, στις οποίες μου παρείχε πάντοτε την υποστήριξή της και με προέτρεψε να συνεχίσω. Σε ευχαριστώ.

Στον πατέρα και τη μητέρα μου

Στη γιαγιά μου

Στον αδελφό μου

Στη Βαλεντίνη



## Πρόλογος

Οι καθ' ἑξιν αποβολές, οι οποίες ορίζονται ως  $\geq 3$  ή  $\geq 2$  διαδοχικές αυτόματες εκτρώσεις, είναι μία σχετικά συχνή κατάσταση που, ανάλογα με τον ορισμό της, απαντάται στο 1-5% των ζευγών που επιχειρούν κύηση. Τα αίτια που έχουν προταθεί για την παθογένεση των καθ' ἑξιν αποβολών είναι πάρα πολλά, και από αυτά ελάχιστα μόνο έχουν αποδεδειγμένη συσχέτιση.

Πέρα από την ετερογενή και πιθανώς πολυπαραγοντική αιτιολογία αυτής της κατάστασης, οι διαφορές σε πολλές πτυχές του σχεδιασμού και της ανάλυσης των σχετικών μελετών και η ποικιλότητα στον επιπολασμό των διαφόρων παραγόντων σε διαφορετικούς πληθυσμούς έχουν οδηγήσει σε μεγάλη ετερογένεια και ασυμφωνία των αποτελεσμάτων .

Συνέπεια αυτού του γεγονότος είναι ότι συχνά ζητούνται πολλές εξετάσεις των οποίων τα αποτελέσματα είτε δεν μπορούν να ερμηνευθούν είτε δεν μεταβάλλουν στην ουσία την αντιμετώπιση, αφού αρκετοί κλινικοί χορηγούν τελικά ασπιρίνη ή/και ηπαρίνη εμπειρικά. Ακόμη χειρότερα, κάποιοι χορηγούν πειραματικές θεραπείες αμφίβολης ασφάλειας και αποτελεσματικότητας (π.χ. ανοσοθεραπείες) παρά την έλλειψη στοιχείων. Στην πραγματικότητα, οι περισσότερες ασθενείς με ανεξήγητες καθ' ἑξιν αποβολές θα έχουν καλή έκβαση σε επόμενη κύηση, και το μόνο ίσως που χρειάζεται για να βελτιστοποιήσει την πρόγνωση αυτών των ασθενών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλούς δείκτες άγχους και κατάθλιψης, είναι η παρακολούθηση σε εξειδικευμένο Ιατρείο με δυνατότητα στενής παρακολούθησης, επικοινωνίας και υποστήριξης.

Στη μελέτη αυτή αναλύσαμε τους αποδεδειγμένους καθώς και κάποιους πιθανούς αιτιολογικούς παράγοντες σε ένα δείγμα ασθενών από τη Βορειοδυτική Ελλάδα, και όπου ήταν ενδεικνυόμενο συγκρίναμε τον επιπολασμό των πιθανών αιτιολογικών παραγόντων στις ασθενείς μας με μία ομάδα ελέγχου από την ίδια περιοχή. Παρά το μικρό μας δείγμα, καταλήξαμε σε συμπεράσματα στα περισσότερα από τα ερωτήματα που θέσαμε και επιβεβαιώσαμε την καλή πρόγνωση σε ασθενείς στις οποίες ο έλεγχος για αποδεδειγμένα αίτια αποβαίνει αρνητικός.

Αλέξανδρος Σωτηριάδης

Ιωάννινα 2007



# Πίνακας Περιεχομένων

## A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ορισμοί	1
Επιδημιολογία	3
Αιτιολογία	4
Παθοφυσιολογία	5
Εμφύτευση – ανοσολογική ανοχή	5
• Γενετικοί παράγοντες	8
Ορμονικές διαταραχές	10
Αντιθυροειδικά αντισώματα	10
Υπερανδρογοναιμία	11
Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών – αντίσταση στην ινσουλίνη	11
Ανεπάρκεια ωχρού σωματίου	12
Ανατομικές ανωμαλίες	13
Θρομβοφιλικό παράγοντες	15
~ Συγγενής έλλειψη αντιπηκτικών παραγόντων	16
Θρομβοφιλικές μεταλλάξεις	17
Διαταραχές της ινωδόλυσης	19
Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο	20
Αλλοάνοσοι μηχανισμοί	22
Καθ' έξιν αποβολές άγνωστης αιτιολογίας	24
Σκοπός της ερευνητικής εργασίας	26

## B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά και μέθοδοι	27
Ασθενείς και πρωτόκολλο	27
Χρωμοσωμικός έλεγχος του ζεύγους	29
Ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας	29
Ενδοκρινολογικές διαταραχές	30
Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο	31
Συγγενείς θρομβοφιλίες	32
Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου	34
Στατιστική ανάλυση	35
Αποτελέσματα	36
Διαγνωστικό σκέλος του πρωτοκόλλου	36
Ερευνητικό σκέλος	37
Θρομβοφιλικές μεταλλάξεις στο σύνολο των ασθενών	37
Θρομβοφιλικές μεταλλάξεις σε ασθενείς με ιδιοπαθείς καθ' έξιν αποβολές	41
Ενεργότητα και πολυμορφισμός του PAI	45
Πίνακες	46
Σχήματα	51
Συζήτηση	52
Κατανομή των αιτίων	52
Χρωμοσωμικές ανωμαλίες	53
Ανατομικοί παράγοντες	54
Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα	55
Συγγενής έλλειψη αντιπηκτικών παραγόντων	56
Βιοχημικός – ενδοκρινολογικός έλεγχος	57
Μοριακή διερεύνηση – θρομβοφιλικές μεταλλάξεις	60
Ενεργότητα και πολυμορφισμός του PAI	70
Καθ' έξιν αποβολές άγνωστης αιτιολογίας	72
Συμπεράσματα	74



Περίληψη	76
Abstract	79
<b>Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>82</b>





# A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## Ορισμοί

---

Αυτόματη έκτρωση (ΑΕ) ορίζεται η αποτυχία προόδου μίας κύησης η οποία καταλήγει σε θάνατο και αποβολή εμβρύου ηλικίας κύησης  $< 20$  εβδομάδων ( $\leq 500$  gr) (1).

Ως παλίνδρομη κύηση (missed miscarriage) ορίζεται η διακοπή της ενδομήτριας ανάπτυξης του εμβρύου χωρίς να έχει ακόμη συμβεί εκβολή των προϊόντων της σύλληψης, και η διάγνωσή της γίνεται όταν διαπιστώνεται υπερηχογραφικά η ύπαρξη ενδομήτριας κύησης με εμβρυϊκό πόλο  $> 6$  mm και αρνητική καρδιακή λειτουργία (2).

Η ανεμβρυϊκή κύηση ή σύνδρομο κενού σάκου (anembryonic pregnancy, blighted ovum) αποτελεί περίπτωση παλίνδρομης κύησης στην οποία έχει συμβεί ανάπτυξη της τροφοβλάστης αλλά όχι και της εμβρυοβλάστης και διαγιγνώσκεται υπερηχογραφικά όταν διαπιστώνεται η ύπαρξη σάκου κύησης διαμέτρου  $> 20$  mm χωρίς εμβρυϊκό πόλο (2).

Ατελής έκτρωση διαγιγνώσκεται όταν υπάρχει ιστορικό εκβολής προϊόντων σύλληψης από τον τράχηλο της μήτρας αλλά υπερηχογραφικά διαπιστώνεται η ύπαρξη ανομοιογενούς υπολειμματικού υλικού στην ενδομήτρια κοιλότητα, ενώ στην τελεία ΑΕ τα προϊόντα της σύλληψης έχουν αποβληθεί πλήρως.

Ως καθ' ἑξιν αποβολές (recurrent miscarriage, RM) ορίζεται η εμφάνιση τριών η περισσότερων (ή δύο ή περισσότερων) διαδοχικών αυτόματων εκτρώσεων (3).

Οι καθ' ἑξιν αποβολές μπορούν να διαιρεθούν περαιτέρω σε 3 υποκατηγορίες (4):

A) Πρωτοπαθείς καθ' ἑξιν αποβολές, δηλαδή  $\geq 3$  διαδοχικές ΑΕ και καμία κύηση που να έχει προχωρήσει  $> 20$  εβδομάδες,

B) Δευτεροπαθείς καθ' ἑξιν αποβολές, δηλαδή  $\geq 3$  διαδοχικές ΑΕ οι οποίες σημειώθηκαν μετά από μία τουλάχιστον κύηση που προχώρησε πέρα από τις 20 εβδομάδες και κατέληξε είτε σε γέννηση ζώντος, είτε σε γέννηση θνησιγενούς νεογνού, είτε σε νεογνικό θάνατο, και,

Γ) Τριτοπαθείς καθ' ἑξιν αποβολές: η ομάδα αυτή δεν έχει μελετηθεί ακόμη καλά και περιλαμβάνει ασθενείς που έχουν  $\geq 3$  ΑΕ οι οποίες όμως δεν είναι διαδοχικές αλλά παρεμβάλλονται μεταξύ τους κύσεις που προχώρησαν



περισσότερο από 20 εβδομάδες και κατέληξαν είτε σε γέννηση ζώντος, είτε σε γέννηση θνησιγενούς νεογνού, είτε σε νεογνικό θάνατο.



## Επιδημιολογία

---

Η συνηθέστερη επιπλοκή μίας κύησης είναι η αυτόματη έκτρωση. Σε μελέτη 518 γυναικών οι οποίες είχαν πρόθεση να συλλάβουν και στις οποίες έγινε καθημερινός προσδιορισμός της hCG πρωινού δείγματος ούρων βρέθηκε ότι 25% των συλλήψεων που καταφέρνουν να εμφυτευθούν στη μήτρα καταλήγουν σε αυτόματη έκτρωση πριν τις 6 εβδομάδες κύησης, και από τις κυήσεις που συνεχίζουν περίπου το 11% καταλήγει σε αυτόματη έκτρωση (5;6). Χρησιμοποιώντας διαφορετική μεθοδολογία, οι Knudsen και συν. υπολόγισαν ότι η πιθανότητα ΑΕ στην πρώτη κύηση είναι 16% και αυξάνεται συνεχώς μετά από κάθε διαδοχική ΑΕ (7).

Το 90% περίπου των σποραδικών ΑΕ συμβαίνει σε ηλικία κύησης ως 12-14 εβδομάδες, ενώ μόνο το 2-5% συμβαίνει αργότερα. Επιπλέον φαίνεται ότι οι ΑΕ ακολουθούν μία σχετικά διφασική κατανομή, αφού σπάνια συμβαίνουν σε ηλικία κύησης μεταξύ 8.5 και 14 εβδομάδων (8).

Η μεγάλη πλειονότητα των σποραδικών ΑΕ οφείλεται σε χρωμοσωμική ανωμαλία του εμβρύου. Ο καρυοτυπικός έλεγχος 114 σποραδικών αποβολών έδειξε ότι 72% των κυημάτων είχαν κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία, με συχνότερες τις τρισωμίες (9). Αντίστοιχα, 90% των εμβρύων με χρωμοσωμική ανωμαλία αποβάλλονται στη διάρκεια του πρώτου τριμήνου, ενώ η μεγάλη πλειοψηφία (93%) των χρωμοσωμικώς υγιών κυήσεων συνεχίζει περαιτέρω (10). Έτσι, η αυτόματη έκτρωση μπορεί κατ' αρχήν να θεωρηθεί ως ένας μηχανισμός της φύσης για ποιοτικό έλεγχο των εμβρύων.

Ο επιπολασμός των καθ' ἑξιν αποβολών είναι περίπου 1% στα ζεύγη αναπαραγωγικής ηλικίας και ο αριθμός αυτός αυξάνεται περαιτέρω σε περίπου 5% αν στον ορισμό των καθ' ἑξιν αποβολών περιληφθούν και ζεύγη με  $\geq 2$  διαδοχικές ΑΕ. Σύμφωνα με το σκεπτικό που αναπτύχθηκε από τους Quenby και συν. (11), αν δεχθούμε πιθανότητα σποραδικής ΑΕ 15% ανά κύηση, η πιθανότητα δύο διαδοχικών ΑΕ είναι  $0.15^2=2.2\%$  και η πιθανότητα τριών διαδοχικών αποβολών είναι  $0.15^3=0.33\%$ . Καθώς οι συχνότητες αυτές είναι υποδιπλάσιες από εκείνες που παρατηρούνται στην πραγματικότητα (5% και 1% όπως αναφέρθηκε πριν), η εμφάνιση διαδοχικών αποβολών δεν μπορεί να αποδοθεί απλά σε επαναλαμβανόμενα τυχαία γεγονότα.



## Αιτιολογία

---

Σήμερα γνωρίζουμε ότι στα αίτια των καθ'έξιν αποβολών περιλαμβάνονται γενετικές ανωμαλίες του ζεύγους, ορμονικές διαταραχές, ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας, θρομβοφιλικές διαταραχές, το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, και πιθανώς αλλοάνοσοι παράγοντες (12). Ωστόσο, ακόμη και μετά από πλήρη διερεύνηση, τα αίτια των καθ'έξιν αποβολών παραμένουν αδιευκρίνιστα στο 50% περιπτώσεων ή και περισσότερο (13;14), οπότε μιλούμε για ιδιοπαθείς ή αγνώστου αιτιολογίας (idiopathic, unexplained) καθ'έξιν αποβολές.



## Παθοφυσιολογία

---

### Εμφύτευση – ανοσολογική ανοχή

#### Εμφύτευση

Τα βασικά σημεία της διαδικασίας της εμφύτευσης παρουσιάζονται σε πρόσφατη ανασκόπηση των Norwitz και συν. (15). Η εμφύτευση του εμβρύου αρχίζει 6-7 ημέρες μετά τη σύλληψη και σχηματικά εξελίσσεται σε τρία στάδια:

- α) Προσέγγιση, όπου μικροθηλές από την επιφάνεια της κυτταροτροφοβλάστης έρχονται σε χαλαρή επαφή με μικροπροσεκβολές του ενδομητρίου (πτινοπόδια),
- β) Σταθερή προσκόλληση, και,
- γ) Διείσδυση στο τοίχωμα της μήτρας.

Για την επιτυχία της εμφύτευσης απαιτούνται σύνθετες μοριακές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε μία δεκτική μήτρα και μία ώριμη βλαστοκύστη. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές ρυθμίζονται από μία σειρά ειδικών μορίων (αυξητικοί παράγοντες). Ο ανασταλτικός παράγοντας της λευχαιμίας (leukemia inhibiting factor, LIF) βοηθά στη φθαρτοποίηση και έλλειψή του οδηγεί σε πρώιμη αποβολή. Προσθήκη συνδεδεμένου με την ηπαρίνη επιθηλιακού αυξητικού παράγοντα (heparin binding epithelial growth factor) σε εμβρυϊκές καλλιέργειες διεγείρει την αύξηση και ωρίμανσή τους. Η παρουσία βλαστοκύστης έτοιμης προς εμφύτευση επάγει την τοπική έκκριση κυκλοξυγενάσης-2 (COX-2), η οποία αποτελεί βασικό ένζυμο στην οδό σύνθεσης των προσταγλανδινών. Οι προσταγλανδίνες που παράγονται με αυτό τον τρόπο συνδέονται με τον πυρηνικό υποδοχέα PPAR(delta) σε μία αντίδραση που είναι πιθανώς ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της κύησης. Αντίθετα, εξωγενής χορήγηση προσταγλανδινών επάγει έκτρωση σε όλα τα είδη και σε όλα τα στάδια της κύησης. Καθώς η τροφοβλάστη διεισδύει στο φθαρτό παράγει στρωματική μεταλλοπρωτεϊνάση-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9), αλλά παράλληλα αυξάνει και την παραγωγή ιστικού αναστολέα της MMP-3, ώστε η διείσδυση να είναι ελεγχόμενη. Ο αγγειοενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας του φθαρτού (vascular endothelial growth factor, VEGF) προάγει πιθανώς την αγγειογένεση και αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα.

Τελικά η τροφοβλάστη διηθεί όλο το ενδομήτριο και 1/3 του πάχους του μυομητρίου (διάμεση διήθηση) καθώς και τα αγγεία της μήτρας (ενδαγγειακή διήθηση), εγκαθιστώντας τη μητροπλακουντιακή κυκλοφορία.

Η ανακατασκευή (remodeling) των αγγείων της μήτρας σε μία φυσιολογική κύηση χαρακτηρίζεται από αποσύνθεση του μέσου χιτώνα και της έσω ελαστικής στιβάδας



των αρτηριών του φθαρτού και από αντικατάσταση του ενδοθηλίου από κύτταρα της εξωλάχνιας τροφοβλάστης (extravillous trophoblast cells, EVT). Οι μεταβολές αυτές σημειώνονται σε όλο το πάχος του ενδομητρίου καθώς και σε μέρος του μυομητρίου και καταλήγουν στη μετατροπή των στενών και σταθερού εύρους μυωδών αρτηριών σε μεγαλύτερου εύρους αγγεία με χαλαρότερο τοίχωμα, τα οποία διευκολύνουν τη ροή του μετρικού αίματος προς το πλακούντα. Η έναρξη αυτών των μεταβολών τοποθετείται χρονικά πριν από την άφιξη των εξωτροφοβλαστικών κυττάρων στη θέση των αρτηριών και η ανακατασκευή των αγγείων ολοκληρώνεται περί την 22<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης (16).

Διαταραχές στη διείσδυση της τροφοβλάστης και την πλακουντοποίηση αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης μαιευτικών επιπλοκών όπως η αυτόματη έκτρωση, η ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης και η προεκλαμψία. Η τελευταία χαρακτηρίζεται από μικρό βάθος διήθησης και ανεπαρκή ανακατασκευή των αγγείων (16).

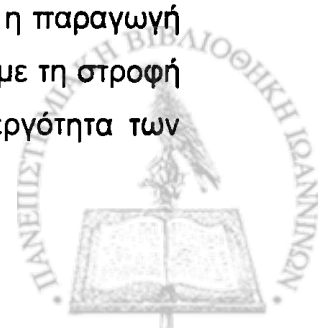
#### *Ανοσολογική απάντηση*

Καθώς το έμβρυο αποτελεί ημιαλλομόσχευμα, η διατήρηση της κύησης απαιτεί τροποποίηση της ανοσολογικής απάντησης της μητέρας. Η τροποποίηση αυτή γίνεται με διάφορους τρόπους (17).

#### *Th1 και Th2, κυτταρική και χυμική ανοσία*

Ο πρώτος από αυτούς είναι η μεταβολή της ανοσολογικής απάντησης. Τα Τ-λεμφοκύτταρα διαιρούνται λειτουργικά σε υποομάδες ανάλογα με το είδος των κυτοκινών που παράγουν. Τα Τ-κύτταρα τύπου 1 παράγουν ιντερφερόνη-γ (IFN-γ), ιντερλευκίνη-2 (IL-2) και παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α), ουσίες οι οποίες προάγουν τις αντιδράσεις κυτταρικής ανοσίας. Σε αντιδιαστολή τα Τ-κύτταρα τύπου 2 παράγουν IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 και IL-13 οι οποίες προάγουν τις αντιδράσεις χυμικής ανοσίας. Στην κύηση παρατηρείται στροφή της ανοσολογικής απάντησης προς τον τύπο Th2. Η μεταβολή αυτή είναι ουσιώδης για τη διατήρηση της κύησης καθώς οι κυτοκίνες που χαρακτηρίζουν τον τύπο 1 (π.χ. IFN-γ και TNF-α) καταστέλλουν την ανάπτυξη του εμβρύου.

Μεταβολές παρατηρούνται και στα κύτταρα φυσικούς φονείς (natural killer, NK) του περιφερικού αίματος, των οποίων μειώνεται ο αριθμός και ελαττώνεται η παραγωγή IFN-γ στη διάρκεια της κύησης, φαινόμενα που είναι και αυτά συμβατά με τη στροφή από την κυτταρική προς τη χυμική ανοσία. Αντίθετα, αυξάνεται η ενεργότητα των κυττάρων της συγγενούς ανοσίας (μονοκυττάρων και κοκκιοκυττάρων).



### *NK και T κύτταρα στο φθαρτό*

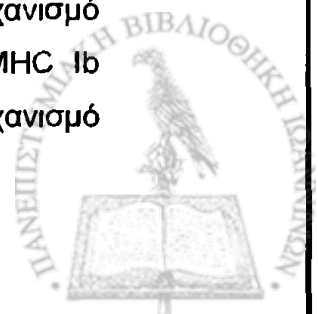
Η μήτρα περιέχει έναν υποπληθυσμό NK-κυττάρων (uterine NK, uNK), τα οποία αν και λειτουργικά είναι παρόμοια με τα αντίστοιχα κύτταρα του περιφερικού αίματος, έχουν διαφορετικό φαινότυπο από αυτά. Αν και ο αριθμός αυτών των κυττάρων είναι μεγάλος στο φθαρτό, εντούτοις δεν επιτίθενται στην ημιαλλογονική εξωλάχνια τροφοβλάστη διότι εκφράζουν ανασταλτικούς υποδοχείς οι οποίοι συνδέονται με αντίστοιχα μόρια της τροφοβλάστης (HLA-C, HLA-E και HLA-G), με αποτέλεσμα την αναστολή της λυτικής τους δράσης. Στους ανασταλτικούς υποδοχείς των uNK κυττάρων περιλαμβάνονται οι Ig-like killer cell inhibitory receptors (KIRs) (π.χ. KIR2D, KIR2DL4) και οι lectin-like KIRs (CD94/NKG2A).

Στη μήτρα περιέχονται και T-λεμφοκύτταρα, τα οποία επίσης δεν επιτίθενται στην EVT επειδή δεν αναγνωρίζουν την αρνητική για MHC-Ia μόρια τροφοβλάστη ως ξένη. Τα T-κύτταρα του φθαρτού μπορούν να παράγουν διάφορες κυτοκίνες, με διαφορετική επίδραση στην ερχόμενη κύηση. Ο TNF-α διεγείρει την απόπτωση των κυττάρων της τροφοβλάστης και η IFN-γ αυξάνει την καταστροφική δράση του TNF-α. Επιπλέον, οι δύο αυτές ουσίες ενεργοποιούν μία προθρομβινάση με αποτέλεσμα το σχηματισμό θρομβίνης και τη θρόμβωση της αιματικής παροχής προς τον αναπτυσσόμενο πλακούντα. Αντίθετα οι κυτοκίνες τύπου Th2 γενικά διεγείρουν την αύξηση και διείσδυση της τροφοβλάστης.

### *Ανοσοαναγνώριση - MHC*

Ενώ η τροφοβλάστη βρίσκεται σε άμεση επαφή με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος της μητέρας, εντούτοις διαφεύγει της επίθεσης από αυτό. Ένα από τα αίτια αυτού του φαινομένου είναι η εκλεκτική έκφραση συγκεκριμένων τύπων μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC) από την τροφοβλάστη.

Το MHC είναι μία περιοχή στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 όπου εντοπίζονται τα γονίδια που κωδικοποιούν αντιγόνα τα οποία προκαλούν ισχυρές αντιδράσεις απόρριψης. Τα αντιγόνα ονομάζονται HLA (human leucocyte antigens, ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα), καθώς αρχικά πιστεύονταν ότι απαντούσαν μόνο στα λευκοκύτταρα. Τα MHC μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις τάξεις: class Ia (HLA-A, HLA-B και HLA-C), class II (HLA-DP, HLA DQ και HLA-DR), και class Ib (HLA-E, HLA-F και HLA-G). Τα αντιγόνα του MHC Ia και II ενέχονται στο μηχανισμό της ανοσοαναγνώρισης και ανοσοαπάντησης. Ωστόσο τα αντιγόνα του MHC Ib φαίνεται να έχουν διαφορετική λειτουργία και συμμετέχουν στο μηχανισμό ανοσοανοχής του εμβρύου.



Τα κύτταρα της εξωλάχνιας τροφοβλάστης εκφράζουν ισχυρά το HLA-G, το οποίο πιστεύεται ότι εμποδίζει την καταστροφή τους εμποδίζοντας την προσέγγιση των uNK κυττάρων, περιορίζοντας τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και εκτρέποντας την παραγωγή κυτοκινών από αυτά σε απάντηση τύπου Th2. Το HLA-E παίζει πιθανώς παρόμοιο ρόλο στην προστασία της τροφοβλάστης.

### *Απόπτωση – Ρόλος της CRH*

Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι εκτός από την τροποποίηση της ανοσοαναγνώρισης, το έμβρυο διαφεύγει και της ανοσοαπάντησης της μητέρας. Αυτό γίνεται μέσω επαγωγής της απόπτωσης (δηλαδή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου) στα μητρικά λευκοκύτταρα που επιτίθενται στην τροφοβλάστη.

Ο κύριος μεσολαβητής σε αυτό το μηχανισμό είναι η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (corticotrophin-releasing hormone, CRH). Σήμερα γνωρίζουμε ότι εκτός από το κεντρικό νευρικό σύστημα, η CRH παράγεται σε αρκετά από τα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος περιλαμβανομένου του ενδομητρίου, του φθαρού, της τροφοβλάστης και της συγκυτιοτροφοβλάστης. Η CRH έχει ζωτική σημασία για την εμφύτευση, και χορήγηση ανταγωνιστή της σε ποντίκια μειώνει το ποσοστό εμφύτευσης κατά 70%.

Καθώς η βλαστοκύστη εμφυτεύεται, εκκρίνει τοπικά μεσολαβητές φλεγμονής όπως IL-1 και προσταγλανδίνη E2 (PGE2). Οι ουσίες αυτές με τη σειρά τους επάγουν την έκφραση της CRH και η CRH διεγείρει την έκφραση Fas ligand από την τροφοβλάστη και το ενδομήτριο. Η έκφραση Fas ligand από τα κύτταρα της εξωλάχνιας τροφοβλάστης επάγει την απόπτωση των ενεργοποιημένων T κυττάρων που εκφράζουν σε υψηλούς αριθμούς τη μεμβρανική πρωτεΐνη Fas. Επιπλέον, ο εμβρυϊκός και μητρικός Fas ligand περιορίζει τη διείσδυση των κυττάρων της κυτταροτροφοβλάστης στους ιστούς της μήτρας, και αντίστροφα. Με τον τρόπο αυτό ρυθμίζεται η έκταση και η ταχύτητα της εμφύτευσης (18;19).

### *Γενετικοί παράγοντες*

Ισοζυγισμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες παρατηρούνται σε περίπου 3-5% των ζευγών με καθ' ἑξιν αποβολές έναντι του 2-5% που αναφέρεται στο γενικό πληθυσμό (20-24).<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Στις μεταθέσεις παρατηρείται θραύση και ανταλλαγή υλικού μεταξύ τουλάχιστον δύο μη ομολόγων χρωμοσωμάτων. Μία μετάθεση καλείται αμοιβαία (reciprocal) όταν συμβαίνει





Οι ισοζυγισμένες αμοιβαίες μεταθέσεις αποτελούν τις συχνότερες από τις ανωμαλίες αυτές (περίπου 2/3 των περιπτώσεων) και ακολουθούν οι μεταθέσεις τύπου Robertson (18%), οι αναστροφές (16%) και σπάνια μωσαϊκισμοί για αυτοσώματα ή χρωμοσώματα του φύλου, ή άλλες ανωμαλίες (20)}(22-25). Ο επιπολασμός αυτών των ανωμαλιών δεν φαίνεται να διαφέρει μεταξύ ασθενών με 2 ή >2 αυτόματες εκτρώσεις (20). Το θήλυ μέλος του ζεύγους είναι φορέας της διαταραχής στα 2/3 περίπου των περιπτώσεων ενώ το άρρεν στο 1/3 (20)}(22-25).

Αν και οι φορείς αυτών των ανωμαλιών είναι ασυμπτωματικοί (ισοζυγισμένος τύπος), υπάρχει πιθανότητα να παράγουν μη ισοζυγισμένους γαμέτες κατά τη διαδικασία της μείωσης, και αυτό μπορεί να οδηγήσει είτε σε αυτόματη έκτρωση είτε στη δημιουργία εμβρύου με συγγενείς ανωμαλίες.

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων με μη ισοζυγισμένους γαμέτες, η διαταραχή είναι τόσο βαριά ώστε ο ζυγώτης παλινδρομεί κατά την περίοδο της εμφύτευσης (26). Ως αποτέλεσμα, οι κλινικές κυήσεις σε αυτά τα ζεύγη εμφανίζουν συνηθέστερα είτε φυσιολογικό καρυότυπο είτε τον ισοζυγισμένο τύπο. Αν και οι αριθμοί είναι μικροί, προοπτικά στοιχεία από τις πλέον πρόσφατες σειρές δείχνουν ότι μη ισοζυγισμένος καρυότυπος εμφανίζεται σε 0-4% από τα ζώντα τέκνα / συνεχιζόμενες κυήσεις (24;25;27) και σε περίπου μισές από τις αυτόματες εκτρώσεις (23;24).

Αν και διαφορετικές ανωμαλίες συνεπάγονται διαφορετική πρόγνωση, στις δημοσιευμένες σειρές γίνεται ομαδοποίηση σε ευρύτερες διαγνωστικές κατηγορίες για πρακτικούς λόγους. Τρεις μελέτες (23;24;27) μελέτησαν προοπτικά την έκβαση της επόμενης κύησης μετά από διερεύνηση σε ζεύγη με καθ' ἑξίν αποβολές και ισοζυγισμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Τα συγκριτικά στοιχεία από τις μελέτες αυτές δείχνουν ότι φορεία ισοζυγισμένης χρωμοσωμικής ανωμαλίας σχετίζεται με ελάττωση της πιθανότητας επιτυχίας στην επόμενη κύηση (OR 0.49, 95% CI 0.28-0.86). Αν και τα στοιχεία είναι πολύ περιορισμένα (68 περιπτώσεις), φαίνεται ότι η πρόγνωση για τις αμοιβαίες μεταθέσεις (οι οποίες αποτελούν τις συχνότερες διαταραχές) δεν διαφέρει ανάλογα με τον αν φορέας είναι ο άνδρας ή η γυναίκα (OR 0.67, 95% CI 0.24-1.87) (23;24).

ακριβής ανταλλαγή χρωμοσωμικών τμημάτων μεταξύ δύο ομολόγων χρωμοσωμάτων. Αν και οι αμοιβαίες μεταθέσεις κατά κανόνα δεν προκαλούν προβλήματα στη λειτουργία του κυττάρου, μπορεί να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση ογκογονιδίων και καρκινογένεση ή σε προβλήματα κατά την πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Οι μεταθέσεις τύπου Robertson είναι μία ειδική περίπτωση μετάθεσης που συμβαίνει μεταξύ δύο ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων (δηλ. 13, 14, 15, 21 και 22). Στην περίπτωση αυτή, τα σημεία θραύσης βρίσκονται κοντά ή στα κεντρομερίδια των χρωμοσωμάτων και γίνεται συγχώνευση των μακρών σκελών τους. Η απώλεια των βραχέων σκελών δε δημιουργεί ουσιώδες πρόβλημα, αφού το υλικό που χάνεται είναι ελάχιστο, προκαλούνται όμως διαταραχές στη μείωση λόγω σχηματισμού τριμερούς. Στην αναστροφή παρατηρούνται δύο θραύσεις σε ένα χρωμόσωμα και περιστροφή κατά 180° του τμήματος που βρίσκεται ανάμεσα σε αυτά τα σημεία. Παρακεντρικές αναστροφές συνδέονται συχνότερα με μη ισοζυγισμένους απογόνους.



Μακροπρόθεσμα, ζεύγη με χρωμοσωμικές ανωμαλίες φαίνεται να έχουν εξίσου καλή πρόγνωση με ζεύγη χωρίς τέτοιες διαταραχές, εν τω μεταξύ όμως είναι πιθανότερο να εμφανίσουν μία ή περισσότερες αυτόματες εκτρώσεις (27).

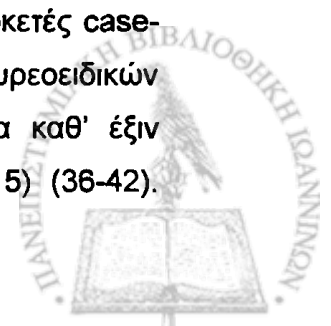
Την τελευταία δεκαετία έχει αρχίσει να μελετάται η πιθανή συσχέτιση των καθ' έξιν αποβολών με ένα φαινόμενο που αναφέρεται ως εκλεκτική απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος (X-skewed inactivation, XSI). Η απενεργοποίηση ενός από τα δύο X χρωμοσώματα που βρίσκονται σε κάθε σωματικό κύτταρο στα θήλεα θηλαστικά συμβαίνει κατά τη διαδικασία της εμβρυογένεσης προκειμένου να επιτευχθεί ίσο ποσό γενετικής εντολής από το X χρωμόσωμα όπως και στα άρρενα άτομα (υπόθεση Lyon) (28). Η απενεργοποίηση αυτή συμβαίνει με τυχαίο τρόπο, ώστε τελικά τα μητρικής και πατρικής προέλευσης X χρωμοσώματα απενεργοποιούνται περίπου ισότιμα. Η εκλεκτική απενεργοποίηση του X είναι η κατάσταση στην οποία η απενεργοποίηση συμβαίνει επιλεκτικά κυρίως στο μητρικής ή στο πατρικής προέλευσης X. Η συχνότητα της εξαιρετικά εκλεκτικής απενεργοποίησης (η οποία ορίζεται ως επιλεκτικότητα  $\geq 90\%$  ή  $\geq 95\%$ ) αυξάνει με την αύξηση της ηλικίας, από 2% στα νεογνά σε 23% σε γυναίκες άνω των 60 ετών (29).

Πέντε μελέτες συγκρίνουν τη συχνότητα της εκλεκτικής απενεργοποίησης του X σε γυναίκες με  $\geq 2$  (30-32) ή  $\geq 3$  (33;34) αυτόματες εκτρώσεις και γυναίκες ομάδας ελέγχου. Τα συγκεντρωτικά τους αποτελέσματα (374 ασθενείς, 403 γυναίκες ελέγχου) δείχνουν ότι αν και το φαινόμενο αυτό απαντάται στο 11% των ασθενών έναντι 5% των γυναικών ελέγχου, η διαφορά αυτή δεν αποδεικνύεται στατιστικά σημαντική (OR 1.96, 95% 0.53, 7.18).

## Ορμονικές διαταραχές

### Αντιθυρεοειδικά αντισώματα

Η αναζήτηση της πιθανής συσχέτισης μεταξύ της ύπαρξης αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων και πρόκλησης αυτόματων εκτρώσεων άρχισε σχεδόν τυχαία, όταν οι Stagnaro-Green και συν. παρατήρησαν το 1990 ότι γυναίκες με αντιθυρεοειδικά αντισώματα απέβαλλαν σημαντικά συχνότερα από γυναίκες αρνητικές για αυτά τα αντισώματα (17% έναντι 8.4% αντίστοιχα) (35). Έκτοτε ακολούθησαν αρκετές case-control μελέτες οι οποίες έδειξαν συνολικά ότι η παρουσία αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων συσχετίζεται με σημαντική αύξηση της πιθανότητας για καθ' έξιν αποβολές (OR 2.34, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 1.18-4.63;  $p=0.015$ ) (36-42).



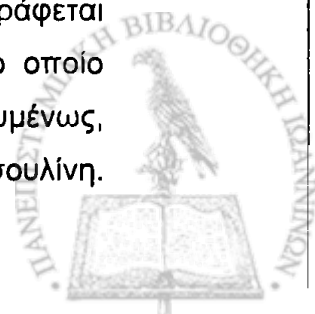
Ωστόσο, παρά την αυξημένη συχνότητα αυτών των αντισωμάτων σε ασθενείς με καθ' έξιν αποβολές, η παρουσία τους δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκβαση μίας επόμενης κύησης. Σε μία μεγάλη προοπτική σειρά 98 ευθυρεοειδικών ασθενών με  $\geq 3$  αυτόματες εκτρώσεις και αντιθυρεοειδικά αντισώματα και 703 ασθενών χωρίς τέτοια αντισώματα, οι Rushworth και συν. ανέφεραν ότι η πιθανότητα επιτυχίας σε επόμενη κύηση ήταν η ίδια (58%) και στις δύο ομάδες (43). Το αποτέλεσμα αυτό, σε συνδυασμό με την απουσία θεραπείας αποδεδειγμένης αξίας για τα αντιθυρεοειδικά αντισώματα οδήγησε τόσο το Βρετανικό όσο και το Αμερικανικό Κολέγιο Μαιευτήρων – Γυναικολόγων στη σύσταση της αποφυγής εξετάσεων για τη θυρεοειδική λειτουργία σε ευθυρεοειδικές ασθενείς με καθ' έξιν αποβολές (3;44).

### **Υπερανδρογοναιμία**

Η πιθανή συσχέτιση μεταξύ αυξημένων επιπέδων ανδρογόνων και καθ' έξιν αποβολών άρχισε επίσης να διερευνάται στις αρχές της δεκαετίας του 1990 και η ωχρινοτρόπος ορμόνη (luteinising hormone, LH) είναι η πρώτη που μελετήθηκε. Οι Regan και συν. παρακολούθησαν προοπτικά 193 γυναίκες και ανέφεραν ότι εκείνες που παρουσίαζαν υψηλά επίπεδα LH ( $>10$  IU/l) παρουσίαζαν μικρότερη πιθανότητα να συλλάβουν (67%) και μεγαλύτερη πιθανότητα να αποβάλλουν (65%) από ό,τι αντίστοιχες γυναίκες με χαμηλότερα επίπεδα LH (45). Η ίδια ομάδα ωστόσο μελέτησε αργότερα ασθενείς με καθ' έξιν αποβολές και ανέφερε ότι τα επίπεδα της LH δεν συσχετίζονται με την πρόγνωση σε επόμενη κύηση (46), και καταστολή των υψηλών επιπέδων LH πριν από την κύηση δεν οδηγεί σε βελτίωση της έκβασης (47).

### **Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών – αντίσταση στην ινσουλίνη**

Ταυτόχρονα με την LH άρχισε να διερευνάται και η πιθανή συσχέτιση μεταξύ των καθ'έξιν αποβολών και του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών (polycystic ovarian syndrome, PCOS). Για αρκετό διάστημα δεν χρησιμοποιήθηκαν ενιαία κριτήρια στις μελέτες για τον ορισμό του PCOS και οι έννοιες της πολυκυστικής εμφάνισης των ωοθηκών και του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών χρησιμοποιήθηκαν κατ' εναλλαγήν. Σήμερα γνωρίζουμε ότι η εμφάνιση των ωοθηκών δεν επηρεάζει την πιθανότητα επιτυχίας σε επόμενη κύηση (48;49), και οι ορμονολογικές / μεταβολικές διαταραχές που παρατηρούνται συχνά στις ασθενείς αυτές αποτελούν πολύ πιθανότερο αίτιο για το αυξημένο ποσοστό αυτόματων εκτρώσεων που καταγράφεται σε ασθενείς με PCOS. Εκτός από την αύξηση των επιπέδων της LH, το οποίο αποτελεί συχνό εύρημα σε ασθενείς με PCOS και συζητήθηκε προηγουμένως, πολλές από τις ασθενείς αυτές παρουσιάζουν παθολογική αντίσταση στην ινσουλίνη.



Έχει βρεθεί ότι ακόμη και σε μη διαβητικές γυναίκες χωρίς PCOS η αντίσταση στην ινσουλίνη απαντάται συχνότερα σε ασθενείς με καθ' ἑξιν αποβολές από ό,τι σε γυναίκες ελέγχου (50). Επιπλέον, χορήγηση μετφορμίνης (η οποία βελτιώνει την αντίσταση στην ινσουλίνη) σε ασθενείς με PCOS βρέθηκε ότι ελαττώνει τη συχνότητα αυτομάτων εκτρώσεων κατά 4-5 φορές (51-53). Ωστόσο τα επιδημιολογικά στοιχεία σε ασθενείς με καθ' ἑξιν αποβολές είναι λίγα, δεν έχει υπάρξει συσχέτιση με την πρόγνωση σε επόμενη κύηση και δεν έχουν υπάρξει προοπτικές τυχαιοποιημένες μελέτες σχετικά με την επίδραση της μετφορμίνης σε αυτή την πρόγνωση, και για το λόγο αυτό τόσο το Αμερικανικό όσο και το Βρετανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων – Γυναικολόγων δεν συνιστούν τακτικό έλεγχο για αυτό τον παράγοντα (3;44).

### **Ανεπάρκεια ωχρού σωματίου**

Έχει υποτεθεί ότι συστηματική ανεπάρκεια στην υποστήριξη των αρχικών σταδίων της κύησης από το ωχρό σωματίο θα μπορούσε να αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα σε κάποιες ασθενείς με καθ' ἑξιν αποβολές. Η ανεπάρκεια του ωχρού σωματίου θα μπορούσε να επιδράσει σε οποιοδήποτε στάδιο από την προσκόλληση / εμφύτευση της βλαστοκύστης ως την πλακουντοποίηση. Στην πραγματικότητα, η συσχέτιση μεταξύ της υποτιθέμενης ανεπάρκειας του ωχρού σωματίου και της πρόκλησης καθ' ἑξιν αποβολών περιπλέκεται για πολλούς λόγους. Για αρκετά χρόνια δεν υπήρξε κοινά παραδεκτός ορισμός για αυτή την παθολογική οντότητα, ούτε και αξιόπιστη μέθοδος για τη διάγνυσή της. Συχνά στο παρελθόν η διάγνωση έχει τεθεί με μία μέτρηση προγεστερόνης ορού στο μέσο του κύκλου ή με βιοψία ενδομητρίου, αλλά ακόμη και τότε μπορεί ο έμμηνος κύκλος να είναι περιστασιακά ανώμαλος ανεξάρτητα από το αναπαραγωγικό ιστορικό της γυναίκας. Για τους λόγους αυτούς, το Αμερικανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων – Γυναικολόγων θεωρεί ότι η διάγνωση της ανεπάρκειας ωχρού σωματίου μπορεί να γίνεται μόνο μετά από δύο ενδομήτριες βιοψίες «εκτός φάσης» σε διαδοχικούς κύκλους (3).

Ακόμη και τότε ωστόσο, είναι αμφίβολο αν η διάγνωση αυτής της κατάστασης μπορεί να επηρεάσει την πρόγνωση ή την αντιμετώπιση σε επόμενη κύηση. Σε δύο σειρές ασθενών που μελέτησαν την επίδραση της ύπαρξης ανεπάρκειας ωχρού σωματίου στην έκβαση μελλοντικής κύησης αποδείχθηκε ότι η πιθανότητα επιτυχίας ήταν παρόμοια (80-85%) ανεξάρτητα με τη χορήγηση ή μη προγεστερόνης (54;55).

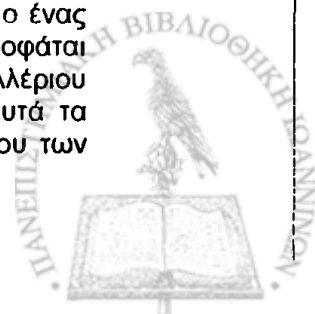


## Ανατομικές ανωμαλίες

Οι ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας υπήρξαν από τους πρώτους παράγοντες που μελετήθηκαν για πιθανή συσχέτιση με καθ' ἑξιν αποβολές. Η συχνότητα αυτών των ανωμαλιών σε ασθενείς με καθ' ἑξιν αποβολές ποικίλλει από 5% ως 30% στις διάφορες μελέτες, ανάλογα με τον ορισμό που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε σειρά για τις καθ' ἑξιν αποβολές και για τις ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας (56-59).

Η ύπαρξη ανατομικών ανωμαλιών της μήτρας έχει συσχετιστεί με επιπλοκές της αναπαραγωγικής λειτουργίας και οι συχνότερα συσχετιζόμενες ανωμαλίες είναι οι συγγενείς ανωμαλίες διάπλασης της μήτρας <sup>2</sup>. Οι Maneschi και συν. παρακολούθησαν προοπτικά γυναίκες με ασυμπτωματικές ανωμαλίες διάπλασης της μήτρας επί 36 μήνες και αναφέρουν ότι οι ασθενείς αυτές παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα αποβολών από ό,τι γυναίκες με φυσιολογική μήτρα (61). Οι Woelfer και συν. ανέφεραν ότι γυναίκες με ατελές διάφραγμα μήτρας παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα αυτόματων εκτρώσεων πρώτου τριμήνου και γυναίκες με τοξοειδή μήτρα σημαντικά υψηλότερη συχνότητα αυτομάτων εκτρώσεων δεύτερου τριμήνου και πρόωρου τοκετού (62). Οι Akar και συν. παρακολούθησαν 55 ασθενείς με μονόκερω μήτρα για μία ελάχιστη περίοδο δύο ετών και ανέφεραν υψηλή συχνότητα επιπλοκών, όπως αυτομάτων εκτρώσεων (29%) και πρόωρου τοκετού (43%), με το ποσοστό γεννήσεων ζώντων να ανέρχεται σε 29% μόνο (63). Οι Stein και συν. ανέφεραν ότι 9% των ασθενών με συγγενείς ανωμαλίες διάπλασης της μήτρας αναπτύσσουν τελικά καθ' ἑξιν αποβολές (σε αντίθεση με τον επιπολασμό 1-3% στον γενικό πληθυσμό) (64). Αν και διαταραχές στη διείδυση της τροφοβλάστης μπορεί να μετέχουν στο μηχανισμό πρόκλησης όψιμων αυτομάτων εκτρώσεων σε ασθενείς με συγγενείς ανωμαλίες διάπλασης της μήτρας (65), τέτοιες διαταραχές δεν είναι συχνές σε περιπτώσεις αυτόματων εκτρώσεων πρώτου τριμήνου (66).

<sup>2</sup> Εμβρυολογικά, οι Μυλλέριοι πόροι αρχίζουν να αναπτύσσονται στην 7<sup>η</sup> εβδομάδα ως πτυχώσεις του εξωεμβρυϊκού επιθηλίου, και αναπτύσσονται ουριαία και προς τη μεσότητα του σώματος ώσπου φτάνουν στο υψος του ουρογεννητικού βόθρου προς το τέλος της όγδοης εβδομάδας. Οι δύο Μυλλέριοι πόροι συντήκονται σε έναν ενιαίο κυλινδρικό σχηματισμό, την πρωτογενή υστεροκολεϊκή αύλακα. Η σύντηξη προχωρά κεφαλικά και φτάνει ως το επίπεδο του πυθμένα της μήτρας. Σε αυτό το στάδιο οι δύο πόροι βρίσκονται ο ένας δίπλα στον άλλο και είναι συμπαγείς. Εν συνεχεία στο εσωτερικό κάθε ενός από τους πόρους σχηματίζεται μία κοιλότητα, ώστε τελικά προκύπτουν δύο σωληνοειδείς σχηματισμοί, ο ένας δίπλα στον άλλο, οι οποίοι χωρίζονται με ένα διάφραγμα. Το διάφραγμα αυτό απορροφάται σταδιακά με κατεύθυνση από την ουρά προς την κεφαλή, και η ανάπτυξη του Μυλλέριου συστήματος ολοκληρώνεται προς την 20<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης. Διαταραχές σε αυτά τα στάδια οδηγούν στην ανάπτυξη ανωμαλιών διάπλασης της μήτρας. Στο 30% περίπου των περιπτώσεων συνυπάρχει και ανεπάρκεια του τραχήλου της μήτρας (60).

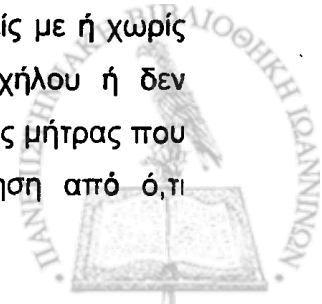


Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, τα στοιχεία για τη συσχέτιση των συγγενών ανωμαλιών διάπλασης της μήτρας με καθ' ἑξίν αποβολές προέρχονται από μελέτες χωρίς ομάδα ελέγχου, οι οποίες εμφανίζουν υψηλό επιπολασμό αυτών των ανωμαλιών σε γυναίκες με καθ' ἑξίν αποβολές (67-72).

Σε μία πολύ μεγάλη σειρά ασθενών με καθ' ἑξίν αποβολές και ασθενών ελέγχου από τα νοσοκομεία St. Mary's και King's College Hospital, εξέταση με τρισδιάστατη κοιλιακή υπερηχογραφία έδειξε ότι ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας διαγιγνώσκονται στο 24% των ασθενών έναντι 5% των γυναικών ελέγχου. Ωστόσο, οι παθολογικές περιπτώσεις στην πλειονότητά τους αφορούσαν σε τοξοειδή μήτρα, ενώ σημαντικότερη ανωμαλία βρέθηκε μόνο στο 6.8% των περιπτώσεων (72).

Εκτός από τις ανωμαλίες διάπλασης της μήτρας, η ύπαρξη ενδομητρίων συμφύσεων και ινομυωμάτων μήτρας έχει επίσης συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο αυτομάτων εκτρώσεων. Στην περίπτωση των συμφύσεων, η ελάττωση του λειτουργικού όγκου της ενδομήτριας κοιλότητας και η ίνωση και φλεγμονή των ενδομητρίων αδένων και του στρώματος μπορεί να προδιαθέτουν σε πλακουντιακή ανεπάρκεια και αυτόματη έκτρωση. Σε ότι αφορά στην (αμφισβητούμενη) συσχέτιση των ινομυωμάτων με την πρόκληση αυτόματων εκτρώσεων, έχει υποστηριχθεί ότι ανάλογα με τη θέση και το μέγεθός τους, τα ινομυώματα μπορεί να μεταβάλλουν τη μορφή της ενδομήτριας κοιλότητας και να προκαλούν ελάττωση στη διαταραχή του ενδομητρίου ή ακόμη και να δρουν σαν ενδομήτρια σπειράματα προκαλώντας άσηπτη φλεγμονή. (60).

Η αναγνώριση και αποκατάσταση, αν αυτό είναι δυνατόν, των ανατομικών ανωμαλιών φαίνεται να βελτιώνει την πρόγνωση σε επόμενη κύηση. Ιδιαίτερα δε η εκτομή σε περίπτωση ενδομητρίου διαφράγματος φαίνεται να σχετίζεται με θεαματική αύξηση της πιθανότητας επιτυχίας σε επόμενη κύηση. Σε μία αναλυτική ανασκόπηση, οι Homer και συν. αναφέρουν ότι τα ποσοστά 88%, 9% και 3% για αυτόματη έκτρωση, πρόωρο τοκετό και τελειόμηνο τοκετό αντίστοιχα σε ασθενείς με διαφραγματοφόρο μήτρα βελτιώθηκαν σε 14%, 6% και 80% αντίστοιχα μετά από εκτομή του διαφράγματος (73). Οι Ventolini και συν. αναφέρουν ότι το 77% των ασθενών με καθ' ἑξίν αποβολές και ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας σημειώνει επιτυχία στην επόμενη κύηση μετά από διόρθωση της ανωμαλίας, έναντι 57% των ασθενών με ιδιοπαθείς καθ' ἑξίν αποβολές (74). Η περίδεση του τραχήλου της μήτρας έχει χρησιμοποιηθεί εμπειρικά, κυρίως σε περιπτώσεις μονόκερου, δίκερου και τοξοειδούς μήτρας, η αποτελεσματικότητά της όμως δεν είναι σαφής. Υπάρχει μόνο μία ελεγχόμενη κλινική δοκιμή με μικτό σχεδιασμό, όπου ασθενείς με ή χωρίς ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας υπεβλήθησαν σε περίδεση τραχήλου ή δεν υπεβλήθησαν σε καμία θεραπεία. Ασθενείς με ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας που υπεβλήθησαν σε περίδεση σημείωσαν καλύτερη έκβαση στην κύηση από ό,τι



γυναίκες που δεν έλαβαν καμία θεραπεία (75). Ενώ η υστεροσκοπική λύση των συμφύσεων φαίνεται να αυξάνει τις πιθανότητες επιτυχίας σε επόμενη κύηση, δεν υπάρχουν τυχαίοποιημένες μελέτες για την αξία της ινομυωματεκτομής.

### Θρομβοφιλική παράγοντες

Οι καθ' έξιν αποβολές αποτελούν πιθανώς μία θρομβοφιλική κατάσταση. Η επιτυχής πλακουντοποίηση απαιτεί την ύπαρξη μίας δυναμικής ισορροπίας ανάμεσα στη διείσδυση της τροφοβλάστης στα αγγεία, την αιμόσταση στα σημεία της διήθησης και την επανασηραγοποίηση του αυλού, και αυτό μεταφράζεται σε ισορροπία ανάμεσα στα συστήματα της πήξης και της ινωδολύσης. Διαταραχές αυτής της ισορροπίας θεωρείται ότι μπορούν να οδηγήσουν σε παθολογική πλακουντοποίηση και αυτόματη έκτρωση ή μαιευτικές επιπλοκές.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι η θρομβοφιλία σχετίζεται με μαιευτικές επιπλοκές πλακουντιακής προέλευσης (προεκλαμψία, ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης του εμβρύου), και η παρουσία πλακουντιακών μικροθρόμβων αποτελεί συνηθισμένο εύρημα σε αυτές τις περιπτώσεις (76). Οι Quenby και συν. αναφέρουν ότι ασθενείς με ανεξήγητες καθ' έξιν αποβολές έχουν παρόμοια υψηλό κίνδυνο για μελλοντική θρόμβωση όπως και ασθενείς με καθ' έξιν αποβολές και αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα (2/1000 γυναικο-έτη έναντι 6/1000 γυναικο-έτη αντίστοιχα,  $p=0.18$ ), ο οποίος είναι σημαντικά υψηλότερος από εκείνον στο γενικό πληθυσμό (0.27/1000 γυναικο-έτη σύμφωνα με μία αναδρομική μελέτη βασισμένη σε αρχεία γενικών ιατρών στο Ηνωμένο Βασίλειο) (77). Επομένως, είναι πιθανό ότι ακόμη και σε κάποιες από τις γυναίκες με φαινομενικά ανεξήγητες καθ' έξιν αποβολές υπάρχει κάποια υποκείμενη θρομβοφιλία η οποία όμως δεν μπορεί να διαγνωστεί με τις υπάρχουσες δοκιμασίες. Το 1998 δημοσιεύτηκε μελέτη σύμφωνα με την οποία τα επίπεδα των συμπλεγμάτων θρομβίνης – αντιθρομβίνης (thrombin – antithrombin complexes; TAT), τα οποία αποτελούν ένα συνολικό δείκτη της γένεσης θρομβίνης, είναι υψηλότερα σε ασθενείς με καθ' έξιν αποβολές από ό,τι σε γυναίκες ελέγχου, ανεξάρτητα από το αν είναι θετικές ή αρνητικές για αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα (78).



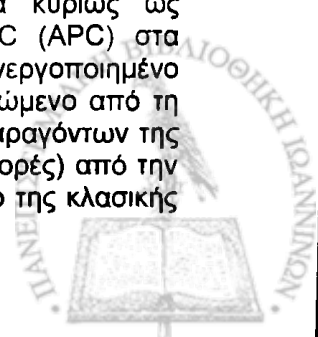
### Συγγενής έλλειψη αντιπηκτικών παραγόντων<sup>3</sup>

Η πιθανή συσχέτιση μεταξύ της συγγενούς έλλειψης φυσικών αντιπηκτικών παραγόντων και της πρόκλησης καθ' ἑξιν αποβολών μελετήθηκε για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του 1990. Οι Sanson και συν. μελέτησαν αναδρομικά το αναπαραγωγικό ιστορικό 129 γυναικών υψηλού κινδύνου για συγγενή έλλειψη πρωτεΐνης C, πρωτεΐνης S και αντιθρομβίνης III και βρήκαν ότι 22% των κυήσεων γυναικών με έλλειψη σε κάποιον από αυτούς τους παράγοντες κατέληξε σε αυτόματη έκτρωση ή ενδομήτριο θάνατο, σε σύγκριση με 11% σε γυναίκες χωρίς έλλειψη για αυτούς τους παράγοντες (79).

Η πρώτη μεγάλη συγκριτική μελέτη έγινε το 1996. Σε αυτή τη μελέτη συγκρίθηκε το αναπαραγωγικό ιστορικό 571 ασθενών με συγγενή έλλειψη αντιπηκτικών παραγόντων (έλλειψη πρωτεΐνης C: 162, έλλειψη πρωτεΐνης S: 145, έλλειψη αντιθρομβίνης III: 108, παράγοντας V Leiden: 141, συνδυασμός ανωμαλιών: 15) με το αναπαραγωγικό ιστορικό 395 γυναικών ομάδας ελέγχου. Ο λόγος αναλογιών για απώλεια του εμβρύου ήταν 1.35 επί παρουσίας θρομβοφιλίας (OR 1.35, 95% CI 1.01–1.82). Η έλλειψη αντιθρομβίνης συσχετίστηκε με τη μεγαλύτερη πιθανότητα τόσο για αυτόματη έκτρωση (OR 1.7, 95% CI 1.0-2.8) όσο και για ενδομήτριο θάνατο (OR 5.2, 95% CI 1.5-18.1). Αυτή η ερευνητική ομάδα επίσης μελέτησε την επίδραση της ύπαρξης θρομβοφιλίας στον σύζυγο και βρήκε ότι δεν συσχετιζόνταν με το αναπαραγωγικό ιστορικό (80).

Η σύνθεση των στοιχείων από 5 case-control μελέτες (81-85) (818 ασθενείς, 370 γυναίκες ελέγχου) έδειξε ότι η συγγενής έλλειψη πρωτεΐνης C είναι σπάνια και στις δύο ομάδες (4/818 [0.5%], 1/370 αντίστοιχα) και η παρουσία της δεν αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα για καθ' ἑξιν αποβολές (OR 1.44, 95% διάστημα

<sup>3</sup>Στους φυσικούς αντιπηκτικούς παράγοντες του πλάσματος περιλαμβάνονται η πρωτεΐνη C, η πρωτεΐνη S και η αντιθρομβίνη (AT, ή αντιθρομβίνη III [AT-III]). Η πρωτεΐνη C συντίθεται στο ήπαρ ως ζυμογόνο και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία. Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C απαιτεί μετατροπή του ζυμογόνου απλής αλύσου σε διπλής αλύσου ένζυμο. Φυσιολογικά η ενεργοποίηση αυτή λαμβάνει χώρα στα φωσφολιπίδια της επιφάνειας του κυττάρου με της δράση της θρομβίνης, μετά τη σύνδεση της τελευταίας σε μία κυτταρική πρωτεογλυκάνη, τη θρομβομοδουλίνη. Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (APC) συνδέεται στον κυτταρικό συμπαράγοντά της, την πρωτεΐνη S, και το σύμπλεγμα APC-πρωτεΐνης S λύει τους ενεργοποιημένους παράγοντες πήξης V και VIII, επιβραδύνοντας έτσι το σχηματισμό ινικής μέσω αναστολής της ενεργοποίησης των παραγόντων X και II (προθρομβίνης). Η πρωτεΐνη S είναι εξαρτώμενο από τη βιταμίνη K φυσικό αντιπηκτικό, και δρα κυρίως ως συμπαράγοντας ενισχύοντας τη δράση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C (APC) στα υποστρώματά της, δηλαδή τον ενεργοποιημένο παράγοντα V (Va) και τον ενεργοποιημένο παράγοντα VIII (VIIIa). Η αντιθρομβίνη III είναι φυσικό αντιπηκτικό, μη εξαρτώμενο από τη βιταμίνη K, το οποίο αναστέλλει τη δράση της θρομβίνης καθώς και άλλων παραγόντων της πήξης (π.χ. Xa). Η δράση της αντιθρομβίνης III ενισχύεται σημαντικά (1000 φορές) από την ηπαρίνη, και αυτός είναι ο κύριος μηχανισμός για την αντιπηκτική δράση τόσο της κλασικής όσο και της χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνης.





εμπιστοσύνης 0.35-6.02;  $\rho=0.62$ ;  $Q=1.35$ ). Από τις παραπάνω μελέτες, οι δύο (81;82) περιέλαβαν ασθενείς με  $\geq 3$  αυτόματες εκτρώσεις, ενώ οι υπόλοιπες περιέλαβαν ασθενείς με  $\geq 2$  αυτόματες εκτρώσεις. Στην πολύ μεγάλη πλειοψηφία επρόκειτο για αυτόματες εκτρώσεις πρώτου τριμήνου, ωστόσο κάποιες μελέτες περιέλαβαν και εκτρώσεις στο δεύτερο τρίμηνο.

Οι ίδιες μελέτες χρησιμοποιήθηκαν και για τη σύνθεση των στοιχείων για την έλλειψη πρωτεΐνης S. Φαίνεται ότι η έλλειψη πρωτεΐνης S είναι κάπως συχνότερη από την έλλειψη πρωτεΐνης C τόσο στις ασθενείς όσο και στην ομάδα ελέγχου (5/818 [0.6%], 2/370 αντίστοιχα), και επίσης δεν αυξάνει την πιθανότητα για καθ' ἑξιν αποβολές (OR 1.43, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.37-5.55;  $\rho=0.61$ ;  $Q=2.10$ ).

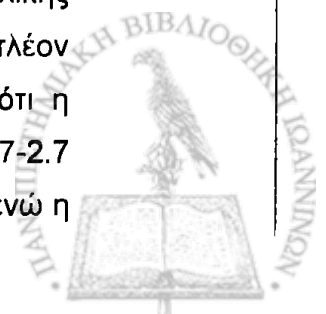
Η σύνθεση αυτών των στοιχείων για την αντιθρομβίνη III δείχνει ότι πρόκειται για μία πολύ σπάνια διαταραχή (αναφέρθηκε μόνο σε μία ασθενή και καμία από τις γυναίκες ελέγχου) και δεν αυξάνει σημαντικά της πιθανότητα για καθ' ἑξιν αποβολές (OR 0.90, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.17-4.82;  $\rho=0.90$ ;  $Q=1.21$ ).

### Θρομβοφιλικές μεταλλάξεις

Η πιθανή συσχέτιση μεταξύ διαφόρων θρομβοφιλικών μεταλλάξεων και της εμφάνισης καθ' ἑξιν αποβολών αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης κατά την τελευταία δεκαετία.

Η πρώτη από τις μεταλλάξεις που διερευνήθηκε ήταν η μετάλλαξη Leiden του παράγοντα V (Factor V Leiden mutation, FVL). Οι Bertina και συν. ανέφεραν το 1994 ότι μία απλή σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο του παράγοντα V (στη θέση 1691, αντικατάσταση G από A) οδηγεί στη σύνθεση μίας συγκεκριμένης μορφής παράγοντα V (Factor V Leiden) η οποία είναι ανθεκτική στη δράση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C, και 80-100% των ασθενών με αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (APC resistance, APC-R) είναι είτε ομόζυγοι είτε ετερόζυγοι για τον FVL (86). Η μετάλλαξη FVL απαντάται σε περίπου 3% του μαιευτικού πληθυσμού, με σημαντικές διαφορές ανάλογα με την εθνικότητα και τη γεωγραφική κατανομή. Τόσο ομοζυγωτία όσο και ετεροζυγωτία για τον FVL απαντώνται σε ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών με θρομβοεμβολική νόσο και αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο θρομβοεμβολής.

Οι πολυμορφισμοί Leiden του παράγοντα V, G20210 του γονιδίου της προθρομβίνης (FII G20210A) και C677T του γονιδίου της μεθυλενε-τετραϋδροφυλικής αναγωγάσης (methylenetetrahydrofolate reductase - MTHFR C677T) είναι οι πλέον μελετημένοι σε συσχέτιση με τις καθ' ἑξιν αποβολές. Σήμερα γνωρίζουμε ότι η παρουσία του FVL αυξάνει την πιθανότητα για καθ' ἑξιν αποβολές κατά 1.7-2.7 φορές και η μετάλλαξη G20210A αυξάνει τον κίνδυνο κατά περίπου 2.5 φορές, ενώ η



παρουσία της μετάλλαξης MTHFR C677T δεν φαίνεται να αυξάνει την πιθανότητα καθ' ἑξιν αποβολών (87).

Η μετάλλαξη G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης αυξάνει τα επίπεδα της προθρομβίνης που κυκλοφορεί στο πλάσμα και αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη θρομβοφιλική μετάλλαξη (88;89). Εκτός από την αυξημένη προδιάθεση για θρόμβωση στο επίπεδο του πλακούντα, τα αυξημένα επίπεδα προθρομβίνης είναι πιθανό ότι παραβλάπτουν την πλακουντιακή λειτουργία επιδρώντας στην προσκόλληση των κυττάρων, στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών και στην αγγειογένεση (90).

Η μεθυλενε-τετραϋδροφυλλική αναγωγάση (methylenetetrahydrofolate reductase – MTHFR) αποτελεί βασικό ένζυμο για την εξαρτώμενη από το φυλλικό οξύ επαναμεθυλίωση της ομοκυστεΐνης, και πολυμορφισμοί στο γονίδιο της συσχετίζονται συχνά με αύξηση των επιπέδων της ομοκυστεΐνης στο αίμα. Ο πολυμορφισμός MTHFR C677T καθιστά το ένζυμο θερμοευαίσθητο και οδηγεί σε *in vitro* ελάττωση της δραστηριότητας του ενζύμου. Ομοζυγωτία για τα αλληλόμορφο 677T σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης, ειδικά σε ασθενείς με χαμηλές συγκεντρώσεις φυλλικού οξέος στο πλάσμα (91), και επομένως σε αύξηση του κινδύνου για θρόμβωση.

Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι η συνύπαρξη δύο ή περισσότερων θρομβοφιλικών μεταλλάξεων (ακόμη κι αν αυτές είναι ελάσσονες) στην ίδια ασθενή είναι συχνότερες σε γυναίκες με καθ' ἑξιν αποβολές (92;93), αν και το εύρημα αυτό δεν επιβεβαιώνεται από όλες τις μελέτες (94).

Νέες μεταλλάξεις που έχουν διερευνηθεί ελάχιστα σε συνδυασμό με τις καθ' ἑξιν αποβολές είναι αυτές που οδηγούν στον απλότυπο R2 του παράγοντα V και η μετάλλαξη A1298H του γονιδίου της MTHFR. Ο απλότυπος R2 του παράγοντα V χαρακτηρίζεται από ήπια ελάττωση της ολικής συγκέντρωσης του παράγοντα V με σχετική αύξηση του περισσότερο θρομβογόνου κλάσματος FV1 (95). Ο πολυμορφισμός Arg1299His (A4070G) αποτελεί μία από τις 4 μεταλλάξεις που οδηγούν στον απλότυπο R2 και τα αποτελέσματα των μελετών για πιθανή συσχέτιση του με θρομβοεμβολικά φαινόμενα ποικίλλουν (96-98).

Η μετάλλαξη A1298C του γονιδίου της MTHFR οδηγεί σε υποκατάσταση ενός μορίου γλουταμικού οξέος από αλανίνη σε μία ρυθμιστική θέση του γονιδίου του ενζύμου, και έχει ως συνέπεια μία ελάττωση της δραστηριότητας του ενζύμου στο πλάσμα, της τάξης του 40% (99). Σε αντίθεση με τη μετάλλαξη MTHFR C677T, όπου η ομοζυγωτία (TT) συνεπάγεται σημαντική αύξηση των επιπέδων ομοκυστεΐνης στο πλάσμα, τα επίπεδα ομοκυστεΐνης δεν εμφανίζονται σημαντικά αυξημένα σε γυναίκες με γονότυπο 1298CC type (99;100). Αν και η παρουσία των πολυμορφισμών της

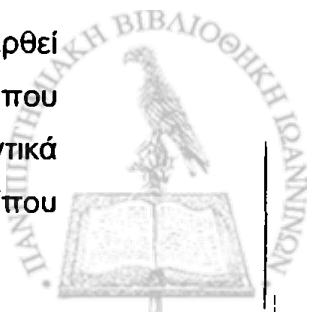
MTHFR είναι συχνότερη σε έμβρυα που αποβάλλονται (101), τα υπάρχοντα δεδομένα στη βιβλιογραφία δεν υποστηρίζουν την ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα σε αυτούς τους πολυμορφισμούς και σε αύξηση του κινδύνου για καθ' ἑξιν αποβολές (93;94;102).

### Διαταραχές της ινωδόλυσης

Η επιτυχής πλακουντοποίηση προϋποθέτει την επίτευξη ισορροπίας μεταξύ της διείσδυσης της τροφοβλάστης, της αιμόστασης στα αγγεία του φθαρτού στα οποία γίνεται η διαίσδυση, και της λύσης του θρόμβου ώστε να αποκατασταθεί ομαλή μητροπλακουντιακή κυκλοφορία. Διαταραχές σε αυτή την ισορροπία είναι πιθανό να οδηγούν σε επιπλοκές στην κύηση ή σε αυτόματη έκτρωση. Οι αναστολείς του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (plasminogen activator inhibitors, PAIs) είναι βασικοί ρυθμιστές στον μηχανισμό της ινωδόλυσης και δρουν αναστέλλοντας τον ιστικό ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (tPA και uPA). Από τους δύο σημαντικότερους τύπους PAI, ο PAI-1 σχετίζεται με τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενώ ο PAI-2 παράγεται από τα κύτταρα της τροφοβλάστης κατά της κύηση καθώς και από τα μακροφάγα. Ο PAI-2 σπάνια ανιχνεύεται εκτός κύησης, και κατά συνέπεια μετρήσεις εκτός κύησης αντιπροσωπεύουν στην ουσία τον PAI-1. mRNA για τον PAI εκφράζεται τόσο στα κύτταρα της εξωλάχνιας τροφοβλάστης (extravillous trophoblast, EVT) όσο και στα διεισδυτικά τροφοβλαστικά κύτταρα σε πιθήκους του γένους Rhesus (103) και διαταραχές στη δραστηριότητα του PAI έχουν αναφερθεί στον άνθρωπο σε περιπτώσεις μαιευτικών επιπλοκών σχετιζόμενων με παθολογική πλακουντοποίηση. Ως παράδειγμα, ασθενείς που αναπτύσσουν προεκλαμψία εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα PAI σε σχέση με αντίστοιχη ομάδα ελέγχου (104;105).

Ο πολυμορφισμός 4G/5G αποτελεί κοινό πολυμορφισμό διαγραφής/εγγραφής στο γονίδιο του PAI-1, στον οποίον παρουσία του αλληλόμορφου 4G έχει συσχετιστεί με αύξηση των επιπέδων του PAI (106;107). Ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο 4G έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για προεκλαμψία (108;109), ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης (109;110) και πρόωρη αποκόλληση του πλακούντα (109;110), και ο προτεινόμενος παθοφυσιολογικός μηχανισμός περιλαμβάνει πιθανώς αυξημένη εναπόθεση ινικής στους μεσολάχνιους χώρους και ελαττωματική διείσδυση της τροφοβλάστης (16;93).

Διαταραχή της ινωδόλυσης λόγω αυξημένης δραστηριότητας του PAI έχει αναφερθεί και σε γυναίκες με καθ' ἑξιν αποβολές (82;111). Στη μεγαλύτερη σειρά ασθενών που έχει δημοσιευθεί, ασθενείς με ιστορικό καθ' ἑξιν αποβολών παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερη δραστηριότητα για τον PAI σε σύγκριση με γυναίκες ελέγχου, και περίπου



το ένα τρίτο από αυτές είχε παθολογικά υψηλή δραστηριότητα PAI (82). Ωστόσο, ο γονότυπος καθορίζει κατά ένα μέρος μόνο τη δραστηριότητα του PAI και ως τώρα δεν έχει ταυτόχρονη διερεύνηση του επιπολασμού του πολυμορφισμού PAI-1 4G/5G και της δραστηριότητας του PAI σε ασθενείς με καθ'έξιν αποβολές.

### Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο

Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο αναγνωρίστηκε σχετικά πρόσφατα ως μία αυτοάνοση οντότητα η οποία είναι δυνατό να εκδηλωθεί με απώλεια κύησης, θρομβοεμβολικά επεισόδια ή αυτοάνοση θρομβοκυττοπενία, σε συνδυασμό με τυπικά εργαστηριακά ευρήματα. Τα τελευταία περιλαμβάνουν επίμονα αυξημένα επίπεδα έναντι ανιονικών φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης (π.χ. αντισώματα κατά καρδιολιπίνης ή κατά φωσφατιδυλσερίνης) ή έναντι των σχετιζόμενων πρωτεϊνών του πλάσματος (κυρίως της β2-γλυκοπρωτεΐνης I [απολιποπρωτεΐνη H]), ή ανίχνευση κυκλοφορούντος αντιπηκτικού.

Η παρουσία αντιπηκτικού λύκου (lupus anticoagulant, LA) συσχετίστηκε με την πρόκληση καθ'έξιν αποβολών ήδη από τα μέσα της δεκαετίας του 1980 (112). Το 1990, οι Taylor και συν. μελέτησαν 189 ζεύγη με καθ'έξιν αποβολές και ανέφεραν ότι αντιπηκτικό λύκου ανιχνεύονταν στο 3% και αυξημένος τίτλος αντισωμάτων κατά καρδιολιπίνης στο 15% των ασθενών (113). Το 1991 οι Creagh και συν. ανέφεραν θετικά αποτελέσματα για αντιπηκτικό λύκου και αντισώματα κατά καρδιολιπίνης σε 7 και 6 αντίστοιχα εκ των 35 ασθενών με τουλάχιστον 3 αυτόματες εκτρώσεις πρώτου και δευτέρου τριμήνου, έναντι 1/31 και 0/31 επί ασθενών με μία ή δύο αυτόματες εκτρώσεις (114).

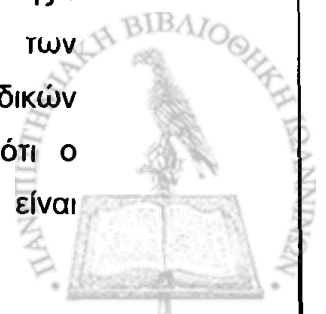
Τα πρώτα μεγάλης κλίμακας στοιχεία προέρχονται από τη μελέτη των Rai και συν. το 1995. Στοιχεία από 500 ασθενείς με  $\geq 3$  αυτόματες εκτρώσεις έδειξαν ότι 9.6% από αυτές ήταν επίμονα θετικές για LA, 2.2 και 3.3% ήταν επίμονα θετικές για IgM και IgG αντισώματα κατά καρδιολιπίνης αντίστοιχα, και μόνο 1.4% ήταν θετικές για LA αντισώματα κατά καρδιολιπίνης ταυτόχρονα. Ένα ακόμη σημαντικό στοιχείο αυτής της μελέτης είναι ότι οι συγγραφείς αναφέρουν πως μόνο 2/3 των θετικών αποτελεσμάτων για LA και 1/3 των θετικών αποτελεσμάτων για αντισώματα κατά καρδιολιπίνης παραμένουν θετικά όταν επανελέγχονται μετά από τουλάχιστον 6 εβδομάδες. Τα επίπεδα της β2-γλυκοπρωτεΐνης-I δεν διέφεραν μεταξύ ασθενών που ήταν θετικές ή αρνητικές για αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα (115). Οι ερευνητές αυτοί σημειώνουν επίσης ότι η δοκιμασία Dilute Russel Viper Venom Time (DRVVT)

έχει μεγαλύτερη ακρίβεια για τη διάγνωση LA από ό,τι ο χρόνος πήξης καολίνης (Kaolin Clotting Time, KCT), παρατήρηση που αργότερα επιβεβαιώθηκε από μελέτη που έγινε σε όλη τη Μεγάλη Βρετανία (116). Οι Balasch και συν. ανέφεραν το 1996 ότι 12% από τις 199 ασθενείς με καθ' ἑξιν αποβολές ήταν θετικές για LA συν/ή αντισώματα κατά καρδιολιπίνης, σε σύγκριση με καμία εκ των 125 γυναικών ελέγχου (117). Σε μία σειρά 133 ασθενών με  $\geq 3$  αυτόματες εκτρώσεις πριν τις 23 εβδομάδες κύησης και 127 γυναικών ελέγχου, τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα ήταν σημαντικά συχνότερα στις ασθενείς (14/127) από ό,τι στην ομάδα ελέγχου (3/133) (85). Οι Ogasawara και συν. ανέφεραν παρομοίως 13.3% επιπολασμό αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων σε 301 ασθενείς με  $\geq 2$  ιδιοπαθείς αυτόματες εκτρώσεις (118). Η συγκέντρωση των στοιχείων από 5 case-control μελέτες (85;117;119-121) δείχνει ότι η παρουσία αντισωμάτων κατά καρδιολιπίνης αυξάνει την πιθανότητα για καθ' ἑξιν αποβολές κατά 4.77 φορές (OR 4.77, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 2.28, 9.99), με μέτρια ετερογένεια των αποτελεσμάτων ( $Q=7.88$ ,  $p=0.09$ ). Ο επιπολασμός των αντισωμάτων κατά καρδιολιπίνης ήταν 16.7% στις ασθενείς και 3.2% στην ομάδα ελέγχου.

Τα στοιχεία σχετικά με το αντιπηκτικό λύκου είναι λιγότερα (2 μελέτες) (117;121), και κατά συνέπεια το διάστημα εμπιστοσύνης είναι πολύ ευρύ (OR 7.03, CI 0.36, 136.57). Ο επιπολασμός αντιπηκτικού λύκου σε αυτές τις μελέτες ήταν 17/296 (5.7%) στην ομάδα των ασθενών και 0/231 στις γυναίκες ελέγχου. Το αντιπηκτικό λύκου ανιχνεύεται λιγότερο συχνά σε ασθενείς με καθ' ἑξιν αποβολές από όσο τα αντισώματα κατά καρδιολιπίνης αλλά θεωρείται ότι έχει μεγαλύτερη ειδικότητα.

Η πρόγνωση για επόμενη κύηση είναι κακή χωρίς θεραπεία στις περιπτώσεις ασθενών με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο. Οι Rai και συν. αναφέρουν ότι 90% των ασθενών αποβάλλουν σε επόμενη κύηση, συγκριτικά με 34% των ασθενών με καθ' ἑξιν αποβολές οι οποίες είναι αρνητικές για αυτά τα αντισώματα. Περισσότερες δε από 90% αυτών των αυτόματων εκτρώσεων συμβαίνουν στο 1<sup>ο</sup> τρίμηνο και η πλειοψηφία αυτών (85%) μετά από την επίδειξη εμβρυϊκής καρδιακής δραστηριότητας (122).

Στην αρχή υποτέθηκε ότι το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο οδηγεί σε απώλεια της κύησης μέσω πρόκλησης θρόμβωσης στο επίπεδο του πλακούντα. Αυτό θα μπορούσε να συμβεί είτε μέσω ελάττωσης των επιπέδων της αννεξίνης V (η οποία είναι πλακουντιακό αντιπηκτικό) είτε μέσω εξουδετέρωσης της  $\beta 2$ -γλυκοπρωτεΐνης I (επίσης πλακουντιακό αντιπηκτικό το οποίο δρα μέσω αναστολής των αιμοπεταλίων). Ωστόσο, είναι πιθανό ότι ο τρόπος δράσης των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων είναι περισσότερο σύμπλοκος, και πρόσφατα αναφέρθηκε ότι ο υποκείμενος μηχανισμός που ευθύνεται για τις μαιευτικές επιπλοκές είναι



ελαττωματική διείσδυση της τροφοβλάστης στα αγγεία του φθαρτού μάλλον παρά θρομβωτικά φαινόμενα μεταξύ των λαχνών (123).

Τα αντισώματα κατά καρδιολιπίνης δεν συνδέονται άμεσα στην καρδιολιπίνη, αλλά προσδένονται σε συμπλέγματα καρδιολιπίνης –  $\beta 2$  γλυκοπρωτεΐνης-I και για το λόγο αυτό έχει προταθεί η εξέταση και για αυτό τον παράγοντα πέρα από τα κλασικά αντισώματα κατά καρδιολιπίνης και το αντιπηκτικό λύκου. Σε δύο μελέτες που εστίασαν ειδικά στον επιπολασμό των αντι- $\beta 2$ -GP-I αντισωμάτων σε ασθενείς θετικές και αρνητικές για αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα βρέθηκε ότι αυτά είναι συχνά στην πρώτη ομάδα αλλά σπάνια στη δεύτερη και οι συγγραφείς καταλήγουν ότι ειδική εξέταση για τα αντισώματα αυτά είναι περιττή (124;125).

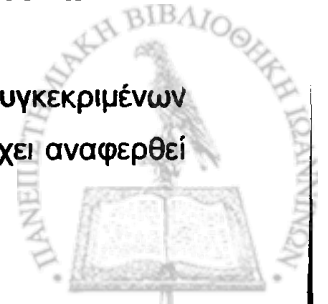
Η χορήγηση χαμηλής δόσης ασπιρίνης με ηπαρίνη (κλασσική ή χαμηλού μοριακού βάρους) αποτελεί τη θεραπεία εκλογής σε ασθενείς με καθ' ἑξιν αποβολές και αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα.

### *Αλλοάνοσοι μηχανισμοί*

Για την επιτυχία της κύησης απαιτείται μία σύμπλοκη αλληλεπίδραση ανάμεσα στο εμβρυϊκό «ημιαλλομόσχευμα» και το μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα, και έχει υποστηριχθεί ότι διαταραχές σε αυτή την αλληλεπίδραση μπορούν να οδηγήσουν σε απόρριψη του εμβρύου.

Αρχικά, έρευνα σε απομονωμένους πληθυσμούς έδειξε ότι η μεγάλη ανοσολογική ομοιότητα μεταξύ του ζεύγους, εκφραζόμενη από τη μεγάλη ομοιότητα στα αλληλόμορφα για το HLA-B ή το HLA-C, μπορεί να σχετίζεται με αύξηση του κινδύνου για αυτόματη έκτρωση (126). Σύμφωνα με τη θεωρία κατά την οποία το έμβρυο πρέπει να είναι ανοσολογικά ασύμβατο με τη μητέρα, ώστε να αναγνωριστεί ανοσολογικά από αυτή και να προκαλέσει την έκλυση μίας «προστατευτικής» αντίδρασης, η μεγάλη ομοιότητα μεταξύ του ζεύγους μπορεί να οδηγεί σε αποτυχία αναγνώρισης και επομένως αποτυχία έκλυσης της προστατευτικής αντίδρασης. Πέρα από την ασυμφωνία στα αποτελέσματα των σχετικών μελετών, σήμερα γνωρίζουμε ότι, με την εξαίρεση του HLA-C, κλασσικά αντιγόνα τύπου I και τύπου II δεν εκφράζονται στο πρώιμο έμβρυο, και επομένως είναι απίθανο ότι η ανοσοανοχή στο έμβρυο ρυθμίζεται από τη μητρική αναγνώριση εμβρυϊκών κλασσικών HLA αντιγόνων.

Σε μία διαφορετική γραμμή έρευνας, μελετήθηκε η πιθανή συσχέτιση συγκεκριμένων HLA αλληλίων με την αύξηση του κινδύνου για καθ' ἑξιν αποβολές. Έχει αναφερθεί

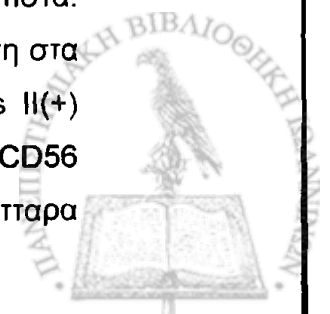


ότι γονότυπος HLA-DR1 ή HLA-DR3 στη γυναίκα απαντάται συχνότερα σε ασθενείς με καθ' έξιν αποβολές (127), και οι φορείς αυτού του γονότυπου είναι πιθανότερο να αποβάλλουν σε επόμενη κύηση από ό,τι οι μη φορείς (128). Σε μία μετα-ανάλυση από τους Christiansen και συν (1999) αναφέρθηκε ότι ο γονότυπος DR1 αυξάνει οριακά την πιθανότητα καθ' έξιν αποβολών (OR 1.29, 95% CI 1.05, 1.58), ενώ ο γονότυπος DR3 δεν συσχετίζεται με αύξηση της πιθανότητας (OR 1.00) (129).

Το HLA-G είναι ο κύριος τύπος HLA που δρα στην περιοχή όπου το έμβρυο έρχεται σε επαφή με τους μητρικούς ιστούς. Ως τώρα έχουν περιγραφεί διάφορα αλληλόμορφα για το HLA-G. Φαίνεται ότι, αν και το αλληλόμορφο HLA-G1 (η κύρια μεμβρανική μορφή του HLA) δεν είναι απαραίτητο για την επιβίωση του εμβρύου, οι πιθανότητες εμφύτευσης είναι καλύτερες σε έμβρυα που εκφράζουν HLA-G, και τα επίπεδα του διαλυτού HLA-G μπορεί να αποτελούν προγνωστικό παράγοντα για την επιτυχία της κύησης (4).

Οι κυτοκίνες αποτελούν ουσίες που ρυθμίζουν και τροποποιούν τις λειτουργίες των κυττάρων. Έχει υποστηριχθεί ότι ασθενείς με καθ' έξιν αποβολές εκφράζουν κυτοκίνες τύπου Th-1 συχνότερα από ότι γυναίκες ελέγχου με φυσιολογικό αναπαραγωγικό ιστορικό. Οι Lim και συν. αναφέρουν ότι τα επίπεδα των Th1 κυτοκινών ήταν σημαντικά υψηλότερα σε 25 ασθενείς με καθ' έξιν αποβολές από ό,τι σε γυναίκες ελέγχου, ενώ τα επίπεδα της Th2 κυτοκίνης ιντερλευκίνης -6 (IL-6) ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με καθ' έξιν αποβολές από ό,τι σε 10 γυναίκες ελέγχου, χωρίς να υπάρχει καμία εμφανής σχέση μεταξύ των επιπέδων αυτών και των στεροειδών του φύλου (130). Ελαττωμένη έκφραση IL-1b και IL-6 αναφέρθηκε επίσης και σε μελέτη που χρησιμοποίησε ανάλυση RNA (131).

Τα λευκοκύτταρα αποτελούν σημαντικό μέρος (περίπου 20%) του στρώματος του ενδομητρίου κατά την περίοδο της εμφύτευσης, και τα NK κύτταρα (natural killers, φυσικοί φονείς) αντιπροσωπεύουν έναν πολύ ενδιαφέροντα υποπληθυσμό, ειδικά κατά το τέλος της εκκριτικής φάσης και την αρχή της κύησης (132). Έχει υποστηριχθεί ότι τα NK κύτταρα στο ενδομήτριο συμμετέχουν στη ρύθμιση του βάθους της τροφοβλαστικής διείσδυσης και έτσι είναι πολύ σημαντικά για την αρχική εδραίωση της κύησης (132). Είναι πολύ πιθανό ότι η μελέτη των κυτταρικών υποπληθυσμών στο περιφερικό αίμα δεν αντικατοπτρίζει τις τοπικές συνθήκες που επικρατούν στο ενδομήτριο της περιεμφυτευτικής περιόδου, και επομένως μόνο τα στοιχεία που προέρχονται από το ενδομήτριο μπορεί να θεωρηθούν αξιόπιστα. Ακόμη όμως και αυτά είναι ανομοιογενή, αφού κάποιες μελέτες δείχνουν αύξηση στα NK κύτταρα (133), στα CD4(+), CD14(+), CD16(+), CD56(+) και MHC class II(+) κύτταρα (134), στα CD16+CD56 dim NK με παράλληλη ελάττωση στα CD16-CD56 bright NK κύτταρα (135), κάποιες δεν ανιχνεύουν διαφορές στα NK κύτταρα



(136;137), ενώ κάποιες αναφέρουν ελάττωση στον αριθμό των κυττάρων που εκκρίνουν ιντερφερόνη-γ (136;138).

Εκτός από την αβεβαιότητα σχετικά με τη συμμετοχή ανοσολογικών μηχανισμών στην πρόκληση καθ' έξιν αποβολών, δεν υπάρχει θεραπεία αποδεδειγμένης αξίας για τις καταστάσεις αυτές (139), με συνέπεια τόσο το Αμερικανικό όσο και το Βρετανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων – Γυναικολόγων να μη συνιστούν διερεύνηση και θεραπεία των ασθενών με καθ' έξιν αποβολές για τέτοιους παράγοντες (3;44).

### *Καθ' έξιν αποβολές άγνωστης αιτιολογίας*

Ακόμη και μετά από πλήρη διερεύνηση, σε ένα μεγάλο ποσοστό περιπτώσεων δεν βρίσκεται κανένα αίτιο το οποίο θα μπορούσε να σχετιστεί με την παθογένεση των αποβολών. Το ποσοστό αυτό ανέρχεται γενικά σε 50-70% των περιπτώσεων, ανάλογα με τον ορισμό που δίνεται στις καθ' έξιν αποβολές και τον ορισμό που χρησιμοποιείται κάθε φορά για τα «παραδεκτά» αίτια καθ' έξιν αποβολών (3). Η πρόγνωση σε επόμενη κύηση είναι γενικά καλή σε αυτές τις περιπτώσεις, και η ψυχολογική υποστήριξη του ζεύγους αποτελεί πολύ σημαντικό μέρος της φροντίδας τους. Οι Liddell και συν. συνέκριναν το 1991 την έκβαση της κύησης σε ασθενείς που έλαβαν οργανωμένη συναισθηματική υποστήριξη και παρακολούθηση σε ειδικό Ιατρείο με την έκβαση ασθενών που επέστρεψαν στη κανονική φροντίδα από τον οικογενειακό γιατρό τους και βρήκαν ότι η πιθανότητα επιτυχίας ήταν σημαντικά υψηλότερη στην πρώτη ομάδα από ό,τι στη δεύτερη (86% έναντι 67%) (140)

Η επιτυχία σε επόμενη κύηση ήταν περίπου 70% συνολικά για ασθενείς με  $\geq 3$  αυτόματες εκτρώσεις μετά από απλή υποστηρικτική παρακολούθηση σε εξειδικευμένο Ιατρείο στο Νοσοκομείο St. Mary's του Λονδίνου, φάνηκε δε ότι η έκβαση είναι καλύτερη σε νέες ( $\leq 30$  ετών) ασθενείς με μικρό αριθμό ( $\leq 4$ ) αυτόματων εκτρώσεων, προσεγγίζοντας το 80%, ενώ επιδεινώνεται ταχέως σε γυναίκες  $\geq 40$  ετών (141). Ωστόσο, ακόμη και μετά από  $\geq 6$  προηγούμενες αυτόματες εκτρώσεις, περισσότερες από 45% των γυναικών σημείωσαν επιτυχή κύηση χωρίς θεραπεία (141). Οι πιθανότητες επιτυχίας εμφανίζονται ακόμη υψηλότερες σε παρόμοια σειρά από το Λίβερπουλ, όντας 86% για γυναίκες 25 ετών με 3 αυτόματες εκτρώσεις, 73% για γυναίκες 25 ετών με 3 αυτόματες εκτρώσεις, και επιδεινούμενες σταδιακά με την αύξηση της ηλικίας και του αριθμού των αποβολών σε 42% για γυναίκες 45 ετών με 5



αυτόματες εκτρώσεις. Ένα σημαντικό εύρημα αυτής της μελέτης είναι ότι η πιθανότητα αυτόματης έκτρωσης μειώνεται ταχέως όσο προχωρά η κύηση, από 22% στις 6 εβδομάδες σε 2% στις 8 εβδομάδες και 0.6% στις 10 εβδομάδες κύησης (142). Αρκετές φορές, η έλλειψη ανιχνεύσιμου αιτίου μετά τη διερεύνηση για καθ' ἑξιν αποβολές δημιουργεί άγχος και απογοήτευση στην ασθενή και στον γιατρό της, και συχνά σε τέτοιες περιπτώσεις δημιουργείται πίεση για χορήγηση «εμπειρικών» θεραπειών. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι αυτό δεν είναι απαραίτητο και επομένως θα πρέπει να αποφεύγεται.

Ωστόσο, κάθε επιτυχής κύηση μετά από καθ' ἑξιν αποβολές παραμένει κύηση υψηλού κινδύνου για μαιευτικές επιπλοκές όπως χαμηλό βάρος για την ηλικία κύησης (30% <10<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση), προωρότητα (28%) και περιγεννητικό θάνατο (161/1000), των οποίων οι συχνότητες φαίνονται αρκετά υψηλότερες από τις αναμενόμενες σε ένα γενικό μαιευτικό πληθυσμό (143). Αντίστοιχα στοιχεία από την ομάδα των Tulppala και συν. έδωσαν συχνότητα 20% για καθυστέρηση της εμβρυϊκής ανάπτυξης, 10% για προωρότητα και 23% για παθολογική ανοχή γλυκόζης στην κύηση (59). Οι Jivraj και συν. αναφέρουν συχνότητα πρόωρου τοκετού 13%, χαμηλού βάρους για την ηλικία κύησης 13% και περιγεννητικής θνησιμότητας 2.5% (144).



## Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

---

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η καταγραφή των αιτιολογικών παραγόντων των καθ' ἑξιν αποβολών σε πληθυσμό ασθενών από τη Βορειοδυτική Ελλάδα που διερευνήθηκε στο Ιατρείο Καθ' ἑξιν Αποβολών του ΠΠΓΝΙ και η εξέταση της σχέσης συγκεκριμένων παραγόντων με την αύξηση του κινδύνου για καθ' ἑξιν αποβολές. Εκτός από τις αναπόφευκτες διαφοροποιήσεις στα αποτελέσματα διαφορετικών μελετών, είναι γνωστό ότι πολλοί από τους πιθανούς αιτιολογικούς παράγοντες παρουσιάζουν έντονη γεωγραφική διακύμανση, και η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη καταγραφή τους στον πληθυσμό της ΒΔ Ελλάδας.



## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **Υλικά και μέθοδοι**

---

#### *Ασθενείς και πρωτόκολλο*

Η παρούσα μελέτη έγινε στο Ιατρείο Καθ' Έξιν Αποβολών της Μαιευτικής – Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Το δείγμα περιλάμβανε δύο ομάδες: την ομάδα των ασθενών με καθ' έξιν αποβολές και μία ομάδα ελέγχου.

Οι ασθενείς διερευνήθηκαν με βάση συγκεκριμένο πρωτόκολλο (βλ. παρακάτω) με διαγνωστικό και ερευνητικό σκέλος. Το διαγνωστικό σκέλος περιλάμβανε διερεύνηση για αποδεδειγμένα αίτια καθ' έξιν αποβολών, ενώ στο ερευνητικό σκέλος μελετήθηκε η ύπαρξη πιθανών αλλά μη αποδεδειγμένων αιτιών και έγινε σύγκριση της συχνότητας ανίχνευσής τους μεταξύ των ασθενών και των γυναικών της ομάδας ελέγχου.

#### *Ομάδα ασθενών*

Οι ασθενείς που μελετήθηκαν προέρχονται από το Ιατρείο Καθ' Έξιν Αποβολών της Μαιευτικής – Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Ως καθ' έξιν αποβολές (ΚΕΕ) ορίστηκε η ύπαρξη δύο ή περισσότερων διαδοχικών αποβολών πριν από τις 20 εβδομάδες κύησης.

Πρωτοπαθείς ΚΕΕ ορίστηκαν αυτές οι περιπτώσεις στις οποίες δεν υπήρχε ιστορικό γέννησης τέκνου ή κύησης που προχώρησε περισσότερο από τις 24 εβδομάδες, ενώ δευτεροπαθείς ΚΕΕ ορίστηκαν οι περιπτώσεις αυτές στις οποίες η ασθενής είχε γεννήσει ζωνν τέκνο ή είχε ιστορικό κύησης που προχώρησε περισσότερο από 24 εβδομάδες.

#### *Ομάδα ελέγχου*

Η ομάδα ελέγχου περιέλαβε γυναίκες με δύο ή περισσότερες γεννήσεις ζώντων νεογνών, οι οποίες δεν είχαν ιστορικό αποβολών.



### **Διερεύνηση ασθενών**

Η διερεύνηση των ασθενών έγινε με βάση πρωτόκολλο για τις παρακάτω παθολογικές καταστάσεις:

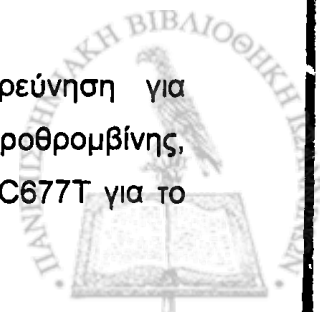
1. Ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας
2. Ενδοκρινολογικές διαταραχές (ανωμαλίες των γεννητικών ορμονών, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, θυρεοειδοπάθεια, υπερπρολακτιναιμία)
3. Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (αντισώματα κατά καρδιολιπίνης, αντιπηκτικό λύκου)
4. Συγγενείς θρομβοφιλίες (έλλειψη πρωτεΐνης S, C, αντιθρομβίνης III, αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C [APC-R], μετάλλαξη G20210A για το γονίδιο της προθρομβίνης, μετάλλαξη Leiden για το γονίδιο του παράγοντα πήξης V, μετάλλαξη C677T για το γονίδιο της μεθυλ-τετραϋδροφυλλικής αναγωγάσης (MTHFR), μετάλλαξη A1299H (R2) του παράγοντα πήξης V και μετάλλαξη A1298C για το γονίδιο της MTHFR)
5. Δραστικότητα του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI) και μετάλλαξη 4G/5G για το γονίδιο του PAI-1
6. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες του ζεύγους

### **Ερευνητικό σκέλος**

Σύμφωνα με την πλέον πρόσφατη οδηγία του Βασιλικού Κολλεγίου Μαιευτήρων – Γυναικολόγων του Ηνωμένου Βασιλείου, αποδεδειγμένα αίτια καθ' ἑξίν αποβολών για τα οποία θα πρέπει να γίνεται διερεύνηση είναι οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες του ζεύγους, ανωμαλίες διάπλασης της μήτρας και το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (αντιπηκτικό λύκου ή/και αντισώματα κατά καρδιολιπίνης). Η διερεύνηση και η χορήγηση αγωγής για αλλοάνοσα αίτια θεωρείται εσφαλμένη πρακτική, ενώ διερεύνηση για ενδοκρινολογικά αίτια προτείνεται εφόσον υπάρχουν κλινικές ενδείξεις.

Το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε προηγουμένως περιλαμβάνει τόσο αποδεδειγμένα αίτια καθ' ἑξίν αποβολών (όπως π.χ. ανωμαλίες διάπλασης της μήτρας ή αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο), όσο και πιθανά αίτια τα οποία δεν έχουν διερευνηθεί ή για τα οποία υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα στη βιβλιογραφία.

Το ερευνητικό σκέλος του πρωτοκόλλου περιλαμβάνει τη διερεύνηση για θρομβοφιλικές μεταλλάξεις (μετάλλαξη G20210A για το γονίδιο της προθρομβίνης, μετάλλαξη Leiden για το γονίδιο του παράγοντα πήξης V, μετάλλαξη C677T για το



γονίδιο της MTHFR, μετάλλαξη A1299H (R2) του παράγοντα πήξης V και μετάλλαξη A1298C για το γονίδιο της MTHFR) και για ανωμαλίες του μηχανισμού πήξης - ινωδόλυσης (δραστικότητα του PAI και πολυμορφισμός 4G/5G για το γονίδιο του PAI-1).

### *Χρωμοσωμικός έλεγχος του ζεύγους*

Για την παρασκευή καρυοτύπου από δείγματα λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος αρχικά προστέθηκαν 6-8 σταγόνες αίματος σε 5ml καλλιεργητικού υλικού, στη συνέχεια φυτοαιμαγλουτινίνη (PHA) για διέγερση των κυττάρων σε συνεχείς κυτταρικές διαιρέσεις και ακολούθησε επώαση των κυττάρων στους 37<sup>0</sup> για 3 24ωρα. Μετά την επώαση ακολούθησε προσθήκη κολχικίνης και αναμονή για 1 ώρα. Ακολούθησε προσθήκη υποτονικού διαλύματος KCL και παραμονή για 10 λεπτά. Μία σταγόνα του κυτταρικού εναιωρήματος προστέθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα, τα κύτταρα στερεώθηκαν με αιθανόλη και οξικό οξύ και στη συνέχεια βάφθηκαν με τεχνική χρώσης κατά Giemsa. Σε ορισμένες περιπτώσεις έγινε χρώση και με τις τεχνικές των C ζωνών, NOR καθώς και χρήση κινακρίνης για αναγνώριση του χρωμοσώματος Y. Οι τελευταίες τεχνικές πραγματοποιήθηκαν όπου η χρώση με Giemsa ήταν ανεπαρκής.

### *Ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας*

Η διερεύνηση για ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας έγινε με διακοιλιακό υπερηχογράφημα (transvaginal scan, TVS) και διαγνωστική υστεροσκόπηση.

Η διαγνωστική υστεροσκόπηση έγινε σε όλες τις περιπτώσεις σε βάση εξωτερικού ιατρού και με φυσιολογικό ορό ως μέσο διάτασης, σύμφωνα με δημοσιευμένο πρωτόκολλο (145).

Ο ανατομικός έλεγχος έγινε σε όλες τις περιπτώσεις μεταξύ της 8<sup>ης</sup> και 12<sup>ης</sup> ημέρας του κύκλου.



## Ενδοκρινολογικές διαταραχές

### Ανωμαλίες των γεννητικών ορμονών

Η αιμοληψία γίνονταν κατά την πρώτη (ημέρα 3-5) και τη δεύτερη (ημέρα 21-23) φάση του κύκλου. Στην αιμοληψία της πρώτης φάσης καθορίζονταν τα επίπεδα της θυλακιοτρόπου (follicle stimulating hormone, FSH) και της ωχρινοτρόπου (luteinising hormone, LH) ορμόνης, της τεστοστερόνης, της φυλοσυνδετικής σφαιρίνης (sex-hormone binding globulin, SHBG) και της προλακτίνης. Στην αιμοληψία της δεύτερης φάσης του κύκλου μετρούνταν η προγεστερόνη ορού.

Η αιμοληψία σε όλες τις περιπτώσεις έγινε μεταξύ 10:00 και 11:00 πμ με την ασθενή νήστι και αφού είχαν δοθεί οδηγίες για αποφυγή καπνίσματος και σεξουαλικής επαφής το προηγούμενο βράδυ, προκειμένου να αποφευχθεί ψευδής αύξηση του επιπέδου της προλακτίνης.

Η μέτρηση των επιπέδων των περισσοτέρων ορμονών έγινε με ανοσομετρική μέθοδο (χημειοφωταύγεια στερεάς φάσης), με αντιδραστήρια διαθέσιμα στο εμπόριο (Immulite, EURO/DPC Ltd., Gwynedd UK). Η αναλυτική ευαισθησία της μεθόδου ήταν 0.1 mIU/ml για την FSH, 0.1 mIU/ml για την LH, 15 pg/ml (55 pmol/l) για την οιστραδιόλη, 0.2 ng/ml για την προγεστερόνη και 15 ng/dl για την ολική τεστοστερόνη.

### Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (polycystic ovarian syndrome, PCOS) απαντά σε 4-12% των γυναικών. Αν και κατά καιρούς έχουν προταθεί διαφορετικά διαγνωστικά κριτήρια, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών γενικά ορίζεται ως παρουσία υπερανδρογοναιμίας (κλινικά και/ή βιοχημικά) και/ή χρόνιας ανωθυλακιορρηξίας επί απουσίας παθολογίας των επινεφριδίων και/ή της υπόφυσης (146). Σύμφωνα με τα αναθεωρημένα κριτήρια που προτάθηκαν από την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Ανθρώπινης Αναπαραγωγής και Εμβρυολογίας (ESHRE), για τη διάγνωση του συνδρόμου απαιτούνται δύο από τα τρία παρακάτω:

- Αραιομηνόρροια ή αμηνόρροια
- Κλινικά και/ή βιοχημικά σημεία υπερανδρογοναιμίας
- Πολυκυστικές ωοθήκες, και επιπλέον
- Αποκλεισμός άλλων αιτιών (συγγενής επινεφριδιακή υπερπλασία, όγκοι εκκρίνοντες ανδρογόνα, σύνδρομο Cushing).



Η διάγνωση του συνδρόμου στις ασθενείς της μελέτης έγινε σύμφωνα με τον παραπάνω ορισμό με βάση το ιστορικό, την κλινική εξέταση, τον εργαστηριακό έλεγχο και το κολπικό υπερογράφημα. Η εργαστηριακή εκτίμηση της υπερανδρογοναιμίας βασίστηκε στο δείκτη ελεύθερων ανδρογόνων (Free Androgen Index, FAI) ο οποίος ορίζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης της ολικής τεστοστερόνης προς τη συγκέντρωση της φυλοσυνδετικής σφαιρίνης.

### Θυρεοειδοπάθεια

Η αρχική διερεύνηση για θυρεοειδοπάθεια έγινε με μέτρηση της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH). Σε περίπτωση παθολογικών τιμών, ο περαιτέρω έλεγχος του θυρεοειδούς γίνονταν με μέτρηση των επιπέδων του ελεύθερου κλάσματος της θυροξίνης (f-T4) και των επιπέδων της τρι-ιωδοθυρονίνης (T3).

Η μέτρηση των επιπέδων των ορμονών έγινε με ανοσομετρική μέθοδο (χημειοφωταύγεια στερεάς φάσης), με αντιδραστήριο διαθέσιμο στο εμπόριο (Immulite, EURO/DPC Ltd., Gwynedd UK). Η αναλυτική ευαισθησία της μεθόδου ήταν 0.004  $\mu\text{IU/ml}$ .

### Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο

Το εργαστηριακό μέρος της διερεύνησης για αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο περιελάμβανε εξέταση για αντιπηκτικό λύκου και αντισώματα κατά καρδιολιπίνης.

Ο έλεγχος για αντιπηκτικό λύκου (lupus anticoagulant, LA) άρχιζε με μέτρηση του χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (activated partial thromboplastin time, aPTT). Σε περίπτωση αυξημένου aPTT ακολουθούσε μίξη 1:1 πλάσματος από την ασθενή με φυσιολογικό ανθρώπινο πλάσμα, και αδυναμία διόρθωσης του aPTT θεωρούνταν ενδεικτική της ύπαρξης κυκλοφορούντος αντιπηκτικού λύκου και όχι έλλειψης κάποιου παράγοντα πήξης.

Η παρουσία αντιπηκτικού λύκου επιβεβαιώνονταν σε πλάσμα πτωχό αιμοπεταλίων με χρήση του χρόνου Russel Viper Venom (diluted Russel viper venom time, DRVVT) (LA1 screening reagent / LA2 confirmation reagent; Dade Behring). Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως λόγος LA1:LA2. Λόγος 1.5-2.0 είναι ενδεικτικός μετρίων επιπέδων LA, ενώ λόγος >2.0 είναι ενδεικτικός της παρουσίας ισχυρού LA.



Τα αντισώματα κατά καρδιολιπίνης (anticardiolipin antibodies, ACL) ανιχνεύονται με ποσοτική, ειδική για τον ισότυπο ELISA στερεάς φάσης.

Σύμφωνα και με τις οδηγίες του RCOG, η εργαστηριακή διάγνωση του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου απαιτούσε δύο θετικά αποτελέσματα με χρονική διαφορά τουλάχιστον έξι εβδομάδων, είτε για το αντιπηκτικό λύκου είτε για αντισώματα αντικαρδιολιπίνης (IgG και/ή IgM, μέτριος ή υψηλός τίτλος).

### *Συγγενείς θρομβοφιλίες*

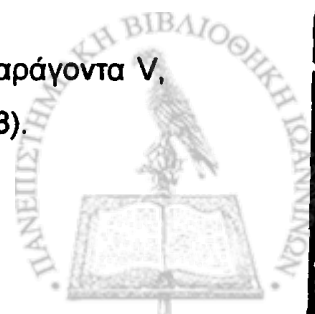
Η ανάλυση για συγγενείς θρομβοφιλίες έγινε με βάση πρωτόκολλο που έχουμε δημοσιεύσει παλαιότερα (147).

Το φλεβικό αίμα που λήφθηκε φυγοκεντρήθηκε σε 2000 g επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να απομονωθεί πλάσμα με σχετικά λίγα αιμοπετάλια. Εν συνεχεία το πλάσμα καταψύχθηκε και αποθηκεύθηκε στους  $-70^{\circ}\text{C}$  ως τη στιγμή της ανάλυσης. Η απομόνωση του DNA από τα δείγματα αίματος έγινε με βάση δημοσιευμένες τεχνικές.

Η δραστηριότητα της **αντιθρομβίνης** και της **πρωτεΐνης C** μετρήθηκε με χρήση χρωμογονικού αντιδραστηρίου (chromogenic assay, Berichrom; Dade-Behring, Marburg, Germany), ενώ η ολική πρωτεΐνη S μετρήθηκε με τη χρήση αντιδραστηρίου πηκτικότητας για την **πρωτεΐνη S** (Protein S; Dade-Behring). Το εύρος των φυσιολογικών τιμών όπως υπολογίστηκε από 150 δείγματα αναφοράς ( $\pm 2$  SD από τη μέση τιμή) ήταν 67-136 για την αντιθρομβίνη, 68-128 για την πρωτεΐνη C και 56-127% για την πρωτεΐνη S. Η απόκριση καθενός από τα κατεψυγμένα δείγματα στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C μετρήθηκε με το αντιδραστήριο Pro APC (Dade-Behring), μετά από αραιώση του πλάσματος σε πλάσμα με έλλειψη παράγοντα V, και εκφράστηκε ως λόγος APC (APC ratio) (λόγος των χρόνων πήξης σε παρουσία και απουσία ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C). Οι τιμές αναφοράς υπολογίστηκαν με βάση 150 δείγματα αναφοράς και ήταν 1.9-2.7. Τιμές  $<1.9$  θεωρήθηκε ότι αντιστοιχούν σε **αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C**.

### *Παράγοντας V Leiden*

Τμήμα μήκους 287 ζευγών βάσεων (base pairs, bp) του γονιδίου του παράγοντα V, στο οποίο περιλαμβάνεται το ζεύγος 1691 G→A, ενισχύθηκε με PCR (148).





Συνολικός όγκος 10 μl γενομικού DNA ενισχύθηκε σε 40 ml μείγματος αντίδρασης (54 μl Tris-HCl, pH 8.8, 5.4 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 5.4 mol/l EDTA 13.3 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.8 mmol/l dNTP, 500 μg από κάθε primer) και 2 IU Taq πολυμεράσης για 39 κύκλους (94°C για 2 λεπτά - 94°C για 1 λεπτό - 58 °C για 1 λεπτό - 72°C για 1 λεπτό), και εν συνεχεία για 5 λεπτά σε ένα τελικό βήμα επέκτασης στους 72°C. Δείγματα όγκου 16 μl από κάθε προϊόν PCR υποβλήθηκαν σε πέψη με 2 IU MnlI επί 4 ώρες στους 37°C. Αυτά τα δείγματα εν συνεχεία διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αραρόζης 2% με βρωμιούχο αιθίδιο (w/v). Ανάλογα με το αλληλίο που περιέχεται, η πέψη των προϊόντων της PCR με το περιοριστικό ένζυμο MnlI δίνει τμήματα 37, 93 και 157 bp για τον άγριο τύπο, 157, 130, 93 και 37 bp για ετεροζυγωτία, και 157 και 130 bp για τον ομόζυγο τύπο.

#### **Ανάλυση για τη μετάλλαξη A1299H (A4070G) του παράγοντα V**

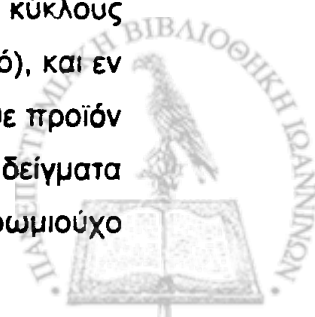
Τμήμα μήκους 877 ζευγών βάσεων (base pairs, bp) του γονιδίου του παράγοντα V, στο οποίο περιλαμβάνεται το ζεύγος A4070G ενισχύθηκε με PCR (149).

Συνολικός όγκος 10 μl γενομικού DNA ενισχύθηκε σε 50 ml μείγματος αντίδρασης (20 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l KCl, 2 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 200 μmol/l dNTPs) που περιείχε 20 pmol από τον κάθε primer (FV exon 13 R2 PCR: forward, 5'-CTCCAGACCT CAGCCACACG-3'; reverse, 5'-GTAGGAGAT GAAGGAGATGGCA-3') και 1 IU Taq πολυμεράσης για 30 κύκλους (94°C για 2 λεπτά, 94°C για 45 δευτερόλεπτα, 50 °C για 45 δευτερόλεπτα, 72°C για 45 δευτερόλεπτα), και εν συνεχεία επωάστηκε για 7 λεπτά στους 72°C. Δείγματα όγκου 16 μl από κάθε προϊόν PCR υποβλήθηκαν σε πέψη με 2 IU RsaI επί 2 ώρες στους 37°C. Αυτά τα δείγματα εν συνεχεία διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αραρόζης 2% με βρωμιούχο αιθίδιο (w/v). Η πέψη των προϊόντων της PCR που περιέχουν το αλληλίο A4070G με το περιοριστικό ένζυμο RsaI δίνει τμήματα 476 και 401.

#### **Ανάλυση για τη μετάλλαξη FII G20210A**

Τμήμα μήκους 345 ζευγών βάσεων (base pairs, bp) του γονιδίου της προθρομβίνης, στο οποίο περιλαμβάνεται το ζεύγος G20210A ενισχύθηκε με PCR (88).

Συνολικός όγκος 40 μl γενομικού DNA ενισχύθηκε σε 40 ml μείγματος αντίδρασης (54 μl Tris-HCl, pH 8.8, 5.4 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 5.4 mol/l EDTA 13.3 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.8 mmol/l dNTP, 500 μg από κάθε primer) και 2 IU Taq πολυμεράσης για 39 κύκλους (94°C για 2 λεπτά - 94°C για 1 λεπτό - 58 °C για 1 λεπτό - 72°C για 1 λεπτό), και εν συνεχεία επωάστηκε για 5 λεπτά στους 72°C. Δείγματα όγκου 16 μl από κάθε προϊόν PCR υποβλήθηκαν σε πέψη με 2 IU HindIII επί 2 ώρες στους 37°C. Αυτά τα δείγματα εν συνεχεία διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αραρόζης 2% με βρωμιούχο



αιθίδιο. Ανάλογα με το αλλήλιο που περιέχεται, η πέψη των προϊόντων της PCR με το περιοριστικό ένζυμο *HindIII* δίνει τμήματα 345 bp για τον άγριο τύπο, 345, 322 και 32 bp για ετεροζυγωτία, και 322 και 23 bp για τον ομόζυγο τύπο.

#### **Ανάλυση για τη μετάλλαξη MTHFR C677T**

Τμήμα μήκους 198 ζευγών βάσεων (base pairs, bp) του γονιδίου της MTHFR, στο οποίο περιλαμβάνεται το ζεύγος C677T ενισχύθηκε με PCR (150).

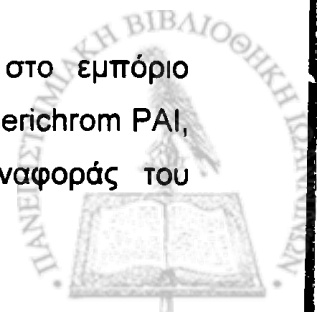
Συνολικός όγκος 10 μl γενομικού DNA ενισχύθηκε σε 40 ml μείγματος αντίδρασης (54 μl Tris-HCl, pH 8.8, 5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 10 mol/l EDTA 13.3 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.8 mmol/l dNTP, 250 μg από κάθε primer) και 2 IU Taq πολυμεράσης για 39 κύκλους (94°C για 2 λεπτά - 94°C για 1 λεπτό - 58 °C για 1 λεπτό - 72°C για 1 λεπτό), και εν συνεχεία για 5 λεπτά στους 72°C. Δείγματα όγκου 16 μl από κάθε προϊόν PCR υποβλήθηκαν σε πέψη με 2 IU *HinfI* επί 2 ώρες στους 37°C. Αυτά τα δείγματα εν συνεχεία διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2% με βρωμιούχο αιθίδιο. Ανάλογα με το αλλήλιο που περιέχεται, η πέψη των προϊόντων της PCR με το περιοριστικό ένζυμο *HinfI* δίνει τμήματα 175,23 και 198 bp για ετεροζυγωτία και 175 και 23 bp για τον ομόζυγο τύπο.

#### **Ανάλυση για τη μετάλλαξη MTHFR A1298C**

Κάθε ένα από τα δείγματα του γενομικού DNA ενισχύθηκε σε 44 μl μείγματος αντίδρασης (5 μL 10x ρυθμιστικό διάλυμα Stoffel [100 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, pH 8.3], 5 μL 10x MgCl<sub>2</sub> [25 mM], 26 μL απεσταγμένο και απιονισμένο ύδωρ, 2 μL dNTP [τελική συγκέντρωση, 200 μM]) και 0.25 μL Taq πολυμεράσης, αρχικά για 5 λεπτά στους 94°C, εν συνεχεία για ακόμη 30 κύκλους στους 94°C, για 30 δευτερόλεπτα στους 50°C, και για ένα δεύτερο κύκλο επέκτασης στους 72°C επί 30 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε μία τελική περίοδος επέκτασης του DNA επί 5 λεπτά στους 72°C. Δείγματα από τα προϊόντα που προέκυψαν υποβλήθηκαν σε πέψη με 0.2 IU *MbolI* και στη συνέχεια διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2% με βρωμιούχο αιθίδιο. Η ανίχνευση των θραυσμάτων που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση έγινε με χρήση υπεριώδους φωτισμού (151).

#### **Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου**

Η δραστικότητα του PAI μετρήθηκε με χρήση ενός διαθέσιμου στο εμπόριο αντιδραστηρίου, το οποίο βασίζεται στην αναστολή της ουροκινάσης (Berichrom PAI, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany). Οι τιμές αναφοράς του



αντιδραστηρίου κυμαίνονταν μεταξύ 0.3 και 3.5 U/ml ( $10^0$  and  $90^0$  εκατοστιαία θέση αντίστοιχα) με διάμεση τιμή 1.1 U/ml.

Ο πολυμορφισμός 4G/5G του γονιδίου του PAI-1 αναλύθηκε με PCR. Η νουκλεοτιδική ακολουθία των primers ήταν 5'-CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-3' και 5'-CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3'. Τα παραγόμενα θραύσματα είχαν μήκος 100 (5G) ή 99 (4G) bp. Η πέψη με περιοριστικό ένζυμο έγινε με επώαση 20 μl των προϊόντων της PCR για 3 hours στους 55 °C με 3U του ενζύμου *Bst* I (New England Biolabs (UK) Ltd, Herts, UK). Τα θραύσματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης 4% (Metaphor Agarose, FMC Bio Product, Rockland, USA) και εξετάστηκαν μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (Gel Star Nucleic Acid Gel Stain, FMC Bio Product, Rockland, USA) με υπεριώδη καταυγασμό. Το αλλήλιο που κωδικοποιεί για το 4G δίνει θραύσματα 99 bp, το αλλήλιο που κωδικοποιεί για το 5G δίνει θραύσματα 77 και 23 bp, και το αλλήλιο που κωδικοποιεί για το 4G/5G δίνει θραύσματα 99, 77 και 23 bp.

### Στατιστική ανάλυση

Η μέση (mean) και η διάμεση (median) τιμή χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή συνεχών μεταβλητών. Οι παρατηρούμενες συχνότητες μαζί με το 95% διάστημα εμπιστοσύνης τους (confidence interval, CI) χρησιμοποιήθηκαν για κατηγορικές μεταβλητές που ακολουθούν τη διωνυμική κατανομή. Η κανονικότητα της κατανομής συνεχών μεταβλητών ελέγχθηκε με τη δοκιμασία Kolmogorov – Smirnov. Η σύγκριση συνεχών μεταβλητών μεταξύ των ομάδων έγινε με παραμετρικές (t test for independent samples) ή μη παραμετρικές μεθόδους (Mann – Whitney U test). Η σύγκριση της κατανομής κατηγορικών μεταβλητών μεταξύ των ομάδων έγινε με  $\chi^2$  ή Fisher's test. Εναλλακτικά, η κατανομή κατηγορικών μεταβλητών στις δύο ομάδες συγκρίθηκε με χρήση του λόγου αναλογιών (odds ratio, OR).

Η ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της δραστηριότητας του PAI και των παραγόντων πήξης έγινε με την τεχνική της γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression). Η κανονική κατανομή των υπολοίπων και η γραμμική συσχέτιση μεταξύ αναμενόμενων – παρατηρούμενων τιμών χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της εγκυρότητας του μοντέλου.



## Αποτελέσματα

---

### Γενικά

#### A. Ομάδα ασθενών

Μελετήθηκαν 120 ασθενείς με 2 ή περισσότερες αποβολές σε ηλικία κύησης <20 εβδομάδων. Η μέση ηλικία των γυναικών αυτών ήταν 32.2 έτη (SD 4.7 έτη).

Λίγο περισσότερες από τις μισές ασθενείς (56%, N=66) είχαν δύο συνεχόμενες αποβολές, 34 ασθενείς (28%) είχαν τρεις, 13 ασθενείς (11%) είχαν 4, ενώ οι υπόλοιπες (5%) είχαν περισσότερες από 4 αποβολές. Στη μεγάλη τους πλειοψηφία (115/120) οι ασθενείς είχαν αυτόματες εκτρώσεις αποκλειστικά <15 εβδομάδων.

Σε 95 περιπτώσεις (79%) οι αποβολές ήταν πρωτοπαθείς, ενώ στις υπόλοιπες (21%) ήταν δευτεροπαθείς.

#### B. Ομάδα ελέγχου

Η ομάδα ελέγχου περιέλαβε 107 γυναίκες με 2 ή περισσότερες γεννήσεις ζώντων νεογνών με αρνητικό ιστορικό για αυτόματες εκτρώσεις.

Η μέση ηλικία των γυναικών της ομάδας ελέγχου ήταν 32.2 έτη (SD 5.1 έτη), και δεν διέφερε σημαντικά από εκείνη των ασθενών (t-test, p=0.99).

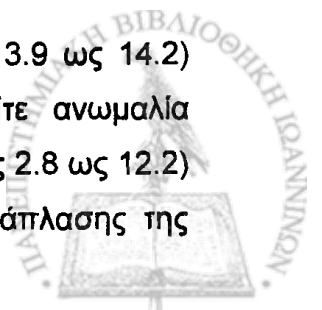
### ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΣΚΕΛΟΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

Τα ευρήματα του διαγνωστικού σκέλους της διερεύνησης παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 1.

#### 1. Ανατομικές ανωμαλίες

Το 90% των ασθενών με καθ' ἑξίν αποβολές παρουσίασε φυσιολογική υστεροσκοπική εικόνα.

Οι υπόλοιπες 11 ασθενείς (9%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 3.9 ως 14.2) παρουσίαζαν κάποια παθολογική υστεροσκοπική εικόνα, είτε ανωμαλία διάπλασης της μήτρας (N=9, 7.5%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 2.8 ως 12.2) είτε συμφύσεις (N=2, 1.5%). Από τις συγγενείς ανωμαλίες διάπλασης της



μήτρας, μία περίπτωση αφορούσε σε μονόκερω, τρεις σε δίκερω μήτρα και οι υπόλοιπες πέντε σε ενδομήτριο διάφραγμα.

Επιπλέον, 5 ασθενείς (4%) παρουσίασαν ευρήματα ήσσονος ή αμφίβολης σημασίας στην υστεροσκόπηση (πολύποδας= 4, μικρό μέγεθος μήτρας=1), τα οποία δεν θεωρείται ότι σχετίζονται με καθ' ἑξίν αποβολές.

## \*2. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες του ζεύγους

Σε 2 από τα ζεύγη (1.6%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.0 ως 3.9) βρέθηκαν ισοζυγισμένες μεταθέσεις (σε 1 περίπτωση στη γυναίκα και στην άλλη στον άνδρα). Στην πρώτη περίπτωση επρόκειτο για μετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 16 και 17 (46XX t(16;17)(p11;p11)), ενώ στη δεύτερη επρόκειτο για μετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 13 και 14 σε 3 από τις 13 μεταφάσεις που μελετήθηκαν. Σε 4 ακόμη περιπτώσεις βρέθηκαν μικροδορυφόροι, κυρίως του χρωμοσώματος 21, τα ευρήματα αυτά όμως θεωρούνται φυσιολογική παραλλαγή.

## 3. Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο

Έξι ασθενείς (5.0%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 1.1 ως 8.9) είχαν εργαστηριακά ευρήματα αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου. Από αυτές οι 2 είχαν αντιπηκτικό λύκου ενώ οι υπόλοιπες 4 αντισώματα κατά καρδιολιπίνης.

## 4. Συγγενείς θρομβοφιλίες (έλλειψη αντιπηκτικών παραγόντων)

Τρεις ασθενείς (2.5%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.0 ως 5.2) εμφάνισαν ελαττωμένη συγκέντρωση πρωτεΐνης S.

## 5. Ενδοκρινολογικές διαταραχές

Τέσσερις ασθενείς (3.5%) παρουσίασαν εικόνα συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών. Μία ασθενής έπασχε από κλινικό υπερθυρεοειδισμό και ο εργαστηριακός έλεγχος ήταν ενδεικτικός πλημμελούς ρύθμισης. Σε μία περίπτωση διαγνώστηκε πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια και η ασθενής παραπέμφθηκε στο αντίστοιχο Ιατρείο.

## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΣΚΕΛΟΣ

### 1. Θρομβοφιλικές μεταλλάξεις στο σύνολο των ασθενών

Οι σχετικές συχνότητες για τις διάφορες θρομβοφιλικές μεταλλάξεις στις ασθενείς και στις γυναίκες της ομάδας ελέγχου φαίνονται στον Πίνακα 2.



## A. Σύγκριση μεταξύ ασθενών – ομάδας ελέγχου

### **Παράγοντας V Leiden**

Η κατανομή των αλληλόμορφων για τον παράγοντα V Leiden δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα στην ομάδα των ασθενών και στην ομάδα ελέγχου (Fisher's Exact test,  $p=0.725$ ). Η παρουσία της μετάλλαξης δεν φάνηκε να αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα καθ' ἑξιν αποβολών (OR 1.59, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.37 ως 6.82).

### **Πολυμορφισμός A1299H (A4070G) του παράγοντα V (απλότυπος HR2)**

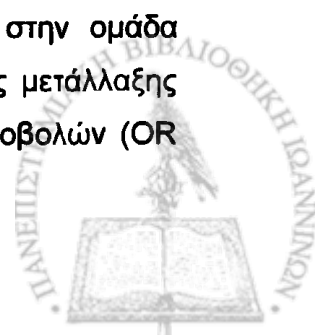
Η κατανομή των αλληλόμορφων για τον πολυμορφισμό A1299H διέφερε σημαντικά μεταξύ της ομάδας των ασθενών και της ομάδας ελέγχου (Pearson's Chi square test,  $p=0.0015$ ). Περίπου 1/4 των γυναικών της ομάδας ελέγχου ήταν ετερόζυγες και 2% ήταν ομόζυγες για τον πολυμορφισμό, ενώ μόνο 10% των ασθενών ήταν ετερόζυγες και δεν υπήρχαν περιπτώσεις ομοζυγωτίας.

### **Μετάλλαξη G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης (FII G20210A)**

Η κατανομή των αλληλόμορφων για τη μετάλλαξη FII G20210A δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα στην ομάδα των ασθενών και στην ομάδα ελέγχου (Fisher's Exact test,  $p=0.452$ ). Η παρουσία της μετάλλαξης δεν φάνηκε να αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα καθ' ἑξιν αποβολών (OR 2.38, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.45 ως 12.55).

### **Πολυμορφισμός C677T του γονιδίου της MTHFR (MTHFR C677T)**

Η κατανομή των αλληλόμορφων για τον πολυμορφισμό MTHFR C677T δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα στην ομάδα των ασθενών και στην ομάδα ελέγχου (Pearson's Chi square test,  $p=0.430$ ). Η παρουσία της μετάλλαξης δεν φάνηκε να αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα καθ' ἑξιν αποβολών (OR 1.03, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.46 ως 2.31).



### **Πολυμορφισμός A1298C του γονιδίου της MTHFR (MTHFR A1298C)**

Η κατανομή των αλληλόμορφων για τον πολυμορφισμό MTHFR A1298C δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα στην ομάδα των ασθενών και στην ομάδα ελέγχου (Pearson's Chi square test,  $p=0.730$ ). Η παρουσία της μετάλλαξης δεν φάνηκε να αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα καθ' ἑξιν αποβολών (OR 1.06, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.34 ως 3.29).

### **Τουλάχιστον μία θρομβοφιλική μετάλλαξη**

Για τη συγκεκριμένη ανάλυση, ο ορισμός της (κλινικά σημαντικής) μετάλλαξης ήταν διαφορετικός για κάθε πολυμορφισμό, ανάλογα με τη δυνατότητα του κάθε απλότυπου να προδιαθέτει σε θρόμβωση.

Για τις περιπτώσεις των Factor V Leiden και FII G20210A θεωρήθηκε (κλινικά σημαντική) μετάλλαξη τόσο η ομοζυγωτία όσο και η ετεροζυγωτία για τον πολυμορφισμό, ενώ για τις περιπτώσεις των MTHFR C677T, MTHFR A1268C και FV HR2 (A1299H) θεωρήθηκε (κλινικά σημαντική) μετάλλαξη μόνο η ομόζυγη μορφή για τον πολυμορφισμό.

Με βάση τον παραπάνω ορισμό, η συχνότητα παρουσίας τουλάχιστον μίας θρομβοφιλικής μετάλλαξης δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου (Pearson's Chi square test,  $p=0.867$ )

### **Συνδυασμός θρομβοφιλικών μεταλλάξεων**

Συνδυασμός θεωρήθηκε η ύπαρξη δύο ή περισσότερων από τις παραπάνω μεταλλάξεις.

Με βάση τον παραπάνω ορισμό, η συχνότητα παρουσίας συνδυασμού δύο ή περισσότερων θρομβοφιλικών μεταλλάξεων δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου (Pearson's Chi square test,  $p=0.682$ )

### **B. Σύγκριση μεταξύ ασθενών με 2 και ασθενών με >2 αποβολές**

Η κατανομή των μεταλλάξεων παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.



### **Παράγοντας V Leiden**

Η συχνότητα παρουσίας του παράγοντα V Leiden (ετερόζυγος ή ομόζυγος τύπος) δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα στις ομάδες των ασθενών με 2 και με >2 αποβολές (Pearson's Chi square test,  $p=1.000$ ).

### **Πολυμορφισμός A1299H (A4070G) του παράγοντα V (απλότυπος HR2)**

Η συχνότητα παρουσίας της μετάλλαξης R2 (A1299H) του παράγοντα V (ετερόζυγος ή ομόζυγος τύπος) δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα στις ομάδες των ασθενών με 2 και με >2 αποβολές (Fisher's Exact test,  $p=0.179$ ). Λόγω της απουσίας ομόζυγων περιπτώσεων στην ομάδα των ασθενών είναι αδύνατη η στατιστική ανάλυση για την ομοζυγωτία.

### **Μετάλλαξη G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης (FII G20210A)**

Η συχνότητα παρουσίας της μετάλλαξης FII G20210A (ετερόζυγος ή ομόζυγος τύπος) δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα στις ομάδες των ασθενών με 2 και με >2 αποβολές (Fisher's Exact test,  $p=0.657$ ).

### **Πολυμορφισμός C677T του γονιδίου της MTHFR (MTHFR C677T)**

Η συχνότητα της ομοζυγωτίας για τον πολυμορφισμό MTHFR C677T δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα στις ομάδες των ασθενών με 2 και με >2 αποβολές (Pearson's Chi square test,  $p=1.000$ ).

### **Πολυμορφισμός A1298C του γονιδίου της MTHFR (MTHFR A1298C)**

Η συχνότητα της ομοζυγωτίας για τον πολυμορφισμό MTHFR A1298C δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα στις ομάδες των ασθενών με 2 και με >2 αποβολές (Pearson's Chi square test,  $p=0.294$ ).

### **Τουλάχιστον μία θρομβοφιλική μετάλλαξη**

Για τη συγκεκριμένη ανάλυση, ο ορισμός της (κλινικά σημαντικής) μετάλλαξης ήταν διαφορετικός για κάθε πολυμορφισμό, ανάλογα με τη δυνατότητα του κάθε απλότυπου να προδιαθέτει σε θρόμβωση.





Για τις περιπτώσεις των Factor V Leiden και FII G20210A θεωρήθηκε (κλινικά σημαντική) μετάλλαξη τόσο η ομοζυγωτία όσο και η ετεροζυγωτία για τον πολυμορφισμό, ενώ για τις περιπτώσεις των MTHFR C677T, MTHFR A1268C και FV HR2 (A1299H) θεωρήθηκε (κλινικά σημαντική) μετάλλαξη μόνο η ομόζυγη μορφή για τον πολυμορφισμό.

Με βάση τον παραπάνω ορισμό, η συχνότητα παρουσίας τουλάχιστον μίας θρομβοφιλικής μετάλλαξης δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ασθενών με 2 και εκείνων με >2 αποβολές (Pearson's Chi square test,  $p=0.756$ )

### **Συνδυασμός θρομβοφιλικών μεταλλάξεων**

Συνδυασμός θεωρήθηκε η ύπαρξη δύο ή περισσότερων από τις παραπάνω μεταλλάξεις.

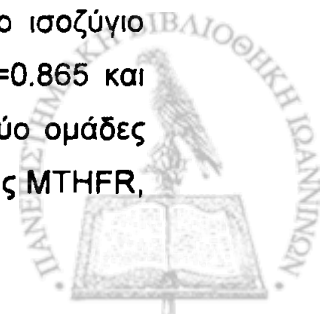
Με βάση τον παραπάνω ορισμό, η συχνότητα παρουσίας συνδυασμού δύο ή περισσότερων θρομβοφιλικών μεταλλάξεων δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ασθενών με 2 και εκείνων με >2 αποβολές (Fisher's exact test,  $p=0.125$ ), αν και όλες οι περιπτώσεις συνδυασμένων θρομβοφιλικών μεταλλάξεων καταγράφηκαν σε ασθενείς με 2 αυτόματες εκτρώσεις.

## **2. Θρομβοφιλικές μεταλλάξεις σε ασθενείς με ιδιοπαθείς καθ' ἑξιν αποβολές**

Η ανάλυση για τις θρομβοφιλικές μεταλλάξεις επαναλήφθηκε αποκλειστικά για τις ασθενείς με ιδιοπαθείς καθ' ἑξιν αποβολές, όταν αποκλείστηκαν δηλαδή οι περιπτώσεις εκείνες με αποδεδειγμένα αίτια καθ' ἑξιν αποβολών.

Διαθέσιμα στοιχεία για τον παράγοντα V Leiden υπήρχαν σε 99 ασθενείς και 102 γυναίκες ελέγχου, για τη μετάλλαξη FII G20210A σε 99 ασθενείς και 101 γυναίκες ελέγχου, για τη μετάλλαξη MTHFR C677T σε 97 ασθενείς και 102 γυναίκες ελέγχου, και για τις μεταλλάξεις FV A1299H και MTHFR A1298C σε 88 ασθενείς και 90 γυναίκες ελέγχου. Διαθέσιμα στοιχεία για όλες τις μεταλλάξεις υπήρχαν σε 88 ασθενείς και 88 γυναίκες ελέγχου (Πίνακας 4).

Τόσο οι ασθενείς όσο και η ομάδα ελέγχου βρέθηκε ότι ακολουθούν το ισοζύγιο Hardy-Weinberg στην περίπτωση των μεταλλάξεων Factor V Leiden ( $p=0.865$  και  $0.797$  αντίστοιχα) FII G20210A ( $p=0.866$  και  $0.785$  αντίστοιχα). Και οι δύο ομάδες αποκλίνουν από το ισοζύγιο για τους δύο πολυμορφισμούς του γονιδίου της MTHFR,



τον C677T ( $p=0.0002$  and  $0.0015$ ) και τον A1298C ( $p=0.0128$  and  $0.0056$ ), καθώς και για τον πολυμορφισμό A1299H του γονιδίου του παράγοντα V ( $p=0.0128$  and  $0.0056$ ).

Η συσχέτιση της κάθε μίας από τις θρομβοφιλικές μεταλλάξεις με τον κίνδυνο για καθ' ἑξιν αποβολές απεικονίζεται στο Σχήμα 1 με την μορφή του λόγου αναλογιών (odds ratio, OR).

### ***Παράγοντας V Leiden***

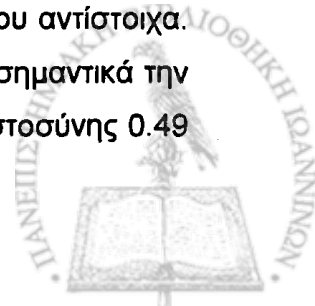
Στο δείγμα της μελέτης μας δεν υπήρξε καμία περίπτωση ομοζυγωτίας για τον παράγοντα V Leiden. Η συχνότητα του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου (A) ήταν 2.5% (95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.0 ως 4.7) και 1.5% (95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.0 ως 3.1) στις ασθενείς και στις γυναίκες ελέγχου, αντίστοιχα. Η φορεία για τον παράγοντα V Leiden δεν βρέθηκε να αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα καθ' ἑξιν αποβολών (OR 1.75, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.41 ως 7.55).

### ***Πολυμορφισμός R2 (A1299H) του παράγοντα V***

Δύο γυναίκες στην ομάδα ελέγχου ήταν ομόζυγες και 23 ετερόζυγες, ενώ καμία ασθενής δεν ήταν ομόζυγη και 10 ήταν ετερόζυγες για αυτή τη μετάλλαξη. Η συχνότητα του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου (G) ήταν 5.7% (95% διάστημα εμπιστοσύνης 2.2 ως 9.1) και 15.0% (95% διάστημα εμπιστοσύνης 9.8 ως 20.2) στις ασθενείς και στις γυναίκες ελέγχου, αντίστοιχα. Ο επιπολασμός του ομόζυγου γονότυπου (GG) δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα στις ασθενείς και στις γυναίκες ελέγχου (Fisher's exact test,  $p=0.2113$ ).

### ***Μετάλλαξη G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης (FII G20210A)***

Δύο γυναίκες στην ομάδα ελέγχου και πέντε ασθενείς ήταν ετερόζυγες για αυτή τη μετάλλαξη. Η συχνότητα του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου ήταν 2.5% (95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.0 ως 4.7) και 1.0% (95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.0 ως 2.4), στις ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου αντίστοιχα. Η φορεία για τον παράγοντα V Leiden δεν βρέθηκε να αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα καθ' ἑξιν αποβολών (OR 2.63, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.49 ως 13.90).



### ***Πολυμορφισμός C677T του γονιδίου της MTHFR (MTHFR C677T)***

Δώδεκα ασθενείς και 13 γυναίκες στην ομάδα ελέγχου ήταν ομόζυγες και 61 ασθενείς και 57 γυναίκες στην ομάδα ελέγχου ήταν ετερόζυγες για τον πολυμορφισμό. Η συχνότητα του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου (T) ήταν 43.8% (95% διάστημα εμπιστοσύνης 36.8 ως 50.8) και 40.7% (95% διάστημα εμπιστοσύνης 33.9 ως 47.4) στις ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου αντίστοιχα. Ομοζυγωτία για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (TT) δεν βρέθηκε να αυξάνει την πιθανότητα καθ' ἑξιν αποβολών (OR 0.97, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.42 ως 2.24).

### ***Πολυμορφισμός A1298C του γονιδίου της MTHFR (MTHFR A1298C)***

Επτά ασθενείς και 13 γυναίκες στη ομάδα ελέγχου ήταν ομόζυγες και 61 ασθενείς και 57 γυναίκες στην ομάδα ελέγχου ήταν ετερόζυγες για τον πολυμορφισμό. Η συχνότητα του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου (C) ήταν 28.9% (95% διάστημα εμπιστοσύνης 22.2, ως 35.7) και 28.3% (95% διάστημα εμπιστοσύνης 21.7 ως 34.9) στις ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου αντίστοιχα. Ομοζυγωτία για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (CC) δεν βρέθηκε να αυξάνει την πιθανότητα καθ' ἑξιν αποβολών (OR 1.21, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.39 ως 3.75).

### ***Συνδυασμός θρομβοφιλικών μεταλλάξεων***

Διαθέσιμα στοιχεία και για τις 5 μεταλλάξεις υπήρχαν σε 88 ασθενείς και 88 γυναίκες της ομάδας ελέγχου. Δύο από τις ασθενείς ήταν φορείς για τον παράγοντα V Leiden και ομόζυγες για τον πολυμορφισμό MTHFR A1298C, μία ήταν φορέας για τον παράγοντα V Leiden και ομόζυγη για τον MTHFR C677T και μία ήταν φορέας για τον FII G20210A και ομόζυγη για τον MTHFR C677T. Δύο γυναίκες στην ομάδα ελέγχου ήταν ομόζυγες ταυτόχρονα για τους πολυμορφισμούς FV A1299H και MTHFR C677T. Ο επιπολασμός συνδυασμένης θρομβοφιλίας (4/88 έναντι 2/88) δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων ( $\chi^2$  test,  $p=0.406$ ). Όταν στην ανάλυση περιλήφθηκαν και οι ετερόζυγες περιπτώσεις για τις ελάχιστονες μεταλλάξεις (MTHFR A1298C και FV A1299H), 35/88 ασθενείς και 45/88 γυναίκες της



ομάδας ελέγχου ήταν τουλάχιστον ετερόζυγες για δύο ή περισσότερους πολυμορφισμούς (OR 0.66, 95% CI 0.36, 1.19).

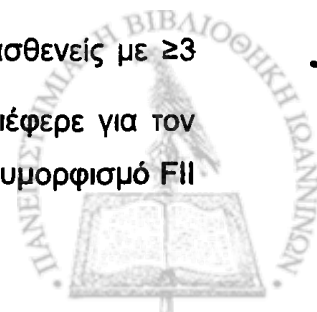
Όσον αφορά στην ύπαρξη στο ίδιο άτομο διαφορετικών μεταλλάξεων του ίδιου γονιδίου, μία ασθενείς και πέντε από τις γυναίκες της ομάδας ελέγχου ήταν ταυτόχρονα ομόζυγες για τον MTHFR C677T και ετερόζυγες για τον MTHFR A1298C, και δύο ασθενείς και τρεις γυναίκες από την ομάδα ελέγχου ήταν ομόζυγες για τον A1298C και ετερόζυγες για τον C677T. Εικοσιπέντε ασθενείς και 22 γυναίκες από την ομάδα ελέγχου ήταν ετερόζυγες ταυτόχρονα για τους δύο παραπάνω πολυμορφισμούς ( $\chi^2$  test,  $p=0.609$ ). Δεν βρέθηκε καμία περίπτωση συνδυασμένης ομοζυγωτίας ταυτόχρονα για τον MTHFR C77T και τον A1298C σε καμία από τις ομάδες. Καμία από τις ασθενείς που ήταν φορέας για τον παράγοντα V Leiden δεν ήταν ταυτόχρονα φορέας για τον πολυμορφισμό FV A1299H. Μία από τις γυναίκες της ομάδας ελέγχου που ήταν φορέας για τον παράγοντα V Leiden ήταν ταυτόχρονα φορέας για τον πολυμορφισμό FV A1299H.

#### ***Θρομβοφιλία και ηλικία κύησης κατά την αυτόματη έκτρωση***

Ογδόντα δύο ασθενείς είχαν αυτόματες εκτρώσεις πριν από τις 10 εβδομάδες κύησης και 17 ασθενείς είχαν τουλάχιστον μία από τις δύο ή τουλάχιστον δύο από τις τρεις ή περισσότερες αυτόματες εκτρώσεις μετά από τις 10 εβδομάδες. Όλες οι φορείς του παράγοντα V Leiden και του πολυμορφισμού FII G20210A καθώς και όλες οι ομόζυγες ασθενείς για τον MTHFR C677T είχαν αυτόματες εκτρώσεις πριν από τις 10 εβδομάδες. Μία από τις επτά ομόζυγες ασθενείς για τον πολυμορφισμό MTHFR A1298C είχε αυτόματες εκτρώσεις μετά τις 10 εβδομάδες. Και οι τέσσερις ασθενείς με συνδυασμένες θρομβοφιλικές μεταλλάξεις είχαν αποβολές πριν από τις 10 εβδομάδες. Ωστόσο οι διαφορές αυτές δεν απέβησαν στατιστικά σημαντικές λόγω του μικρού μεγέθους της υπο-ομάδας με αυτόματες εκτρώσεις μετά τις 10 εβδομάδες κύησης.

#### ***Σύγκριση μεταξύ δύο και $\geq 3$ αυτομάτων εκτρώσεων***

Όταν ασθενείς με δύο αυτόματες εκτρώσεις συγκρίθηκαν με ασθενείς με  $\geq 3$  αυτόματες εκτρώσεις, η κατανομή των πολυμορφισμών δεν διέφερε για τον παράγοντα V Leiden (Fisher's exact test,  $p=1.000$ ) για τον πολυμορφισμό FII



- G20210A (Fisher's exact test,  $p=0.652$ ) και για τον πολυμορφισμό MTHFR C677T ( $\chi^2$  test,  $p=0.869$ ). Ο ομόζυγος (CC) γονότυπος για τον πολυμορφισμό MTHFR A1298C ήταν συχνότερος σε ασθενείς με δύο από ό,τι σε ασθενείς με  $\geq 3$  αυτόματες εκτρώσεις (Fisher's exact test,  $p=0.017$ ). Στατιστικοί υπολογισμοί δεν ήταν δυνατό να γίνουν για τον πολυμορφισμό FV A1299H καθώς δεν υπήρχε καμία ομόζυγη περίπτωση στις ασθενείς. Τέσσερις από τις 50 γυναίκες με δύο αυτόματες εκτρώσεις είχαν δύο ή περισσότερους
- πολυμορφισμούς ταυτόχρονα, ενώ καμία από τις γυναίκες με  $\geq 3$  αυτόματες εκτρώσεις δεν είχε συνδυασμένη θρομβοφιλία.

### 3. Ενεργότητα και πολυμορφισμός του PAI

Στοιχεία για την ενεργότητα του PAI και τον πολυμορφισμό PAI-1 4G/5G υπήρχαν για 93 ασθενείς με ανεξήγητες καθ' έξιν αποβολές και 92 γυναίκες ελέγχου (Πίνακας 5).

Η κατανομή των γονοτύπων για τον πολυμορφισμό 4G/5G διέφερε σημαντικά μεταξύ της ομάδας των ασθενών και της ομάδας ελέγχου (Pearson's Chi square test,  $p=0.01$ ). Περίπου 23% των γυναικών της ομάδας ελέγχου ήταν ομόζυγες για το αλληλόμορφο 4G, ενώ μόνο 9% των ασθενών ήταν αντίστοιχα ομόζυγες (Pearson's Chi square test,  $p=0.014$ ).

Ωστόσο, η μέση ενεργότητα του PAI δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα στις δύο ομάδες (Welsch's test for non-equal variances,  $p=0.61$ ).

Η πιθανή συσχέτιση της ενεργότητας του PAI με την ηλικία, τον αριθμό των αποβολών, τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης C, της πρωτεΐνης S και της αντιθρομβίνης III και τον απλότυπο για τον 4G/5G διερευνήθηκε με την τεχνική της γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression). Βρέθηκε ότι μόνο η ομοζυγωτία 4G/4G, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης C και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης S συσχετίζονται με την ενεργότητα του PAI σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{Ενεργότητα PAI} = -2.179 + 0.053*(\text{Prot.C}) + (4\text{G}/4\text{G})^1 - 0.013*(\text{Prot.S})$$

<sup>1</sup>Για την εξίσωση τίθεται 1 αν 4G/4G και 0 αν 4G/5G ή 5G/5G

- Το μοντέλο αυτό ερμηνεύει το 32% της διακύμανσης της ενεργότητας του PAI.
- Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης C από μόνη της ερμηνεύει το 22%.



## Πίνακες

**Πίνακας 1.** Συνοπτική παρουσίαση των ευρημάτων του *διαγνωστικού* σκέλους της διερεύνησης

	N	%	95% διάστημα εμπιστοσύνης
<b>Ανατομικά αίτια</b>	<b>11</b>	<b>9.0</b>	<b>3.9 ως 14.2%</b>
Ανωμαλίες διάπλασης της μήτρας	9	7.5	2.8 ως 12.2
Ενδομήτριες συμφύσεις	2	1.7	0.0 ως 3.9
<b>Χρωμοσωμικές ανωμαλίες ζεύγους</b>	<b>2</b>	<b>1.6</b>	<b>0.0 ως 3.9%</b>
<b>Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο</b>	<b>6</b>	<b>5.0</b>	<b>1.1 ως 8.9%</b>
Αντιπηκτικό λύκου	2	1.7	0.0 ως 3.9
Αντισώματα κατά καρδιολιπίνης	4	3.3	0.0 ως 6.5
<b>Συγγενείς θρομβοφιλίες</b>	<b>3</b>	<b>2.5</b>	<b>0.0 ως 5.3%</b>
Έλλειψη πρωτεΐνης S	3	2.5	
<b>Ενδοκρινολογικές διαταραχές</b>	<b>4</b>	<b>3.3</b>	<b>0.0 ως 6.5%</b>



**Πίνακας 2.** Συχνότητα των θρομβοφιλικών πολυμορφισμών στο σύνολο των ασθενών και σε ομάδα ελέγχου

	<u>Ασθενείς (N=120)</u>	<u>Ομάδα ελέγχου (N=107)</u>
<b>Πολυμορφισμός</b>	<b>N (% και 95% διάστημα εμπιστοσύνης)</b>	<b>N (% και 95% διάστημα εμπιστοσύνης)</b>
<b>Factor V Leiden</b>		
Ομοζυγωτία	0	0
Ετεροζυγωτία	5 (4.5%, 0.6 ως 8.4%)	3 (2.9%, 0.0 to 6.2%)
Άγριος τύπος	105 (95.5%, 91.6 ως 99.3%)	99 (97.1%, 93.8 to 100.0%)
<b>Factor V HR2 (A1299H)</b>		
Ομοζυγωτία	0	2 (2.2%, 0.0 ως 5.3%)
Ετεροζυγωτία	10 (10.3%, 4.2 ως 16.4%)	23 (25.5%, 16.5 to 34.5%)
Άγριος τύπος	87 (89.7%, 83.6 ως 95.7%)	65 (72.2%, 62.9 to 81.5%)
<b>Factor II G20210A</b>		
Ομοζυγωτία	0	
Ετεροζυγωτία	5 (4.5%, 0.6 ως 8.4%)	2 (2.0%, 0.0 to 4.7%)
Άγριος τύπος	105 (95.5%, 91.6 ως 99.3%)	99 (98.0%, 95.3 to 100.0%)
<b>MTHFR C677T</b>		
Ομοζυγωτία	14 (13.0%, 6.6 ως 19.3%)	13 (12.6%, 6.1 to 19.0%)
Ετεροζυγωτία	69 (63.9%, 54.8 ως 72.9%)	57 (55.9%, 46.2 to 65.5%)
Άγριος τύπος	25 (23.1%, 15.1 ως 31.0%)	32 (31.4%, 22.3 to 40.4%)
<b>MTHFR A1298C</b>		
Ομοζυγωτία	8 (8.2%, 2.8 ως 13.7%)	6 (6.6%, 1.5 to 11.8%)
Ετεροζυγωτία	41 (42.2 %, 32.4 ως 52.1%)	39 (43.3%, 33.1 to 53.6%)
Άγριος τύπος	48 (49.5%, 39.5 ως 59.4%)	45 (50.0%, 39.7 to 60.3%)
<b>&gt;1 μετάλλαξη<sup>1,3</sup></b>	4 (4.1%, 0.0 ως 8.1%)	2 (2.3%, 0.0 to 5.4%)
<b>Τουλάχιστον 1 μετάλλαξη<sup>2,3</sup></b>	26 (26.8%, 17.9 ως 35.6%)	24 (27.3%, 17.9 to 36.6%)

Οι απόλυτοι αριθμοί και οι συχνότητες αναφέρονται στις περιπτώσεις κάθε ομάδες για τις οποίες υπήρχαν αποτελέσματα στους ανάλογους πολυμορφισμούς.

<sup>1</sup>Ως (πιθανώς κλινικά σημαντική) μετάλλαξη για τη συγκεκριμένη γραμμή θεωρήθηκε ο ετερόζυγος ή ομόζυγος τύπος για τον παράγοντα V Leiden, ο ετερόζυγος ή ομόζυγος τύπος για τον πολυμορφισμό A1299H του παράγοντα V, ο ομόζυγος ή ετερόζυγος τύπος για τον πολυμορφισμό G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης, ο ομόζυγος τύπος για τον πολυμορφισμό C677T του γονιδίου της MTHFR, και ο ομόζυγος τύπος για τον πολυμορφισμό A1298C του γονιδίου της MTHFR.

<sup>2</sup>Η γραμμή αυτή αναφέρεται στη συνύπαρξη 2 ή περισσότερων από τις μεταλλάξεις της περίπτωσης (1).

<sup>3</sup>Οι απόλυτοι αριθμοί και οι συχνότητες στις συγκεκριμένες γραμμές αναφέρονται στις περιπτώσεις κάθε ομάδας για τις οποίες υπήρχαν αποτελέσματα για ΟΛΟΥΣ τους πολυμορφισμούς



**Πίνακας 3.** Κατανομή των θρομβοφιλικών πολυμορφισμών στο **σύνολο** των ασθενών ανάλογα με τον αριθμό των αποβολών

	<b>Δύο αποβολές (N=66)</b>	<b>&gt;2 αποβολές (N=54)</b>
<b>Πολυμορφισμός</b>	<b>N (% και 95% διάστημα εμπιστοσύνης)</b>	<b>N (% και 95% διάστημα εμπιστοσύνης)</b>
<b>Factor V Leiden</b>		
Ομοζυγωτία	0	0
Ετεροζυγωτία	3 (4.9%, 0.0 ως 10.3%)	2 (4.1%, 0.0 ως 9.6%)
Άγριος τύπος	58 (95.1%, 89.7 ως 100.0%)	47 (95.9%, 90.3 ως 100.0%)
<b>Factor V HR2 (A1299H)</b>		
Ομοζυγωτία	0	0
Ετεροζυγωτία	4 (7.4%, 0.4 ως 14.4%)	6 (14.0%, 3.6 ως 24.4%)
Άγριος τύπος	50 (92.6%, 85.6 ως 99.6%)	37 (86.0%, 75.6 ως 96.4%)
<b>Factor II G20210A</b>		
Ομοζυγωτία	0	0
Ετεροζυγωτία	2 (3.3%, 0.0 ως 7.7%)	3 (6.0%, 0.0 ως 12.6%)
Άγριος τύπος	58 (96.7%, 92.2 ως 100.0%)	47 (94.0%, 87.4 ως 100.0%)
<b>MTHFR C677T</b>		
Ομοζυγωτία	8 (13.3%, 4.7 ως 21.9%)	6 (12.5%, 3.1 ως 21.8%)
Ετεροζυγωτία	36 (60.0%, 47.6 ως 72.4%)	33 (68.8%, 55.7 ως 81.9%)
Άγριος τύπος	16 (26.7%, 15.5 ως 37.9%)	9 (18.8%, 7.7 ως 29.8%)
<b>MTHFR A1298C</b>		
Ομοζυγωτία	6 (11.1%, 2.7 ως 19.5%)	2 (4.6%, 0.0 ως 10.9%)
Ετεροζυγωτία	22 (40.7%, 27.6 ως 53.8%)	19 (44.2%, 29.3 ως 59.0%)
Άγριος τύπος	26 (48.1%, 34.7 ως 61.4%)	22 (51.2%, 36.2 ως 66.1%)
<b>&gt;1 μετάλλαξη<sup>1,3</sup></b>	4 (7.4%, 0.4 ως 14.4%)	0
<b>Τουλάχιστον 1 μετάλλαξη<sup>2,3</sup></b>	15 (27.8%, 15.8 ως 39.7%)	17 (25.0%, 12.2 ως 37.8%)

Οι απόλυτοι αριθμοί και οι συχνότητες αναφέρονται στις περιπτώσεις κάθε ομάδας για τις οποίες υπήρχαν αποτελέσματα στους ανάλογους πολυμορφισμούς.

<sup>1</sup>Ως (πιθανώς κλινικά σημαντική) μετάλλαξη για τη συγκεκριμένη γραμμή θεωρήθηκε ο ετερόζυγος ή ομόζυγος τύπος για τον παράγοντα V Leiden, ο ετερόζυγος ή ομόζυγος τύπος για τον πολυμορφισμό A1299H του παράγοντα V, ο ομόζυγος ή ετερόζυγος τύπος για τον πολυμορφισμό G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης, ο ομόζυγος τύπος για τον πολυμορφισμό C677T του γονιδίου της MTHFR, και ο ομόζυγος τύπος για τον πολυμορφισμό A1298C του γονιδίου της MTHFR.

<sup>2</sup>Η γραμμή αυτή αναφέρεται στη συνύπαρξη 2 ή περισσότερων από τις μεταλλάξεις της περίπτωσης (1).

<sup>3</sup>Οι απόλυτοι αριθμοί και οι συχνότητες στις συγκεκριμένες γραμμές αναφέρονται στις περιπτώσεις κάθε ομάδας για τις οποίες υπήρχαν αποτελέσματα για ΟΛΟΥΣ τους πολυμορφισμούς





**Πίνακας 4.** Συχνότητα των θρομβοφιλικών πολυμορφισμών σε ασθενείς με *ανεξήγητες* καθ' ἑξίν αποβολές και σε ομάδα ελέγχου

	<u>Patients (N=99)</u>	<u>Controls (N=102)</u>
<b>Πολυμορφισμός</b>	<b>N (% και 95% διάστημα εμπιστοσύνης)</b>	<b>N (% και 95% διάστημα εμπιστοσύνης)</b>
<b>Factor V Leiden</b>		
Ομοζυγωτία	0	0
Ετεροζυγωτία	5 (5.0%, 0.7 to 9.4%)	3 (2.9%, 0.0 to 6.2%)
Άγριος τύπος	94 (94.4%, 90.6 to 99.3%)	99 (97.1%, 93.8 to 100.0%)
<b>Factor V HR2 (A1299H)</b>		
Ομοζυγωτία	0	2 (2.2%, 0.0 ως 5.3%)
Ετεροζυγωτία	10 (11.4%, 4.7 to 18.0%)	23 (25.5%, 16.5 to 34.5%)
Άγριος τύπος	78 (88.6%, 81.9 to 95.2%)	65 (72.2%, 62.9 to 81.5%)
<b>Factor II G20210A</b>		
Ομοζυγωτία	0	
Ετεροζυγωτία	5 (5.0%, 0.7 to 9.4%)	2 (2.0%, 0.0 to 4.7%)
Άγριος τύπος	94 (94.4%, 90.6 to 99.3%)	99 (98.0%, 95.3 to 100.0%)
<b>MTHFR C677T</b>		
Ομοζυγωτία	12 (12.4%, 5.8 to 18.9%)	13 (12.6%, 6.1 to 19.0%)
Ετεροζυγωτία	61 (62.9%, 53.2 to 72.5%)	57 (55.9%, 46.2 to 65.5%)
Άγριος τύπος	24 (24.7%, 16.1 to 33.3%)	32 (31.4%, 22.3 to 40.4%)
<b>MTHFR A1298C</b>		
Ομοζυγωτία	7 (7.9%, 2.3 to 13.6%)	6 (6.6%, 1.5 to 11.8%)
Ετεροζυγωτία	37 (42.0%, 31.7 to 52.3%)	39 (43.3%, 33.1 to 53.6%)
Άγριος τύπος	44 (50.0%, 39.5 to 60.4%)	45 (50.0%, 39.7 to 60.3%)
<b>&gt;1 μετάλλαξη<sup>1,3</sup></b>	4 (4.5%, 0.0 to 8.9%)	2 (2.3%, 0.0 to 5.4%)
<b>Τουλάχιστον 1 μετάλλαξη<sup>2,3</sup></b>	23 (26.1%, 16.9 to 35.3%)	24 (27.3%, 17.9 to 36.6%)

Οι απόλυτοι αριθμοί και οι συχνότητες αναφέρονται στις περιπτώσεις κάθε ομάδες για τις οποίες υπήρχαν αποτελέσματα στους ανάλογους πολυμορφισμούς.

<sup>1</sup>Ως (πιθανώς κλινικά σημαντική) μετάλλαξη για τη συγκεκριμένη γραμμή θεωρήθηκε ο ετερόζυγος ή ομόζυγος τύπος για τον παράγοντα V Leiden, ο ετερόζυγος ή ομόζυγος τύπος για τον πολυμορφισμό A1299H του παράγοντα V, ο ομόζυγος ή ετερόζυγος τύπος για τον πολυμορφισμό G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης, ο ομόζυγος τύπος για τον πολυμορφισμό C677T του γονιδίου της MTHFR, και ο ομόζυγος τύπος για τον πολυμορφισμό A1298C του γονιδίου της MTHFR.

<sup>2</sup>Η γραμμή αυτή αναφέρεται στη συνύπαρξη 2 ή περισσότερων από τις μεταλλάξεις της περίπτωσης (1).

<sup>3</sup>Οι απόλυτοι αριθμοί και οι συχνότητες στις συγκεκριμένες γραμμές αναφέρονται στις περιπτώσεις κάθε ομάδας για τις οποίες υπήρχαν αποτελέσματα για ΟΛΟΥΣ τους πολυμορφισμούς



**Πίνακας 5.** Ενεργότητα του PAI και κατανομή του πολυμορφισμού PAI-1 4G/5G σε ασθενείς με ανεξήγητες καθ' έξιν αποβολές και σε ομάδα ελέγχου

	Ομάδα ασθενών (N=93)	Ομάδα ελέγχου (N=92)
<b>PAI-1 4G/5G<sup>†</sup></b>		
Ομοζυγωτία	8 (8.6%, 2.9% ως 14.3%)	21 (22.8%, 14.2 ως 31.3%)
Ετεροζυγωτία	61 (65.6%, 55.9 ως 75.2%)	43 (46.7%, 36.5 ως 56.8%)
Άγριος τύπος	24 (25.8%, 16.9 ως 34.7%)	28 (30.4%, 21.0 ως 39.8%)
<b>Συχνότητα αλληλίων</b>		
4G	41%*	46%*
5G	59%*	54%*
<b>Μέση ενεργότητα PAI (U/ml)<sup>‡</sup></b>	2.78 <sup>•</sup>	2.98 <sup>•</sup>

\* Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων

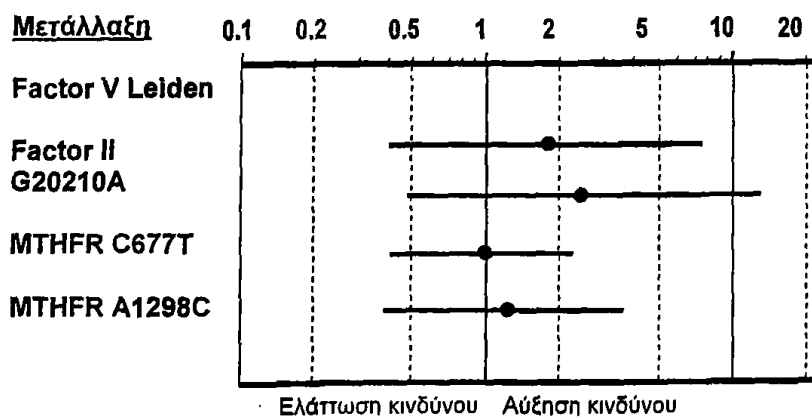
<sup>†</sup>P < 0.01

<sup>‡</sup>Η κανονικότητα της κατανομής ελέγχθηκε με Kolmogorov-Smirnoff test



## Σχήματα

Σχήμα 1. Συσχέτιση μεταξύ θρομβοφιλικών μεταλλάξεων και καθ' ἑξιν αποβολών στις ασθενείς με ανεξήγητες καθ' ἑξιν αποβολές (λόγος αναλογιών [OR] και 95% διάστημα εμπιστοσύνης αυτού)

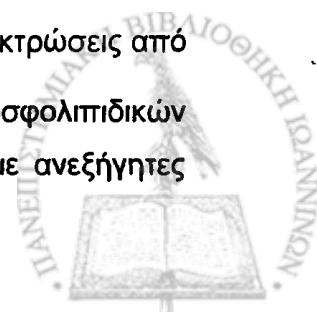


## Συζήτηση

### Κατανομή των αιτίων

Ανατομικά, χρωμοσωμικά, ενδοκρινολογικά αίτια, αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα ή συγγενής έλλειψη πρωτεΐνης S βρέθηκε σε περίπου 1/6 των ασθενών μας (17.5%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 10.7 ως 24.3). Δέκα επιπλέον ασθενείς ήταν φορείς για τη μετάλλαξη Leiden του παράγοντα V ή τη μετάλλαξη G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης, οι οποίες θεωρούνται οι κλινικά σημαντικότερες μεταλλάξεις.

Κατά συνέπεια, ένα ή περισσότερα από τα αποδεκτά αίτια καθ' έξι αποβολών βρέθηκε συνολικά στο 1/4 περίπου των περιπτώσεων (25.8%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 17.9 ως 33.7), ενώ στα υπόλοιπα ¾ (74.2, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 66.3 ως 82.0) δε στάθηκε δυνατό να βρεθεί κάποιος αποδεκτός αιτιολογικός παράγοντας. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται συνήθως ότι το ποσοστό των ιδιοπαθών (ανεξήγητων) περιπτώσεων ανέρχεται σε 50% ή και περισσότερο των ασθενών. Ωστόσο, το ακριβές ποσοστό ποικίλλει ανάλογα με το ποια από τα προτεινόμενα αίτια θεωρούνται αποδεδειγμένα σε κάθε μελέτη, καθώς το ποσοστό των περιπτώσεων που θεωρούνται ανεξήγητες εξαρτάται άμεσα από αυτό. Για παράδειγμα, ο Roger Bick, συνοψίζοντας την εμπειρία από το Dallas/Fort Worth Metroplex αναφέρει ότι σε 10 μόνο από τις 160 ασθενείς που μελέτησε για διαταραχές της αιμόστασης δεν στάθηκε δυνατό να βρεθεί αιτιολογικός παράγοντας για τις αυτόματες εκτρώσεις (152). Ωστόσο, προσεκτικότερη ανάλυση των ευρημάτων του αποκαλύπτει ότι στα αίτια των αποβολών συμπεριλήφθηκαν περιπτώσεις με σύνδρομο προσκόλλησης αιμοπεταλίων (sticky platelet syndrome), έλλειψη ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, αύξηση της λιποπρωτεΐνης (α), έλλειψη συμπαράγοντα II κ.ο.κ. Αν περιορίσουμε τις παθολογικές περιπτώσεις στα αποδεκτά σύμφωνα με το Βρετανικό και Αμερικανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων – Γυναικολόγων αίτια (αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα και πιθανώς μετάλλαξη Leiden του παράγοντα V και μετάλλαξη G20210A της προθρομβίνης, το ποσοστό των ασθενών με παθολογικά αποτελέσματα μειώνεται από 94% σε 61%. Και πάλι όμως το ποσοστό αυτό είναι ασύμβατο με την πλειονότητα των δεδομένων στη βιβλιογραφία, αφού ανεβάζει τον επιπολασμό των αντισωμάτων κατά καρδιολιπίνης σε περίπου 56%. Αντίθετα, σε μελέτη 1111 ασθενών με ≥3 αυτόματες εκτρώσεις από το Νοσοκομείο St. Mary's του Λονδίνου, ο επιπολασμός των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων ήταν περίπου 21% (153). Το ποσοστό των ασθενών με ανεξήγητες



καθ' ἑξιν αποβολές στην τελευταία κλινική οδηγία του Αμερικανικού Κολλεγίου Μαιευτήρων – Γυναικολόγων είναι 50-75%.

### Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

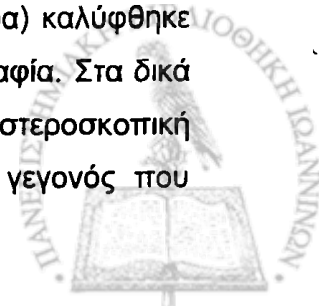
Χρωμοσωμικές ανωμαλίες βρέθηκαν σε δύο ζεύγη (1.6%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.0 ως 3.9). Και στις δύο περιπτώσεις επρόκειτο για ισοζυγισμένες αμοιβαίες μεταθέσεις, όπου φορέας ήταν η γυναίκα στη μία περίπτωση και ο άνδρας στην άλλη. Οι ισοζυγισμένες αμοιβαίες μεταθέσεις αποτελούν τα 2/3 περίπου των χρωμοσωμικών ανωμαλιών που διαγιγνώσκονται σε ζεύγη με καθ' ἑξιν αποβολές, και στα 2/3 περίπου των περιπτώσεων φορέας είναι η γυναίκα. Ο μηχανισμός με τον οποίον ισοζυγισμένες μεταθέσεις στο ζεύγος μπορούν να οδηγήσουν σε αυτόματες εκτρώσεις είναι μέσω δημιουργίας μη ισοζυγισμένου γαμέτη κατά τη μείωση. Το αποτέλεσμα σε αυτές τις περιπτώσεις θα ήταν είτε αυτόματη έκτρωση είτε ένα έμβρυο με συγγενείς ανωμαλίες. Στην πραγματικότητα, η διαταραχή στις περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις είναι τόσο βαριά ώστε η κύηση παλινδρομεί κατά την εμφύτευση, πριν δηλαδή γίνει κλινικά αντιληπτή (26). Σε πρόσφατη μελέτη αναφέρεται ότι ο μη ισοζυγισμένος τύπος απαντάται σε 1/3 περίπου από τα αποβληθέντα έμβρυα ζευγών με ισοζυγισμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες (22), ενώ οι Goddijn και συν. δεν αναφέρουν περίπτωση μη ισοζυγισμένου καρυότυπου σε 33 γεννήσεις ζώντων από 25 ζεύγη με καθ' ἑξιν αποβολές και ισοζυγισμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες (154). Η πρόγνωση για αυτά τα ζεύγη είναι γενικά καλή. Σε δική μας συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας βρέθηκε ότι φορεία για χρωμοσωμική ανωμαλία μειώνει κατ' αρχήν την πιθανότητα επιτυχίας στην πρώτη κύηση μετά τη διερεύνηση κατά περίπου 50% (23;24;27). Ωστόσο, η πολύ πρόσφατη μελέτη των Franssen και συν. έδειξε ότι το μακροπρόθεσμο αποτέλεσμα αυτών των ασθενών είναι παρόμοια ευνοϊκό με εκείνο των ζευγών που δεν είναι φορείς για χρωμοσωμική ανωμαλία, αν και ενδιάμεσα τα ζεύγη με χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι πιθανότερο να έχουν αυτόματες εκτρώσεις (27). Αν και η χρήση τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (assisted reproduction techniques, ART) σε συνδυασμό με προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (preimplantation genetic diagnosis, PGD) έχει προταθεί εμπειρικά στην αντιμετώπιση των καθ' ἑξιν αποβολών, η αποτελεσματικότητα και η σκοπιμότητά της δεν έχουν ελεγχθεί σε προοπτικές τυχαιοποιημένες μελέτες. Οι υπάρχουσες μη τυχαιοποιημένες μελέτες από ζεύγη με καθ' ἑξιν αποβολές και φυσιολογικό καρυότυπο δείχνουν ότι το ποσοστό επιτυχίας είναι παρόμοιο με εκείνα της ART/PGD που γίνεται για άλλες ενδείξεις, το οποίο είναι και πάλι σημαντικά χαμηλότερο από εκείνο που αναμένεται



χωρίς καμία θεραπευτική παρέμβαση. Η εφαρμογή εξωσωματικής γονιμοποίησης (in vitro fertilisation, IVF) ή ενδοκυττοπλασματικής έγχυσης σπέρματος (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) και PGD έχει δώσει ποσοστά επιτυχίας ανά εμβρυομεταφορά της τάξης του 29-36% (155-157). Αν και τα ποσοστά αυτά είναι πιθανώς ικανοποιητικά για ασθενείς με υπογονιμότητα που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση, το ποσοστό επιτυχίας χωρίς παρέμβαση αναμένεται να είναι 77%, 71% και 73% ύστερα από 2, 3 ή 4 αυτόματες εκτρώσεις αντίστοιχα (71;142). Προς το παρόν δεν υπάρχουν μελέτες οι οποίες θα εστιάζουν συγκεκριμένα σε ασθενείς με καθ' έξιν αποβολές και χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Ωστόσο, η γενίκευση των αποτελεσμάτων των τριών μελετών που αναφέρθηκαν δίνει ποσοστά μικρότερα από το 54% που αναμένεται σε αυτές τις ασθενείς χωρίς παρέμβαση (23;24;27). Η χρήση ART/PGD είναι πιθανώς επωφελής για μία υπο-ομάδα μεγαλύτερων σε ηλικία ασθενών με ανεξήγητες καθ' έξιν αποβολές. Οι Munne και συν. ανέφεραν ποσοστό κύησης ανά εμβρυομεταφορά της τάξης του 46%, με ποσοστό απώλειας της κύησης της τάξης του 12% για ασθενείς άνω των 35 ετών, το οποίο είναι μικρότερο από το αναμενόμενο 45% για αυτή την ηλικιακή ομάδα (158). Ωστόσο, η παρατήρηση αυτή δεν έχει πιστοποιηθεί από τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες.

### **Ανατομικοί παράγοντες**

Ανατομική ανωμαλία της μήτρας βρέθηκε σε 11 από ασθενείς μας (9%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 3.9 ως 14.2). Η μεγάλη πλειοψηφία αφορούσε ανωμαλία διάπλασης της μήτρας (N=9, 7.5%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 2.8 ως 12.2) ενώ σε δύο περιπτώσεις διαγνώστηκαν ενδομήτριες συμφύσεις (N=2, 1.5%). Η διερεύνηση έγινε σε όλες τα περιπτώσεις με διακολπικό υπερηχογράφημα (transvaginal scan, TVS) και διαγνωστική υστεροσκόπηση, χρησιμοποιώντας φυσιολογικό ορό ως μέσο διάτασης. Έχει φανεί στο παρελθόν ότι η χρήση φυσιολογικού ορού ως μέσο διάτασης γίνεται το ίδιο καλά ανεκτή από της ασθενή όπως και το CO<sub>2</sub>, συνοδεύεται από εξίσου καλή διαγνωστική ακρίβεια για τις μεγάλες βλάβες, και φαίνεται να πλεονεκτεί του αέριου μέσου για μικρές βλάβες (όπως μικρούς πολύποδες, παχύνσεις του βλεννογόνου, ενδομητρίτιδα ή νεοαγγείωση) (145). Η αδυναμία της υστεροσκόπησης να διαφοροδιαγνώσει καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από παρόμοια εικόνα του εσωτερικού αλλά διαφορετική μορφή του εξωτερικού περιγράμματος της μήτρας (π.χ. δίκερως και διαφραγματοφόρος μήτρα) καλύφθηκε με τη συμπληρωματική εξέταση της μήτρας με διακολπική υπερηχογραφία. Στα δικά μας περιστατικά η πιθανολογούμενη διάγνωση όπως τέθηκε με την υστεροσκοπική εξέταση συνέπιπτε πάντοτε με τα ευρήματα της υπερηχογραφίας, γεγονός που



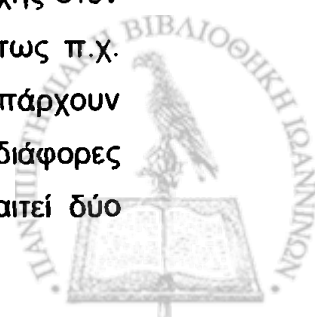
υποδεικνύει ότι η εμπειρία του υστεροσκόπου μπορεί σε μεγάλο βαθμό να αντισταθμίσει τις θεωρητικές αδυναμίες της μεθόδου στην εκτίμηση του εξωτερικού περιγράμματος της μήτρας.

Η τρισδιάστατη κολπική υπερηχογραφία φαίνεται να συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της ταυτόχρονης εκτίμησης του εξωτερικού και του εσωτερικού περιγράμματος της μήτρας με τη δυνατότητα υπολογισμού του όγκου των ευρημάτων και της αποθήκευσης των στοιχείων, και πρόσφατα χρησιμοποιήθηκε σε δύο μεγάλες σειρές ασθενών, τόσο χαμηλού κινδύνου (62), όσο και με ιστορικό καθ' ἑξιν αποβολών (72). Στην τελευταία αυτή μελέτη αναφέρεται ότι το ποσοστό των ασθενών με καθ' αποβολές που παρουσίασε κάποια ανατομική ανωμαλία της μήτρας ήταν 23.7%. Ωστόσο, καθώς η μεγάλη πλειοψηφία αυτών των περιπτώσεων αφορούσε σε τοξοειδή μήτρα, ο επιπολασμός των σημαντικότερων ανωμαλιών τελικά ήταν περίπου 7%, το οποίο είναι παρόμοιο με το δικό μας ποσοστό, ειδικά αν ληφθούν υπόψιν τα ευρέα όρια εμπιστοσύνης στο δείγμα μας.

Τέσσερις από τις ασθενείς με ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας συνέλαβαν κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους μετά από τη διερεύνηση. Στις τρεις περιπτώσεις οι οποίες ακολούθησαν επιτυχή υστεροσκοπική εκτομή ενδομητρίου διαφράγματος η κύηση κατέληξε σε τελειόμηνο τοκετό υγιούς νεογνού. Σε μία περίπτωση μονόκερου μήτρας η κύηση κατέληξε σε αυτόματη έκτρωση στις 9 εβδομάδες. Ωστόσο στην ασθενή αυτή συνυπήρξε και θρομβοφιλικός και ενδοκρινολογικός παράγοντας (βαρύ σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών).

### **Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα**

Η παρουσία αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων αποτελεί ένα από τα ελάχιστα αποδεδειγμένα αίτια καθ' ἑξιν αποβολών. Τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα είναι δυνατόν να υπάρχουν είτε ως πρωτοπαθής διαταραχή σε γυναίκες χωρίς άλλη αναγνωρίσιμη αυτοάνοση νόσο, είτε ως δευτεροπαθές φαινόμενο σε ασθενείς με υποκείμενη αυτοάνοση πάθηση, π.χ. συστηματικό ερυθηματώδη λύκο. Εντούτοις, αν και η συμμετοχή τους στην παθογένεση των καθ' ἑξιν αποβολών είναι αδιαμφισβήτητα, πολλά ερωτήματα είναι ακόμη αναπάντητα, όπως π.χ. αν τα αντισώματα αυτά δρουν μέσω θρόμβωσης ή μέσω ελαττωματικής διείσδυσης της τροφοβλάστης ή αποτελούν δείκτες μίας γενικότερης ανοσολογικής διαταραχής στον οργανισμό, ή εάν έχει σημασία η ανίχνευση και άλλων αντισωμάτων (όπως π.χ. αντιφωσφατιδυλσερίνης ή αντιφωσφατιδυλαιθανολαμίνης) ή για ποιο λόγο υπάρχουν τόσο ευρείες διαφορές στον επιπολασμό των αντισωμάτων ανάμεσα στις διάφορες μελέτες. Σύμφωνα με τις υπάρχουσες κλινικές οδηγίες, η διάγνωση απαιτεί δύο



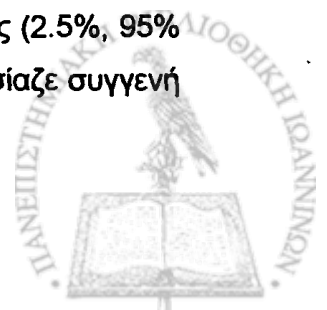
τουλάχιστον θετικές δοκιμασίες για αντιπηκτικό λύκου ή αντισώματα κατά καρδιολιπίνης σε απόσταση τουλάχιστον 6 εβδομάδων και το συνιστώμενο θεραπευτικό σχήμα επί θετικού αποτελέσματος είναι ο συνδυασμός χαμηλού μοριακού βάρους ασπιρίνης με ηπαρίνη.

Πέντε από τις ασθενείς μας (4.2%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.6 ως 7.3) είχαν εργαστηριακά ευρήματα αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου. Σε καμία από τις ασθενείς αυτές δεν υπήρχαν ενδείξεις γενικότερης αυτοάνοσης διαταραχής και καμία τους δεν είχε ιστορικό απώλειας κύησης μετά τις 20 εβδομάδες. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα στη συζήτηση, ο επιπολασμός των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων ποικίλλει ευρέως στις διάφορες μελέτες ανάλογα με τα κριτήρια και τα όρια της θετικότητας, την εργαστηριακή μεθοδολογία αλλά και τον πληθυσμό που μελετάται. Σε έξι μελέτες ασθενών – ομάδας ελέγχου (82;85;117;119-121), ο επιπολασμός των αντισωμάτων κατά καρδιολιπίνης ποίκιλλε από 3.4% (82) ως 24.9% (119), με σταθμισμένο επιπολασμό 13%. Αντίστοιχα ο επιπολασμός των αντισωμάτων κατά καρδιολιπίνης στις γυναίκες ελέγχου ποίκιλλε από 0% (117) ως 4% (119), με σταθμισμένο επιπολασμό 3%. Αν και δεν γνωρίζουμε τον επιπολασμό των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων στο γενικό πληθυσμό της περιοχής από την οποία προέρχονται οι ασθενείς μας, δημοσιευμένα στοιχεία από 267 υγιή άτομα από την Κεντρική Ελλάδα τον εκτιμούν σε 2.2% (159). Τα στοιχεία από μελέτες ασθενών – γυναικών ελέγχου είναι αρκετά λιγότερα σε ό,τι αφορά στο αντιπηκτικό λύκου, το οποίο φαίνεται ότι είναι σπανιότερο αλλά και περισσότερο ειδικό εύρημα.

Τρεις από αυτές τις ασθενείς πέτυχαν κύηση στη διάρκεια του πρώτου έτους της παρακολούθησης και τέθηκαν σε ηπαρίνη και χαμηλής δόσης ασπιρίνη με τη διάγνωση της κύησης. Δύο ασθενείς κατέληξαν σε τελειόμηνο τοκετό ζώντος τέκνου, ενώ στην τρίτη περίπτωση σημειώθηκε αυτόματη έκτρωση κατά της 12<sup>ης</sup> εβδομάδα της κύησης. Το έμβρυο παρουσίαζε αυξημένη αυχενική διαφάνεια, και, αν και η λήψη χοριακών λαχνών απέκλεισε την ύπαρξη χρωμοσωμικής ανωμαλίας, η εμφάνιση της καρδιάς ήταν ενδεικτική παθολογίας ήδη από το πρώτο τρίμηνο. Στην περίπτωση αυτού του εμβρύου είναι δύσκολο να στοιχειοθετηθεί συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων και της αυτόματης έκτρωσης.

### **Συγγενής έλλειψη αντιπηκτικών παραγόντων**

Συγγενής έλλειψη της πρωτεΐνης S παρατηρήθηκε σε τρεις ασθενείς μας (2.5%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.0 ως 5.2. Καμία από τις ασθενείς δεν παρουσίαζε συγγενή έλλειψη πρωτεΐνης C ή αντιθρομβίνης.





Οι τρεις αυτοί παράγοντες αποτελούν φυσικά αντιπηκτικά του αίματος, τα οποία ρυθμίζουν ανασταλτικά και προλαμβάνουν την υπερβολική ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης του αίματος. Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C σχηματίζει συμπλέγματα με την πρωτεΐνη S, η οποία είναι συμπαράγοντάς της, και τα συμπλέγματα διασπούν τους ενεργοποιημένους παράγοντες V και VIII, αναστέλλοντας τη δράση τους. Η αντιθρομβίνη αναστέλλει τη δράση της θρομβίνης και του ενεργοποιημένου παράγοντα X.

Συγγενής έλλειψη αυτών των παραγόντων αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο θρόμβωσης, και υπολογίζεται ότι περίπου 30%, 40% και 60% των ατόμων με συγγενή έλλειψη πρωτεΐνης S, πρωτεΐνης C και αντιθρομβίνης αντίστοιχα θα εμφανίσουν φλεβοθρόμβωση πριν από την ηλικία των 60 ετών, συγκρινόμενοι με το 10% περίπου των ατόμων χωρίς θρομβοφιλία (160).

Στην κλασική μελέτη των Preston και συν. σχετίστηκε για πρώτη φορά η παρουσία θρομβοφιλίας με απώλεια του εμβρύου και βρέθηκε ότι, παρόμοια με τον κίνδυνο για θρόμβωση, η έλλειψη αντιθρομβίνης συνοδεύεται από τη μεγαλύτερη πιθανότητα για αυτόματη έκτρωση (OR 1.7, 95% CI 1.0-2.8) και για ενδομήτριο θάνατο (OR 5.2, 95% CI 1.5-18.1) (80).

Ωστόσο, καθώς οι διαταραχές αυτές είναι σπάνιες, ειδικά δε η έλλειψη αντιθρομβίνης, ο συσχετισμός τους με τις καθ' έξιν αποβολές είναι δύσκολο να στοιχειοθετηθεί με τα υπάρχοντα δεδομένα (81-85). Επιπλέον, ακόμη και για συχνότερες διαταραχές, όπως η έλλειψη πρωτεΐνης S, τα στοιχεία στη βιβλιογραφία παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια. Έτσι, ενώ έχει αναφερθεί επιπολασμός της τάξης του 3:10000-13:10000 για την έλλειψη πρωτεΐνης S στον γενικό πληθυσμό (161), συχνότητες της τάξης του 1:36 – 1:40 αναφέρονται για ασθενείς και γυναίκες ελέγχου σε μελέτες για καθ' έξιν αποβολές (84). Επίσης, παρόμοια με τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα, περισσότερες από τις μισές ασθενείς που διαγιγνώσκονται με έλλειψη πρωτεΐνης S παρουσιάζουν φυσιολογικά επίπεδα σε επανέλεγχο μετά μερικές εβδομάδες (161), γεγονός που μειώνει την αξιοπιστία των περισσότερων από τα δημοσιευμένα στοιχεία στις περιπτώσεις καθ' έξιν αποβολών και καθιστά επιτακτική την επαναληπτική εξέταση μετά από 6-8 εβδομάδες αν ο πρώτος έλεγχος αποβαίνει θετικός.

### **Βιοχημικός – ενδοκρινολογικός έλεγχος**

- Σε όλες τις ασθενείς δόθηκε ορμονολογικός έλεγχος (ωχρινοτρόπος ορμόνη [LH], θυλακιοτρόπος ορμόνη [FSH], οιστραδιόλη, τεστοστερόνη, φυλοσυνδετική σφαιρίνη



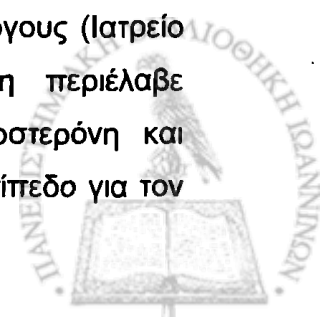
[SHBG], προγεστερόνη, θυρεοειδοτρόπος ορμόνη, προλακτίνη). Ο έλεγχος αυτός αποσκοπούσε όχι τόσο στην εύρεση άμεσης αιτιολογικής συσχέτισης, όσο στην εκτίμηση της γενικότερης ενδοκρινολογικής κατάστασης της ασθενούς και τη διόρθωση τυχόν διαταραχής πριν από επόμενη κύηση. Επίσης ο βιοχημικός έλεγχος αποτέλεσε μέρος της διερεύνησης για σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου επιβεβαίωσαν τη χαμηλή του διαγνωστική αξία σε ασθενείς με φυσιολογική κλινική εικόνα. Ιδιαίτερα ο έλεγχος της θυρεοειδικής λειτουργίας απέβη θετικός μόνο σε μία περίπτωση ασθενούς με γνωστό υπερθυρεοειδισμό και παρουσία αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων, υποδεικνύοντας πλημμελή ρύθμιση. Η ασθενής αυτή παραπέμφθηκε για ενδοκρινολογική εκτίμηση, και δεν υπάρχουν στοιχεία για επόμενη κύηση μετά τη διερεύνηση.

Η χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα έγινε εμφανής και στην περίπτωση του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών. Αν και η συσχέτιση του συνδρόμου με αυξημένο κίνδυνο αυτόματης έκτρωσης είναι δεδομένη (52), εντούτοις ο ορισμός του ίδιου του συνδρόμου δεν ήταν σαφής μέχρι πολύ πρόσφατα και η κλινική του εικόνα ποικίλλει σημαντικά. Σήμερα αναγνωρίζεται ότι το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών μπορεί να εμφανίζεται με διαφορετικά σημεία και συμπτώματα και τα διαγνωστικά κριτήρια πιθανώς επηρεάζονται από το σκοπό της κάθε κλινικής μελέτης. Σύμφωνα με τα αναθεωρημένα κριτήρια που προτάθηκαν από την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Ανθρώπινης Αναπαραγωγής και Εμβρυολογίας (ESHRE), και τα οποία εφαρμόσαμε στο δείγμα μας, για τη διάγνωση του συνδρόμου απαιτούνται δύο από τα τρία κριτήρια: 1) αραιομηνόρροια ή αμηνόρροια, 2) κλινικά και/ή βιοχημικά σημεία υπερανδρογοναιμίας, και 3) πολυκυστικές ωοθήκες.

Έχει βρεθεί ότι υπάρχουν μεγάλες διαφορές τόσο στη διάγνωση όσο και στην αντιμετώπιση του συνδρόμου ανάλογα με το αν η διερεύνηση γίνεται από γυναικολόγους ή ενδοκρινολόγους – οι ενδοκρινολόγοι βασίζονται κυρίως στην υπερανδρογοναιμία και τις διαταραχές της εμμήνου ρύσεως, ενώ οι γυναικολόγοι τείνουν να στηρίζονται (κατά σειρά προτίμησης) στην πολυκυστική εμφάνιση των ωοθηκών, στην υπερανδρογοναιμία, στις διαταραχές εμμήνου ρύσεως, αλλά και στο λόγο LH/FSH. Σε ό,τι δε αφορά στην εργαστηριακή διερεύνηση, οι γυναικολόγοι είναι πιθανότερο να συστήσουν υπερηχογράφημα ωοθηκών (91% έναντι 44%) και οι ενδοκρινολόγοι πιθανότερο να συστήσουν μέτρηση των επινεφριδιακών ανδρογόνων (80% έναντι 58%) και των λιπιδίων του αίματος (67% έναντι 34%) (162).

Στην περίπτωση των ασθενών μας η διερεύνηση έγινε από γυναικολόγους (Ιατρείο Καθ' Ήξιν Αποβολών ΠΠΓΝΙ), και η εργαστηριακή διερεύνηση περιέλαβε υπερηχογράφημα πυέλου και LH, FSH, οιστραδιόλη, ολική τεστοστερόνη και φυλοσυνδετική σφαιρίνη. Η διερεύνηση αυτή αποτέλεσε ένα πρώτο επίπεδο για τον



αρχικό έλεγχο (screening) των ασθενών, και περαιτέρω εξετάσεις έγιναν σε ειδικό Ιατρείο στην περίπτωση θετικού ελέγχου. Η εκτίμηση της υπερανδρογοναιμίας έγινε με κλινικά κριτήρια και με το δείκτη ελεύθερων ανδρογόνων (FAI). Δύο από τις ασθενείς που διαγνώστηκαν με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών εμφάνιζαν ελαφρά αυξημένα επίπεδα ολικής τεστοστερόνης ενώ ο δείκτης ελεύθερων ανδρογόνων ήταν αυξημένος σε τρεις ασθενείς. Αν και παραδοσιακά αναφέρεται λόγος LH/FSH  $>2$  ή και  $>3$  σε γυναίκες με πολυκυστικές ωοθήκες, καμία από τις ασθενείς μας δεν παρουσίασε τιμή  $>1.5$ . Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι η τιμή του λόγου LH/FSH πάνω από την οποία πρέπει να θεωρείται ότι υπάρχει αύξηση εξαρτάται κατά πολύ από το διαγνωστικό σύστημα που χρησιμοποιείται (163), γεγονός που περιορίζει την επαναληψιμότητά της μέτρησης και άρα την κλινική της αξία.

Η αντίσταση στην ινσουλίνη αποτελεί μεταβολική διαταραχή που συχνά συνοδεύει το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και έχει συσχετιστεί με αύξηση του κινδύνου για αυτόματη έκτρωση. Η υπερινσουλιναιμία πιθανώς προκαλεί διαταραχή στο μηχανισμό πήξης – ινωδόλυσης και σχετίζεται με αύξηση της δραστηριότητας του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI). Βελτίωση της αντίστασης στην ινσουλίνη με χορήγηση μετφορμίνης έχει συσχετιστεί με ελάττωση της πιθανότητας αυτόματης έκτρωσης (51-53;164). Η δοκιμασία αναφοράς για τη διάγνωση της αντίστασης στην ινσουλίνη είναι η υπερινσουλιναιμική ευγλυκαιμική καμπύλη. Ωστόσο, για λόγους κόστους και χρόνου, στη μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε τις απλούστερες δοκιμασίες της ινσουλίνης νήστεως (παθολογική τιμή  $>15$  U/ml) και του λόγου γλυκόζης / ινσουλίνης νήστεως (φυσιολογική τιμή  $<4$ ).

Με βάση αυτή τη μεθοδολογία, μία από τις ασθενείς με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών βρέθηκε να παρουσιάζει αντίσταση στην ινσουλίνη. Στην ασθενή αυτή συστήθηκε περιορισμός της πρόσληψης θερμίδων και άσκηση επί τέσσερις μήνες προκειμένου να επιτευχθεί ελάττωση του σωματικού βάρους, ενώ επιπρόσθετα χορηγήθηκε μετφορμίνη επί δύο μήνες πριν από τη σύλληψη, καθώς και φυλλικό οξύ λόγω ομοζυγωτίας στη μετάλλαξη C677T της MTHFR. Λόγω αραιομηνόρροιας εφαρμόστηκε πρόκληση εμμηνορρησίας και έγινε πρόκληση ωοθηλακιορρηξίας με κιτρική κλομιφαίνη. Σύλληψη επιτεύχθηκε με το δεύτερο κύκλο κλομιφαίνης, και με τη διαπίστωση θετικής δοκιμασίας κύησης προστέθηκε στην αγωγή χαμηλής δοσολογίας ασπιρίνη και ηπαρίνη χαμηλού μοριακού, καθώς η συγκεκριμένη ασθενής ήταν επιπρόσθετα ετερόζυγη για τη μετάλλαξη G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης. Παρά τη συνδυασμένη αγωγή, τα επίπεδα της β-χοριακής γοναδοτροπίνης αυξάνονταν με παθολογικά αργό ρυθμό και η κύηση παλινδρόμησε στις 8 περίπου εβδομάδες.



Σε μία ακόμη περίπτωση ο τακτικός βιοχημικός έλεγχος ανέδειξε αυξημένα επίπεδα γοναδοτροπινών. Η ασθενής (41 ετών) υποβλήθηκε σε περαιτέρω έλεγχο και διαγνώστηκε ως πάσχουσα από πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια.

Σε τρεις περιπτώσεις ασθενών μετρήθηκαν ελαφρά αυξημένα επίπεδα προλακτίνης, τα οποία σε επαναληπτική εξέταση μετά από 4 εβδομάδες είχαν επανέλθει στα φυσιολογικά όρια.

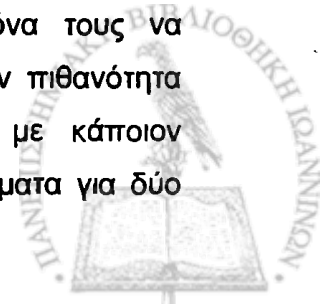
Οι παρατηρήσεις μας από το βιοχημικό έλεγχο των ασθενών με καθ' ἑξιν αποβολές βρίσκονται σε συμφωνία με τα συμπεράσματα των πρόσφατων οδηγιών του Βρετανικού και του Αμερικανικού Κολλεγίου Μαιευτήρων – Γυναικολόγων (3;44). Οι εργαστηριακές εξετάσεις δεν φαίνεται να αποκαλύπτουν επιπρόσθετη παθολογία σε κλινικά ασυμπτωματικές ασθενείς. Ο επιπολασμός του σακχαρώδη διαβήτη και των θυρεοειδοπαθειών στις γυναίκες με καθ' ἑξιν αποβολές δεν φαίνεται να διαφέρει από αυτόν που αναμένεται για το γενικό πληθυσμό. Επιπλέον, ο ορμονολογικός έλεγχος δεν φαίνεται να συμβάλλει σημαντικά στο σχεδιασμό της αντιμετώπισης των ασθενών με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Αν και τα στοιχεία είναι προς το παρόν ελάχιστα και η διαγνωστικές δοκιμασίες ατελείς, τα αποτελέσματα από τη χρήση μετφορμίνης σε ασθενείς με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και ιστορικό απώλειας της κύησης δείχνουν ότι πιθανώς η εξέταση για αντίσταση στην ινσουλίνη θα αποτελεί μέρος της διερεύνησης σε επιλεγμένες ασθενείς που είναι πιθανό να ωφεληθούν από τη διόρθωσή της.

### **Μοριακή διερεύνηση – θρομβοφιλικές μεταλλάξεις**

Η σύγκριση του επιπολασμού των θρομβοφιλικών μεταλλάξεων στις ασθενείς του δείγματός μας με την ομάδα ελέγχου έγινε με δύο τρόπους:

- Συγκρίνοντας το σύνολο των ασθενών με την ομάδα ελέγχου, και
- Συγκρίνοντας τις ασθενείς που ήταν αρνητικές για αποδεκτά αίτια καθ' ἑξιν αποβολών με την ομάδα ελέγχου.

Η διπλή αυτή σύγκριση έγινε καθώς κάθε μία από τις παραπάνω προσεγγίσεις έχει πλεονεκτήματα. Η δεύτερη προσέγγιση –της μελέτης ασθενών αρνητικών για άλλα αίτια- είναι η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη σήμερα στη βιβλιογραφία. Η αρχή στην οποία στηρίζεται είναι ότι προκειμένου να εκτιμηθεί ανεξάρτητα η αιτιολογική σχέση κάποιου παράγοντα με τη νόσο θα πρέπει να εκτιμηθούν ασθενείς οι οποίες είναι αρνητικές για άλλα, αποδεδειγμένα, αίτια τα οποία μπορούν μόνα τους να προκαλέσουν τα νόσο. Αν και αυτή η μεθοδολογία απομακρύνει την πιθανότητα σφαλμάτων λόγω σύμπτωσης του υπό διερεύνηση παράγοντα με κάποιον αποδεδειγμένο παράγοντα, είναι εντούτοις η ίδια -επιρρεπής σε σφάλματα για δύο



λόγους. Ο πρώτος λόγος είναι διότι δέχεται εξ ορισμού την έννοια του επαρκούς αιτίου. Σε πρόσφατη ανασκόπηση οι Christiansen και συν. αντιπαραβάλλουν το συγκεκριμένο μοντέλο του ενός επαρκούς αιτίου με ένα νέο, πολυπαραγοντικό μοντέλο στο οποίο πολλαπλοί παράγοντες με αθροιστική επίδραση μπορεί να συνυπάρχουν σε ένα άτομο, οδηγώντας σε αυτόματη έκτρωση όταν ξεπεραστεί ένας συγκεκριμένος ουδός. Αν και δεν είναι ακόμη σαφές ποιοι είναι αυτοί οι παράγοντες και ποια είναι η σχετική βαρύτητα καθενός από αυτούς, η έννοια του αθροιστικού μοντέλου έχει φανεί να ισχύει σε αρκετές παθήσεις με πολυπαραγοντική αιτιολογία, με κλασικά παραδείγματα την αρτηριακή υπέρταση, το σακχαρώδη διαβήτη και τη σχιζοφρένεια (4). Στη διερεύνηση αυτού του μοντέλου δεν είναι απαραίτητο να απομονώνονται οι περιπτώσεις με αρνητικό λοιπό έλεγχο. Ο δεύτερος λόγος είναι ότι στις μελέτες ασθενών – ομάδας ελέγχου δεν είναι πρακτικά εφικτό να γίνει ίδιας έκτασης έλεγχος στις ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου. Για παράδειγμα, ενώ είναι δυνατό να μελετηθούν για θρομβοφιλία ασθενείς στις οποίες έγινε προηγουμένως έλεγχος για χρωμοσωμικές, ανατομικές, ενδοκρινολογικές ανωμαλίες και αντιφωσφωλιπιδικά αντισώματα, είναι πολύ σπάνιο να υποβληθούν οι γυναίκες της ομάδας ελέγχου σε τόσο λεπτομερή έλεγχο, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε συστηματικό σφάλμα.

Καθώς τα αποτελέσματα των δύο αναλύσεων είναι πρακτικά ταυτόσημα, η συζήτησή τους είναι κοινή.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι καμία από τις πέντε κοινές θρομβοφιλικές μεταλλάξεις που μελετήσαμε (παράγοντας V Leiden, μετάλλαξη A1299H [A4070G] του παράγοντα V, μετάλλαξη G20210A του παράγοντα II [προθρομβίνης], μετάλλαξη C677T της MTHFR και μετάλλαξη A1298C της MTHFR), μόνη ή σε συνδυασμό, δεν σχετίζεται με στατιστική αύξηση του κινδύνου για εμφάνιση καθ' έξιν αποβολών. Πιθανώς σε αυτό αποτελούν εξαιρέσεις ο παράγοντας V Leiden (λόγος πιθανοτήτων [OR] 1.59 [95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.37 ως 6.82] για όλες τις ασθενείς και OR 1.75 [95% CI 0.41 ως 7.55] για τις περιπτώσεις ανεξήγητων καθ' έξιν αποβολών) και η μετάλλαξη G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης (OR 2.38 [95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.45 ως 12.55] για όλες τις ασθενείς και OR 2.63 [95% CI 0.49 ως 13.90] για τις περιπτώσεις ανεξήγητων καθ' έξιν αποβολών), αν και το μέγεθος του δείγματος δεν επέτρεψε σε αυτές την επίτευξη σημαντικότητας.

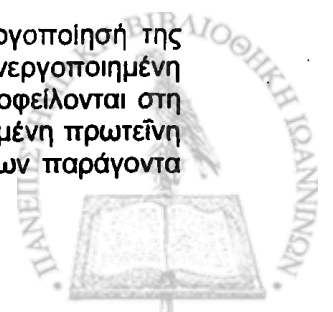
#### **Παράγοντας V Leiden**

Η μετάλλαξη Leiden του γονιδίου του παράγοντα V G1691A (παράγοντας V Leiden) προκύπτει από μία σημειακή αντικατάσταση G από A στη θέση 1691 του εξονίου 10



του γονιδίου στο χρωμόσωμα 1, η οποία οδηγεί σε αντικατάσταση ενός μορίου αργινίνης στη θέση 506 από γλουταμίνη (165). Καθώς η θέση 506 αποτελεί σημείο διάσπασης για την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C, η δομή του παράγοντα V Leiden<sup>4</sup> οδηγεί σε αντίσταση στην απενεργοποίησή του από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C<sup>4</sup>, με αποτέλεσμα αυξημένη παραγωγή θρομβίνης και δημιουργία συνθηκών υπερπηκτικότητας στο αίμα. Η μετάλλαξη Leiden είναι σχετικά συχνή, αν και ο επιπολασμός της ποικίλλει σημαντικά ανά περιοχή και εθνική ομάδα. Σε μελέτη που έγινε στην περιοχή μας βρέθηκε ότι η μετάλλαξη V Leiden παρατηρείται στο 3.3% των υγιών ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου και σε 16.2% των ασθενών με ένα ή περισσότερα θρομβοεμβολικά επεισόδια (167). Ωστόσο, ο κίνδυνος θρόμβωσης κατά τη διάρκεια της ζωής των φορέων είναι σχετικά χαμηλός, όπως φάνηκε από μία μεγάλη ιταλική μελέτη όπου μόνο το 6% των φορέων του παράγοντα V Leiden είχαν εμφανίσει θρομβοεμβολικά επεισόδια ως την ηλικία των 65 ετών, και τα περισσότερα από αυτά συνέβησαν σε περιόδους υψηλού κινδύνου, π.χ. μετά από χειρουργικές επεμβάσεις (168). Η αύξηση του κινδύνου για αρτηριακά αγγειακά συμβάματα (OR 1.21, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.99-1.49) (169) και στεφανιαία νόσο (σχετικός κίνδυνος [RR] 1.17, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 1.08-1.28) (170) φαίνεται παρομοίως μικρή. Αντίθετα, και πιθανώς λόγω των θρομβοφιλικών μεταβολών που ούτως ή άλλως συνοδεύουν την κύηση, η παρουσία της μετάλλαξης V Leiden αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο επιπλοκών στην κύηση: η πιθανότητα φλεβικής θρομβοεμβολής αυξάνεται κατά 8 περίπου φορές, της αυτόματης έκτρωσης σε αρχικά στάδια κατά 1.7 φορές, της πιθανότητας καθ' έξιν αποβολών πρώτου τριμήνου κατά 1.9 φορές, της πιθανότητας σποραδικής απώλειας του εμβρύου στο δεύτερο τρίμηνο κατά 4.1 φορές και της πιθανότητας για όψιμο εμβρυϊκό θάνατο κατά 2.1 φορές (87). Η πιθανότητα προεκλαμψίας δεν φαίνεται να αυξάνεται σημαντικά (87). Στο δείγμα της μελέτης μας ο επιπολασμός της μετάλλαξης V Leiden ήταν 4.5% (95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.0 – 8.8) στο σύνολο της ομάδας των ασθενών και 5.0% (95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.7 to 9.4%) στις ασθενείς με ανεξήγητες καθ' έξιν αποβολές, έναντι 2.9%, (95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.0 ως 6.2%) στην ομάδα ελέγχου. Οι αριθμοί αυτοί είναι απόλυτα συμβατοί με τα στοιχεία προηγούμενης μελέτης από την περιοχή μας με διαφορετικό δείγμα (167), και δίνουν αύξηση του κινδύνου για καθ' έξιν αποβολές κατά 1.75

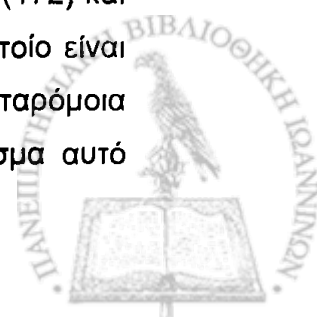
<sup>4</sup>Η πρωτεΐνη C αποτελεί φυσικό αντιπηκτικό του αίματος, και μετά την ενεργοποίησή της αναστέλλει τη δράση των παραγόντων πήξης V και VIII. Η αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C μπορεί να είναι συγγενής ή επίκτητη. Οι συγγενείς περιπτώσεις οφείλονται στη μετάλλαξη Leiden του παράγοντα V ενώ επίκτητη αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C συνδέεται με την παρουσία αντιπηκτικού λύκου και υψηλών συγκεντρώσεων παράγοντα VIII (166).



φορές, το οποίο είναι επίσης συμβατό με τη μετα-ανάλυση των Robertson και συν. (87), αν και λόγω του μικρού δείγματος δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται σε τυχαία γεγονότα.

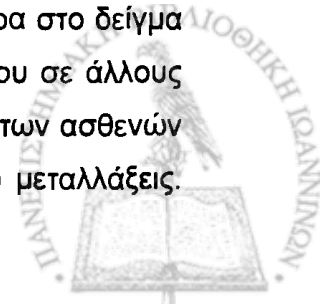
#### **Μετάλλαξη G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης**

Η μετάλλαξη G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη θρομβοφιλική μετάλλαξη. Η μετάλλαξη αυτή προκαλείται από μία αντικατάσταση G σε A στη θέση 20210 της 3' μη μεταφραζόμενης θέσης του γονιδίου (88) της προθρομβίνης και απαντάται στο 0.7% - 4.0% του ευρωπαϊκού πληθυσμού, με τον επιπολασμό να αυξάνεται από τη Βόρεια προς τη Νότια Ευρώπη (171). Η παρουσία του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου (A) σχετίζεται με αύξηση της δραστηριότητας της προθρομβίνης στο αίμα και αυτός θεωρείται ότι είναι ο τρόπος με τον οποίον η μετάλλαξη αυξάνει τον κίνδυνο για θρομβοεμβολικά φαινόμενα (171). Στην αρχική δημοσίευση για τη μετάλλαξη είχε αναφερθεί ότι αυξάνει τον κίνδυνο θρόμβωσης κατά 2.8 φορές (88). Έκτοτε ακολούθησαν πολλές μελέτες που δείχνουν ότι η παρουσία αυτής της μετάλλαξης σχετίζεται με μέτρια αύξηση του κινδύνου (2-3 φορές) όταν αποτελεί μεμονωμένο εύρημα, αλλά με σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση όταν συνυπάρχει με παράγοντα V Leiden (20 φορές) ή συνδυάζεται με λήψη αντισυλληπτικών σκευασμάτων (16 φορές) (171). Παρόμοια με τον παράγοντα V Leiden, η μετάλλαξη G20210A προκαλεί μία μικρή αύξηση του κινδύνου για στεφανιαία νόσο (OR 1.32, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 1.03-1.69) (170), αλλά σχετίζεται με μεγαλύτερη αύξηση του κινδύνου για επιπλοκές στην κύηση. Παρουσία της μετάλλαξης G20210A σχετίζεται με αύξηση της πιθανότητας για θρομβοεμβολικά φαινόμενα στην κύηση κατά 6.8 φορές, για αυτόματη έκτρωση στο πρώτο τρίμηνο κατά 2.5 φορές, για καθ' έξιν αποβολές πρώτου τριμήνου κατά 2.7 φορές, για σποραδική απώλεια κύησης στο δεύτερο τρίμηνο κατά 8.6 φορές, για όψιμο ενδομήτριο θάνατο κατά 2.7 φορές και για προεκλαμψία κατά 2.5 φορές (87). Στο δείγμα της μελέτης μας ο επιπολασμός της μετάλλαξης V Leiden ήταν 4.5% (95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.0 – 8.8) στο σύνολο της ομάδας των ασθενών και 5.0% (95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.7 to 9.4%) στις ασθενείς με ανεξήγητες καθ' έξιν αποβολές, έναντι 2.0%, (95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.0 ως 4.7%) στην ομάδα ελέγχου. Η συχνότητα της μετάλλαξης G20210A στην ομάδα ελέγχου μας είναι συμβατή με προηγούμενη μελέτη από πληθυσμό της ίδιας περιοχής (2.7%) (172) και δίνουν αύξηση του κινδύνου για καθ' έξιν αποβολές κατά 2.6 φορές, το οποίο είναι επίσης συμβατό με τη μετα-ανάλυση των Robertson και συν. (87), αν και παρόμοια με τον παράγοντα V Leiden δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται σε τυχαία γεγονότα.



### **Μεταλλάξεις C677T και A1298C της MTHFR**

Η μεθυλενε-τετραϋδροφυλλική αναγωγάση (methylenetetrahydrofolate reductase – MTHFR) αποτελεί βασικό ένζυμο για την εξαρτώμενη από το φυλλικό οξύ επαναμεθυλίωση της ομοκυστεΐνης, και πολυμορφισμοί στο γονίδιο της συσχετίζονται συχνά με αύξηση των επιπέδων της ομοκυστεΐνης στο αίμα. Ο πολυμορφισμός MTHFR C677T καθιστά το ένζυμο θερμοευαίσθητο και οδηγεί σε *in vitro* ελάττωση της δραστηριότητας του ενζύμου. Ομοζυγωτία για τα αλληλίο 677T σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης, ειδικά σε ασθενείς με χαμηλές συγκεντρώσεις φυλλικού οξέος στο πλάσμα (91), και επομένως σε αύξηση του κινδύνου για θρόμβωση. Αν και ο μηχανισμός με τον οποίο η υπερομοκυστεϊναιμία αυξάνει τον κίνδυνο για θρόμβωση δεν είναι απόλυτα σαφής, είναι πιθανό ότι ενέχεται η ενεργοποίηση του ενδοθηλίου, ο πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών ινών, μεταβολές στην παραγωγή του νιτρικού οξέος από το ενδοθήλιο και διαταραχές στο μεταβολισμό των στεροειδών από το ενδοθήλιο (173;174). Ο δεύτερος πολυμορφισμός της MTHFR (A1298C) προκαλεί ελάττωση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 40% περίπου (99), η οποία όμως δεν συνοδεύεται από σημαντική αύξηση των επιπέδων ομοκυστεΐνης στο αίμα (99;100). Η ύπαρξη ομοζυγωτίας για τον πολυμορφισμό C677T της MTHFR δεν έχει συσχετιστεί με αύξηση της πιθανότητας επιπλοκών στην κύηση, με μόνη εξαίρεση την προεκλαμψία, όπου προκαλεί πολύ μικρή αύξηση του κινδύνου (OR 1.37, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 1.07-1.76) (87). Τα στοιχεία σχετικά με τη μετάλλαξη A1298C είναι πολύ λιγότερα, φαίνεται όμως ότι η παρουσία της δεν σχετίζεται με αύξηση της πιθανότητας για προεκλαμψία (175;176), ενώ τα αποτελέσματα είναι περισσότερο ετερογενή σε ό,τι αφορά στην ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης, όπου μία μεγάλη Καναδική μελέτη δεν ανιχνεύει διαφορά (177), ενώ μία μικρότερη μελέτη από τη Νότια Αφρική αναφέρει αύξηση του κινδύνου (178). Σε σχέση με τις καθ' ἑξίν αποβολές η πλειονότητα των μελετών αναφέρει έλλειψη συσχέτισης (93;94;102), ενώ μία μελέτη αναφέρει αύξηση του κινδύνου (179). Στην περίπτωση του δείγματός μας καμία από τις δύο μεταλλάξεις δεν φάνηκε να σχετίζεται με αύξηση του κινδύνου για καθ' ἑξίν αποβολές. Η μετάλλαξη C677T απαντά συχνά στο γενικό πληθυσμό (12.5% στο δείγμα μας, 10% σε δείγμα υγιών αιμοδοτών από παλιότερη μελέτη στην περιοχή μας) (180) και ο επιπολασμός της ήταν πρακτικά ίσος στις ασθενείς μας και στην ομάδα ελέγχου. Ο πολυμορφισμός A1298C απαντά ελάχιστα σπανιότερα στο δείγμα μας, ενώ δεν υπάρχουν δημοσιευμένα στοιχεία για τον επιπολασμό του σε άλλους ελληνικούς πληθυσμούς. Περίπου 1 ανά 4 γυναίκες, τόσο στην ομάδα των ασθενών όσο και στην ομάδα ελέγχου, είναι ταυτόχρονα ετερόζυγη για τις δύο μεταλλάξεις.





Έχει βρεθεί ότι η διπλή ετεροζυγωτία σχετίζεται με ελάττωση της δραστηριότητας της MTHFR στο 60% περίπου των επιπέδων ασθενών ελέγχου, και η δραστηριότητα αυτή είναι παρόμοια με την παρατηρούμενη σε ασθενείς ομόζυγους για τον πολυμορφισμό A1298C και περισσότερο ελαττωμένη σε σχέση με την παρατηρούμενη σε απλή ετεροζυγωτία για τον πολυμορφισμό C677T (99). Η παρουσία του πολυμορφισμού A1298C δεν βρέθηκε να αυξάνει το επίπεδο της ολικής ομοκυστεΐνης πλάσματος, το οποίο επηρεάζεται μόνο από το γονότυπο για τον A1298C (100). Ως εκ τούτου, η παρουσία του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου για τον A1298C δεν αναμένεται να αυξάνει τον κίνδυνο για θρόμβωση και άρα για καθ' ἑξιν αποβολές μέσω θρομβοφιλίας. Καμία από τις γυναίκες της μελέτης μας δεν ήταν ταυτόχρονα ομόζυγη για τους δύο πολυμορφισμούς. Οι διπλές μεταλλάξεις *in cis* (δηλαδή στο ίδιο αντίγραφο ενός γονιδίου) είναι πολύ σπάνιες και ως τώρα δεν έχει αναφερθεί περίπτωση διπλής ομοζυγωτίας για τις μεταλλάξεις C677T και A1298C (99;100;181;182). Ο επιπολασμός του συνδυασμού ομοζυγωτίας για τη μία με ετεροζυγωτία για την άλλη μετάλλαξη ήταν παρόμοιος στις δύο ομάδες του δείγματός μας.

#### **Μετάλλαξη A1299H (A4070G) του παράγοντα V**

Ο απλότυπος HR2 του παράγοντα V προκαλείται από τέσσερις παρανοηματικές (missense) μεταλλάξεις, τις Met385Thr, His1299Arg, Met1736Val και Asp2194Gly. Το αλληλόμορφο R2 εμφανίζεται σε 11.9% των λευκών Αμερικανών, 11.3% των Αμερικανών ισπανικής καταγωγής και 5.6% των Αφροαμερικανών (183). Φορεία του απλότυπου HR2 του παράγοντα V σχετίζεται με ήπια αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C, μέτρια ελάττωση των επιπέδων του παράγοντα V και σχετική αύξηση του περισσότερο θρομβογόνου ισότυπου του παράγοντα V (FV1) (95). Η μετάλλαξη A1299H προκαλείται από μία υποκατάσταση A→G στη θέση 4070 του εξονίου 13 του γονιδίου του παράγοντα V, και χαρακτηρίζεται από ελάττωση της μέσης δραστηριότητας του παράγοντα V στο πλάσμα (184). Η αντίσταση στη δράση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C που παρατηρείται σε φορείς του απλοτύπου HR2 αποδίδεται όχι τόσο στον ίδιο τον μεταλλαγμένο παράγοντα όσο στην επιβράδυνση της απενεργοποίησης του παράγοντα VIII που συνοδεύει την παρουσία του HR2 (95).

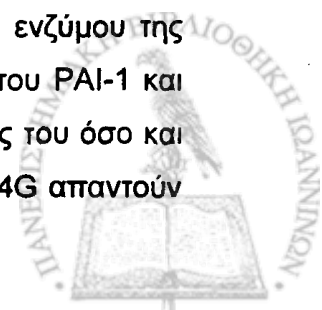
Τα στοιχεία σχετικά με την κλινική σημασία της μετάλλαξης A1299H είναι αντικρουόμενα. Στη μελέτη των Doggen et al (96) η συχνότητα της μετάλλαξης δεν διέφερε μεταξύ 560 ανδρών ασθενών με πρώτο έμφραγμα μυοκαρδίου πριν από την ηλικία των 70 ετών και 650 υγιών ανδρών (ετεροζυγωτία 9.5% και 9.9% αντίστοιχα). Αντίθετα, στη μελέτη των Alhenc-Gelus et al. ετεροζυγωτία για τον πολυμορφισμό



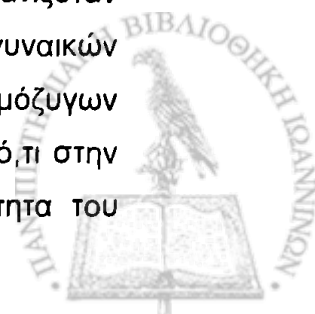
βρέθηκε σε 18% των 205 ασθενών με φλεβοθρόμβωση έναντι 11% των 394 ατόμων της ομάδας ελέγχου (98), ενώ η ύπαρξη του πολυμορφισμού συσχετίστηκε με αύξηση του κινδύνου για εγκεφαλικό έμφρακτο κατά 3.9 φορές σε άτομα ηλικίας 10-18 ετών (97). Στη μελέτη μας δεν υπήρχαν περιπτώσεις ομοζυγωτίας στην ομάδα των ασθενών, ενώ η ετεροζυγωτία ήταν συχνότερη στην ομάδα ελέγχου. Δύο μόνο μελέτες έχουν δεδομένα για τη μετάλλαξη A1299H σε περιπτώσεις καθ' έξιν αποβολών, και τα αποτελέσματα είναι ετερογενή. Αν και δεν υπήρχε σημαντική συσχέτιση σε καμία από τις μελέτες, στη μελέτη των Dilley και συν. η ετεροζυγωτία για τη μετάλλαξη έτεινε να εμφανίζεται σπανιότερα σε 60 ασθενείς με  $\geq 3$  απώλειες κύησης σε οποιοδήποτε στάδιο από ό,τι σε 92 γυναίκες ελέγχου (OR 0.74, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.29–1.9) (185), ενώ στη μελέτη των Coulan και συν. η ετεροζυγωτία ήταν συχνότερη σε 150 ασθενείς με  $\geq 2$  αυτόματες εκτρώσεις από ό,τι σε 20 γυναίκες ελέγχου (OR 3.09, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.39–24.35) (102). Από τις μελέτες αυτές φαίνεται επίσης ότι η ομοζυγωτία για τη μετάλλαξη αυτή είναι πολύ σπάνια, αφού καμία από τις 112 γυναίκες ελέγχου και μόνο μία από τις 210 ασθενείς ήταν ομόζυγη (102;185). Παρόμοια με το αποτέλεσμα της μελέτης μας, η συχνότητα του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου εμφανίζεται μεγαλύτερη στην ομάδα ελέγχου από ό,τι σε ασθενείς με φλεβοθρόμβωση στις μελέτες των Kostka και συν. (186) και Benson και συν. (183). Ωστόσο είναι ακόμη δύσκολο να ερμηνεύσουμε αυτή της παρατήρηση καθώς, η γνώση μας σχετικά με τη φυσιολογική σημασία του φαινοτύπου HR2 είναι περιορισμένη.

#### **Συνδυασμός θρομβοφιλικών μεταλλάξεων**

Πρόσφατα άρχισε να μελετάται η πιθανή σημασία της συνύπαρξης στην ίδια ασθενή περισσοτέρων της μίας θρομβοφιλικών μεταλλάξεων οι οποίες, ακόμη και αν είναι ήσσονος σημασίας η κάθε μία ξεχωριστά, μπορεί να ασκούν αθροιστική επίδραση και να αυξάνουν με αυτό τον τρόπο την πιθανότητα για αυτόματη έκτρωση. Η μεθοδολογία και τα αποτελέσματα αυτών των μελετών είναι ετερογενή. Οι Wolf και συν. μελέτησαν την κατανομή των πολυμορφισμών FV G1691A, F II G20210A, PAI-1 4G/5G PAI-1, και A1u I/D tPA PM σε 49 ασθενείς με  $\geq 2$  ανεξήγητες αυτόματες εκτρώσεις πρώτου τριμήνου και διαπίστωσαν ότι η συχνότητα της κάθε μίας μετάλλαξης ξεχωριστά ή συνδυασμών τους δεν διέφερε ανάμεσα στις ασθενείς και σε ομάδα ελέγχου (187). Αντίθετα, οι Buchholz και συν. μελέτησαν έναν συχνό πολυμορφισμό διαγραφής / εγγραφής του γονιδίου του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACE D/I) και τον πολυμορφισμό 4G/5G του γονιδίου του PAI-1 και βρήκαν ότι τόσο ο ομόζυγος μεταλλαγμένος γονότυπος ACE D/D μόνος του όσο και ο συνδυασμός του με τον ομόζυγο μεταλλαγμένο γονότυπο PAI-1 4G/4G απαντούν



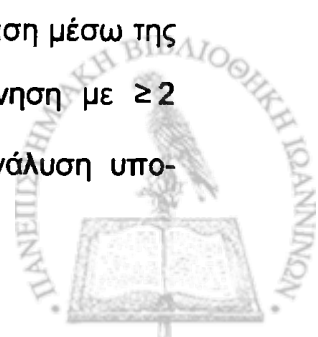
συχνότερα σε ασθενείς με  $\geq 2$  αυτόματες εκτρώσεις  $< 25$  εβδομάδων από ό,τι σε ομάδα ελέγχου (13.6% έναντι 4.7% για τη διπλή ομοζυγωτία. Ωστόσο, η διπλή ετεροζυγωτία ήταν συχνότερη στην ομάδα ελέγχου από ό,τι στις ασθενείς (17.4% έναντι 28.3%), υποδεικνύοντας ότι ο συγκεκριμένος γονότυπος ίσως έχει προστατευτική επίδραση (188). Οι Hohlagschwandtner και συν. αναφέρουν ότι η συχνότητα έξι πολυμορφισμών (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, factor V Leiden G1691A, factor II G20210A, HPA 1 C12548T, και APO B R3500Q) ή συνδυασμών τους δεν διέφερε ανάμεσα σε 145 ασθενείς με  $\geq 3$  συνεχόμενες αυτόματες εκτρώσεις πριν από τις 20 εβδομάδες και σε 101 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με  $\geq 2$  γεννήσεις ζώντων νεογνών χωρίς ιστορικό αυτόματων εκτρώσεων (94). Οι Sarig και συν. αναφέρουν ότι συνδυασμοί θρομβοφιλικών διαταραχών απαντούν συχνότερα σε ασθενείς με  $\geq 3$  αυτόματες εκτρώσεις τριμήνου από ό,τι σε ομάδα ελέγχου, ωστόσο στις θρομβοφιλικές διαταραχές συμπεριλαμβάνουν συγγενείς (παράγοντας V Leiden, μετάλλαξη G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης, πολυμορφισμός MTHFR C677T, συγγενής έλλειψη πρωτεΐνης C, πρωτεΐνης S και αντιθρομβίνης III) και επίκτητες (αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα, αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C) και τα συγκεκριμένα στοιχεία των συνδυασμών δεν δίνονται στο δημοσιευμένο κείμενο (189). Οι Brenner και συν. συνέκριναν τον επιπολασμό των τριών συχνότερων θρομβοφιλικών μεταλλάξεων (παράγοντας V Leiden, μετάλλαξη G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης, πολυμορφισμός MTHFR C677T) και συνδυασμών τους σε μια ετερογενή ομάδα ασθενών με ιστορικό αυτόματης έκτρωσης ( $\geq 3$  πρώτου τριμήνου ή  $\geq 2$  δευτέρου τριμήνου ή  $\geq 1$  τρίτου τριμήνου) και σε ομάδα ελέγχου και αναφέρουν ότι συνδυασμός θρομβοφιλιών απαντά συχνότερα στις ασθενείς (8% έναντι 1%) (190). Πρόσφατα οι Coulam και συν. δημοσίευσαν μελέτη σχετικά με τον επιπολασμό 10 θρομβοφιλικών πολυμορφισμών [παράγοντας V G1691A, πολυμορφισμός V H1299R (R2), πολυμορφισμός Y1702C του παράγοντα V, πολυμορφισμός G20210A της προθρομβίνης, πολυμορφισμός V34L του παράγοντα XIII, πολυμορφισμός -455G>A του β-ινωδογόνου, πολυμορφισμός PAI-1 4G/5G, πολυμορφισμός HPA1 a/b (L33P), πολυμορφισμός MTHFR C677T, πολυμορφισμός MTHFR A1298C] σε 150 ασθενείς με  $\geq 2$  αυτόματες εκτρώσεις και 20 γυναίκες ελέγχου. Κανένας από τους πολυμορφισμούς μεμονωμένα δεν εμφανιζόταν σημαντικά συχνότερα στην ομάδα των ασθενών (αν ο μικρός αριθμός των γυναικών ελέγχου καθιστά τις συγκρίσεις πολύ δύσκολες), ο επιπολασμός των ομόζυγων μεταλλάξεων ήταν σημαντικά μεγαλύτερος στην ομάδα των ασθενών από ό,τι στην ομάδα ελέγχου (59% έναντι 10%) (102). Στο δικό μας δείγμα η συχνότητα του



συνδυασμού θρομβοφιλικών μεταλλάξεων δεν διέφερε μεταξύ των ασθενών (4/88) και της ομάδας ελέγχου (2/88). Πολυμορφισμοί για τον παράγοντα V και την MTHFR συνδυάζονταν στις πέντε από τις έξι περιπτώσεις θρομβοφιλιών. Μείζονες θρομβοφιλίες (παράγοντας V Leiden ή μετάλλαξη G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης) ήταν παρούσες σε όλες τις περιπτώσεις συνδυασμένης θρομβοφιλίας στην ομάδα των ασθενών, ενώ ελάσσονες μεταλλάξεις ήταν παρούσες στις γυναίκες της ομάδας ελέγχου. Ωστόσο, οι αριθμοί είναι πολύ μικροί ώστε να μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα, είτε για την πραγματική συχνότητα είτε για το είδος του συνδυασμού. Αυτή άλλωστε είναι και η εγγενής αδυναμία των μελετών της συνδυασμένης θρομβοφιλίας, αφού η ετερογένεια των μεταλλάξεων που μελετούνται, οι διαφορετικοί ορισμοί των καθ' έξιν αποβολών και οι διαφορετικοί ορισμοί σχετικά με ποιες περιπτώσεις θεωρούνται θετικές, οδηγούν αναγκαστικά στην κατάτμηση των δειγμάτων και στη δημιουργία πολύ μικρών υπο-ομάδων των οποίων η σύγκριση έχει αμφίβολη κλινική αξία.

#### **Κατανομή των πολυμορφισμών ανάλογα με τον αριθμό των αυτόματων εκτρώσεων**

Μία δευτερεύουσα ανάλυση που εφαρμόσαμε στο δείγμα μας αφορούσε στη σύγκριση της συχνότητας των μεταλλάξεων μεταξύ ασθενών με δύο ή περισσότερες από δύο αυτόματες εκτρώσεις. Αν δεχθούμε πιθανότητα 15% για (σποραδική) αυτόματη έκτρωση ανά κλινική κύηση, η πιθανότητα δύο διαδοχικών τυχαίων αυτόματων εκτρώσεων είναι 1:44 ( $0.15^2$ ), ενώ η πιθανότητα για τρεις διαδοχικές τυχαίες αυτόματες εκτρώσεις είναι 1:296 ( $0.15^3$ ). Καθώς η συχνότητα  $\geq 3$  διαδοχικών αυτόματων εκτρώσεων είναι πολύ μεγαλύτερη (1%) από ό,τι θα περιμέναμε από τύχη μόνο, έχει υποστηριχτεί ότι αυτός ο πληθυσμός αντιπροσωπεύει μία ομάδα στην οποία είναι πολύ πιθανό να υφίσταται κάποιος αιτιολογικός παράγοντας υπεύθυνος για την απώλεια της κύησης, σε αντιδιαστολή με τις γυναίκες με δύο αυτόματες εκτρώσεις όπου η πιθανότητα τυχαίου γεγονότος είναι μεγαλύτερη. Ακολουθώντας διαφορετική προσέγγιση, πολλές κλινικές ομάδες επιλέγουν τη διερεύνηση των ασθενών μετά από δύο (παρά μετά από τρεις) αυτόματες εκτρώσεις, καθώς υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι ενώ η πρόγνωση για επόμενη κύηση δεν διαφέρει σημαντικά μετά από δύο ή μετά από τρεις αυτόματες εκτρώσεις, εντούτοις επιδεινώνεται σημαντικά με την αύξηση της ηλικίας της μητέρας (142) και επομένως καθυστέρηση στη διερεύνηση μπορεί να έχει αρνητική επίδραση μέσω της αύξησης της ηλικίας της ασθενούς. Σε κάθε περίπτωση, η διερεύνηση με  $\geq 2$  αυτόματες εκτρώσεις είναι πολύ συχνή στη βιβλιογραφία και μια ανάλυση υπο-



ομάδων στη μετα-ανάλυση των Rey και συν. έδειξε ότι οι λόγοι αναλογιών (odds ratios, OR) για τις μεταλλάξεις V Leiden, G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης και MTHFR C677T ήταν στην πραγματικότητα μεγαλύτεροι για τις μελέτες που περιλάμβαναν  $\geq 2$  από ό,τι για αυτές που περιλάμβαναν  $\geq 3$  αυτόματες εκτρώσεις (191). Τα δεδομένα από τη δική μας μελέτη δείχνουν ότι δεν υπάρχει διαφορά στην κατανομή των γονοτύπων, εκτός από τον πολυμορφισμό MTHFR A1298C, όπου όλες οι ομόζυγες ασθενείς είχαν δύο αυτόματες εκτρώσεις.

#### **Θρομβοφιλικό πολυμορφισμοί και ηλικία κύησης κατά την αυτόματη έκτρωση**

Παραδοσιακά θεωρήθηκε ότι οι θρομβοφιλικές μεταλλάξεις οδηγούν σε αυτόματη έκτρωση μέσω της πρόκλησης θρομβώσεων στο επίπεδο του πλακούντα. Αν και η συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία συγκεκριμένων θρομβοφιλικών διαταραχών και στην αύξηση του κινδύνου για επιπλοκές στην κύηση (περιλαμβανομένων των αυτόματων εκτρώσεων) είναι δεδομένη (78;87), η συνεισφορά της θρόμβωσης στις αυτόματες εκτρώσεις σε αρχικά στάδια της κύησης είναι περισσότερο αμφιλεγόμενη. Σήμερα γνωρίζουμε ότι τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του εμβρύου γίνονται σε ένα υποξικό περιβάλλον. Κανονική αγγειακή επικοινωνία με το μεσολάχιον χώρο αποκαθίσταται μόνο από τη 10<sup>η</sup> εβδομάδα και πέρα, και φαίνεται ότι η επιφανειακή διείσδυση της τροφοβλάστης και η πρώιμη έναρξη της μητροπλακουντιακής επικοινωνίας με το συνακόλουθο οξειδωτικό stress παρά η θρόμβωση είναι οι παράγοντες που υπόκεινται της αυτόματης έκτρωσης (192). Καθώς η πλακουντιακή θρόμβωση φαίνεται πειστικότερος μηχανισμός για επιπλοκές σε περισσότερο όψιμα στάδια της κύησης παρά νωρίς στο πρώτο τρίμηνο, αναλύσαμε περαιτέρω την κατανομή των πολυμορφισμών στις ασθενείς ανάλογα με την ηλικία κύησης στην οποία σημειώθηκε η αυτόματη έκτρωση. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι σχεδόν όλες οι περιπτώσεις θρομβοφιλίας βρέθηκαν σε ασθενείς όπου όλες ή η πλειοψηφία των αυτόματων εκτρώσεων είχε σημειωθεί πριν από τις 10 εβδομάδες. Αν και η τάση αυτή είναι σαφής, λόγω του μικρού μεγέθους της υπο-ομάδας με αυτόματη έκτρωση μετά τις 10 εβδομάδες, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την περίπτωση οι διαφορές που καταγράψαμε να είναι αποτέλεσμα τυχαίων γεγονότων. Εναλλακτικά, μηχανισμοί πέρα από την πρόκληση πλακουντιακής θρόμβωσης είναι συνεισφέρουν στην απώλεια της κύησης σε αυτές τις περιπτώσεις. Ακόμη και για τα ανιψωσφολιπιδικά αντισώματα, τα οποία αποτελούν το πρότυπο των επιδρώντων στην κύηση θρομβοφιλιών, έχει βρεθεί ότι η ελαττωματική διήθηση των αγγείων του φθαρτού είναι συχνότερο εύρημα από την παρουσία θρομβώσεων (123). Τα στοιχεία σχετικά με την επίδραση των θρομβοφιλικών μεταλλάξεων στη διεισδυτικότητα της πρώιμης τροφοβλάστης είναι ελάχιστα. Σύμφωνα με μία σειρά ασθενών που υποβλήθηκαν σε



εξωσωματική γονιμοποίηση, η παρουσία του παράγοντα V Leiden πιθανώς αυξάνουν τις πιθανότητες εμφύτευσης (193), ενώ *in vitro* μελέτες από ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα έδειξαν ότι η θρομβίνη και η προθρομβίνη διεγείρουν την κινητικότητα και τη διεισδυτικότητά τους (194;195). Αν και η ομοκυστεΐνη έχει αντι-αγγειογενετική δράση (196), η θειολακτονούχος ομοκυστεΐνη (homocysteine thiolactone) η οποία είναι παράγωγο που δημιουργείται σε συνθήκες παθολογικού μεταβολισμού της ομοκυστεΐνης, στην πραγματικότητα διεγείρει την αγγειογένεση και την κυτταρική διείσδυση (197).

Συμπερασματικά φαίνεται ότι, με την πιθανή εξαίρεση του παράγοντα V Leiden και της μετάλλαξης G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης, η ύπαρξη θρομβοφιλικών μεταλλάξεων δεν αυξάνει την πιθανότητα καθ' έξιν αποβολών. Παρόμοια, ο συνδυασμός θρομβοφιλικών μεταλλάξεων είναι σπάνιος τόσο στις ασθενείς όσο και στην ομάδα ελέγχου και επομένως δεν αναμένεται να αυξάνει τον κίνδυνο για καθ' έξιν αποβολές σημαντικά. Υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στη διάρθρωση των συνδυασμών και, λόγω του μικρού μεγέθους των υπο-ομάδων που αναπτόφευκτα δημιουργούνται λόγω αυτής της ετερογένειας, η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων απαιτεί πολύ μεγάλα δείγματα.

### **Ενεργότητα και πολυμορφισμός του PAI**

Σύμφωνα με τα ευρήματά μας, η δραστηριότητα του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI) δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου. Αντίθετα, η κατανομή του πολυμορφισμού PAI-1 4G/5G διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων, και ο ομόζυγος γονότυπος 4G/4G είναι σπανιότερος στις ασθενείς από ό,τι στην ομάδα ελέγχου. Ο ισχυρότερος προγνωστικός παράγοντας για τη δραστηριότητα του PAI είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης C, ενώ ο γονότυπος για τον πολυμορφισμό 4G/5G είναι μόνο οριακά σημαντικός.

Η πιθανή συσχέτιση της παθολογικής δραστηριότητας του PAI και της παρουσίας του πολυμορφισμού PAI-1 4G/5G με αύξηση του κινδύνου μαιευτικών επιπλοκών άρχισε να μελετάται σχετικά πρόσφατα. Ο PAI εκφράζεται στη διεισδυτική τροφοβλάστη και ενδεχόμενη δυσλειτουργία του συστήματος πήξης – ινωδόλυσης είναι πιθανό να διαταράσσει τη διείσδυση της τροφοβλάστης οδηγώντας είτε σε πρόωμη απώλεια της κύησης είτε σε μαιευτικές επιπλοκές σε οψιμότερα στάδια (16). Από τους δύο κύριους τύπους PAI, ο PAI-2 ανιχνεύεται σπάνια εκτός κύησης, οπότε μετρήσεις του PAI σε μη εγκύους αντικατοπτρίζουν στην ουσία το PAI-1.



Σύμφωνα με τα υπάρχοντα στοιχεία, οι διαταραχές της ινωδόλυσης είναι συχνές σε γυναίκες με καθ' ἑξιν αποβολών (82;198), και γυναίκες με ιστορικό είτε σποραδικών είτε καθ' ἑξιν αυτόματων εκτρώσεων βρέθηκε να εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη δραστηριότητα για τον PAI-1 σε σχέση με αντίστοιχες ομάδες ελέγχου (82;199). Τα δικά μας αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με αυτές τις παρατηρήσεις και σε αυτό μπορεί να συντρέχουν διάφοροι λόγοι. Η δραστηριότητα του PAI στο περιφερικό αίμα εκτός κύησης δεν αντικατοπτρίζει απαραίτητα την τοπική έκκριση του PAI στο ενδομήτριο της προεμφυτευτικής περιόδου. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται σε διαφορετικά εργαστήρια μπορεί να διαφέρουν σημαντικά, και τέλος, η διακύμανση των τιμών της δραστηριότητας του PAI τόσο στις ασθενείς όσο και στην ομάδα ελέγχου ήταν ευρεία στο δείγμα μας. Έτσι, παρά τη θεωρητική βάση για συνεισφορά του PAI σε επιπλοκές στην πρώιμη κύηση, οι μετρήσεις του στο περιφερικό αίμα δεν είναι απαραίτητα αξιόπιστες.

Προηγούμενες μελέτες για τον πολυμορφισμό 4G/5G έδειξαν ότι, αν και η κατανομή του δεν διαφέρει μεταξύ ασθενών με καθ' ἑξιν αποβολές και ομάδας ελέγχου, ο συνδυασμός του με τους πολυμορφισμούς ACE D/I (188) και FXIII Val34Leu (93) είναι συχνότερος στις ασθενείς. Η συνύπαρξη του PAI-1 4G/5G με τον πολυμορφισμό ACE D/I είναι πιθανό ότι αυξάνει περαιτέρω τα επίπεδα του PAI (188), ενώ ο συνδυασμός με τον πολυμορφισμό Val34Leu του παράγοντα XIII θεωρητικά διαταράσσει συνολικά την ινωδόλυση (93). Στην πραγματικότητα, η συγκέντρωση του PAI εξαρτάται μόνο εν μέρει από το γονότυπο για τον πολυμορφισμό 4G/5G, ενώ επηρεάζεται σημαντικά από εξωγενείς παράγοντες όπως ο δείκτης μάζας σώματος, η ινσουλίνη νήστεως, τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και οι τιμές της HDL χοληστερόλης. Από τους παράγοντες που εξετάσαμε, η πρωτεΐνη C είχε τη σημαντικότερη επίδραση, όντας υπεύθυνη για το 22% της μεταβολής της ενεργότητας του PAI, ενώ η παρουσία του γονότυπου 4G/4G ευθύνονταν μόνο για το 6%. Υπάρχουν δεδομένα που υποδεικνύουν ότι η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C αποτελεί ισχυρό ρυθμιστή της δραστηριότητας του PAI μέσω καταστολής της παραγωγής θρομβίνης και επομένως μέσω καταστολής της απενεργοποίησης του PAI από τη θρομβίνη (200). Είναι επομένως πιθανό ότι η πρωτεΐνη C ασκεί μία γενικότερη επίδραση στη φυσιολογία της πήξης, δρώντας ταυτόχρονα ως φυσικό αντιπηκτικό αλλά και ως αναστολέας της υπερβολικής ινωδόλυσης.

Η εμφανής αντίθεση των αποτελεσμάτων μας σχετικά με την κατανομή του πολυμορφισμού PAI-1 4G/5G στις ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου συγκριτικά με άλλες μελέτες είναι δύσκολο να ερμηνευτεί. Αν και οι μελέτες σε ασθενείς με καθ' ἑξιν αποβολές δεν δείχνουν σημαντική αύξηση του κινδύνου (188), (93;187), εντούτοις ο πολυμορφισμός αυτός είναι συχνός σε περιπτώσεις μαιευτικών επιπλοκών που

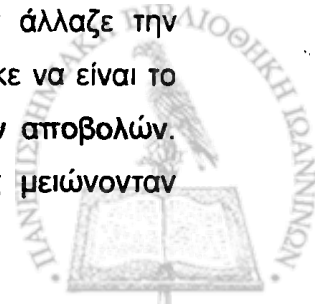


σχετίζονται με τον πλακούντα (108-110), και εντελώς πρόσφατα έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για αποτυχία εμφύτευσης μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση (201). Με βάση τα κριτήρια επιλογής των ομάδων ασθενών και ελέγχου αλλά και τη συμφωνία με τη βιβλιογραφία για τις υπόλοιπες μεταλλάξεις, δεν υπάρχει εμφανής αιτία για αυτή την αντίθεση.

### **Καθ' ἑξιν αποβολές άγνωστης αιτιολογίας**

Ακόμη και μετά από πλήρη διερεύνηση, σε ένα μεγάλο ποσοστό περιπτώσεων δεν βρίσκεται κανένα αίτιο το οποίο θα μπορούσε να σχετιστεί με την παθογένεση των αποβολών. Το ποσοστό αυτό ανέρχεται γενικά σε 50-70% των περιπτώσεων, ανάλογα με τον ορισμό που δίνεται στις καθ' ἑξιν αποβολές και τον ορισμό που χρησιμοποιείται κάθε φορά για τα «παραδεκτά» αίτια καθ' ἑξιν αποβολών (3). Η πρόγνωση για επόμενη κύηση είναι γενικά καλή σε αυτές τις ασθενείς, και βελτιώνεται όταν η φροντίδα τους γίνεται από εξειδικευμένο Ιατρείο που εξασφαλίζει στενή παρακολούθηση, τακτική επικοινωνία και συναισθηματική υποστήριξη.

Οι παράγοντες από το ιστορικό της ασθενούς που επηρεάζουν την πρόγνωση είναι κυρίως η ηλικία της ασθενούς και ο αριθμός των αποβολών. Στην πρώτη σχετική δημοσίευση, οι Cauchi και συν. ανέφεραν ότι οι σημαντικότεροι προγνωστικοί παράγοντες ύστερα από 3 συνεχόμενες αυτόματες εκτρώσεις είναι η διάρκεια του ιστορικού των αποβολών και η ηλικία της ασθενούς (202). Τέσσερα χρόνια αργότερα, οι ίδιοι συγγραφείς δημοσίευσαν τα αποτελέσματα μίας πολυκεντρικής μελέτης με 777 ζεύγη, σύμφωνα με τα οποία σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες ήταν ο αριθμός των προηγούμενων αποβολών, η διάρκεια του ιστορικού των αποβολών και η συνύπαρξη προβλημάτων υπογονιμότητας (203). Οι Clifford και συν. μελέτησαν μία σειρά 201 ασθενών με  $\geq 3$  αυτόματες εκτρώσεις και βρήκαν ότι η πιθανότητα επιτυχίας μειώνονταν με αύξηση της ηλικίας της ασθενούς και του αριθμού των αποβολών. Η ύπαρξη προηγούμενου ιστορικού επιτυχούς κύησης δεν επηρέαζε την πρόγνωση και η μέση ηλικία κύησης κατά την αυτόματη έκτρωση ήταν 8.5 εβδομάδες (141). Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα μίας σειράς 222 ασθενών με  $\geq 2$  διαδοχικές αυτόματες εκτρώσεις που περιγράφηκε από τους Brigham και συν. (142). Και εκεί, η ηλικία της ασθενούς και ο αριθμός των αποβολών αποτελούσαν σημαντικούς προγνωστικούς παράγοντες, ενώ προηγούμενη επιτυχής κύηση δεν άλλαζε την πρόγνωση. Το πλέον επικίνδυνο στάδιο για απώλεια της κύησης φάνηκε να είναι το διάστημα μεταξύ 6-8 εβδομάδων, στο οποίο σημειώθηκε το 78% των αποβολών. Αντίθετα, η πιθανότητα αυτόματης έκτρωσης μετά τις 8 εβδομάδες μειώνονταν





κατακόρυφα σε 2%. Ένα σημαντικό αποτέλεσμα αυτής της μελέτης είναι ότι η πρόγνωση σε επόμενη κύηση δεν διαφέρει πρακτικά μετά από 2 ή 3 αυτόματες εκτρώσεις (76% έναντι 79% επιτυχία), και αυτό αποτέλεσε επιχείρημα για τις κλινικές ομάδες που αρχίζουν τη διερεύνηση των ασθενών μετά τις δύο (και όχι μετά τις τρεις) αυτόματες εκτρώσεις, καθώς η καθυστέρηση στην έναρξη της διερεύνησης θα μπορούσε να επιδεινώσει την πρόγνωση μέσω αύξησης της ηλικίας της ασθενούς.

Ανατομικά, χρωμοσωμικά, ενδοκρινολογικά αίτια, αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα, συγγενής έλλειψη πρωτεΐνης S ή μετάλλαξη Leiden του παράγοντα V ή G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης βρέθηκαν σε 31 από τις 120 ασθενείς μας.

Κατά συνέπεια, ένα ή περισσότερα από τα αποδεκτά αίτια καθ' έξιν αποβολών βρέθηκε συνολικά στο 1/4 περίπου των περιπτώσεων (25.8%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 17.9 ως 33.7), ενώ στα υπόλοιπα ¾ (N=89, 74.2%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 66.3 ως 82.0) δε στάθηκε δυνατό να βρεθεί κάποιος αποδεκτός αιτιολογικός παράγοντας. Σαράντα μία από τις ασθενείς με ανεξήγητες καθ' έξιν αποβολές πέτυχαν κύηση για της οποίας την έκβαση υπάρχουν στοιχεία, εντός ενός έτους από τη διερεύνηση. Η κύηση κατέληξε σε γέννηση ζώντος νεογνού ή συνεχίζει πέρα από τις 24 εβδομάδες σε 31 περιπτώσεις, ενώ σε 8 περιπτώσεις κατέληξε σε αυτόματη έκτρωση και σε 2 περιπτώσεις επρόκειτο για εξωμήτρια σαλπινγική κύηση. Αν αποκλειστούν οι δύο τελευταίες περιπτώσεις, το ποσοστό επιτυχίας στην επόμενη κύηση ανέρχεται σε 79.5% (95% διάστημα εμπιστοσύνης 66.8-92.1). Το μικρό μέγεθος του δείγματος καθίσταται απαγορευτικό για επίσημη στατιστική ανάλυση των παραγόντων που καθορίζουν την πρόγνωση. Μία απλή περιγραφική ανάλυση δείχνει ότι η πιθανότητα επιτυχίας είναι μεγαλύτερη σε ασθενείς με δύο (94.7%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 84.7-100.0%) από ό,τι σε τρεις ή περισσότερες αποβολές (65.0%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 44.1 – 85.9%), και σε ασθενείς ηλικίας ως 30 ετών (90.0%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 76.8 – 100.0%) από ό,τι σε ασθενείς 31 ετών και άνω (68.4%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 47.5 – 89.3%). Η ηλικία κύησης κατά την αυτόματη έκτρωση δεν φαίνεται να επηρεάζει την πρόγνωση, ενώ στο δείγμα μας γυναίκες με δευτεροπαθείς καθ' έξιν αποβολές είχαν μικρότερη πιθανότητα επιτυχίας σε επόμενη κύηση σε σχέση με ασθενείς με πρωτοπαθείς καθ' έξιν αποβολές (Fisher's exact test,  $p=0.022$ ). Η σημασία αυτού του ευρήματος είναι αβέβαιη και το αντιμετωπίζουμε πολύ επιφυλακτικά λόγω του πολύ μικρού αριθμού (N=7) των γυναικών με δευτεροπαθείς καθ' έξιν αποβολές και στοιχεία για την έκβαση της επόμενης κύησης.



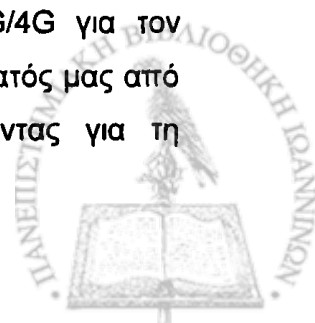
## Συμπεράσματα

---

Στην παρούσα μελέτη αναλύσαμε την κατανομή αποδεκτών και υπό διερεύνηση αιτιολογικών παραγόντων καθ' ἕξιν αποβολών σε ένα δείγμα γυναικών από τη ΒΔ Ελλάδα. Καθώς οι παράγοντες αυτοί παρουσιάζουν ευρεία γεωγραφική και πληθυσμιακή διακύμανση, προσθέτουμε σημαντικά στοιχεία στα ελάχιστα δημοσιευμένα ελληνικά δεδομένα.

Πέραν των άλλων, εξετάσαμε τον επιπολασμό δύο ελάχιστα μελετημένων πολυμορφισμών (FV A1299H και MTHFR C677T) και για πρώτη φορά περιγράψαμε την κατανομή τους σε ελληνικό πληθυσμό. Επίσης πρωχωρήσαμε σε τέσσερις πρωτότυπες ή ελάχιστα πραγματοποιημένες στο παρελθόν αναλύσεις: 1) Ανάλυση της πιθανής συσχέτισης των θρομβοφιλικών πολυμορφισμών με την ηλικία κύησης κατά την αποβολή, 2) Ανάλυση της κατανομής των πολυμορφισμών ανάλογα με τον αριθμό των αποβολών, 3) Ανάλυση του επιπολασμού πολλαπλών θρομβοφιλικών μεταλλάξεων, και 4) Ταυτόχρονη ανάλυση του γονοτύπου και της ενεργότητας του PAI. Τέλος, καταγράψαμε την έκβαση επόμενης κύησης στις ασθενείς μας στις οποίες δεν βρέθηκε εμφανής αιτία για την απώλεια της κύησης.

Καμία από τις πέντε κοινές θρομβοφιλικές μεταλλάξεις που μελετήσαμε (παράγοντας V Leiden, μετάλλαξη A1299H [A4070G] του παράγοντα V, μετάλλαξη G20210A του παράγοντα II [προθρομβίνης], μετάλλαξη C677T της MTHFR και μετάλλαξη A1298C της MTHFR), μόνη ή σε συνδυασμό, δεν σχετίζεται με στατιστική αύξηση του κινδύνου για εμφάνιση καθ' ἕξιν αποβολών στο δείγμα μας. Πιθανώς σε αυτό αποτελούν εξαιρέσεις ο παράγοντας V Leiden (λόγος πιθανοτήτων [OR] 1.59 [95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.37 ως 6.82] για όλες τις ασθενείς και OR 1.75 [95% CI 0.41 ως 7.55] για τις περιπτώσεις ανεξήγητων καθ' ἕξιν αποβολών) και η μετάλλαξη G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης (OR 2.38 [95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.45 ως 12.55] για όλες τις ασθενείς και OR 2.63 [95% CI 0.49 ως 13.90] για τις περιπτώσεις ανεξήγητων καθ' ἕξιν αποβολών), αν και το μέγεθος του δείγματος δεν επέτρεψε σε αυτές την επίτευξη σημαντικότητας. Η δραστηριότητα του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI) δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου ενώ ο ομόζυγος γονότυπος 4G/4G για τον πολυμορφισμό PAI-1 4G/5G ήταν σπανιότερος στις ασθενείς του δείγματός μας από ό,τι στην ομάδα ελέγχου. Ο ισχυρότερος προγνωστικός παράγοντας για τη



δραστηριότητα του PAI είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης C, ενώ ο γονότυπος για τον πολυμορφισμό 4G/5G είναι μόνο οριακά σημαντικός.

Ανατομικά, χρωμοσωμικά, ενδοκρινολογικά αίτια, αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα ή συγγενής έλλειψη πρωτεΐνης S βρέθηκε σε περίπου 1/6 των ασθενών μας (17.5%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 10.7 ως 24.3). Δέκα επιπλέον ασθενείς ήταν φορείς για τη μετάλλαξη Leiden του παράγοντα V ή τη μετάλλαξη G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης, οι οποίες θεωρούνται οι κλινικά σημαντικότερες μεταλλάξεις.

Κατά συνέπεια, ένα ή περισσότερα από τα αποδεκτά αίτια καθ' έξιν αποβολών βρέθηκε συνολικά στο 1/4 περίπου των περιπτώσεων (25.8%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 17.9 ως 33.7), ενώ στα υπόλοιπα ¾ (74.2, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 66.3 ως 82.0) δε στάθηκε δυνατό να βρεθεί κάποιος αποδεκτός αιτιολογικός παράγοντας.

Η πρόγνωση για τις ασθενείς στις οποίες δεν ανευρίσκεται κανένας αιτιολογικός παράγοντας είναι καλή και εξαρτάται κυρίως από την ηλικία της ασθενούς και τον αριθμό των αποβολών.



## Περίληψη

---

Οι καθ' ἑξίν αποβολές (οριζόμενες ως  $\geq 3$  ή  $\geq 2$  αυτόματες εκτρώσεις πριν από τις 20 εβδομάδες κύησης) παρατηρούνται στο 1-5% των ζευγών που επιχειρούν να τεκνοποιήσουν.

Ανατομικοί, γενετικοί, ενδοκρινολογικοί, ανοσολογικοί παράγοντες και θρομβοφιλικές διαταραχές έχουν μελετηθεί για πιθανή συμμετοχή στην παθοφυσιολογία του φαινομένου. Ενώ η σημασία των ανατομικών ανωμαλιών της μήτρας, των χρωμοσωμικών ανωμαλιών στο ζεύγος και μερικών θρομβοφιλικών καταστάσεων είναι αποδεδειγμένη, η εμπλοκή άλλων παραγόντων είναι ακόμη αμφισβητούμενη και νέα στοιχεία προστίθενται συνεχώς στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. Εκτός από τις διαφοροποιήσεις στα αποτελέσματα, ένα επιπλέον στοιχείο που προσθέτει στην ανομοιογένεια των δεδομένων είναι οι αναπόφευκτες γεωγραφικές και εθνολογικές διακυμάνσεις στη συχνότητα των διαφόρων αιτίων.

Στην παρούσα μελέτη αναλύσαμε ένα δείγμα 120 ασθενών με  $\geq 2$  αυτόματες εκτρώσεις  $< 20$  εβδομάδων για αποδεκτά και πιθανά αίτια καθ' ἑξίν αποβολών και, όπου ήταν ενδεικνυόμενο, συγκρίναμε τον επιπολασμό των υπό διερεύνηση παραγόντων με εκείνον ομάδας ελέγχου από γυναίκες με  $\geq 2$  επιτυχείς κυήσεις χωρίς ιστορικό αυτόματων εκτρώσεων.

Η διερεύνηση των ασθενών έγινε με βάση πρωτόκολλο για τις παρακάτω παθολογικές καταστάσεις:

1. Ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας
2. Ενδοκρινολογικές ανωμαλίες (ανωμαλίες των γεννητικών ορμονών, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, θυρεοειδοπάθεια, υπερπρολακτιναιμία)
3. Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (αντισώματα κατά καρδιολιπίνης, αντιπηκτικό λύκου)
4. Συγγενείς θρομβοφιλίες (έλλειψη πρωτεΐνης S, C, αντιθρομβίνης III, αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C [APC-R], μετάλλαξη G20210A για το γονίδιο της προθρομβίνης, μετάλλαξη Leiden για το γονίδιο του παράγοντα πήξης V, μετάλλαξη C677T για το γονίδιο της μεθυλ-τετραϋδροφυλλικής αναγωγάσης (MTHFR), μετάλλαξη A1299H (R2) του παράγοντα πήξης V και μετάλλαξη A1298C για το γονίδιο της MTHFR)



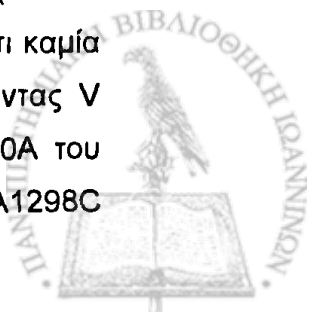
5. Δραστικότητα του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI) και μετάλλαξη 4G/5G για το γονίδιο του PAI-1

6. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες του ζεύγους

Το παραπάνω πρωτόκολλο συνδύασε ένα διαγνωστικό μέρος για αποδεκτά αίτια καθ' έξιν αποβολών με ένα ερευνητικό μέρος για πιθανούς αιτιολογικούς παράγοντες. Στο ερευνητικό σκέλος του πρωτοκόλλου ανήκει η διερεύνηση για θρομβοφιλικές μεταλλάξεις (μετάλλαξη G20210A για το γονίδιο της προθρομβίνης, μετάλλαξη Leiden για το γονίδιο του παράγοντα πήξης V, μετάλλαξη C677T για το γονίδιο της MTHFR, μετάλλαξη A1299H (R2) του παράγοντα πήξης V και μετάλλαξη A1298C για το γονίδιο της MTHFR) και για ανωμαλίες του μηχανισμού πήξης - ινωδόλυσης (δραστικότητα του PAI και πολυμορφισμός 4G/5G για το γονίδιο του PAI-1).

Ένα ή περισσότερα από τα αποδεκτά αίτια καθ' έξιν αποβολών βρέθηκε συνολικά στο 25.8% των περιπτώσεων (95% διάστημα εμπιστοσύνης 17.9 ως 33.7). Χρωμοσωμικές ανωμαλίες βρέθηκαν σε δύο ζεύγη (1.6%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.0 ως 3.9). Και στις δύο περιπτώσεις επρόκειτο για ισοζυγισμένες αμοιβαίες μεταθέσεις, όπου φορέας ήταν η γυναίκα στη μία περίπτωση και ο άνδρας στην άλλη. Ανατομική ανωμαλία της μήτρας βρέθηκε σε 11 από ασθενείς μας (9%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 3.9 ως 14.2). Η μεγάλη πλειοψηφία αφορούσε ανωμαλία διάπλασης της μήτρας (N=9, 7.5%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 2.8 ως 12.2) ενώ σε δύο περιπτώσεις διαγνώστηκαν ενδομήτριες συμφύσεις (N=2, 1.5%). Πέντε από τις ασθενείς μας (4.2%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.6 ως 7.3) είχαν εργαστηριακά ευρήματα αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου. Σε καμία από τις ασθενείς αυτές δεν υπήρχαν ενδείξεις γενικότερης αυτοάνοσης διαταραχής και καμία τους δεν είχε ιστορικό απώλειας κύησης μετά τις 20 εβδομάδες. Τέσσερις ασθενείς (3.5%) παρουσίασαν εικόνα συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών. Μία ασθενής έπασχε από κλινικό υπερθυρεοειδισμό και ο εργαστηριακός έλεγχος ήταν ενδεικτικός πλημμελούς ρύθμισης. Σε μία περίπτωση διαγνώστηκε πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια και η ασθενής παραπέμφθηκε στο αντίστοιχο Ιατρείο. Τρεις ασθενείς (2.5%, 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.0 ως 5.2) εμφάνισαν ελαττωμένη συγκέντρωση πρωτεΐνης S.

Η σύγκριση του επιπολασμού των θρομβοφιλικών μεταλλάξεων στις ασθενείς του δείγματός μας με την ομάδα ελέγχου έγινε με δύο τρόπους: 1) συγκρίνοντας το σύνολο των ασθενών με την ομάδα ελέγχου, και 2) συγκρίνοντας τις ασθενείς που ήταν αρνητικές για αποδεκτά αίτια καθ' έξιν αποβολών με την ομάδα ελέγχου. Τα αποτελέσματα ήταν πρακτικά ταυτόσημα στις δύο περιπτώσεις και έδειξαν ότι καμία από τις πέντε κοινές θρομβοφιλικές μεταλλάξεις που μελετήσαμε (παράγοντας V Leiden, μετάλλαξη A1299H [A4070G] του παράγοντα V, μετάλλαξη G20210A του παράγοντα II [προθρομβίνης], μετάλλαξη C677T της MTHFR και μετάλλαξη A1298C



της MTHFR), μόνη ή σε συνδυασμό, δεν σχετίζεται με στατιστική αύξηση του κινδύνου για εμφάνιση καθ' έξιν αποβολών. Πιθανώς σε αυτό αποτελούν εξαιρέσεις ο παράγοντας V Leiden (λόγος πιθανοτήτων [OR] 1.59 [95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.37 ως 6.82] για όλες τις ασθενείς και OR 1.75 [95% CI 0.41 ως 7.55] για τις περιπτώσεις ανεξήγητων καθ' έξιν αποβολών) και η μετάλλαξη G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης (OR 2.38 [95% διάστημα εμπιστοσύνης 0.45 ως 12.55] για όλες τις ασθενείς και OR 2.63 [95% CI 0.49 ως 13.90] για τις περιπτώσεις ανεξήγητων καθ' έξιν αποβολών), αν και το μέγεθος του δείγματος δεν επέτρεψε σε αυτές την επίτευξη σημαντικότητας.

Η δραστηριότητα του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI) δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου στο δείγμα μας ( $p=0.61$ ). Αντίθετα, η κατανομή του πολυμορφισμού PAI-1 4G/5G διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων ( $p=0.01$ ) και ο ομόζυγος γονότυπος 4G/4G είναι σπανιότερος στις ασθενείς από ό,τι στην ομάδα ελέγχου ( $p=0.014$ ). Ανάλυση με τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression) έδειξε ότι το επίπεδο της πρωτεΐνης C, η ομοζυγωτία για τον πολυμορφισμό και η ηλικία της ασθενούς είναι οι μόνοι σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες για τη δραστηριότητα του PAI. Η πρωτεΐνη C είναι υπεύθυνη για το 22% των μεταβολών της δραστηριότητας του PAI, ενώ ο γονότυπος 4G/4G μόνο για το 6%.

Σε 74.2% των ασθενών του δείγματός μας (95% διάστημα εμπιστοσύνης 66.3 - 82.0) δε στάθηκε δυνατό να βρεθεί κάποιος αποδεκτός αιτιολογικός παράγοντας. Από την ομάδα αυτή, 41 γυναίκες πέτυχαν κύηση της οποίας είναι γνωστή η έκβαση σε διάστημα ενός έτους μετά τη διερεύνηση. Αν εξαιρέσουμε τις 2 περιπτώσεις στις οποίες σημειώθηκε εξωμήτριος κύηση, το συνολικό ποσοστό επιτυχίας ήταν 79.5% (95% διάστημα εμπιστοσύνης 66.8-92.1). Αν και το μικρό μέγεθος αυτής της ομάδας καθιστά απαγορευτική την επίσημη στατιστική ανάλυση, μία απλή περιγραφική ανάλυση δείχνει ότι η πρόγνωση σε επόμενη κύηση εξαρτάται κυρίως από την ηλικία της ασθενούς και τον αριθμό των προηγούμενων αποβολών, το οποίο βρίσκεται σε πλήρη συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.



## Abstract

---

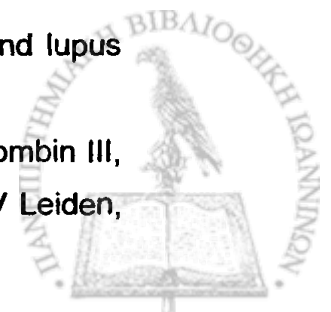
### **Molecular, biochemical and genetic investigation of recurrent miscarriage**

Alexandros Sotiriadis

Recurrent miscarriage (RM), defined as three or more (or two or more) consecutive miscarriages before 20 weeks, affects (depending on the definition) 1-5% of couples. Anatomical, genetic, endocrine, immune factors and thrombophilic disorders have been investigated for their potential contribution in the pathophysiology of recurrent miscarriage. Although structural uterine abnormalities, balanced chromosomal aberrations in the couple, antiphospholipid antibodies and some congenital thrombophilias have a sound causative association with recurrent miscarriage, the implication of other factors is more controversial and new evidence is added in the literature. Apart from the deviations in the results of different studies, the inevitable geographic and ethnic variations furthermore add to the heterogeneity of evidence. In the present study we analysed a sample of 120 patients with  $\geq 2$  miscarriages before 20 gestational weeks for proven and likely causes of recurrent miscarriage and, when indicated, we compared the prevalence of the factors under study with that of a control group including women with  $\geq 2$  successful pregnancies without a history of pregnancy loss.

The investigation of patients was carried out according to a standard protocol for the following conditions:

1. Uterine structural abnormalities (investigation with diagnostic hysteroscopy, transvaginal scan)
2. Endocrine abnormalities (sex steroids abnormalities, polycystic ovarian syndrome, thyroid disease, hyperprolactinaemia)
3. Antiphospholipid syndrome (investigation for anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulant)
4. Congenital thrombophilia (congenital deficiency for protein C / S / antithrombin III, resistance to the activated protein C, factor II G20210A mutation, Factor V Leiden,



Factor V A1299H (A4070G) mutation of HR2 haplotype, MTHFR C677T polymorphism and MTHFR A1298C polymorphism)

5. Activity of the plasminogen activator inhibitor (PAI) and PAI-1 4G/5G polymorphism

6. Chromosomal aberrations in the couple

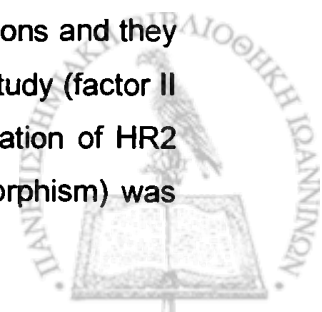
This protocol combined a diagnostic arm for proven causative factors with a research arm for factors under study. The research arm included investigation for thrombophilic mutations (factor II G20210A mutation, Factor V Leiden, Factor V A1299H (A4070G) mutation of HR2 haplotype, MTHFR C677T polymorphism and MTHFR A1298C polymorphism) and for abnormalities of the mechanism of clotting – fibrinolysis (PAI activity and PAI-1 4G/5G polymorphism).

Genomic DNA was obtained from blood samples by a salting-out procedure. Polymorphism analysis was carried out by PCR, using digestion with *Mnl*I for Factor V Leiden, *Rsa*I for FV A1299H (A4070G), *Hind*III for FII G20210A, *Hinf*I for MTHFR C677T, *Mbo*II for MTHFR A1298C and *Bsl*I for PAI-1 4G/5G. The activity of PAI was assessed using a commercially available kit based on the inhibition of urokinase.

One or more accepted causes for recurrent miscarriage were found in 25.8% of the cases (95% confidence interval [CI] 17.9 -33.7%). Chromosomal aberrations were found in two couples (95% CI 17.9 - 33.7). Both cases were balanced reciprocal translocations, with the male partner being the carrier in the first case and the female in the second. A structural uterine defect was found in 11 patients (9%, 95% CI 3.9 - 14.2). A congenital Mullerian abnormality was the most common cause (N=9, 7.5%, 95% CI 2.8  $\omega$  12.2), with the rest two cases being intrauterine adhesions.

Five cases had laboratory findings indicative of antiphospholipid antibodies (4.2%, 95% CI 0.6 - 7.3). None of these patients had signs or symptoms of an underlying autoimmune disease, and none of them had any pregnancy losses after 20 weeks. Four patients (3.5%) were diagnosed as having polycystic ovarian syndrome. In one patients there was evidence of poorly controlled hyperthyroidism. Premature ovarian failure was diagnosed in one case and the patient was referred to a specialist clinic. Three patients (2.5%, 95% CI 0.0  $\omega$  5.2) had protein S deficiency.

The comparison of the prevalence of thrombophilic mutations between patients and controls was made in two ways: 1) comparing the whole group of patients with the controls, and, 2) comparing patients without proven causes of recurrent miscarriage with the controls. The results were essentially identical in both comparisons and they indicated that none of the five common thrombophilic mutations under study (factor II G20210A mutation, Factor V Leiden, Factor V A1299H (A4070G) mutation of HR2 haplotype, MTHFR C677T polymorphism and MTHFR A1298C polymorphism) was





associated with statistically increased risk for recurrent miscarriage. Factor V Leiden (OR 1.75, 95% CI 0.41 - 7.55) and factor II G20210A mutation (OR 2.63, 95% CI 0.49 - 13.90) are two possible exceptions to this; however, the small size of our sample prevented them from reaching statistical significance.

The activity of PAI was not significantly different between the groups ( $p=0.61$ ). However, the distribution of PAI-1 4G/5G polymorphism was significantly different ( $p=0.01$ ) and homozygosity 4G/4G was more common among controls ( $p=0.014$ ). Linear regression analysis showed that protein C level, homozygosity 4G/4G and age are the only significant predictors for PAI activity. Protein C level accounts for 22% of the variability in PAI activity and 4G/4G haplotype for only 6%.

No responsible causative factor was found in 74.2% (95% CI 66.3 - 82.0) of our patients. Forty-one patients from this subgroup achieved pregnancy, for which the outcome is known, within the first year after investigation. Excluding two cases of ectopic pregnancy, the overall successful pregnancy rate was 79.5% (95% CI 66.8-92.1). Although the small size of this sample prevents formal statistical analysis, a simple descriptive analysis indicates that the prognosis in a subsequent pregnancy is mainly associated with the age of the patient and the number of previous miscarriages, which is in agreement with the evidence in the literature.

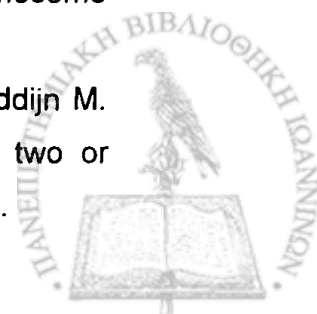


## Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

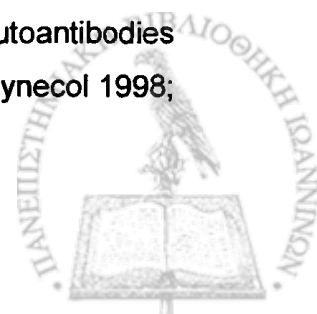
- (1) WHO: recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1977; 56(3):247-253.
- (2) Demetroulis C, Saridogan E, Kunde D, Naftalin AA. A prospective randomized control trial comparing medical and surgical treatment for early pregnancy failure. *Hum Reprod* 2001; 16(2):365-369.
- (3) American College of Obstetricians and Gynecologists. American College of Obstetricians and Gynecologists.ACOG practice bulletin. Management of recurrent pregnancy loss. Number 24, February 2001. (Replaces Technical Bulletin Number 212, September 1995). *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 78(2):179-190.
- (4) Christiansen OB, Nybo Andersen AM, Bosch E et al. Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2005; 83(4):821-839.
- (5) Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1999; 340(23):1796-1799.
- (6) Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W, French J. Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study. *Fertil Steril* 2003; 79(3):577-584.
- (7) Knudsen UB, Hansen V, Juul S, Secher NJ. Prognosis of a new pregnancy following previous spontaneous abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991; 39(1):31-36.
- (8) Goldstein SR. Embryonic death in early pregnancy: a new look at the first trimester. *Obstet Gynecol* 1994; 84(2):294-297.
- (9) Ogasawara M, Aoki K, Okada S, Suzumori K. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil Steril* 2000; 73(2):300-304.
- (10) McFadyen IR. Early Fetal Loss. In: Rodeck C., editor. *Fetal Medicine*. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publishers, 1989: 26-43.
- (11) Quenby S, Vince G, Farquharson R, Aplin J. Recurrent miscarriage: a defect in nature's quality control? *Hum Reprod* 2002; 17(8):1959-1963.
- (12) Porter TF, Scott JR. Evidence-based care of recurrent miscarriage. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2005; 19(1):85-101.



- (13) Stirrat GM. Recurrent miscarriage. *Lancet* 1990; 336(8716):673-675.
- (14) Quenby SM, Farquharson RG. Predicting recurring miscarriage: what is important? *Obstet Gynecol* 1993; 82(1):132-138.
- (15) Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2001; 345(19):1400-1408.
- (16) Lala PK, Chakraborty C. Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury. *Placenta* 2003; 24(6):575-587.
- (17) Veenstra van Nieuwenhoven AL, Heineman MJ, Faas MM. The immunology of successful pregnancy. *Hum Reprod Update* 2003; 9(4):347-357.
- (18) Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S et al. Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nat Immunol* 2001; 2(11):1018-1024.
- (19) Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Chrousos G. Endometrial and placental CRH as regulators of human embryo implantation. *J Reprod Immunol* 2004; 62(1-2):53-59.
- (20) De Braekeleer M., Dao TN. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum Reprod* 1990; 5(5):519-528.
- (21) Portnoi MF, Joye N, van den AJ, Morlier G, Taillemite JL. Karyotypes of 1142 couples with recurrent abortion. *Obstet Gynecol* 1988; 72(1):31-34.
- (22) Stephenson MD, Sierra S. Reproductive outcomes in recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a structural chromosome rearrangement. *Hum Reprod* 2006.
- (23) Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sato T, Suzumori N, Suzumori K. Poor prognosis of recurrent aborters with either maternal or paternal reciprocal translocations. *Fertil Steril* 2004; 81(2):367-373.
- (24) Carp H, Feldman B, Oelsner G, Schiff E. Parental karyotype and subsequent live births in recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2004; 81(5):1296-1301.
- (25) Franssen MT, Korevaar JC, Leschot NJ et al. Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *BMJ* 2005; 331(7509):137-141.
- (26) Ogilvie CM, Braude P, Scriven PN. Successful pregnancy outcomes after preimplantation genetic diagnosis (PGD) for carriers of chromosome translocations. *Hum Fertil (Camb)* 2001; 4(3):168-171.
- (27) Franssen MT, Korevaar JC, van d, V, Leschot NJ, Bossuyt PM, Goddijn M. Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *BMJ* 2006; 332(7544):759-763.



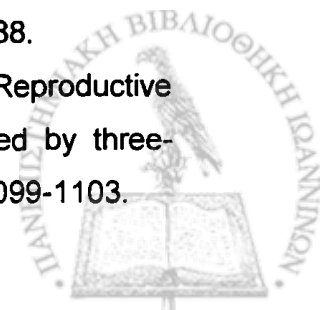
- (28) LYON MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 1961; 190:372-373.
- (29) Busque L, Mio R, Mattioli J et al. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood* 1996; 88(1):59-65.
- (30) Lanasa MC, Hogge WA, Kubik CJ et al. A novel X chromosome-linked genetic cause of recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185(3):563-568.
- (31) Uehara S, Hashiyada M, Sato K, Sato Y, Fujimori K, Okamura K. Preferential X-chromosome inactivation in women with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2001; 76(5):908-914.
- (32) Kim JW, Park SY, Kim YM, Kim JM, Han JY, Ryu HM. X-chromosome inactivation patterns in Korean women with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *J Korean Med Sci* 2004; 19(2):258-262.
- (33) Sullivan AE, Lewis T, Stephenson M et al. Pregnancy outcome in recurrent miscarriage patients with skewed X chromosome inactivation. *Obstet Gynecol* 2003; 101(6):1236-1242.
- (34) Sangha KK, Stephenson MD, Brown CJ, Robinson WP. Extremely skewed X-chromosome inactivation is increased in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Hum Genet* 1999; 65(3):913-917.
- (35) Stagnaro-Green A, Roman SH, Cobin RH, el-Harazy E, varez-Marfany M, Davies TF. Detection of at-risk pregnancy by means of highly sensitive assays for thyroid autoantibodies. *JAMA* 1990; 264(11):1422-1425.
- (36) Roberts J, Jenkins C, Wilson R et al. Recurrent miscarriage is associated with increased numbers of CD5/20 positive lymphocytes and an increased incidence of thyroid antibodies. *Eur J Endocrinol* 1996; 134(1):84-86.
- (37) Dendrinou S, Papasteriades C, Tarassi K, Christodoulakos G, Prasinos G, Creatsas G. Thyroid autoimmunity in patients with recurrent spontaneous miscarriages. *Gynecol Endocrinol* 2000; 14(4):270-274.
- (38) Bussen SS, Steck T. Thyroid antibodies and their relation to antithrombin antibodies, anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulant in women with recurrent spontaneous abortions (antithyroid, anticardiolipin and antithrombin autoantibodies and lupus anticoagulant in habitual aborters). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997; 74(2):139-143.
- (39) Esplin MS, Branch DW, Silver R, Stagnaro-Green A. Thyroid autoantibodies are not associated with recurrent pregnancy loss. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179(6 Pt 1):1583-1586.



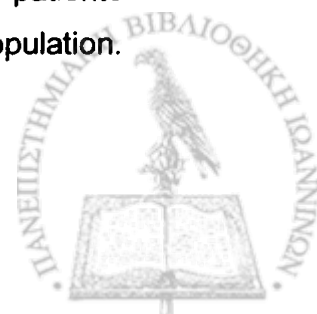
- (40) Roussev RG, Kaider BD, Price DE, Coulam CB. Laboratory evaluation of women experiencing reproductive failure. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35(4):415-420.
- (41) Mecacci F, Parretti E, Cioni R et al. Thyroid autoimmunity and its association with non-organ-specific antibodies and subclinical alterations of thyroid function in women with a history of pregnancy loss or preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2000; 46(1):39-50.
- (42) Kutteh WH, Yetman DL, Carr AC, Beck LA, Scott RT, Jr. Increased prevalence of antithyroid antibodies identified in women with recurrent pregnancy loss but not in women undergoing assisted reproduction. *Fertil Steril* 1999; 71(5):843-848.
- (43) 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(7):1637-1639.
- (44) Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Clinical Green Top Guideline No. 17. The investigation and treatment of couples with recurrent miscarriage. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, editor. 2003.  
Ref Type: Report
- (45) Regan L, Owen EJ, Jacobs HS. Hypersecretion of luteinising hormone, infertility, and miscarriage. *Lancet* 1990; 336(8724):1141-1144.
- (46) Nardo LG, Rai R, Backos M, El-Gaddal S, Regan L. High serum luteinizing hormone and testosterone concentrations do not predict pregnancy outcome in women with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2002; 77(2):348-352.
- (47) Clifford K, Rai R, Watson H, Franks S, Regan L. Does suppressing luteinising hormone secretion reduce the miscarriage rate? Results of a randomised controlled trial. *BMJ* 1996; 312(7045):1508-1511.
- (48) Tulppala M, Stenman UH, Cacciatore B, Ylikorkala O. Polycystic ovaries and levels of gonadotrophins and androgens in recurrent miscarriage: prospective study in 50 women. *Br J Obstet Gynaecol* 1993; 100(4):348-352.
- (49) Liddell HS, Sowden K, Farquhar CM. Recurrent miscarriage: screening for polycystic ovaries and subsequent pregnancy outcome. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1997; 37(4):402-406.
- (50) Craig LB, Ke RW, Kutteh WH. Increased prevalence of insulin resistance in women with a history of recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2002; 78(3):487-490.



- (51) Glueck CJ, Wang P, Goldenberg N, Sieve-Smith L. Pregnancy outcomes among women with polycystic ovary syndrome treated with metformin. *Hum Reprod* 2002; 17(11):2858-2864.
- (52) Glueck CJ, Phillips H, Cameron D, Sieve-Smith L, Wang P. Continuing metformin throughout pregnancy in women with polycystic ovary syndrome appears to safely reduce first-trimester spontaneous abortion: a pilot study. *Fertil Steril* 2001; 75(1):46-52.
- (53) Jakubowicz DJ, Luomo MJ, Jakubowicz S, Roberts KA, Nestler JE. Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(2):524-529.
- (54) Daya S, Ward S, Burrows E. Progesterone profiles in luteal phase defect cycles and outcome of progesterone treatment in patients with recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158(2):225-232.
- (55) Ogasawara M, Kajiura S, Katano K, Aoyama T, Aoki K. Are serum progesterone levels predictive of recurrent miscarriage in future pregnancies? *Fertil Steril* 1997; 68(5):806-809.
- (56) Valli E, Zupi E, Marconi D et al. Hysteroscopic findings in 344 women with recurrent spontaneous abortion. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2001; 8(3):398-401.
- (57) Raga F, Bauset C, Remohi J, Bonilla-Musoles F, Simon C, Pellicer A. Reproductive impact of congenital Mullerian anomalies. *Hum Reprod* 1997; 12(10):2277-2281.
- (58) Portuondo JA, Camara MM, Echanojauregui AD, Calonge J. Mullerian abnormalities in fertile women and recurrent aborters. *J Reprod Med* 1986; 31(7):616-619.
- (59) Tulppala M, Palosuo T, Ramsay T, Miettinen A, Salonen R, Ylikorkala O. A prospective study of 63 couples with a history of recurrent spontaneous abortion: contributing factors and outcome of subsequent pregnancies. *Hum Reprod* 1993; 8(5):764-770.
- (60) Propst AM, Hill JA, III. Anatomic factors associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2000; 18(4):341-350.
- (61) Maneschi F, Zupi E, Marconi D, Valli E, Romanini C, Mancuso S. Hysteroscopically detected asymptomatic mullerian anomalies. Prevalence and reproductive implications. *J Reprod Med* 1995; 40(10):684-688.
- (62) Woelfer B, Salim R, Banerjee S, Elson J, Regan L, Jurkovic D. Reproductive outcomes in women with congenital uterine anomalies detected by three-dimensional ultrasound screening. *Obstet Gynecol* 2001; 98(6):1099-1103.



- (63) Akar ME, Bayar D, Yildiz S, Ozel M, Yilmaz Z. Reproductive outcome of women with unicornuate uterus. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2005; 45(2):148-150.
- (64) Stein AL, March CM. Pregnancy outcome in women with mullerian duct anomalies. *J Reprod Med* 1990; 35(4):411-414.
- (65) Ball E, Bulmer J, Ayis S, Lyall F, Robson S. Late sporadic miscarriage is associated with abnormalities in spiral artery transformation and trophoblast invasion. *J Pathol* 2006; 208(4):535-542.
- (66) Ball E, Robson S, Ayis S, Lyall F, Bulmer J. Early embryonic demise: no evidence of abnormal spiral artery transformation or trophoblast invasion. *J Pathol* 2006; 208(4):528-534.
- (67) Stray-Pedersen B, Stray-Pedersen S. Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148(2):140-146.
- (68) Phung TT, Byrd JR, McDonough PG. Etiologies and subsequent reproductive performance of 100 couples with recurrent abortion. *Fertil Steril* 1979; 32(4):389-395.
- (69) Harger JH, Archer DF, Marchese SG, Muracca-Clemens M, Garver KL. Etiology of recurrent pregnancy losses and outcome of subsequent pregnancies. *Obstet Gynecol* 1983; 62(5):574-581.
- (70) Makino T, Hara T, Oka C et al. Survey of 1120 Japanese women with a history of recurrent spontaneous abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992; 44(2):123-130.
- (71) Clifford K, Rai R, Watson H, Regan L. An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage: preliminary experience of 500 consecutive cases. *Hum Reprod* 1994; 9(7):1328-1332.
- (72) Salim R, Regan L, Woelfer B, Backos M, Jurkovic D. A comparative study of the morphology of congenital uterine anomalies in women with and without a history of recurrent first trimester miscarriage. *Hum Reprod* 2003; 18(1):162-166.
- (73) Homer HA, Li TC, Cooke ID. The septate uterus: a review of management and reproductive outcome. *Fertil Steril* 2000; 73(1):1-14.
- (74) Ventolini G, Zhang M, Gruber J. Hysteroscopy in the evaluation of patients with recurrent pregnancy loss: a cohort study in a primary care population. *Surg Endosc* 2004; 18(12):1782-1784.



- (75) Seidman DS, Ben-Rafael Z, Bider D, Recabi K, Mashiach S. The role of cervical cerclage in the management of uterine anomalies. *Surg Gynecol Obstet* 1991; 173(5):384-386.
- (76) Regan L, Rai R. Thrombophilia and pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2002; 55(1-2):163-180.
- (77) Quenby S, Farquharson RG, Dawood F, Hughes AM, Topping J. Recurrent miscarriage and long-term thrombosis risk: a case-control study. *Hum Reprod* 2005; 20(6):1729-1732.
- (78) Vincent T, Rai R, Regan L, Cohen H. Increased thrombin generation in women with recurrent miscarriage. *Lancet* 1998; 352(9122):116.
- (79) Sanson BJ, Friederich PW, Simioni P et al. The risk of abortion and stillbirth in antithrombin-, protein C-, and protein S-deficient women. *Thromb Haemost* 1996; 75(3):387-388.
- (80) Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID et al. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet* 1996; 348(9032):913-916.
- (81) Pauer HU, Burfeind P, Kostering H, Emons G, Hinney B. Factor XII deficiency is strongly associated with primary recurrent abortions. *Fertil Steril* 2003; 80(3):590-594.
- (82) Gris JC, Ripart-Neveu S, Maugard C et al. Respective evaluation of the prevalence of haemostasis abnormalities in unexplained primary early recurrent miscarriages. The Nimes Obstetricians and Haematologists (NOHA) Study. *Thromb Haemost* 1997; 77(6):1096-1103.
- (83) Dossenbach MR, van TM, Krugluger W et al. Elevated coagulation factor VIII and the risk for recurrent early pregnancy loss. *Thromb Haemost* 2004; 91(4):694-699.
- (84) Raziel A, Kornberg Y, Friedler S, Schachter M, Sela BA, Ron-El R. Hypercoagulable thrombophilic defects and hyperhomocysteinemia in patients with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2001; 45(2):65-71.
- (85) Krause M, Sonntag B, Klamroth R et al. Lipoprotein (a) and other prothrombotic risk factors in Caucasian women with unexplained recurrent miscarriage. Results of a multicentre case-control study. *Thromb Haemost* 2005; 93(5):867-871.
- (86) Bertina RM, Koeleman BP, Koster T et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369(6475):64-67.





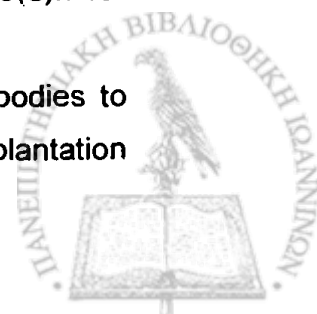
- (87) Robertson L, Wu O, Langhorne P et al. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol* 2006; 132(2):171-196.
- (88) Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88(10):3698-3703.
- (89) Castoldi E, Simioni P, Kalafatis M et al. Combinations of 4 mutations (FV R506Q, FV H1299R, FV Y1702C, PT 20210G/A) affecting the prothrombinase complex in a thrombophilic family. *Blood* 2000; 96(4):1443-1448.
- (90) Pihusch R, Buchholz T, Lohse P et al. Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. *Am J Reprod Immunol* 2001; 46(2):124-131.
- (91) Kornberg A RAR-LNYRSBR-ER. Hypercoagulability and recurrent abortions. *Blood* 1998; 92(Suppl.1):121b.
- (92) Coulam CB JRRR. Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutations are risk factors for recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2004; 82 (Suppl.2):S60.
- (93) Dossenbach-Glaninger A, van TM, Dossenbach M et al. Plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G polymorphism and coagulation factor XIII Val34Leu polymorphism: impaired fibrinolysis and early pregnancy loss. *Clin Chem* 2003; 49(7):1081-1086.
- (94) Hohlagschwandtner M, Unfried G, Heinze G, Huber JC, Nagele F, Tempfer C. Combined thrombophilic polymorphisms in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2003; 79(5):1141-1148.
- (95) Hoekema L, Castoldi E, Tans G et al. Functional properties of factor V and factor Va encoded by the R2-gene. *Thromb Haemost* 2001; 85(1):75-81.
- (96) Doggen CJ, de Visser MC, Vos HL, Bertina RM, Cats VM, Rosendaal FR. The HR2 haplotype of factor V is not associated with the risk of myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2000; 84(5):815-818.
- (97) Akar N, Yilmaz E, Akar E, Deda G, Sipahi T. Factor V (His 1299 Arg) in young Turkish patients with cerebral infarct. *Haemostasis* 2000; 30(3):118-122.
- (98) Alhenc-Gelas M, Nicaud V, Gandrille S et al. The factor V gene A4070G mutation and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 81(2):193-197.



- (99) Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64(3):169-172.
- (100) Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y et al. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. *J Nutr* 1999; 129(9):1656-1661.
- (101) Zetterberg H, Regland B, Palmer M et al. Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. *Eur J Hum Genet* 2002; 10(2):113-118.
- (102) Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple Thrombophilic Gene Mutations Rather than Specific Gene Mutations are Risk Factors for Recurrent Miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55(5):360-368.
- (103) Feng Q, Liu Y, Liu K et al. Expression of urokinase, plasminogen activator inhibitors and urokinase receptor in pregnant rhesus monkey uterus during early placentation. *Placenta* 2000; 21(2-3):184-193.
- (104) Kolben M, Lopens A, Blaser J et al. Proteases and their inhibitors are indicative in gestational disease. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; 68(1-2):59-65.
- (105) Belo L, Santos-Silva A, Rumley A et al. Elevated tissue plasminogen activator as a potential marker of endothelial dysfunction in pre-eclampsia: correlation with proteinuria. *BJOG* 2002; 109(11):1250-1255.
- (106) Burzotta F, Di CA, Amore C et al. 4G/5G promoter PAI-1 gene polymorphism is associated with plasmatic PAI-1 activity in Italians: a model of gene-environment interaction. *Thromb Haemost* 1998; 79(2):354-358.
- (107) Margaglione M, Cappucci G, d'Addetta M et al. PAI-1 plasma levels in a general population without clinical evidence of atherosclerosis: relation to environmental and genetic determinants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(4):562-567.
- (108) Yamada N, Arinami T, Yamakawa-Kobayashi K et al. The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with severe preeclampsia. *J Hum Genet* 2000; 45(3):138-141.
- (109) Glueck CJ, Phillips H, Cameron D et al. The 4G/4G polymorphism of the hypofibrinolytic plasminogen activator inhibitor type 1 gene: an independent risk factor for serious pregnancy complications. *Metabolism* 2000; 49(7):845-852.



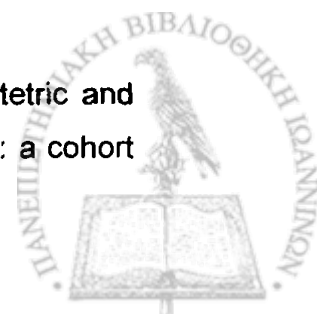
- (110) Glueck CJ, Kupfermanc MJ, Fontaine RN, Wang P, Weksler BB, Eldor A. Genetic hypofibrinolysis in complicated pregnancies. *Obstet Gynecol* 2001; 97(1):44-48.
- (111) Gris JC, Neveu S, Mares P, Biron C, Hedon B, Schved JF. Plasma fibrinolytic activators and their inhibitors in women suffering from early recurrent abortion of unknown etiology. *J Lab Clin Med* 1993; 122(5):606-615.
- (112) Howard MA, Firkin BG, Healy DL, Choong SC. Lupus anticoagulant in women with multiple spontaneous miscarriage. *Am J Hematol* 1987; 26(2):175-178.
- (113) Taylor M, Cauchi MN, Buchanan RR. The lupus anticoagulant, anticardiolipin antibodies, and recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 1990; 23(2):33-36.
- (114) Creagh MD, Malia RG, Cooper SM, Smith AR, Duncan SL, Greaves M. Screening for lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in women with fetal loss. *J Clin Pathol* 1991; 44(1):45-47.
- (115) Rai RS, Regan L, Clifford K et al. Antiphospholipid antibodies and beta 2-glycoprotein-I in 500 women with recurrent miscarriage: results of a comprehensive screening approach. *Hum Reprod* 1995; 10(8):2001-2005.
- (116) Jennings I, Kitchen S, Woods TA, Preston FE, Greaves M. Potentially clinically important inaccuracies in testing for the lupus anticoagulant: an analysis of results from three surveys of the UK National External Quality Assessment Scheme (NEQAS) for Blood Coagulation. *Thromb Haemost* 1997; 77(5):934-937.
- (117) Balasch J, Creus M, Fabregues F et al. Antiphospholipid antibodies and human reproductive failure. *Hum Reprod* 1996; 11(10):2310-2315.
- (118) Ogasawara M, Aoki K, Katano K, Aoyama T, Kajiura S, Suzumori K. Prevalence of autoantibodies in patients with recurrent miscarriages. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41(1):86-90.
- (119) Higashino M, Takakuwa K, Arakawa M, Tamura M, Yasuda M, Tanaka K. Anti-cardiolipin antibody and anti-cardiolipin beta-2-glycoprotein I antibody in patients with recurrent fetal miscarriage. *J Perinat Med* 1998; 26(5):384-389.
- (120) Lee RM, Branch DW, Silver RM. Immunoglobulin A anti-beta2-glycoprotein antibodies in women who experience unexplained recurrent spontaneous abortion and unexplained fetal death. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185(3):748-753.
- (121) Stern C, Chamley L, Hale L, Kloss M, Speirs A, Baker HW. Antibodies to beta2 glycoprotein I are associated with in vitro fertilization implantation



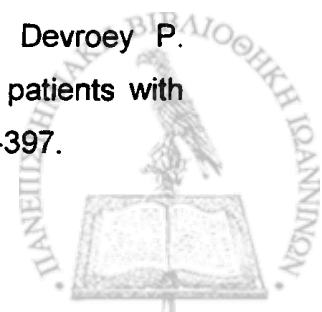
- failure as well as recurrent miscarriage: results of a prevalence study. *Fertil Steril* 1998; 70(5):938-944.
- (122) Rai RS, Clifford K, Cohen H, Regan L. High prospective fetal loss rate in untreated pregnancies of women with recurrent miscarriage and antiphospholipid antibodies. *Hum Reprod* 1995; 10(12):3301-3304.
- (123) Sebire NJ, Fox H, Backos M, Rai R, Paterson C, Regan L. Defective endovascular trophoblast invasion in primary antiphospholipid antibody syndrome-associated early pregnancy failure. *Hum Reprod* 2002; 17(4):1067-1071.
- (124) Balasch J, Reverter JC, Creus M et al. Human reproductive failure is not a clinical feature associated with beta(2) glycoprotein-I antibodies in anticardiolipin and lupus anticoagulant seronegative patients (the antiphospholipid/cofactor syndrome). *Hum Reprod* 1999; 14(8):1956-1959.
- (125) Franklin RD, Hollier N, Kutteh WH. beta2-Glycoprotein 1 as a marker of antiphospholipid syndrome in women with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2000; 73(3):531-535.
- (126) Ober C, Hyslop T, Elias S, Weitkamp LR, Hauck WW. Human leukocyte antigen matching and fetal loss: results of a 10 year prospective study. *Hum Reprod* 1998; 13(1):33-38.
- (127) Christiansen OB, Rasmussen KL, Jersild C, Grunnet N. HLA class II alleles confer susceptibility to recurrent fetal losses in Danish women. *Tissue Antigens* 1994; 44(4):225-233.
- (128) Christiansen OB, Mathiesen O, Husth M, Lauritsen JG, Jersild C, Grunnet N. Prognostic significance of maternal DR histocompatibility types in Danish women with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 1993; 8(11):1843-1847.
- (129) Christiansen OB, Ring M, Rosgaard A, Grunnet N, Gluud C. Association between HLA-DR1 and -DR3 antigens and unexplained repeated miscarriage. *Hum Reprod Update* 1999; 5(3):249-255.
- (130) Lim KJ, Odukoya OA, Ajjan RA, Li TC, Weetman AP, Cooke ID. The role of T-helper cytokines in human reproduction. *Fertil Steril* 2000; 73(1):136-142.
- (131) von Wolff M., Thaler CJ, Strowitzki T, Broome J, Stolz W, Tabibzadeh S. Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion. *Mol Hum Reprod* 2000; 6(7):627-634.
- (132) King A, Burrows T, Verma S, Hiby S, Loke YW. Human uterine lymphocytes. *Hum Reprod Update* 1998; 4(5):480-485.



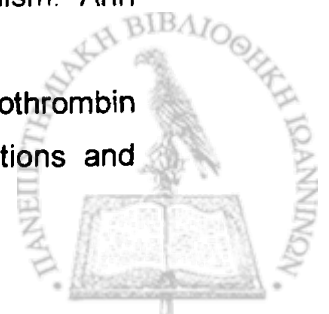
- (133) Clifford K, Flanagan AM, Regan L. Endometrial CD56+ natural killer cells in women with recurrent miscarriage: a histomorphometric study. *Hum Reprod* 1999; 14(11):2727-2730.
- (134) Quenby S, Bates M, Doig T et al. Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 1999; 14(9):2386-2391.
- (135) Lachapelle MH, Miron P, Hemmings R, Roy DC. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *J Immunol* 1996; 156(10):4027-4034.
- (136) Shimada S, Kato EH, Morikawa M et al. No difference in natural killer or natural killer T-cell population, but aberrant T-helper cell population in the endometrium of women with repeated miscarriage. *Hum Reprod* 2004; 19(4):1018-1024.
- (137) Michimata T, Ogasawara MS, Tsuda H et al. Distributions of endometrial NK cells, B cells, T cells, and Th2/Tc2 cells fail to predict pregnancy outcome following recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol* 2002; 47(4):196-202.
- (138) Ramhorst R, Garcia V, Agriello E et al. Intracellular expression of CD69 in endometrial and peripheral T cells represents a useful marker in women with recurrent miscarriage: modulation after allogeneic leukocyte immunotherapy. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49(3):149-158.
- (139) Porter TF LYSJR. Immunotherapy for recurrent miscarriage. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* [2]. 2006.  
Ref Type: Electronic Citation
- (140) Liddell HS, Pattison NS, Zanderigo A. Recurrent miscarriage--outcome after supportive care in early pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1991; 31(4):320-322.
- (141) Clifford K, Rai R, Regan L. Future pregnancy outcome in unexplained recurrent first trimester miscarriage. *Hum Reprod* 1997; 12(2):387-389.
- (142) Brigham SA, Conlon C, Farquharson RG. A longitudinal study of pregnancy outcome following idiopathic recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 1999; 14(11):2868-2871.
- (143) Reginald PW BRCJFPLHMJUJL. Outcome of pregnancies progressing beyond 28 weeks gestation in women with a history of recurrent miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol*.1987 Jul;94(7):643-8. 94, 643-648. 1987.  
Ref Type: Generic
- (144) Jivraj S, Anstie B, Cheong YC, Fairlie FM, Laird SM, Li TC. Obstetric and neonatal outcome in women with a history of recurrent miscarriage: a cohort study. *Hum Reprod* 2001; 16(1):102-106.



- (145) Paschopoulos M, Kaponis A, Makrydimas G et al. Selecting distending medium for out-patient hysteroscopy. Does it really matter? *Hum Reprod* 2004; 19(11):2619-2625.
- (146) Sheehan MT. Polycystic ovarian syndrome: diagnosis and management. *Clin Med Res* 2004; 2(1):13-27.
- (147) Tsanadis G, Vartholomatos G, Korkontzelos I et al. Polycystic ovarian syndrome and thrombophilia. *Hum Reprod* 2002; 17(2):314-319.
- (148) Zoller B, Svensson PJ, He X, Dahlback B. Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C. *J Clin Invest* 1994; 94(6):2521-2524.
- (149) Pecheniuk NM, Morris CP, Walsh TP, Marsh NA. The factor V HR2 haplotype: prevalence and association of the A4070G and A6755G polymorphisms. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12(3):201-206.
- (150) Frosst P, Blom HJ, Milos R et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10(1):111-113.
- (151) Isotalo PA, Donnelly JG. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase mutations in patients with venous thrombosis. *Mol Diagn* 2000; 5(1):59-66.
- (152) Bick RL. Recurrent miscarriage syndrome and infertility caused by blood coagulation protein or platelet defects. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000; 14(5):1117-1131.
- (153) Rai R, Shlebak A, Cohen H et al. Factor V Leiden and acquired activated protein C resistance among 1000 women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2001; 16(5):961-965.
- (154) Goddijn M, Joosten JH, Knegt AC et al. Clinical relevance of diagnosing structural chromosome abnormalities in couples with repeated miscarriage. *Hum Reprod* 2004; 19(4):1013-1017.
- (155) Rubio C, Simon C, Vidal F et al. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* 2003; 18(1):182-188.
- (156) Wilding M, Forman R, Hogewind G et al. Preimplantation genetic diagnosis for the treatment of failed in vitro fertilization-embryo transfer and habitual abortion. *Fertil Steril* 2004; 81(5):1302-1307.
- (157) Platteau P, Staessen C, Michiels A, Van SA, Liebaers I, Devroey P. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in patients with unexplained recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 2005; 83(2):393-397.



- (158) Munne S, Chen S, Fischer J et al. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 2005; 84(2):331-335.
- (159) Dalekos GN, Kistis KG, Boumba DS et al. Increased incidence of anti-cardiolipin antibodies in patients with hepatitis C is not associated with aetiopathogenetic link to anti-phospholipid syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12(1):67-74.
- (160) Crowther MA, Kelton JG. Congenital thrombophilic states associated with venous thrombosis: a qualitative overview and proposed classification system. *Ann Intern Med* 2003; 138(2):128-134.
- (161) Dykes AC, Walker ID, McMahon AD, Islam SI, Tait RC. A study of Protein S antigen levels in 3788 healthy volunteers: influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state. *Br J Haematol* 2001; 113(3):636-641.
- (162) Cussons AJ, Stuckey BG, Walsh JP, Burke V, Norman RJ. Polycystic ovarian syndrome: marked differences between endocrinologists and gynaecologists in diagnosis and management. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 62(3):289-295.
- (163) Iwasa T, Matsuzaki T, Tanaka N et al. Comparison and Problems of Measured Values of LH, FSH, and PRL among Measurement Systems. *Endocr J* 2006; 53(1):101-109.
- (164) Palomba S, Falbo A, Orio F, Jr., Russo T, Tolino A, Zullo F. Metformin hydrochloride and recurrent miscarriage in a woman with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2006; 85(5):1511-1515.
- (165) Bertina RM, Koeleman BP, Koster T et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369(6475):64-67.
- (166) Laffan MA, Manning R. The influence of factor VIII on measurement of activated protein C resistance. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996; 7(8):761-765.
- (167) Ioannou HV, Mitsis M, Eleftheriou A et al. The prevalence of factor V Leiden as a risk factor for venous thromboembolism in the population of North-Western Greece. *Int Angiol* 2000; 19(4):314-318.
- (168) Rodeghiero F, Tosi A. Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation are independent risk factors for venous thromboembolism. *Ann Intern Med* 1999; 130(8):643-650.
- (169) Kim RJ, Becker RC. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and



- events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies. *Am Heart J* 2003; 146(6):948-957.
- (170) Ye Z, Liu EH, Higgins JP et al. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet* 2006; 367(9511):651-658.
- (171) McGlennen RC, Key NS. Clinical and laboratory management of the prothrombin G20210A mutation. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126(11):1319-1325.
- (172) Zalavras C, Giotopoulou S, Dokou E et al. Prevalence of the G20210A prothrombin gene mutation in Northwestern Greece and association with venous thromboembolism. *Int Angiol* 2003; 22(1):55-57.
- (173) van Guldener C., Stehouwer CD. Hyperhomocysteinemia, vascular pathology, and endothelial dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26(3):281-289.
- (174) Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest* 2001; 107(10):1263-1273.
- (175) Lachmeijer AM, Arngrimsson R, Bastiaans EJ et al. Mutations in the gene for methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine levels, and vitamin status in women with a history of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184(3):394-402.
- (176) Kaiser T, Brennecke SP, Moses EK. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms are not a risk factor for pre-eclampsia/eclampsia in Australian women. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 50(2):100-102.
- (177) Infante-Rivard C, Rivard GE, Yotov WV et al. Absence of association of thrombophilia polymorphisms with intrauterine growth restriction. *N Engl J Med* 2002; 347(1):19-25.
- (178) Gebhardt GS, Scholtz CL, Hillermann R, Odendaal HJ. Combined heterozygosity for methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations C677T and A1298C is associated with abruptio placentae but not with intrauterine growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 97(2):174-177.
- (179) Mtiraoui N, Zammiti W, Ghazouani L et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. *Reproduction* 2006; 131(2):395-401.





- (180) Zalavras C, Giotopoulou S, Dokou E et al. Lack of association between the C677T mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene and venous thromboembolism in Northwestern Greece. *Int Angiol* 2002; 21(3):268-271.
- (181) Rady PL, Tying SK, Hudnall SD et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): the incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Med Genet* 1999; 86(4):380-384.
- (182) Bottini F, Celle ME, Calevo MG et al. Metabolic and genetic risk factors for migraine in children. *Cephalalgia* 2006; 26(6):731-737.
- (183) Benson JM, Ellingsen D, El-Jamil M et al. Factor V Leiden and factor V R2 allele: high-throughput analysis and association with venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001; 86(5):1188-1192.
- (184) Lunghi B, Iacoviello L, Gemmati D et al. Detection of new polymorphic markers in the factor V gene: association with factor V levels in plasma. *Thromb Haemost* 1996; 75(1):45-48.
- (185) Dilley A, Benito C, Hooper WC et al. Mutations in the factor V, prothrombin and MTHFR genes are not risk factors for recurrent fetal loss. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2002; 11(3):176-182.
- (186) Kostka H, Schwarz T, Schellong S et al. Coagulation factor V G allele and HR2 haplotype: factor V activity, activated protein C resistance and risk of venous thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14(1):49-56.
- (187) Wolf CE, Haubelt H, Pauer HU et al. Recurrent pregnancy loss and its relation to FV Leiden, FII G20210A and polymorphisms of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33(3):134-137.
- (188) Buchholz T, Lohse P, Rogenhofer N, Kosian E, Pihusch R, Thaler CJ. Polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes are associated with recurrent spontaneous miscarriages. *Hum Reprod* 2003; 18(11):2473-2477.
- (189) Sarig G, Younis JS, Hoffman R, Lanir N, Blumenfeld Z, Brenner B. Thrombophilia is common in women with idiopathic pregnancy loss and is associated with late pregnancy wastage. *Fertil Steril* 2002; 77(2):342-347.
- (190) Brenner B, Sarig G, Weiner Z, Younis J, Blumenfeld Z, Lanir N. Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause. *Thromb Haemost* 1999; 82(1):6-9.
- (191) Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 2003; 361(9361):901-908.



- (192) Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *Am J Pathol* 2003; 162(1):115-125.
- (193) Gopel W, Ludwig M, Junge AK, Kohlmann T, Diedrich K, Moller J. Selection pressure for the factor-V-Leiden mutation and embryo implantation. *Lancet* 2001; 358(9289):1238-1239.
- (194) Sano T, Gabazza EC, Zhou H et al. The zymogen prothrombin stimulates cell locomotion and calcium influx in murine osteosarcoma cells by different mechanism from thrombin. *Int J Oncol* 1999; 15(6):1197-1203.
- (195) Henrikson KP, Salazar SL, Fenton JW, Pentecost BT. Role of thrombin receptor in breast cancer invasiveness. *Br J Cancer* 1999; 79(3-4):401-406.
- (196) Rodriguez-Nieto S, Chavarria T, Martinez-Poveda B, Sanchez-Jimenez F, Rodriguez QA, Medina MA. Anti-angiogenic effects of homocysteine on cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293(1):497-500.
- (197) Martinez-Poveda B, Chavarria T, Sanchez-Jimenez F, Quesada AR, Medina MA. An in vitro evaluation of the effects of homocysteine thiolactone on key steps of angiogenesis and tumor invasion. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311(3):649-653.
- (198) Patrassi GM, Sartori MT, Ruffatti A et al. Fibrinolytic pattern in recurrent spontaneous abortions: no relationship between hypofibrinolysis and anti-phospholipid antibodies. *Am J Hematol* 1994; 47(4):266-272.
- (199) Glueck CJ, Pranikoff J, Aregawi D et al. The factor V Leiden mutation, high factor VIII, and high plasminogen activator inhibitor activity: etiologies for sporadic miscarriage. *Metabolism* 2005; 54(10):1345-1349.
- (200) Urano T, Castellino FJ, Ihara H et al. Activated protein C attenuates coagulation-associated over-expression of fibrinolytic activity by suppressing the thrombin-dependent inactivation of PAI-1. *J Thromb Haemost* 2003; 1(12):2615-2620.
- (201) Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2006; 12(3):322-327.
- (202) Cauchi MN, Pepperell R, Kloss M, Lim D. Predictors of pregnancy success in repeated miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 1991; 26(2):72-75.



- (203) Cauchi MN, Coulam CB, Cowchock S et al. Predictive factors in recurrent spontaneous aborters—a multicenter study. Am J Reprod Immunol 1995; 33(2):165-170.

