



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΑΡΕΤΑΙΕΙΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ

«ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΕΚΒΑΣΗ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΔΡΥΛΛΗΣ

ΕΙΔΙΚΟΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2018

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει δημοσιευτεί στο PUBMED με τον τίτλο: CORRELATION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN THE PROMOTER REGION OF THE ANXA5 (ANNEXIN A5) GENE WITH RECURRENT MISCARRIAGES IN WOMEN OF GREEK ORIGIN, στο περιοδικό: The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine (1521799) με DOI του paper: 10.1080/14767058.2018.1521799. Το άρθρο θα υπάρχει δημοσιευμένο με το ακόλουθο μόνιμο link: <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1521799>

**ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ
ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΔΡΥΛΛΗ**

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

ΕΠΩΝΥΜΟ	ΔΡΥΛΛΗΣ
ΟΝΟΜΑ	ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΡΟΣ	ΙΩΑΝΝΗΣ
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	ΑΘΗΝΑ
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	8 ΑΠΡΙΛΙΟΥ 1980
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΜΟΝΙΜΗΣ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ	ΠΕΙΡΑΙΑΣ, ΝΙΚΟΔΗΜΟΥ 9-ΚΑΣΤΕΛΛΑ Τ.Κ: 18533
ΤΗΛΕΦΩΝΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ	6974601554 211-2132126
e-mail	gdrillis@yahoo.gr

ΙΔΙΟΤΗΤΑ

- Ειδικός Αιματολόγος-Ακαδημαϊκός Υπότροφος της Α' Παθολογικής Κλινικής του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου ΛΑΙΚΟ Αθηνών
- Ειδικεύθηκα στην κλινική της Παθολογικής Φυσιολογίας (και στην Αιματολογική Κλινική) στο ΓΝΑ Λαϊκό Νοσοκομείο (έχω επιτελέσει το αγροτικό μου, το γενικό κομμάτι της Παθολογίας και ένα κομμάτι ειδικότητας της Αιματολογίας στο Αιματολογικό Τμήμα του Τζανείου Νοσοκομείου στον Πειραιά)
- Δόκιμο μέλος της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας (από το 2017)
- Υποψήφιος διδάκτωρ της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο θέμα: Γονιδιακοί πολυμορφισμοί και έκβαση της κύησης (έναρξη από 06-2013- κοντά σε ολοκλήρωσή του- αναμένεται ορισμός επταμελούς επιτροπής).
- Απόφοιτος Ιατρικής Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης (MD)-*βαθμός: Λίαν καλώς-7,07*
- Κάτοχος μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών (M.Sc) στις βασικές ιατρικές επιστήμες, Ιατρικής σχολής πανεπιστημίου Πατρών-*βαθμός: Άριστα*
- Απόφοιτος τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης- *βαθμός: Λίαν καλώς- 8,21*
- Μέλος του Μητρώου Εκπαιδευτών Ενηλίκων της μη Τυπικής Εκπαίδευσης
- Κάτοχος Michigan proficiency in English
- Κάτοχος Goethe- Zertifikat C1 in German
- Γνώστης Microsoft Office

ΣΠΟΥΔΕΣ

1998: Απόφοιτος λυκείου ιδιωτικού εκπαιδευτηρίου Μελισσίων Αττικής ‘ η Ελληνική Παιδεία’ με **βαθμό απόλυσης 19,2/11**

1999: Εισαγωγή μου στο τμήμα Α.Τ.Ε.Ι Αθηνών (της ημεδαπής): Ραδιο-ακτινολογίας μέσω του θεσμού των πανελληνίων εξετάσεων με το σύστημα των δεσμών, εισαγωγή μου ως δεύτερος επιτυχών κερδίζοντας δικαίωμα υποτροφίας

2000-2004: Εισαγωγή μου στο τμήμα Α.Ε.Ι (της ημεδαπής) Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, σχολή επιστημών υγείας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης- Αλεξανδρούπολη μέσω του θεσμού των Πανελληνίων εξετάσεων με το σύστημα των δεσμών. **Απόφοιτος τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής**, σχολή επιστημών υγείας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης- Αλεξανδρούπολη με **βαθμό αποφοίτησης ‘Λίαν καλώς- 8,21’**.

Διπλωματική εργασία: Κλινική και μοριακή μελέτη της μείζονος β-μεσογειακής αναιμίας στην Ελλάδα. Εργάστηκα για 7 μήνες στο εργαστήριο προγεννητικής διάγνωσης αιμοσφαιρινοπαθειών του λαϊκού νοσοκομείου, με επιβλέπουσα καθηγήτρια την κυρία Λουτράδη-Αναγνώστου

- **Δεκέμβριος 2004-** Επιτυχών στο τμήμα ιατρικής (επιστημών υγείας) του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης- Αλεξανδρούπολη μέσω του θεσμού των κατατακτηρίων εξετάσεων και εισαγωγή μου στο 8^ο εξάμηνο σπουδών
- **Σεπτέμβριος 2005:** Εισαγωγή μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Εφαρμογές στις βασικές ιατρικές επιστήμες», Ιατρικής σχολής πανεπιστημίου Πατρών
- **2005-2007:** Μεταπτυχιακός φοιτητής στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Εφαρμογές στις βασικές ιατρικές επιστήμες», Ιατρικής σχολής πανεπιστημίου Πατρών
- **2006:** Επιτυχών κρατικής υποτροφίας του Ι.Κ.Υ στην κατεύθυνση της γενετικής τον Μάιο του 2006- διάρκεια της μέχρι αρχές Νοεμβρίου του 2007
- **2007:** **Κάτοχος μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών (M.Sc) στις βασικές ιατρικές επιστήμες**, Ιατρικής σχολής πανεπιστημίου Πατρών με **βαθμό αποφοίτησης ‘Άριστα’**.

Διπλωματική εργασία: κατασκευή επισωματικού φορέα για την ενεργοποίηση του τεχνητού μεταγραφικού παράγοντα της γ- σφαιρίνης του ανθρώπου σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα- τομέας γενετικής και κυτταρογενετικής, επιβλέπουσα καθηγήτρια κυρία Αγλαΐα Αθανασσιάδου

- Επιτυχών εσωτερικής υποτροφίας για εκπόνηση διδακτορικού στο ερευνητικό κέντρο «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ» Αγ. Παρασκευής Αττικής στο Ινστιτούτο Ραδιοϊσοτόπων και Ραδιοδιαγνωστικών προϊόντων. Ωστόσο δεν οδηγήθηκα στην έναρξη εκπόνησης του διδακτορικού.
- **2008:** Εκπλήρωσα τη στρατιωτική μου θητεία στην Πολεμική Αεροπορία.
- **2008- 2010:** Ολοκλήρωσα τις σπουδές μου στο τμήμα Ιατρικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης. **Πτυχιούχος Ιατρικής**.

- Υποψήφιος διδάκτωρ της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο θέμα: Γονιδιακοί πολυμορφισμοί και έκβαση της κύησης (έναρξη από 06-2013-κοντά σε ολοκλήρωσή του).
- Ένας εκ των συνεργατών στην ελληνική μετάφραση του Bethesda Handbook of Clinical Hematology
- Κάτοχος Πιστοποιητικού Επιμόρφωσης «Εκπαίδευση Εκπαιδευτών Ενηλίκων: Πρόγραμμα Ολοκληρωμένης Εκπαίδευσης και Άσκησης σε Μικροδιδασκαλίες» από το Κέντρο Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης και Δια βίου μάθησης του Ε.Κ.Π.Α. (Οκτώβριος 2016-Ιανουάριος 2017– Πιστωτικές Μονάδες ECVET 12,5)
- Εκπαίδευση στο αντικείμενο: Εκμάθηση Microsoft Office Excel-Powerpoint-Access 2010 του Κέντρου Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης και Δια βίου μάθησης του Ε.Κ.Π.Α. (Νοέμβριος 2016-Φεβρουάριος 2017)
- Συμμετοχή σε όλα τα μαθήματα της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας από τον Ιανουάριο του 2016
- 26 Ιανουαρίου 2018: Πιστοποιητικό στη θεωρητική και πρακτική άσκηση στον καθετηριασμό περιφερικών φλεβών
- 11 Νοεμβρίου 2017- Πιστοποιητικό στην Προηγμένη Υποστήριξη Ζωής (ALS) - Πιστοποίηση ΕΕΣ
- Εκπαίδευση στο αντικείμενο: 'Τρόποι χρηματοδότησης επιχειρηματικών δράσεων' του Κέντρου Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης και Δια βίου μάθησης του Ε.Κ.Π.Α. (Νοέμβριος 2017-Φεβρουάριος 2018)
- Εκπαίδευση στο αντικείμενο: 'Μίγμα Marketing και Brand' του Κέντρου Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης και Δια βίου μάθησης του Ε.Κ.Π.Α. (Νοέμβριος 2017-Φεβρουάριος 2018)
- Οκτώβριος 2017-Ιούνιος 2018: Πιστοποιητικό στην Οργάνωση και Διοίκηση Υπηρεσιών Υγείας - Εξειδικευμένο πρόγραμμα κατάρτισης του Κέντρου Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης και Δια Βίου Μάθησης του Πανεπιστημίου Αθηνών (βαθμοί ECVET: 25,83)
- Φεβρουάριος 2018-Σεπτέμβριος 2018: Πιστοποιητικό στην 'Ανοσολογία και Αυτοάνοσα Συστηματικά Ρευματικά Νοσήματα'- Εξειδικευμένο πρόγραμμα κατάρτισης του Κέντρου Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης και Δια Βίου Μάθησης του Πανεπιστημίου Αθηνών (βαθμοί ECVET: 36)

ΓΛΩΣΣΕΣ

Ελληνικά	Μητρική γλώσσα
Αγγλικά	<ul style="list-style-type: none">• First certificate in English-university of Cambridge 1995,• International English language testing system (IELTS) 2005• Michigan proficiency in English 2007
Γερμανικά	<ul style="list-style-type: none">• Goethe- Zertifikat B1 2011• Goethe- Zertifikat B2 2016• Goethe- Zertifikat C1 2017

Εργασιακή εμπειρία

- **01/02/2011- 24/06/2011:** Εργάστηκα στην εταιρεία ιατρικών ειδών Vamvas Medicals ως ιατρός πάνω στον τομέα της διεγχειρητικής νευροπαρακολούθησης.
- **27/06/2011- 27/06/2012:** Εργάστηκα ως αγροτικός ιατρός στο ΠΙ Εφύρας- ΚΥ Σιμόπουλου (το υποχρεωτικό τρίμηνο εργάστηκα στο Νοσοκομείο Αμαλιάδας).
- **16/07/2012- 15/01/2014:** Ειδικευόμενος Παθολογίας στην Παθολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Σύρου.
- **16/01/2014- 13/03/2014:** Σε παράταση ως ειδικευόμενος Παθολογίας στο Γενικό Νοσοκομείο Σύρου
- **19/03/2014- 01/09/2014:** Ειδικευόμενος Αιματολογίας στο Αιματολογικό Τμήμα του Τζανείου Νοσοκομείου στον Πειραιά
- **02/09/2014-22/06/2018:** Ειδικευόμενος Αιματολογίας στην κλινική της Παθολογικής Φυσιολογίας (και στην Αιματολογική Κλινική) στο ΓΝΑ Λαϊκό- (παρακολούθηση εργαστηρίων Μοριακών Τεχνικών και Κυτταρομετρίας ροής στα πλαίσια της εκπαίδευσης- Εκπαίδευση στο τμήμα Αιμοδοσίας του Αρεταιείου- Εκπαίδευση στο τμήμα Αλλογενούς Μεταμόσχευσης του Αττικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου- Συνεχής παρακολούθηση των μαθημάτων των Κύκλων του Εκπαιδευτικού προγράμματος 2016 και 2017 της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας)
- **22/06/2018- έως 17/10/2018:** **Ειδικός Αιματολόγος στο ΓΝΑ Λαϊκό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο (κλινική Παθολογικής Φυσιολογίας)**
- **18/10/2018- έως σήμερα:** **Αιματολόγος- Ακαδημαϊκός υπότροφος στην κλινική της Α' Παθολογικής Κλινικής του ΓΝΑ Λαϊκό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο**

Δημοσιεύσεις:

1. **'Correlation of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the ANXA5 (Annexin a5) gene with recurrent miscarriages in women of Greek origin":** G. Dryllis, A. Giannopoulos, C. Zoi, A. Pouliakis, E. Logothetis, M. Voulgarelis, K. Zoi, E. Kouskouni, A. Dinou, C. Stavropoulos-Giokas, G. Kreatsas, K. Konstantopoulos, M. Politou. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine- Received 23 Jan 2018, Accepted 06 Sep 2018, Accepted author version posted online: 09 Sep 2018 <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1521799>
2. **Health risk behaviors among high school and university adolescent students:** Published online on: August 17, 2018 <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6612> , Pages:3433-3438
3. **Pregnancy complications in a –thalassemia (hemoglobinopathy H): a case study:** Marianna Politou, Giorgos Dryllis, Maria Efstathopoulou, Serena Valsami, Athanasia Tsaroucha, Antonios Kattamis, Nikos.F.Vlahos- Case Reports in Obstetrics and Gynecology, Hindawi- Volume 2018, Article ID 8532081, 4 pages, Published 27 May 2018
4. **'Hematology Quiz – Case 57.** ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ. ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ-ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2018, ΤΟΜΟΣ 35, ΤΕΥΧΟΣ 1
5. **P156: Aleukemic leukemia cutis with blood dyscrasias- Poster Presentations:** Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology Volume 31, Issue S3, June 2017, pages 49–100
6. **ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΑΝΕΞΙΝΗΣ Α5 (ANNEXIN A5) ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΕΣ ΚΑΘ' ΕΞΙΝ ΑΠΟΒΟΛΕΣ.** Poster Presentation. ID 65. 12 - 14 Νοεμβρίου 2015. 26ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο
7. **T786C polymorphism of eNOS gene and risk of developing atherosclerosis in women with endopelvic endometriosis.** ePoster Presentation. International Conference on Thrombosis and Hemostasis November 02-03, 2015 Beijing, China. Submitted Date: 2015-05-09
8. **European Hematology Association-21st Congress,** June 9-12, Κοπεγχάγη- Συμμετοχή με 2 Poster
9. **Hematology Quiz – Case 49.** ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ. ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ-ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2016, ΤΟΜΟΣ 33, ΤΕΥΧΟΣ 6
10. **Hematology Quiz – Case 49.** ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ. ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ-ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2016, ΤΟΜΟΣ 33, ΤΕΥΧΟΣ 5
11. **Hematology Quiz – Case 48.** ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ. ΙΟΥΛΙΟΣ-ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 2016, ΤΟΜΟΣ 33, ΤΕΥΧΟΣ 4
12. **Hematology Quiz – Case 47.** ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ. ΜΑΙΟΣ-ΙΟΥΝΙΟΣ 2016, ΤΟΜΟΣ 33, ΤΕΥΧΟΣ 3
13. **Hematology Quiz – Case 46.** ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ. ΜΑΡΤΙΟΣ-ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2016, ΤΟΜΟΣ 33, ΤΕΥΧΟΣ 2
14. **Hematology Quiz – Case 45.** ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ. ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ-ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2016, ΤΟΜΟΣ 33, ΤΕΥΧΟΣ 1
15. **Hematology Quiz – Case 44.** ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ. ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ-ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2016, ΤΟΜΟΣ 32, ΤΕΥΧΟΣ 6

16. **Hematology Quiz – Case 43.** ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ. ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ-ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2015, ΤΟΜΟΣ 32, ΤΕΥΧΟΣ 5
17. **Hematology Quiz – Case 41.** ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ. ΙΟΥΛΙΟΣ-ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 2015, ΤΟΜΟΣ 32, ΤΕΥΧΟΣ 4
18. Συγγραφέας του 5^{ου} κεφαλαίου: **Biomarkers and Physiological Agents in Severe Sepsis and Septic Shock** στο βιβλίο **Severe Sepsis and Septic Shock - Understanding a Serious Killer** στο **Intech (2012)**.
19. **Unusual causes of pneumothorax.** J Thorac Dis. October 2014. Vol 6, Supplement 4 (October 2014): (Pneumothorax: From Definition to Diagnosis and Treatment)
20. **Laparoscopy induced pneumothorax.** J Thorac Dis. October 2014. Vol 6, Supplement 4 (October 2014): (Pneumothorax: From Definition to Diagnosis and Treatment)
21. **The role for medical thoracoscopy in pneumothorax.** J Thorac Dis. October 2014. Vol 6, Supplement 4 (October 2014): (Pneumothorax: From Definition to Diagnosis and Treatment)
22. **Bronchoscopic interventions for severe COPD.** J Thorac Dis. October 2014. Vol 6, Supplement 4 (October 2014): (Pneumothorax: From Definition to Diagnosis and Treatment)
23. **Human immunodeficiency virus infection and pneumothorax.** J Thorac Dis. October 2014. Vol 6, Supplement 4 (October 2014): (Pneumothorax: From Definition to Diagnosis and Treatment)
24. **Tube thoracostomy; chest tube implantation and follow up.** J Thorac Dis. October 2014. Vol 6, Supplement 4 (October 2014): (Pneumothorax: From Definition to Diagnosis and Treatment)
25. **Transbronchial lung biopsy and pneumothorax.** J Thorac Dis. October 2014. Vol 6, Supplement 4 (October 2014): (Pneumothorax: From Definition to Diagnosis and Treatment)
26. **Penetrating trauma.** J Thorac Dis. October 2014. Vol 6, Supplement 4 (October 2014): (Pneumothorax: From Definition to Diagnosis and Treatment)
27. **Pneumothorax: observation.** J Thorac Dis. October 2014. Vol 6, Supplement 4 (October 2014): (Pneumothorax: From Definition to Diagnosis and Treatment)
28. **Pneumothorax in sarcoidosis.** J Thorac Dis. October 2014. Vol 6, Supplement 4 (October 2014): (Pneumothorax: From Definition to Diagnosis and Treatment)
29. **Pneumothorax after transbronchial needle biopsy.** J Thorac Dis. October 2014. Vol 6, Supplement 4 (October 2014): (Pneumothorax: From Definition to Diagnosis and Treatment)
30. **Acute respiratory distress syndrome and pneumothorax.** J Thorac Dis. October 2014. Vol 6, Supplement 4 (October 2014): (Pneumothorax: From Definition to Diagnosis and Treatment)
31. **Pneumothorax in cystic fibrosis.** J Thorac Dis. October 2014. Vol 6, Supplement 4 (October 2014): (Pneumothorax: From Definition to Diagnosis and Treatment)
32. **Pneumothorax: from definition to diagnosis and treatment.** J Thorac Dis. October 2014. Vol 6, Supplement 4 (October 2014): (Pneumothorax: From Definition to Diagnosis and Treatment)

33. **Approach of the treatment for pneumothorax.** J Thorac Dis. October 2014. Vol 6, Supplement 4 (October 2014): (Pneumothorax: From Definition to Diagnosis and Treatment)
34. **Catamenial pneumothorax.** J Thorac Dis. October 2014. Vol 6, Supplement 4 (October 2014): (Pneumothorax: From Definition to Diagnosis and Treatment)
35. **Extrapelvic endometriosis: a rare entity or an under diagnosed condition?** *Diagnostic Pathology* December 2013, 8:194
36. **Occupational exposure and lung cancer.** J Thorac Dis. 2013 September; 5(Suppl 4): S440–S445.
37. **Thirteen years follow-up of heart myxoma operated patients: what is the appropriate surgical technique?** Journal of thoracic disease March 2014; 6(Suppl 1):S32-8.
38. **Influence of apnoeic oxygenation in respiratory and circulatory system under general anaesthesia.** J Thorac Dis March 2014 vol 6, Supplement 1.
39. **Φυσιολογικός ρόλος των υποδοχέων που συνδέονται με τις G-πρωτεΐνες (GPCRs) στον ανθρώπινο οργανισμό.** 5th Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 18-20/3/2011, Limassol, Cyprus. (Περίληψη σε πρακτικά διεθνών συνεδρίων με κριτές)
40. **Ανάπτυξη επισωματικού φορέα για τη γονιδιακή μεταφορά του τεχνητού μεταγραφικού παράγοντα ενεργοποίησης της γ-σφαιρίνης.** <http://openarchives.gr/search/Gene%20therapy-nemertis-university-of-patras> (11-09-2008)

Ασχολίες- Ενδιαφέροντα

- Σινεμά, θέατρο, αθλητισμός, μουσική, διάβασμα

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ – ΗΜΕΡΙΔΩΝ

1. 9^ο ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ (ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ, ΑΘΗΝΑ, 2003)
2. 10^ο ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ (ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, 2004- ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΜΕ POSTER)
3. 11^ο ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ (ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ, ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ, 2005- ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΜΕ POSTER)
4. 26^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ (ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΙΑ, 2005)
5. 1^ο ΔΙΕΘΝΕΣ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ @ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ (ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ, 12-14 ΜΑΙΟΥ 2006)
6. 58^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ (11-13 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2006)
7. 17ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ (22-26 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2006)

8. ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ (23-24 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2006- *ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΜΕ POSTER*)
9. ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΙΑΤΡΟ-ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ (23-24 ΑΠΡΙΛΙΟΥ 2007)
- 10.14⁰ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ (ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ, ΑΘΗΝΑ, 9-11 ΜΑΪΟΥ 2008)
- 11.2⁰ ΔΙΕΘΝΕΣ FORUM ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ & ΝΕΩΝ ΙΑΤΡΩΝ ΕΛΛΑΔΟΣ (ΑΘΗΝΑ, 9-11 ΜΑΪΟΥ 2008)
- 12.5⁰ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ (ΑΘΗΝΑ, 23-24 ΜΑΪΟΥ 2008)
- 13.4⁰ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΕΠΙΛΗΨΙΑΣ (15 ΜΟΡΙΑ ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ)- (ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ 14-16 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2008)
- 14.1⁰ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ (ΑΘΗΝΑ, 13-14 ΜΑΡΤΙΟΥ 2009)
- 15.15⁰ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ (ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, 8-10 ΜΑΪΟΥ 2009)- (16 ΜΟΡΙΑ ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ)
- 16.3⁰ ΔΙΕΘΝΕΣ FORUM ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ & ΝΕΩΝ ΙΑΤΡΩΝ ΕΛΛΑΔΟΣ (ΑΘΗΝΑ, 8-10 ΜΑΪΟΥ 2009)
- 17.16⁰ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ (ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, 16-18 ΑΠΡΙΛΙΟΥ 2010- *ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΜΕ POSTER*)- (18 ΜΟΡΙΑ ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ)
- 18.4⁰ ΔΙΕΘΝΕΣ FORUM ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ & ΝΕΩΝ ΙΑΤΡΩΝ ΕΛΛΑΔΟΣ (ΑΘΗΝΑ, 16-18 ΑΠΡΙΛΙΟΥ 2010)
- 19.10¹ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΑ ΣΥΝΑΝΤΗΣΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΗΠΑΤΟΣ-ΧΟΛΗΦΟΡΩΝ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ (ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ 14-15 ΜΑΪΟΥ 2010)
20. ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΣΕΜΙΝΑΡΙΟ ΜΕ ΘΕΜΑ: ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΗΣ ΟΞΕΟΒΑΣΙΚΗΣ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΩΝ- 26-27 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2010 (9 ΜΟΡΙΑ ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ)
- 21.17⁰ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ (ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ, ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 06 - 08 ΜΑΪΟΥ, *ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΜΕ 4 POSTER ΚΑΙ 2 ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ*)- (18 ΜΟΡΙΑ ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ)
- 22.4⁰ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΣΤΑ ΛΟΙΜΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ. ΤΜΗΜΑ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΤΟΥ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΠΑΤΡΩΝ, 23-25 ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΥ 2011.
- 23.18⁰ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ (ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ, ΑΘΗΝΑ 2012- *ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΜΕ 2 POSTER*)- (15 ΜΟΡΙΑ ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ)
- 24.3ο ΕΤΗΣΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΡΟΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΥΓΕΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΡΜΟΥΠΟΛΗ. Η ΕΓΚΑΙΡΗ

- ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΩΣ ΒΑΣΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΖΩΗΣ (28 - 30 ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΥ 2012)
- 25.20⁰ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ (ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ ΜΑΙΟΣ 2014- ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΜΕ 3 POSTER)- (15 ΜΟΡΙΑ ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ)
 - 26.2^H ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΑ ΣΥΝΑΝΤΗΣΗ "AIDS & ΗΠΑΤΙΤΙΔΕΣ". ΑΘΗΝΑ, 19-21 ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΥ 2014 (18 ΜΟΡΙΑ ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ)
 - 27.6ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ - 2ο ΣΥΜΠΟΣΙΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ. 7-9 ΜΑΪΟΥ 2015
 - 28.ΚΥΗΣΗ ΚΑΙ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ - ΜΙΑ ΠΟΛΥΠΛΕΥΡΗ ΣΧΕΣΗ. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ - ΤΜΗΜΑ ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ - ΑΦΑΙΡΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΜΗΜΑ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ. 8 - 9 ΜΑΪΟΥ 2015
 - 29.2⁰ ΣΕΜΙΝΑΡΙΟ ΠΑΙΔΙΚΗΣ&ΕΦΗΒΙΚΗΣ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ (18-19 ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΥ 2015, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ)
 - 30.3Η ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΑ ΣΥΝΑΝΤΗΣΗ "AIDS & ΗΠΑΤΙΤΙΔΕΣ". ΑΘΗΝΑ, 19-21 ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΥ 2014 (16 ΜΟΡΙΑ ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ)
 - 31.POSTGRADUATE ATHENS LYMPHOMA SEMINAR. ATHENS 15 - 17 OCTOBER 2015. (16 ΜΟΡΙΑ ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ)
 - 32.ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΗΜΕΡΙΔΑ ΜΕ ΤΙΤΛΟ: «ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ: ΝΕΟΤΕΡΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ, ΣΤΑ ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΚΑΙ ΣΤΑ ΜΥΕΛΟΎΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ». 31 ΟΚΤΩΒΡΙΟΥ (6 ΜΟΡΙΑ ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ)
 - 33.26ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ (12-14 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2015, ΑΘΗΝΑ)
 - 34.22⁰ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ (ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ, ΠΑΤΡΑ ΜΑΙΟΣ 2016- ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΜΕ 2 POSTER)- (15 ΜΟΡΙΑ ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ)
 - 35.26η ΣΥΝΕΔΡΙΑΚΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΚΔΗΛΩΣΗ (42ο ΕΤΗΣΙΟ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ)- ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ (12 ΜΑΪΟΥ 2016)
 36. ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΣΤΗΝ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ, ΕΝΟΤΗΤΑ 2016: "Β-ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΧΑΜΗΛΗΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ"- ΣΧΟΛΕΙΟ-ΙΔΡΥΜΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ (9-10 ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΥ 2016-ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ)
 - 37.ΔΙΑΔΡΑΣΤΙΚΟ ΣΕΜΙΝΑΡΙΟ: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΗΣ ΕΠΙΡΡΟΗΣ & ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ ΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΩΝ ΜΕ ΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΤΟΥΣ (11 ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΥ 2016-ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ)
 - 38.3RD AEGEAN HEMATOLOGY ONCOLOGY SYMPOSIUM- (22-25 ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΥ 2016. ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ)
 - 39.1⁰ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ- ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ

- ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ (23-24 ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΥ 2016, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ)
40. 27^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ (03-05 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2016, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ)
 41. ΔΙΗΜΕΡΙΔΑ: ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΥ ΑΣΘΕΝΟΥΣ (07-08 ΑΠΡΙΛΙΟΥ 2017, ΒΥΖΑΝΤΙΝΟ ΚΑΙ ΧΡΙΣΤΙΑΝΙΚΟ ΜΟΥΣΕΙΟ-ΑΘΗΝΑ)
 42. ΕΑΡΙΝΟ ΣΧΟΛΕΙΟ ΤΟΥ ΙΔΡΥΜΑΤΟΣ ΤΗΣ Ε.Α.Ε ΜΕ ΘΕΜΑ: ΕΠΙΘΕΤΙΚΑ ΜΗ ΗΟΔΓΚΙΝ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ-ΘΕΡΑΠΕΙΑ-ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΣΜΟΙ (28-29 ΑΠΡΙΛΙΟΥ 2017, ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ)
 43. ΗΜΕΡΙΔΑ ΒΙΟΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΤΑ ΙΑΤΡΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ: «ΥΓΙΕΙΝΗ ΚΑΙ ΒΙΟΑΣΦΑΛΕΙΑ ΣΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ, BIOSAFETY-BIOSECURITY-BIOETHICS, ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΑ, ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ, ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΤΑΣΕΙΣ» (26 ΜΑΙΟΥ 2017, ΠΟΛΕΜΙΚΟ ΜΟΥΣΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ)
 44. 3^Η ΔΙΑΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΗΜΕΡΙΔΑ: «ΕΠΑΝΑΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ-ΕΛΑΧΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ-ΑΝΑΚΥΚΛΩΣΗ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΩΝ ΜΟΝΑΔΩΝ (09 ΙΟΥΝΙΟΥ 2017, ΓΝΑ ΛΑΙΚΟ-ΑΘΗΝΑ)
 45. 14TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON MALIGNANT LYMPHOMA (14-ICML)- 25 CATEGORY 1 ESMO-MORA POINTS [14-17 JUNE 2017 (ON JUNE 13 CORPORATE SATELLITE SYMPOSIA AND TWO WORKSHOPS TOOK PLACE), LUGANO-SWITZERLAND]
 46. ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΣΤΗΝ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ, ΕΝΟΤΗΤΑ 2017: "ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ"- ΣΧΟΛΕΙΟ-ΙΔΡΥΜΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ (15-16 ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΥ 2017-ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ)
 47. POSTGRADUATE ATHENS LYMPHOMA SEMINAR. ATHENS 12 - 14 OCTOBER 2017.
 48. 28^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ (02-04 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2017, ΑΘΗΝΑ)
 49. SEMINARS IN BONE MARROW TRANSPLANTATION: AT THE CUTTING EDGE BETWEEN MOLECULAR AND CELLULAR THERAPY. (10-11 ΜΑΡΤΙΟΥ 2018, ΑΘΗΝΑ)
 50. ΕΑΡΙΝΟ ΣΧΟΛΕΙΟ ΤΟΥ ΙΔΡΥΜΑΤΟΣ ΤΗΣ Ε.Α.Ε ΜΕ ΘΕΜΑ: ΝΕΕΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ. (20-21 ΑΠΡΙΛΙΟΥ 2018, ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ)
 51. ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΚΛΗΛΩΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ "ΟΞΕΙΩΝ ΛΕΥΧΑΙΜΙΩΝ & ΜΥΕΛΟΪΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΩΝ" - "ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΝΔΡΟΜΩΝ & ΜΥΕΛΙΚΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ" - "ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ". (18-20 ΜΑΙΟΥ 2018, ΑΘΗΝΑ)
 52. ΝΕΟΤΕΡΕΣ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΣΤΗΝ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ-ΤΙ ΑΛΛΑΖΕΙ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΥ ΑΣΘΕΝΟΥΣ (02-03 ΙΟΥΝΙΟΥ 2018, ΑΘΗΝΑ)
 53. ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΣΤΗΝ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ, ΕΝΟΤΗΤΑ 2018: "ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ"- ΣΧΟΛΕΙΟ-ΙΔΡΥΜΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ (14-15 ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΥ 2018-ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ)

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΓΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Ευαγγελία Κουσκούνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοπαθολογίας του Αρεταιείου Νοσοκομείου
2. Γεώργιος Κρεατσάς, τ.Αντιπρύτανης, Καθηγητής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Διευθυντής της Β' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Αρεταιείου Νοσοκομείου
3. Μαριάννα Πολίτου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Διευθύντρια Αιμοδοσίας Αρεταιείου Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αισθάνομαι την ανάγκη και την ηθική υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά όλους εκείνους που συνέβαλαν, στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Την κυρία Ευαγγελία Κουσκούνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοπαθολογίας του Αρεταιείου Νοσοκομείου για την ανάρτηση της παρούσας διατριβής, αλλά και την επιστημονική εποπτεία, καθοδήγηση και γόνιμη κριτική καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της.

Τον κύριο Γεώργιο Κρεατσά, Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και Διευθυντή της Β' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Αρεταιείου Νοσοκομείου, για την καθοριστική συμβολή του στην εκτέλεση των πειραμάτων, την ενθάρρυνση, την ευγένεια και τη στήριξη του.

Την κυρία Μαριάννα Πολίτου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και Διευθύντρια της Αιμοδοσίας του Αρεταιείου Νοσοκομείου για την καθοριστική συμβολή της στην προσπάθεια ανεύρεσης κατάλληλου και ικανού αριθμού ασθενών. Το ενδιαφέρον της και η συμπαράστασή της στην εκπόνηση αυτής της μελέτης υπήρξαν πολύτιμα και της είμαι ευγνώμων.

Το προσωπικό του Ιατροβιολογικού Κέντρου της Ακαδημίας Αθηνών και ιδιαιτέρως την κυρία Κατερίνα Ζώη και τον κύριο Ανδρέα Γιαννόπουλο, όπου με την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθειά τους πραγματοποιήθηκαν εξ'ολοκλήρου τα πειράματα της διατριβής μου.

Ολοκληρώνοντας θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στη σύζυγο μου, στους γονείς μου, και στον αδερφό μου για την αγάπη και υποστήριξή τους.

ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή.

Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και την κοινωνία του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδέρφια μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία.

Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο.

Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη.

Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης.

Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά.

Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	3
ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	14
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	15
ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ	16
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	17
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	21
Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΕΣ ΑΠΟΒΟΛΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ: ΟΡΙΣΜΟΣ-ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΙΤΙΑ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΑΥΤΟΜΑΤΩΝ ΑΠΟΒΟΛΩΝ (ΕΑΕ)	23
2.1 Εισαγωγικά	26
2.2 Γενετικά αίτια	28
2.3 Ανατομικά αίτια	28
2.4 Ενδοκρινικά αίτια	30
2.5 Λοιμώδη αίτια	32
2.6 Ανοσολογικά αίτια	33
2.7 Αίτια θρομβώσεων	35
2.8 Περιβαλλοντικά αίτια	38
2.9 Ανεξήγητα αίτια	39
2.10 Πρόγνωση	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ	42
3.1 Εισαγωγή	42
3.2 Παθοφυσιολογικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης	43
3.3 Κληρονομικές και Επίκτητες θρομβοφιλίες	44
3.3.1 Συγκεκριμένες διαταραχές	44
3.3.2 Κληρονομικές διαταραχές	45

3.4	Αποτελέσματα που σχετίζονται με την θρομβοφιλία στην εγκυμοσύνη	50
3.4.1	Αποβολές σε έγκυες γυναίκες με κληρονομική θρομβοφιλία	50
3.4.2	Θρομβοφιλία και αποκόλληση του πλακούντα	50
3.4.3	Θρομβοφιλία και προεκλαμψία	53
3.5	Χορήγηση αντιπηκτικής αγωγής κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης	56
3.6	Μοντέλο με βάση τους παράγοντες κινδύνου για τη χορήγηση αντιπηκτικής αγωγής	60
3.7	Προφυλακτική αντιπηκτική αγωγή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης	62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑ ΚΑΙ ΚΥΗΣΗ- Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΤΗΣ ΑΝΝΕΞΙΝΗΣ

4.1	Εισαγωγή	67
4.1.1	Διάγνωση της κληρονομικής θρομβοφιλίας	68
4.1.2	Διάγνωση της επίκτητης θρομβοφιλίας (αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα)	68
4.2	Επαναλαμβανόμενες αποβολές και γονιδιακοί πολυμορφισμοί	69
4.3	Επαναλαμβανόμενες αποβολές- Ο ρόλος της αννεξίνης και οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της	72

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 73

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ 77

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2:ΥΛΙΚΟ ΜΕΛΕΤΗΣ 79

2.1	Ασθενείς-Δείγματα	79
2.2	Πρωτόκολλο μελέτης	80

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ 82

3.1	Απομόνωση γενωμικού DNA	82
-----	-------------------------	----

3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR-Polymerase Chain Reaction) (Mullis KB and Fallona FA, 1987)	83
3.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – Αρχή της μεθόδου	84
3.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - Η μέθοδος	85
3.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε γέλη αγαρόζης	88
3.4 Αλληλούχηση κατά SANGER της περιοχής του υποκινητή και του γονιδίου της αννεξίνης A5 (ANXA5) με πρωτόκολλο SEQ	90
3.4.1 Αρχή της μεθόδου	90
3.4.2 Καθαρισμός μαγνητικών σφαιριδίων	99
3.5 Στατιστική ανάλυση	104
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	105
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	119
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	128
SUMMARY	130
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	132

**Η παρούσα διδακτορική διατριβή είναι
αφιερωμένη στη σύζυγό μου
Καλλιόπη Βαρούχα**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η αυθόρμητη απώλεια της εγκυμοσύνης είναι συνηθισμένη, με περίπου το 15% όλων των κλινικά αναγνωρισμένων κυήσεων που οδηγούν σε αποβολή.

Όταν η επαναλαμβανόμενη απώλεια εγκυμοσύνης (RPL) ορίζεται ως 3 διαδοχικές απώλειες εγκυμοσύνης πριν από 20 εβδομάδες από την τελευταία εμμηνόρροια περίοδο, θα επηρεαστεί το 1% έως 2% των γυναικών.

Επειδή ο κίνδυνος μεταγενέστερων αποβολών είναι παρόμοιος μεταξύ των γυναικών που είχαν 2 έναντι 3 αποβολών και η πιθανότητα εύρεσης θεραπεύσιμης αιτιολογίας είναι παρόμοια μεταξύ των δύο ομάδων, οι περισσότεροι ειδικοί συμφωνούν ότι υπάρχει ένας ρόλος για την αξιολόγηση μετά από 2 απώλειες.

Οι αποδεκτές αιτιολογίες για RPL περιλαμβάνουν γονικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, μη υποβληθέντα σε θεραπεία υποθυρεοειδισμό, ανεξέλεγκτο σακχαρώδη διαβήτη, ορισμένες ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας και σύνδρομο αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων (APS). Άλλες πιθανές ή πιθανές αιτιολογίες περιλαμβάνουν επιπρόσθετες ενδοκρινικές διαταραχές, κληρονομικές ή / και αποκτηθείσες θρομβοφιλίες, ανοσολογικές ανωμαλίες και περιβαλλοντικές αιτίες. Μετά την αξιολόγηση για αυτά τα αίτια, περισσότερο από το 33% όλων των περιπτώσεων θα παραμείνει ανεξήγητο.

Η διαγνωστική αξιολόγηση πρέπει να περιλαμβάνει μητρικούς και πατρικούς καρυότυπους, αξιολόγηση της ανατομίας της μήτρας και αξιολόγηση για δυσλειτουργία του θυρεοειδούς, APS και επιλεγμένες θρομβοφιλίες. Σε ορισμένες γυναίκες, μπορεί να ενδείκνυται η αξιολόγηση της

αντίστασης στην ινσουλίνη, των αποθεμάτων των ωσθηκών, των αντιθυροειδικών αντισωμάτων και των διαταραχών της προλακτίνης.

Η θεραπεία πρέπει να κατευθύνεται προς οποιαδήποτε θεραπευτική αιτιολογία και μπορεί να περιλαμβάνει γονιμοποίηση *in vitro* με προεμφυτευτική γενετική διάγνωση, χρήση γαμετών δότη, χειρουργική διόρθωση ανατομικών ανωμαλιών, διόρθωση ενδοκρινικών διαταραχών και αντιπηκτική αγωγή ή συμπλήρωση φολικού οξέος.

Σε περιπτώσεις ανεξήγητων RPL, η προγεστερόνη έχει αποδειχθεί ότι είναι επωφελής για τη μείωση του ποσοστού αποβολής σε γυναίκες που είχαν υποστεί τουλάχιστον 3 απώλειες. Η χαμηλή δόση ασπιρίνης ωφελεί εκείνους με ιστορικό απώλειας σε περισσότερες από 13 εβδομάδες κύησης.

Θα πρέπει να προσφέρεται κεφαλαιουχική συμβουλευτική και ψυχολογική στήριξη σε όλα τα ζευγάρια που βιώνουν RPL, καθώς αυτά τα μέτρα έχουν αποδειχθεί ότι αυξάνουν τα ποσοστά επιτυχίας της εγκυμοσύνης.

Η πρόγνωση θα εξαρτηθεί από την υποκείμενη αιτία απώλειας της εγκυμοσύνης και τον αριθμό των προηγούμενων απωλειών. Οι ασθενείς και οι γιατροί μπορούν να ενθαρρυνθούν από τη συνολική καλή πρόγνωση, καθώς ακόμη και μετά από 4 διαδοχικές απώλειες ένας ασθενής έχει πιθανότητα μεγαλύτερη από 60% έως 65% να φέρει την επόμενη εγκυμοσύνη του για να λήξει.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΕΣ ΑΠΟΒΟΛΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ: ΟΡΙΣΜΟΣ-ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Οι σποραδικές αποβολές κατά την εγκυμοσύνη είναι εντυπωσιακά κοινώς εμφανιζόμενες, με περίπου το 15% όλων των κλινικά αναγνωρισμένων κυήσεων να έχουν ως αποτέλεσμα την αποτυχία της εγκυμοσύνης, ενώ υπάρχουν πολλές περισσότερες περιπτώσεις εγκυμοσύνης που αποτυγχάνουν πριν αναγνωριστούν κλινικά. Μόνο το 30% όλων των συλλήψεων έχει ως αποτέλεσμα τη γέννησή του κυήματος. (1)

Οι σποραδικές αποβολές κατά την εγκυμοσύνη μπορεί να επιβαρύνουν φυσικά και συναισθηματικά τα ζευγάρια, ειδικά όταν αντιμετωπίζουν προβλήματα με επαναλαμβανόμενες απώλειες. Οι επαναλαμβανόμενες απώλειες κατά την εγκυμοσύνη (RPL) έχουν προσδιοριστεί αντικειμενικά, καθώς ορίζονται ως 3 διαδοχικές απώλειες εγκυμοσύνης σε διάστημα 20 εβδομάδων από την τελευταία έμμηνο ρύση, και επηρεάζουν περίπου το 1% έως 2% των γυναικών. Λαμβάνοντας υπόψη τη συχνότητα των σποραδικών-τυχαίων αποβολών κατά την εγκυμοσύνη, η συχνότητα των υποτροπιάζουσων αποβολών κατά την εγκυμοσύνη θα πρέπει να είναι περίπου 1 στις 300 περιπτώσεις εγκυμοσύνης. Ωστόσο, επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι 1% έως 2% των γυναικών εμφανίζουν επαναλαμβανόμενες απώλειες κατά την εγκυμοσύνη. (2) Ο καθορισμός των RPL ως κλινική οντότητα που απαιτεί διαγνωστικές εξετάσεις και θεραπευτική παρέμβαση βασίζεται στη γνώση μας για την αύξηση του κινδύνου για μεταγενέστερη απώλεια του εμβρύου και στην πιθανότητα εύρεσης της

υποκείμενης αιτίας για τη συγκεκριμένη διαταραχή και η οποία θα είναι ιάσιμη. Αν και δεν υπάρχουν αξιόπιστα δημοσιευμένα δεδομένα, η πιθανότητα εύρεσης της αιτίας για RPL σε πληθυσμό με 2 έναντι 3 ή περισσότερων αποβολών, τα καλύτερα διαθέσιμα δημοσιευμένα δεδομένα υποδηλώνουν ότι ο κίνδυνος αποβολής σε επόμενες εγκυμοσύνες είναι 30% μετά από 2 απώλειες, σε σύγκριση με 33% μετά από 3 απώλειες σε ασθενείς χωρίς ιστορικό ζωντανού κυήματος. (3) Αυτό καταδεικνύει έντονα την ανάγκη για αξιολόγηση μετά από μόλις 2 απώλειες σε ασθενείς χωρίς προγενέστερες γεννήσεις ζωντανών κυημάτων. Μια πρώιμη αξιολόγηση μπορεί να παρατηρηθεί περαιτέρω εάν η καρδιακή δραστηριότητα του εμβρύου αναγνωρισθεί πριν από μια απώλεια εγκυμοσύνης, η γυναίκα είναι μεγαλύτερη των 35 ετών ή το ζευγάρι είχε δυσκολία στη σύλληψη.

Η υψηλή συχνότητα των σποραδικών απομονωμένων και επαναλαμβανόμενων απωλειών εγκυμοσύνης στον γενικό πληθυσμό, η έλλειψη συγκεκριμένου ορισμού για τις καθ' έξιν αποβολές (RPL), η περιορισμένη πρόσβαση στους ιστούς που επιτρέπουν τη μελέτη της υποκείμενης διαταραχής και η αξιοσημείωτα καλή πρόγνωση για γέννηση ζωντανού φυσιολογικού κυήματος σε ασθενείς με καθ' έξιν αποβολές (RPL), συνδυάζονται για να καθορίσουν τους στόχους υπό κατάλληλες διαγνωστικές και θεραπευτικές συστάσεις.

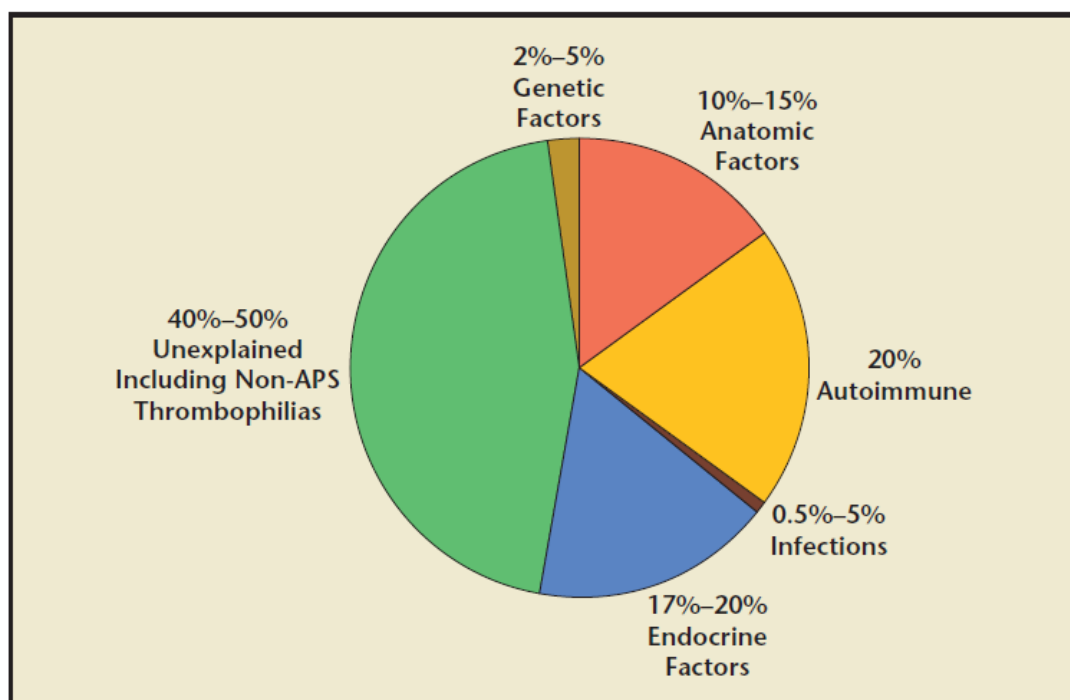
Από τα παραπάνω λοιπόν γίνεται αντιληπτό πως η συχνότητα των επαναλαμβανόμενων αυτόματων αποβολών είναι υψηλότερη από ότι θα αναμενόταν εάν αποτελούσαν ένα τυχαίο συμβάν (12) και άρα πρέπει να υπάρχουν κάποια συγκεκριμένα αίτια στα οποία οφείλονται. Αυτά αναλύονται στα επόμενα κεφάλαια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΙΤΙΑ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΑΥΤΟΜΑΤΩΝ ΑΠΟΒΟΛΩΝ (ΕΑΕ)

2.1 Εισαγωγικά

Επί του παρόντος, υπάρχει συγκεκριμένος αριθμός αποδεκτών αιτιών για τις καθ' ἑξιν αποβολές(RPL)(**Εικόνα 2.1**). Αυτές περιλαμβάνουν τις κληρονομήσιμες χρωμοσωμικές ανωμαλίες των γονέων, τον μη υποβληθέντα σε θεραπεία υποθυρεοειδισμό, τον ανεξέλεγκτο σακχαρώδη διαβήτη, ορισμένες ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας και το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο (APS). Άλλες δυνατές ή πιθανές αιτίες περιλαμβάνουν επιπρόσθετες ενδοκρινικές διαταραχές, κληρονομικούς ή / και επίκτητους θρομβοφιλικούς παράγοντες, ανοσολογικές διαταραχές, λοιμώξεις και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Μετά την αξιολόγηση για όλα αυτά τα αίτια (**Πίνακας 2.1**), περίπου τα μισά από αυτά θα παραμένουν ανεξήγητα.



Εικόνα 2.1: Αίτια καθ' ἑξιν αποβολών, APS: αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο

Αίτια	Εργαστηριακή διάγνωση
Γενετικά	Καρυότυπος γονέων
Ανατομικά	Υστεροσκοπήση ή HSG ή δισδιάστατο ή τρισδιάστατο υπερηχογράφημα μήτρας
Ενδοκρινικά	TSH Έλεγχος για αντοχή στην ινσουλίνη, επίπεδα προλακτίνης ορού, αντιθυρεοειδικά αντισώματα, τεστ για απομένοντα ωάρια
Λοιμώδη	Δεν απαιτείται κάποιος έλεγχος εκτός αν ο ασθενής έχει ενδείξεις για χρόνια ενδομητρίτιδα/ενδοκολπίτιδα από εξετάσεις, ή είναι ανοσοκατεσταλμένος
Αυτοάνοσα	Επίπεδα αντισωμάτων έναντι καρδιολιπινών (IgG και IgM) Αντιπηκτικό λύκου
Θρομβοφιλία όχι εξαιτίας APS	Ομοκυστεΐνη, Παράγοντας VLeiden, μεταλλαξη προθρομβίνης G20210A, MTHFRAPCR(ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C),αντιθρομβίνη III, πρωτεΐνες C, S(και λειτουργικός τους έλεγχος)
APS: αντιφωσολιπιδικό σαλπιγγογραφία,IgG:ανοσοσφαιρίνηG,IgM:ανοσοσφαιρίνηM,TSH: εκλυτική ορμόνη της θυρορμόνης	σύνδρομο,HSG: υστερο-

Πίνακας 2.1: Διαγνωστική προσέγγιση των επαναλαμβανόμενων αυτόματων αποβολών βασισμένη στα αίτιά τους

2.2 Γενετικά αίτια

Περίπου το 2% έως 4% των καθ'έξιν αποβολών(RPL) σχετίζεται με μια ισορροπημένη δομική χρωμοσωμική αναδιάταξη στα γαμετικά κύτταρα, τις περισσότερες φορές ισορροπημένες αμοιβαίες μετατοπίσεις ή μετατοπίσεις κατά Robertson. Πρόσθετες δομικές ανωμαλίες που σχετίζονται με τις RPL περιλαμβάνουν χρωμοσωμικές αναστροφές, παρεμβολές στα χρωμοσώματα και μωσαϊκισμό. Σημειακές γονιδιακές μεταλλάξεις, όπως αυτές που συνδέονται με την κυστική ίνωση ή τη δρεπανοκυτταρική αναιμία, σχετίζονται σπάνια με καθ'έξιν αποβολές (RPL).

Η κατάλληλη προσέγγιση αξιολόγησης των RPL θα πρέπει να περιλαμβάνει τον καρυότυπο των γονέων. Η γενετική συμβουλευτική ενδείκνυται σε όλες τις περιπτώσεις των RPL που σχετίζονται με ανωμαλίες των γονεϊκών χρωμοσωμάτων. Ανάλογα με τη συγκεκριμένη διάγνωση, η κατευθυνόμενη θεραπεία μπορεί να περιλαμβάνει τη γονιμοποίηση in vitro με προεμφυτευτική γενετική διάγνωση. Η χρήση γαμετικών κυττάρων από δότη μπορεί να προταθεί σε περιπτώσεις γενετικών ανωμαλιών που οδηγούν πάντοτε σε ανευπλοειδία του εμβρύου (δηλαδή, μετατοπίσεις κατά Robertson που περιλαμβάνουν ομόλογα χρωμοσώματα).

2.3 Ανατομικά αίτια

Οι ανατομικές ανωμαλίες αντιπροσωπεύουν το 10% έως 15% των περιπτώσεων των καθ'έξιν αποβολών (RPL) και γενικά θεωρείται ότι προκαλούν αποβολή με παρεμπόδιση της αγγειακής παροχής του ενδομητρίου, προκαλώντας μη φυσιολογικό και ανεπαρκή πλακούντα. Έτσι, αυτές οι ανωμαλίες που θα μπορούσαν να διακόψουν την αγγειακή παροχή

του ενδομητρίου θεωρούνται πιθανές αιτίες των καθ' ἑξιν αποβολών (RPL). Αυτές περιλαμβάνουν τις συγγενείς ανωμαλίες της μήτρας, τις ενδομήτριες συμφύσεις και τα ινομύματα της μήτρας ή τους πολύποδες μήτρας. Αν και συνδέονται πιο εύκολα με απώλειες του δεύτερου τριμήνου ή πρόωρο τοκετό, οι συγγενείς ανωμαλίες της μήτρας παίζουν επίσης ρόλο στις καθ' ἑξιν αποβολές (RPL). Το διάφραγμα της μήτρας είναι η συγγενής ανωμαλία της μήτρας που συνδέεται στενότερα με τις καθ' ἑξιν αποβολές (RPL), με κίνδυνο απότομης αποβολής κατά 76% μεταξύ των ασθενών που έχουν προσβληθε. (4) Άλλες ανωμαλίες των πόρων Müller, έχουν συσχετιστεί με μικρότερη αύξηση του κινδύνου για καθ' ἑξιν αποβολές (RPL). (4,5) Ο ρόλος της τοξοειδούς μήτρας στην πρόκληση καθ' ἑξιν αποβολής (RPL) είναι ασαφής. Η παρουσία ενδομήτριων συμφύσεων, μερικές φορές συνδέεται με το σύνδρομο Asherman, μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τον πλακούντα και να οδηγήσει σε πρόωρη απώλεια της εγκυμοσύνης. Ενδομήτρια ινομύματα μεγαλύτερα από 5 cm, καθώς και υποβλεννογόνια ινομύματα οποιοδήποτε μεγέθους, μπορούν να προκαλέσουν καθ' ἑξιν αποβολή (RPL). (6) Αν και οι συγγενείς ανωμαλίες που προκαλούνται από την έκθεση της μητέρας στη διαιθυλοστυλβηστρολή κατά την περίοδο της κύησης, σαφώς συνδέονται με καθ' ἑξιν αποβολές (RPL), αυτό γίνεται όλο και λιγότερο κλινικά σχετικό, καθώς οι ασθενείς που έχουν εκτεθεί φεύγουν από την περίοδο της αναπαραγωγικής τους ηλικίας.

Η διαγνωστική αξιολόγηση για ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας πρέπει να περιλαμβάνει υστεροσκόπηση ή υστεροσαλπιγγογραφία (HSG). Η υστεροσκοπική εκτομή των ενδομήτριων συμφύσεων και των ενδομήτριων διαφραγμάτων ενδείκνυται αν εντοπιστούν αυτές οι ανωμαλίες. Οι ασθενείς

που υποβάλλονται σε επιτυχή υστεροσκοπική εκτομή του διαφράγματος φαίνεται να απολαμβάνουν σχεδόν φυσιολογική έκβαση της εγκυμοσύνης, με αποτέλεσμα επιτυχούς γέννας στο χρόνο περίπου 75% και ποσοστά ζωντανών κυημάτων που προσεγγίζουν το 85%. (7) Η μυομεκτομή θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ως θεραπευτική προσέγγιση σε περιπτώσεις υποβλεννογόνων ινομυωμάτων ή ινομυωμάτων οποιουδήποτε τύπου μεγαλύτερων από 5 cm. Η εκτομή έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει σημαντικά τα ποσοστά ζωντανών γεννήσεων από 57% σε 93%. (6) Η μυομεκτομή μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω ανοικτής λαπαροτομής, λαπαροσκόπησης ή υστεροσκόπησης.

2.4 Ενδοκρινικά αίτια

Η έλλειψη της ωχρινικής φάσης (LPD), το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS), ο σακχαρώδης διαβήτης, η θυρεοειδική νόσος και η υπερπρολακτιναιμία είναι μεταξύ των ενδοκρινολογικών διαταραχών που εμπλέκονται σε περίπου 17% έως 20% περιπτώσεων καθ' έξιν αποβολών (RPL). (2,8)

Παραδοσιακά, η LPD έχει προταθεί ότι προκύπτει από την ανεπαρκή παραγωγή προγεστερόνης από το ωχρό σωματίο και την ανεπαρκή ωρίμανση του ενδομητρίου για το σχηματισμό κατάλληλου πλακούντα. Διαγιγνώσκεται όταν υπάρχει παρατεταμένη καθυστέρηση μεγαλύτερη των 2 ημερών στην ιστολογική ανάπτυξη του ενδομητρίου σε σύγκριση με το φυσιολογικό κατά την αυτή ημέρα του εμμηνορρησιακού κύκλου. Σήμερα, ο πραγματικός ρόλος της LPD στις καθ' έξιν αποβολές (RPL) είναι αμφιλεγόμενος και οι ενδομήτριες βιοψίες για τη διάγνωση LPD σπάνια

υποδεικνύονται ως έλεγχος. Μερικές μελέτες έχουν παρατηρήσει μη φυσιολογικές αυξήσεις στην ωχρινोटρόπο ορμόνη ή σε ανδρογόνα (και τα δύο χαρακτηριστικά ευρήματα που συνδέονται με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών-PCOS) μεταξύ των ασθενών που υποφέρουν από καθ' έξιν αποβολές (RPL), υποδηλώνοντας ότι αυτές οι ανωμαλίες μπορεί να οδηγήσουν σε πρόωρη γήρανση του ωοκυττάρου ή / και δυσύγχρονη ωρίμανση του ενδομητρίου. (9,10) Αυτή η υπόθεση δεν υφίσταται χωρίς αμφιβολία. Μελέτες έχουν βρει στοιχεία για σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) σε τουλάχιστον το 40% των γυναικών με καθ' έξιν αποβολές (RPL). (11) Η αντίσταση στην ινσουλίνη και η προκύπτουσα υπερινσουλιναίμια που υπάρχει συχνά σε περιπτώσεις συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) (καθώς και σακχαρώδη διαβήτη τύπου II) μπορεί επίσης να διαδραματίσει κάποιο ρόλο στις καθ'έξιν αποβολές(RPL), όπως παρατηρείται με τον μειούμενο ρυθμό των αυτόματων αποβολών όταν οι ασθενείς υποβάλλονται σε θεραπεία με το φάρμακο που ευαισθητοποιεί την παραγωγή ινσουλίνης, τη μετφορμίνη. (12) Ο κακώς ελεγχόμενος σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 σχετίζεται επίσης με αυξημένο κίνδυνο αυτόματης αποβολής. (13) Παρόλο που ο υποθυρεοειδισμός που δεν θεραπεύεται σαφώς και σχετίζεται με αυθόρμητες αποβολές και καθ' έξιν αποβολές (RPL), η συσχέτιση μεταξύ αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων και καθ' έξιν αποβολών (RPL) σε ευθυρεοειδικούς ασθενείς βρίσκεται επί του παρόντος υπό μεγάλη συζήτηση (15,16) Υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν ότι οι ευθυρεοειδικές γυναίκες με αντισώματα έναντι του θυρεοειδούς, και ιδιαίτερα εκείνες που υποβάλλονται σε θεραπεία γονιμότητας, είναι πιθανό να γίνουν κλινικά υποθυρεοειδικές πολύ σύντομα μετά την έναρξη της εγκυμοσύνης.

(17)Επειδή τα αποτελέσματα της εγκυμοσύνης σε αυτές τις γυναίκες μπορεί να βελτιωθούν με τον έγκαιρη (ενδεχομένως προγεννητικά) υποκατάσταση των θυρεοειδικών ορμονών, (18) παρόμοιες προσεγγίσεις μελετώνται σήμερα μεταξύ των γυναικών με καθ' ἑξιν αποβολές (RPL).

Η αξιολόγηση των ενδοκρινικών διαταραχών θα πρέπει να περιλαμβάνει τη μέτρηση της εκλυτικής ορμόνης της θυρορμόνης (TSH). Άλλες δοκιμές που ενδεχομένως υποδεικνύονται με βάση την κλινική εικόνα του ασθενούς περιλαμβάνουν τη δοκιμή αντοχής στην ινσουλίνη, τον έλεγχο των αποθεμάτων της ωοθήκης σε ωοθυλάκια, την προλακτίνη του ορού, την ύπαρξη αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων και πολύ σπάνια τις ενδομήτριες βιοψίες κατά την ωχρινική φάση. Η θεραπεία με παράγοντες που προκαλούν ευαισθητοποίηση στην ινσουλίνη για τη θεραπεία των καθ' ἑξιν αποβολών (RPL) που συμβαίνουν παρουσία συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) είναι προσφάτως ιδιαιτέρως δημοφιλής.

2.5 Λοιμώδη αίτια

Ορισμένες λοιμώξεις, όπως από *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*, ερυθρά, ιό απλού έρπητα (HSV), ιλαρά, κυτταρομεγαλοϊό και ιό Coxsackie, είναι γνωστές ή υπάρχουν υπόνοιες ότι παίζουν ρόλο στις αυτόματες επαναλαμβανόμενες αποβολές. Ωστόσο, ο ρόλος των λοιμογόνων παραγόντων στις επαναλαμβανόμενες αποβολές είναι λιγότερο σαφής, με επίπτωση της τάξης του 0,5% (2) έως 5% (8). Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί για τα λοιμώδη αίτια των καθ' ἑξιν αποβολών (RPL) περιλαμβάνουν: (1) άμεση λοίμωξη της μήτρας, του εμβρύου ή του πλακούντα, (2) ανεπάρκεια του πλακούντα, (3) χρόνια ενδομητρίτιδα ή ενδοκολπίτιδα, (4) αμνιοϊνίτιδα ή (5)

λοιμώδες ενδομήτριο. Επειδή τα περισσότερα από αυτά είναι μεμονωμένα γεγονότα, φαίνεται ότι υφίσταται ένας περιορισμένος ρόλος για τις λοιμώξεις ως αιτιολογικού παράγοντα των καθ' έξιν αποβολών (RPL). Οι συγκεκριμένες λοιμώξεις που υποτίθεται ότι παίζουν ρόλο σε καθ' έξιν αποβολές (RPL) περιλαμβάνουν τους εξής λοιμογόνους παράγοντες: μυκόπλασμα, ουρεόπλασμα, *Chlamydia trachomatis*, *L. monocytogenes* και HSV. (19) Ο πιο σχετικός κίνδυνος για καθ' έξιν αποβολή (RPL) δευτερογενή ύστερα από λοίμωξη, είναι η χρόνια λοίμωξη σε έναν ανοσοκατεσταλμένο ασθενή.

Η αξιολόγηση και η θεραπεία πρέπει να προσαρμόζονται αναλόγως της κάθε ασθενούς. Εάν μια ασθενής με RPL έχει μια κατάσταση που την αφήνει ανοσοκατασταλμένη ή ιστορικό που υποδηλώνει ύπαρξη σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων, μπορεί να δικαιολογηθεί η αξιολόγηση για πιθανότητα χρόνιων λοιμώξεων. Δεν υπάρχουν στοιχεία ότι η αξιολόγηση για λοιμογόνους παράγοντες ως εξέταση ρουτίνας είναι η κατάλληλη ή παραγωγική.

2.6 Ανοσολογικά αίτια

Επειδή ένα έμβρυο δεν είναι γενετικά ταυτόσημο με τη μητέρα του, είναι εύλογο να συμπεράνει κανείς ότι υπάρχουν ανοσολογικά γεγονότα που μπορεί να εμφανιστούν κατά τη διάρκεια της κύησης και να επιτρέψουν στη μητέρα να κυοφορεί και να γεννήσει το έμβρυο χωρίς απόρριψη. Πράγματι, έχουν προταθεί τουλάχιστον 10 τέτοιοι μηχανισμοί. (20) Συνεπώς, μπορεί να υπάρχουν ανωμαλίες εντός αυτών των ανοσολογικών μηχανισμών που θα μπορούσαν να οδηγήσουν τόσο σε σποραδικές όσο και σε επαναλαμβανόμενες αποβολές. Παρά το έντονο ενδιαφέρον για αυτή την

πιθανή αιτιολογία για καθ'έξιν αποβολή (RPL), δεν υπάρχει συμφωνία για την κατάλληλη διαγνωστική προσέγγιση ή θεραπεία. Οι θεραπείες όπως η ανοσοποίηση των πατρικών λευκοκυττάρων, η χορήγηση ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης, η ανοσοποίηση κυττάρου δότη και οι εγχύσεις στη μεμβράνη της τροφοβλάστης έχουν αποδειχθεί ότι δεν παρέχουν σημαντική βελτίωση στα ποσοστά των ζωντανών γεννήσεων και είναι διαθέσιμες μόνο για χρήση σε εγκεκριμένες μελέτες. (3,21)

Μία συγκεκριμένη αυτοάνοση διαταραχή, το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο (APS), απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή καθώς έχει σαφώς συνδεθεί με πολλές μαιευτικές επιπλοκές, συμπεριλαμβανομένου των RPL. Η συζήτηση για το APS θα μπορούσε επίσης να εμφανιστεί στο πλαίσιο της θρομβοφιλίας, δεδομένου ότι είναι ο πιο συχνά επίκτητος παράγοντας κινδύνου για θρομβοφιλία, με επίπτωση από 3% έως 5% στο γενικό πληθυσμό. Το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο(APS) χαρακτηρίζεται από την παρουσία τουλάχιστον 1 κλινικού και 1 εργαστηριακού κριτηρίου από τα παρακάτω (22):

- **Κλινικά κριτήρια APS**

- ✓ 1 ή περισσότερα επιβεβαιωμένα επεισόδια αγγειακής θρόμβωσης (φλέβας, αρτηρίας ή μικρού αγγείου)
- ✓ Επιπλοκές στην εγκυμοσύνη που περιλαμβάνουν είτε 3 ή περισσότερες διαδοχικές αποβολές σε λιγότερο από 10 εβδομάδες κύησης, 1 ή περισσότερους θανάτους εμβρύου σε κύηση άνω των 10 εβδομάδων ή τουλάχιστον 1 πρόωρο τοκετό (<34 εβδομάδες) λόγω σοβαρής προεκλαμψίας ή ανεπάρκειας πλακούντα

- **Εργαστηριακά κριτήρια APS** (επαναλαμβανόμενες αποβολές τουλάχιστον 2 φορές, περισσότερο από 12 εβδομάδες χρονική διαφορά)
 - ✓ Θετικά επίπεδα αντισωμάτων έναντι καρδιολιπινών (IgG ή IgM) στο πλάσμα σε μέτριο έως υψηλό επίπεδο
 - ✓ Θετικά επίπεδα αντιπηκτικού του λύκου στο πλάσμα

Οι μηχανισμοί με τους οποίους το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APS) καταλήγει σε καθ'έξιν αποβολή (RPL) είναι ελλιπείς. Μια πλήρης αξιολόγηση για καθ'έξιν αποβολές (RPL) θα πρέπει να περιλαμβάνει τον έλεγχο για αντισώματα έναντι αντικαρδιολιπίνης και για αντιπηκτικό του λύκου. Μετά τη διάγνωση, οι συστάσεις για τη θεραπευτική αγωγή περιλαμβάνουν χαμηλή δόση ασπιρίνης (LDA, 81-100 mg / d) συν προφυλακτική χορήγηση χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνης σε κατά τα άλλα υγιείς γυναίκες (δηλαδή απουσία συστηματικής αυτοάνοσης νόσου όπως συστηματικός ερυθματώδης λύκος ή γνωστό ιστορικό θρόμβωσης). Η LDA θα πρέπει να ξεκινά πριν από τη σύλληψη ή με θετικό τεστ εγκυμοσύνης. Η ηπαρίνη πρέπει να ξεκινά με θετικό τεστ εγκυμοσύνης. (22) Η ηπαρίνη είναι ένα μεγάλο μοριακό σύμπλεγμα που δεν διασχίζει τον πλακούντα και επομένως θεωρείται ασφαλής κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης.

2.7 Αίτια θρομβώσεων

Τόσο οι κληρονομικές όσο και οι συνδυαστικές κληρονομούμενες / επίκτητες θρομβοφιλίες είναι συχνές, με περισσότερο από το 15% του λευκού πληθυσμού να φέρει μια κληρονομική θρομβοφιλική μετάλλαξη. (23) Οι πιο

συνηθισμένες από αυτές είναι η μετάλλαξη του παράγοντα V Leiden, η μετάλλαξη στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της προθρομβίνης και οι μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την αναγωγή του μεθυλενο-τετραϋδροφυλλικού (MTHFR). Αυτές οι κοινές μεταλλάξεις σχετίζονται με ήπιο θρομβωτικό κίνδυνο και παραμένει αμφιλεγόμενο αν οι ομόζυγες μεταλλάξεις του MTHFR συνδέονται με αγγειακές παθήσεις. (24) Αντίθετα, πιο σοβαρές θρομβοφιλικές ελλείψεις, όπως αυτές της αντιθρομβίνης III και της πρωτεΐνης S, είναι πολύ λιγότερο συχνές στο γενικό πληθυσμό.

Η πιθανή συσχέτιση μεταξύ καθ'έξιν αποβολών (RPL) και κληρονομικής θρομβοφιλίας βασίζεται στη θεωρία ότι η εξασθένηση της ανάπτυξης του πλακούντα και η λειτουργία του δευτερευόντως φλεβικής και / ή αρτηριακής θρόμβωσης μπορεί να οδηγήσει σε αποβολή. Με βάση μελέτες που έχουν δείξει ότι το μητρικό αίμα αρχίζει να ρέει εντός των αγγειακών κλάδων του πλακούντα σε περίπου 10 εβδομάδες κύησης, η συσχέτιση μεταξύ θρομβοφιλίας και αποβολής σε περισσότερο από 10 εβδομάδες κύησης είναι ευρύτερα αποδεκτή από τη συσχέτιση με αυτές που συμβαίνουν πριν από τις 10 εβδομάδες κύησης. Ωστόσο, η απόδειξη ότι η μεταφορά των θρεπτικών ουσιών από το μητρικό αίμα στον εμβρυϊκό ιστό εξαρτάται από τη ροή του αίματος στη μήτρα και έτσι μπορεί να επηρεαστεί από τα θρομβωτικά συμβάντα που συμβαίνουν εκεί, υποδεικνύει ένα σημαντικό ρόλο για τη θρομβοφιλία ως αιτιολογικό παράγοντα σε επαναλαμβανόμενες απώλειες εγκυμοσύνης ανεξάρτητα από την ηλικία της κύησης. (25)

Οι κληρονομικές θρομβοφιλίες οι οποίες συνδέονται συχνότερα με καθ'έξιν αποβολές (RPL) περιλαμβάνουν την υπερ-ομοκυστεϊναιμία που προκύπτει από μεταλλάξεις στον MTHFR, την αντίσταση στην

ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C που σχετίζεται με μεταλλάξεις του παράγοντα V Leiden, τις ανεπάρκειες των πρωτεϊνών C και S, τις μεταλλάξεις του υποκινητή της προθρομβίνης και τις μεταλλάξεις της αντιθρομβίνης III. Τα επίκτητα αίτια θρομβοφιλίας που σχετίζονται με καθ'έξιν αποβολή (RPL) περιλαμβάνουν την υπερομοκυστεϊναιμία και την αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C. Παρά το γεγονός ότι οι σαφείς αιτιολογικοί δεσμοί μεταξύ αυτών των κληρονομικών και επίκτητων συνθηκών δεν έχουν ακόμη επιβεβαιωθεί, τα διαθέσιμα υπάρχοντα δεδομένα υποδεικνύουν τους εργαστηριακούς ελέγχους για τη μετάλλαξη του παράγοντα V Leiden, των επίπεδων της πρωτεΐνης S, για τις μεταλλάξεις του υποκινητή του γονιδίου της προθρομβίνης, για τα επίπεδα ομοκυστεΐνης και για την αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C, τουλάχιστον για τις γυναίκες της λευκής φυλής. (26-28)

Η κατάλληλη θεραπεία για την κληρονομική ή την επίκτητη θρομβοφιλία θα πρέπει να ξεκινά μόλις διαγνωστεί η διαταραχή. Η θεραπεία είναι ειδική αναλόγως της κάθε διαταραχής και περιλαμβάνει: (1) φυλλικό οξύ ως συμπλήρωμα για τους ασθενείς με υπερομοκυστεϊναιμία, (2) προφυλακτική αντιπηκτική αγωγή σε περιπτώσεις μεμονωμένων ελλείψεων χωρίς ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό θρομβωτικών επιπλοκών και (3) θεραπευτική αντιπηκτική αγωγή σε περιπτώσεις συνδυαστικών θρομβοφιλικών ελλείψεων. Τα επίπεδα ομοκυστεΐνης θα πρέπει να επανεξετάζονται μετά την αρχική θεραπεία και η προφυλακτική αντιπηκτική αγωγή να λαμβάνεται υπόψη όταν η υπερομοκυστεϊναιμία είναι ανθεκτική στη διατροφική παρέμβαση. (29)

2.8 Περιβαλλοντικά αίτια

Λόγω της τάσης των καθ'έξιν αποβολών να οδηγούν σε αισθήματα ευθύνης και ενοχής, οι ασθενείς συχνά ανησυχούν ιδιαίτερα για το ενδεχόμενο οι περιβαλλοντικές εκθέσεις τους να έχουν οδηγήσει σε αποβολές κατά την εγκυμοσύνη τους. Οι συνδέσεις μεταξύ σποραδικών και / ή καθ'έξιν αποβολών (RPL) και επαγγελματικών και περιβαλλοντικών εκθέσεων σε οργανικούς διαλύτες, φάρμακα, ιονίζουσες ακτινοβολίες και τοξίνες έχουν προταθεί, παρόλο που από τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν είναι δύσκολο να συναχθούν ισχυρά συμπεράσματα επειδή οι μελέτες είναι συνήθως αναδρομικές και συγχέονται με εναλλακτικές ή πρόσθετες περιβαλλοντικές εκθέσεις. (3,8)

Η έκθεση σε τρεις ειδικές ουσίες - το κάπνισμα, το οινόπνευμα και την καφεΐνη – εφιστούν την προσοχή μας και αξίζουν ιδιαίτερης προσοχής λόγω της ευρείας χρήσης τους και του τροποποιήσιμου χαρακτήρα τους. Παρόλο που ο μητρικός αλκοολισμός (ή συχνή κατανάλωση αλκοολούχων ποτών) συσχετίζεται σταθερά με υψηλότερα ποσοστά επαναλαμβανόμενων αποβολών, η συσχέτιση με μια πιο μέτρια κατανάλωση παραμένει αδύναμη. (30) Οι μελέτες που συνδέουν τη μέτρια πρόσληψη αλκοόλ με πιθανές αποβολές κατά την εγκυμοσύνη έχουν δείξει αύξηση του κινδύνου όταν καταναλώνονται περισσότερα από 3 ποτά την εβδομάδα κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου (λόγος πιθανοτήτων [OR]: 2.3) (31) ή περισσότερα από 5 ποτά την εβδομάδα καθόλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (OR: 4.8). (32) Φαίνεται λογικό ότι το κάπνισμα τσιγάρων μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο αυτόματης αποβολής, με βάση τη χρήση νικοτίνης, ενός ισχυρού αγγειοσυσταλτικού που είναι γνωστό ότι μειώνει τη ροή αίματος της μήτρας

και του πλακούντα. Ωστόσο, η σχέση μεταξύ του καπνίσματος και της απώλειας της εγκυμοσύνης παραμένει αμφισβητούμενη, καθώς μερικές, αλλά όχι όλες, μελέτες έχουν βρει μια συσχέτιση. (32-34) Παρόλο που δεν είναι αδιαμφισβήτητο, (35) υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι η καφεΐνη, ακόμη και σε ποσότητες τόσο χαμηλές όσο η κατανάλωση 3 έως 5 φλιτζανιών καφέ ανά ημέρα μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο καθ'έξιν αποβολών με μια δόσοεξαρτώμενη απόκριση. (32,36,37) Η συσχέτιση της κατανάλωσης καφεΐνης, αλκοόλης και νικοτίνης με επαναλαμβανόμενες απώλειες κατά την εγκυμοσύνη είναι ακόμη πιο αδύναμη σε σχέση με τη συσχέτισή τους με σποραδικές απώλειες.

2.9 Ανεξήγητα αίτια

Οι άμεσες παρεμβάσεις για τις ασθενείς με καθ'έξιν αποβολές (RPL) περιγράφονται στον Πίνακα 2. Ωστόσο, όταν καταγράφονται όλες οι γνωστές και πιθανές αιτίες για τις καθ'έξιν αποβολές (RPL), σχεδόν οι μισοί ασθενείς θα παραμείνουν χωρίς οριστική διάγνωση. Η βέλτιστη διαχείριση αυτών των ασθενών είναι συχνά τόσο ασαφής όσο και η αιτιολογία των καθ'έξιν αποβολών (RPL). Η προγεστερόνη έχει αποδειχθεί ότι είναι επωφελής για τη μείωση του ποσοστού αποβολής μεταξύ των γυναικών που έχουν υποστεί τουλάχιστον 3 αποβολές. (38) Η LDA έχει επίσης διερευνηθεί ως πιθανή θεραπεία για ανεξήγητες καθ'έξιν αποβολές (RPL). Η χρήση της πριν και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τα ποσοστά ζωντανών γεννήσεων μόνο σε εκείνες τις γυναίκες με προηγούμενες αποβολές πέρα από τις 13 εβδομάδες κύησης. (39,40) Στην πραγματικότητα, η πιο αποτελεσματική θεραπεία για ασθενείς με ανεξήγητες καθ'έξιν αποβολές

(RPL) είναι συχνά η πιο απλή: Συμβουλευτική και ψυχολογική υποστήριξη. Αυτά τα μέτρα έχουν αποδειχθεί ότι έχουν μεταγενέστερα ποσοστά της επιτυχίας εγκυμοσύνης της τάξης του 86% σε σύγκριση με τα ποσοστά επιτυχίας του 33% στις γυναίκες χωρίς πρόσθετη προγεννητική φροντίδα. (41)

2.10 Πρόγνωση

Αν και η διάγνωση των καθ'έξιν αποβολών (RPL) μπορεί να είναι αρκετά ψυχολογικά επώδυνη, μπορεί να είναι χρήσιμη για τον ιατρό και την ασθενή ώστε να έχει κατά νου την σχετικά υψηλή πιθανότητα ότι η επόμενη εγκυμοσύνη θα είναι επιτυχής. Η πρόγνωση για ένα συγκεκριμένο άτομο θα εξαρτηθεί τόσο από την υποκείμενη αιτία για τις αποβολές όσο και από τον αριθμό των προηγούμενων αποβολών. Η διόρθωση των ενδοκρινικών διαταραχών, και των ανατομικών ανωμαλιών απολαμβάνει τα υψηλότερα ποσοστά επιτυχίας, περίπου 60% έως 90%. Οι ασθενείς με κυτταρογενετικές ανωμαλίες ευθυνόμενες για την μια αποβολή βιώνουν ένα ευρύ φάσμα επόμενων επιτυχιών (20% -80%) που εξαρτάται από τον τύπο της υπάρχουσας ανωμαλίας. (42-44) Συνολικά, η πρόγνωση για καθ'έξιν αποβολές (RPL) είναι ενθαρρυντική. Ακόμη και με τη διάγνωση των καθ'έξιν αποβολές (RPL) και με 4 έως 5 προηγούμενες αποβολές, η ασθενής είναι πιο πιθανό να έχει επιτυχή μια επόμενη εγκυμοσύνη της παρά να έχει μια ακόμα απώλεια.

Αίτιο	Θεραπεία
Γενετικά Ισορροπημένες μεταθέσεις	Γενετική Συμβουλευτική Εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) με προεμφυτευτική γενετική διάγνωση Γαμέτες δοτών
Ανατομικές ανωμαλίες Ανωμαλίες των πόρων του Müller Σύνδρομο Asherman Λειομύματα	Υστεροσκοπική εκτομή των διαφραγμάτων, συμφύσεων και υποβλεννογόνων ινομυωμάτων Μυοεκτομή των υποβλεννογόνων ινομυωμάτων ή ινομυωμάτων οποιουδήποτε τύπου μεγαλύτερων από 5 cm
Ενδοκρινικά Σύνδρομο PCOS Υποθυρεοειδισμός Ανεπάρκεια ωχρινικής φάσης/ανεξήγητη Σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ)	Μετφορμίνη Υποκατάσταση της θυρομόνης Συμπλήρωμα προγεστερόνης Αντιμετώπιση του ΣΔ, χορήγηση ινσουλίνης αν ενδείκνυται
Λοιμώδη	Χορήγηση αντιβιοτικών για την ενδομητρίτιδα ή την υποκείμενη λοίμωξη
Αυτοάνοσα APS	Χαμηλή δόση ασπιρίνης συν προφυλακτική LMWH σε γυναίκες χωρίς ιστορικό συστηματικής αυτοάνοσης νόσου όπως ΣΕΛ (SLE) ή ιστορικό θρόμβωσης
Άλλα	Συνδυαστικές θρομβοφιλικές ελλείψεις - θεραπευτική αντιπηκτική αγωγή
Μη-APS θρομβοφιλίες Περιβαλλοντικά αίτια	Μεμονωμένη έλλειψη και κανένα ατομικό ή ισχυρό οικογενειακό ιστορικό θρομβωτικών επιπλοκών - προφυλακτική αντιπηκτική αγωγή Υπερομοκυστεϊναιμία - συμπλήρωμα φυλλικού οξέος (0,4-1,0 mg / d), βιταμίνη B6 (6 mg / d) και πιθανώς βιταμίνη B12 (0,025 mg / d) Εξετάζουμε την προφυλακτική αντιπηκτική αγωγή εάν η υπερομοκυστεϊναιμία είναι ανθεκτική στη διατροφική παρέμβαση Περιορίζουμε τις εκθέσεις που θα μπορούσαν να είναι προδιαθεσικοί παράγοντες (π.χ. καπνός, αλκοόλ, καφεΐνη)
APS: αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, IVF: γονιμοποίηση in vitro, LMWH: ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους, PCOS: σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, ΣΕΛ (SLE): συστηματικός ερυθηματώδης λύκος.	

Πίνακας 2.2: Θεραπευτικές παρεμβάσεις για τις επαναλαμβανόμενες αποβολές αναλόγως των αιτιών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ

3.1. Εισαγωγή

Ο κίνδυνος φλεβικών θρομβοεμβολικών επεισοδίων (VTE) κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι υψηλός, λόγω τόσο των φυσιολογικών αλλαγών κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης, όσο και λόγω του πρόσθετου αντίκτυπου των κληρονομικής και επίκτητης θρομβοφιλίας. Ο συνολικός ρυθμός θρομβοεμβολικών επεισοδίων κατά την εγκυμοσύνη είναι 200 ανά 100.000 κυήσεις (45). Ο κύριος κίνδυνος φαίνεται να υφίσταται στην περίοδο μετά τον τοκετό, όπου η συχνότητα του αυξάνεται σχεδόν 2,5 φορές και εκτιμάται σε 500 ανά 100.000 κυήσεις. Τα περισσότερα από αυτά τα επεισόδια συνίστανται σε εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση σε αντίθεση με την πιθανότητα της πιο θανάσιμης πνευμονικής εμβολής. Τα συμβάντα φλεβοθρόμβωσης παραμένουν κύρια αιτία θανάτου που εκτιμάται ότι κυμαίνεται από 1,2 έως 4,7 ανά 100.000 εγκυμοσύνες.

Οι περιπτώσεις κληρονομικής και επίκτητης θρομβοφιλίας συμβάλλουν περαιτέρω σε αυξημένη προδιάθεση για θρομβωτικά επεισόδια. Ο συνολικός αντίκτυπος των περιπτώσεων κληρονομικής και επίκτητης θρομβοφιλίας είναι χαμηλός στις μη εγκυμονούσες και η πλειοψηφία των ασθενών δεν εμφανίζουν ποτέ θρομβωτικό επεισόδιο. Στη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ωστόσο, ο αυξημένος κίνδυνος θρόμβωσης σε ασθενείς με κληρονομική και επίκτητη θρομβοφιλία είναι ουσιαστικός και δικαιολογεί τη διενέργεια εξετάσεων, ειδικά καθώς η θρόμβωση αποτελεί την κύρια αιτία θνησιμότητας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Πενήντα τοις εκατό των ασθενών με

θρόμβωση κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να βρεθεί ότι έχουν υποκείμενη θρομβοφιλία.

3.2. Παθοφυσιολογικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης

Οι φυσιολογικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι κυρίως υπεύθυνες για την αυξημένη θρομβογένεση κατά την περιγενετική περίοδο. Ένας αριθμός παραγόντων θρόμβωσης συμπεριλαμβανομένων: του παράγοντα VII, του παράγοντα VIII, του παράγοντα X, του παράγοντα von Willebrand και του ινωδογόνου είναι αυξημένοι ως αποτέλεσμα ορμονικών αλλαγών. Την ίδια στιγμή, η αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C αυξάνεται κατά το δεύτερο και το τρίτο τρίμηνο και η δραστηριότητα της πρωτεΐνης S μειώνεται εξαιτίας μεταβολών στο επίπεδο της ολικής πρωτεΐνης S (46). Υπάρχει επίσης μια αύξηση σε έναν αριθμό ανασταλτών της ινωδολυτικής οδού όπως: στον ενεργοποιημένο ινωδολυτικό αναστολέα (TAFI) και στον αναστολέα του ενεργοποιητή πλασμινογόνου 1 και 2 (PAI-1 και PAI-2) (47, 48).

Επιπλέον, οι φυσικές αλλαγές της εγκυμοσύνης οδηγούν σε μια αυξημένη θρομβωτική κατάσταση. Η αυξημένη πίεση στις φλέβες της πυέλου κατά την εγκυμοσύνη και η μειωμένη ροή του αίματος στο κάτω άκρο οδηγούν σε αυξημένη φλεβική στάση. Σχετική συμπίεση της αριστεράς λαγόνιας φλέβας από τη δεξιά λαγόνια αρτηρία κατά τη διάρκεια της πορείας της μέσω του αγγείου οδηγεί σε αύξηση των θρόμβων στην αριστερή λαγόνια φλέβα (49, 50). Αν και η φλεβική στάση αυξάνεται καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και ο πόνος και το οίδημα στο πόδι είναι πιο συχνά κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου της κύησης, η συχνότητα εμφάνισης της εν τω

βάθει φλεβοθρόμβωσης (DVT) κατανέμεται σχετικά ισομερώς κατά τη διάρκεια των τριμήνων (51).

Συνυπάρχουσες νόσοι όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος ή η δρεπανοκυτταρική αναιμία καθώς και άλλοι παράγοντες κινδύνου συμπεριλαμβανομένων της παχυσαρκίας, τη μειωμένης κινητικότητας, της αυξημένης ηλικίας και του καπνίσματος, όλες αυξάνουν τον κίνδυνο θρόμβωσης. Εκτιμάται ότι οι γυναίκες άνω των 35 ετών και οι έγκυες έχουν 1.38-φορές αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης θρομβωτικού επεισοδίου κατά τη διάρκεια της περιγενετικής περιόδου (52). Οι γυναίκες που είχαν τυχαία επεισόδια θρόμβωσης στο παρελθόν έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ενός δεύτερου συμβάντος με ένα εκτιμώμενο ποσοστό επανάληψης 10,9% κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (53).

Συνολικά, τόσο οι φυσιολογικές όσο και οι ανατομικές αλλαγές κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης χρειάζονται αρκετές εβδομάδες για να επανέλθουν μετά τη γέννα, και ο κίνδυνος θρόμβωσης παραμένει αυξημένος (και πράγματι ακόμη και αυξημένος σε σύγκριση με την εγκυμοσύνη) έως περίπου 6 εβδομάδες μετά τον τοκετό (45).

3.3. Κληρονομικές και Επίκτητες θρομβοφιλίες

3.3.1. Συγκεκριμένες διαταραχές

Η κύρια αιτία επίκτητης θρομβοφιλίας που οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης (VTE) κατά την εγκυμοσύνη είναι το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο. Ορισμένα κριτήρια πρέπει να τηρούνται ώστε να γίνει διάγνωση του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου. Αυτό περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα επεισόδια θρόμβωσης ή / και επαναλαμβανόμενες (3 ή

περισσότερες) πρώιμες αποβολές εμβρύου που εμφανίζονται κατά τις πρώτες 10 εβδομάδες κύησης, 1 ή περισσότερες απώλειες εμβρύου που εμφανίζονται μετά από 10 εβδομάδες ή πρόωρο τοκετός σε ≤ 34 εβδομάδες για την προεκλαμψία ή την ανεπάρκεια του πλακούντα. Αυτά τα κλινικά σενάρια πρέπει επίσης να συνοδεύονται από καθορισμένα εργαστηριακά κριτήρια. Το αντιπηκτικό του λύκου (LAC) πρέπει να είναι παρόν στο πλάσμα σε 2 ξεχωριστούς ελέγχους τουλάχιστον σε απόσταση 12 εβδομάδων / και αντισώματα έναντι αντικαρδιολιπίνης (aCL) είτε IgG είτε IgM (ή και τα δύο) που υπάρχουν στο πλάσμα σε μέτρια προς υψηλά επίπεδα τίτλων (> 40) ή την παρουσία αντι-βήτα-2-γλυκοπρωτεΐνης (αντι-b2GPI) IgG ή IgM που πρέπει να είναι παρόντα 2 ή περισσότερες φορές και πάλι σε διάστημα τουλάχιστον 12 εβδομάδων (54).

Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο έχει συσχετιστεί με αναλογίες πιθανοτήτων 15,8 για τον κίνδυνο θρόμβωσης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (52). Υπάρχει σαφής συσχέτιση μεταξύ του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου και της απώλειας εγκυμοσύνης (55). Η παραμονή των αντισωμάτων έναντι καρδιολιπινών και του αντιπηκτικού του λύκου συσχετίζονται έντονα με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης θρομβοεμβολικών επιπλοκών που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη, αλλά η διαχείριση αυτών των ασθενών δεν είναι καλά καθορισμένη (56).

3.3.2. Κληρονομικές διαταραχές

Οι περιπτώσεις κληρονομικής θρομβοφιλίας είναι παρούσες σε ποσοστό άνω του 50% των περιπτώσεων εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης

(VTE) κατά την εγκυμοσύνη. Υπάρχουν ορισμένες κληρονομικές διαταραχές που οδηγούν σε αυξημένο θρομβωτικό κίνδυνο (**Πίνακας 3.1**).

Θρομβοφιλία	OR Γενικός πληθυσμός	Ετήσια συχνότητα εμφάνισης πρώτου επεισοδίου ΕΦΘ (%)	ORστην εγκυμοσύνη (95% CI)
Έλλειψη ATIII	28.2	1.77	4.69 (1.30–16.96)
Έλλειψη πρωτεΐνηςC	24.1	1.52	4.76 (2.15–10.57)
Έλλειψη πρωτεΐνηςS	30.6	1.90	3.19 (1.48–6.86)
ΠαράγονταςVLeiden	7.5	0.49	Ομόζυγοι 34.4 (9.86–120.0) Ετερόζυγοι 8.32 (5.44–12.70)
ΠροθρομβίνηG20210A	5.2	0.34	Ομόζυγοι26.36 (1.24–559.2) Ετερόζυγοι 6.80 (2.46–19.77)

CI: διάστημα εμπιστοσύνης.

Πίνακας 3.1: Κίνδυνος εμφάνισης εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης σε κληρονομική θρομβοφιλία

Αυτές περιλαμβάνουν τόσο τις σημειακές μεταλλάξεις όσο και τις ελλείψεις σε φυσικές αντιπηκτικές πρωτεΐνες. Οι συχνότερες διαταραχές είναι η μετάλλαξη του παράγοντα V Leiden και η μετάλλαξη του γονιδίου της

προθρομβίνης. Αυτές οι μεταλλάξεις συμβαίνουν στο 2-5% του Καυκάσιου πληθυσμού, που αντιπροσωπεύει τις κύριες γενετικές ανωμαλίες που σχετίζονται με την εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση (VTE) (57-59). Η μετάλλαξη του παράγοντα V Leiden προκαλείται από την υποκατάσταση της αργινίνης από τη γλουταμίνη στη θέση 506 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια μεταβολή στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης που συμβάλλει στην αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C μέσω της διακοπής της απενεργοποίησης του παράγοντα Va. Η μετάλλαξη 20210 της προθρομβίνης προκύπτει από την υποκατάσταση της γουανίνης από αδενίνη στη μη κωδική θέση 20210, οδηγώντας σε μια αύξηση στα επίπεδα της προθρομβίνης στο πλάσμα που οφείλονται πιθανόν στην αυξημένη σταθερότητα του mRNA της προθρομβίνης. Το 44% των θρομβώσεων που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη σε ασθενείς με ιστορικό εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης (VTE) συνδέονται με τις μεταλλάξεις του Factor V Leiden (60). Ο επιπολασμός της μετάλλαξης G20210A της προθρομβίνης είναι 17% σε ασθενείς που αναπτύσσουν εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση (VTE) κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (61).

Ο κίνδυνος της εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης (VTE) που σχετίζεται με την εγκυμοσύνη σε αυτές τις διαταραχές έχει εκτιμηθεί σε μια πρόσφατη μετα-ανάλυση που περιελάμβανε την επανεξέταση 9 μελετών (62). Ο κίνδυνος θρόμβωσης επί ομόζυγου παράγοντα V Leiden έχει αναλογία πιθανοτήτων 43,4 ενώ η ύπαρξη της μετάλλαξης της προθρομβίνης έχει δείκτη πιθανοτήτων 24,4. Η ετερόζυγη κατάσταση για τον παράγοντα V Leiden σχετίζεται με μια αναλογία πιθανοτήτων 8,3 ενώ η ετερόζυγη κατάσταση για την προθρομβίνη G20210A σχετίζεται με αναλογία πιθανότητας 6,8. Πιο απλά, εκτιμάται ότι 1 σε 500 ετεροζυγώτες για τον παράγοντα V Leiden και 1 σε 200 ετεροζυγώτες

για την προθρομβίνη G20210A θα βιώσουν ένα θρομβωτικό επεισόδιο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (63).

Οι ελλείψεις στις φυσιολογικές πρωτεΐνες του καταρράκτη της πήξης μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε μια υπερπηκτική κατάσταση. Ανωμαλίες στην πρωτεΐνη S, στην πρωτεΐνη C και στην αντιθρομβίνη III συνδέονται με την εμφάνιση θρομβοφιλίας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι αλλαγές σε αυτούς τους παράγοντες πήξης εμφανίζονται ως φυσιολογικές εκδηλώσεις της εγκυμοσύνης. Οι ελλείψεις σε αυτούς τους παράγοντες πήξης οδηγούν σε μια πιο βαθιά αλλαγή στα επίπεδα πήξης. Οι αναλογίες πιθανοτήτων για την εμφάνιση εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης (VTE) κατά την εγκυμοσύνη είναι 4,8 για τις γυναίκες με έλλειψη πρωτεΐνης C, 3,2 για έλλειψη πρωτεΐνης S και 4,7 για έλλειψη αντιθρομβίνης (62). Ο κίνδυνος για ένα συμβάν θρόμβωσης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης για γυναίκες με έλλειψη πρωτεΐνης C είναι 1 σε 113, 1 σε 42 για έλλειψη αντιθρομβίνης τύπου 2 και 1 σε 3 για έλλειψη αντιθρομβίνης τύπου 1 (63).

Η συσχέτιση της ύπαρξης θρομβοφιλίας με τις μεταλλάξεις στο MTHFR γονίδιο είναι αμφιλεγόμενη. Η μετάλλαξη C667T στο MTHFR γονίδιο οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα ομοκυστεΐνης στο αίμα, η οποία είναι απαραίτητη για το μεταβολισμό της βιταμίνης B12 και του φυλλικού οξέος. Ως φυσιολογική συνέπεια της εγκυμοσύνης, τα επίπεδα ομοκυστεΐνης μπορεί να είναι χαμηλά (64). Παρόλο που παλιότερα υπήρχε υποψία ότι υπήρχε συσχέτιση, έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι η παρουσία ομόζυγων μεταλλάξεων στο γονίδιο MRHFR δεν συσχετίζονται σημαντικά με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης εν τω

βάθει φλεβοθρόμβωσης (VTE) κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (αναλογία πιθανοτήτων 0,7) (65).

Μπορεί επομένως να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι όλες οι περιπτώσεις κληρονομικής θρομβοφιλίας εκτός από τις μεταλλάξεις του MTHFR σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης (VTE) κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (**Πίνακας 3.2**). Βασιζόμενοι σε αυτές τις στατιστικές, φαίνεται ότι ο μεγαλύτερος κίνδυνος εμφανίζεται στις γυναίκες ομοζυγώτες για τον Παράγοντα V Leiden ή τηνπροθρομβίνη G20210A, στους διπλούς ετεροζυγώτες για τον παράγοντα V Leiden και της προθρομβίνη G20210A, και σε εκείνες τις γυναίκες με ανεπάρκεια αντιθρομβίνης.

Θρομβοφιλία	Εγκυμοσύνη (%/κυήσεις)	Συνολικά (%/έτος)
Παράγοντας V Leiden-ετερόζυγοι	2.1 (0.7–4.9)	0.5 (0.1–1.3)
Προθρομβίνη G20210A-ετερόζυγοι	2.3 (0.8–5.3)	0.4 (0.1–1.1)
ATIII, έλλειψη πρωτεΐνης C, ή πρωτεΐνης S	4.1 (1.7–8.3)	1.5 (0.7–2.8)

Πίνακας 3.2: Συχνότητα εμφάνισης εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης στην εγκυμοσύνη που σχετίζεται με κληρονομική θρομβοφιλία

3.4. Αποτελέσματα που σχετίζονται με την θρομβοφιλία στην εγκυμοσύνη

Η συσχέτιση της θρομβοφιλίας με αρνητική έκβαση της εγκυμοσύνης είναι αμφιλεγόμενη. Οι μελέτες τείνουν να είναι μικρές, να έχουν επιλεκτικούς πληθυσμούς και να έχουν διαφορές στα διαγνωστικά κριτήρια. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένες διαταραχές που έχουν συσχετιστεί με θρομβοφιλία συμπεριλαμβανομένης της προεκλαμψίας, της αποκόλλησης πλακούντα, της καθυστέρησης της ενδομήτριας ανάπτυξης και της απώλειας εμβρύου.

3.4.1. Αποβολές σε έγκυες γυναίκες με κληρονομική θρομβοφιλία

Πολλές μελέτες έχουν προσπαθήσει να αντιμετωπίσουν αυτό το ζήτημα και εξακολουθεί να υπάρχει διαμάχη όσον αφορά τη σημασία της θρομβοφιλίας στην αποβολή. Η συσχέτιση είναι συχνά δύσκολη να γίνει λόγω εγγενών ζητημάτων μελέτης σε πληθυσμούς εγκύων γυναικών. Μελέτες που εξετάζουν το ρόλο του παράγοντα V Leiden και της προθρομβίνης G20210A δεν είναι καθοριστικές, με μερικές μελέτες να εμφανίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση αποβολών και άλλες να εμφανίζουν ένα λιγότερο σαφή ρόλο (66,67). Μια άλλη μελέτη που περιελάμβανε περισσότερες από 5000 γυναίκες διαπίστωσε ότι υπήρξε πράγματι μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του παράγοντα V Leiden και του κινδύνου θνησιγενείας με αναλογία πιθανοτήτων 10,9 (68). Σε αυτή τη μελέτη, δεν υπήρξε παρόμοια συσχέτιση με πρόωρη αποβολή και η μετάλλαξη του γονιδίου της προθρομβίνης δεν συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο. Σε μια μικρότερη μελέτη που περιελάμβανε μόνο 100 έγκυες γυναίκες, υπήρξε πάλι μια

συσχέτιση μεταξύ του παράγοντα V Leiden και του κινδύνου θνησιγενείας αλλά και για την μετάλλαξη του γονιδίου της προθρομβίνης. Σε αυτή τη μελέτη, ωστόσο, μόνο όψιμες αποβολές και όχι πρώιμες σχετίζονται με αυτές τις μεταλλάξεις (69). Στη NOHA(Nimes Μαιευτήρες και Αιματολόγοι) μελέτη που βασίστηκε σε μια ομάδα περισσότερων από 32.000 ασθενών σε σχεδιασμό ομάδας ελέγχου, από το 18% των ασθενών που είχαν αποβολές κατά την εγκυμοσύνη, υπήρξε σαφής συσχέτιση μεταξύ ετεροζυγωτίας για τον παράγοντα V Leiden, με αναλογία πιθανοτήτων 3,46, και προθρομβίνης G20210A, με αναλογία πιθανοτήτων 2,60 (70). Αυτές οι αποβολές συνέβησαν κυρίως μετά την δέκατη εβδομάδα της εγκυμοσύνης με μη συσχετίσεις κατά την αρχή της εγκυμοσύνης. Βάση αυτών των μελετών, φαίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του παράγοντα V Leiden και του κινδύνου θνησιγενείας, αλλά η συσχέτιση είναι μικρή όπως αποκαλύφθηκε από μια προοπτική μελέτη που έδειξε ότι ο κίνδυνος ήταν χαμηλός της τάξης του 4,2% σε σύγκριση με το 3,2% για τους μη-φορείς (71).

Δύο μέτα-αναλύσεις έδειξαν ότι η παρουσία μεταλλάξεων του παράγοντα V Leiden ή της προθρομβίνης G20210A, συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο αποβολής κατά το πρώτο ή το δεύτερο τρίμηνο καθώς και με επαναλαμβανόμενες απώλειες εγκυμοσύνης (62,72). Ο ρόλος των άλλων θρομβοφιλιών είναι λιγότερο ξεκάθαρος: η μέτα-ανάλυση από τους Rey και συνεργάτες της έδειξε ότι η έλλειψη πρωτεΐνης C και η έλλειψη αντιθρομβίνης δεν συνδέονταν με αποβολές, ενώ η έλλειψη πρωτεΐνης S συσχετίστηκε με όψιμες αποβολές.

Η πιο συμπερασματική προοπτική ελεγχόμενη μελέτη που εξετάζει πολλαπλά αίτια θρομβοφιλίας και τη σχέση τους με απώλεια εμβρύου είναι η

EPICOT (Ευρωπαϊκή Προοπτική Μελέτη στη Θρομβοφιλία) μελέτη, στην οποία αξιολογήθηκαν 843 γυναίκες με θρομβοφιλία συμπεριλαμβανομένων 571 γυναικών με 1524 εγκυμοσύνες σε σύγκριση με 541 γυναίκες ελέγχου, εκ των οποίων 395 είχαν 1019 εγκυμοσύνες (73). Ο ρυθμός αποβολών ήταν υψηλότερος σε αυτές τις γυναίκες που είχαν περισσότερα από ένα αίτια θρομβοφιλίας με αναλογία πιθανοτήτων 14,3 για θνησιγενεία. Η συσχέτιση γυναικών με ένα αίτιο θρομβοφιλίας ήταν 29% έναντι 23% στην ομάδα ελέγχου με αναλογία πιθανοτήτων 1,35. Όλες τα αίτια θρομβοφιλίας είχαν μια τάση προς αυξημένο κίνδυνο θνησιγενείας ή όψιμης αποβολής. Ο λόγος πιθανοτήτων για θνησιγένεια για κάθε έλλειψη ξεχωριστά ήταν για την έλλειψη αντιθρομβίνης 5,2, για την έλλειψη πρωτεΐνης C 2,3, για την έλλειψη πρωτεΐνης S 3,3 και για τον παράγοντα V Leiden 2,0. Δεν υπήρξαν, ωστόσο, πειστικές αποδείξεις για συσχέτιση μεταξύ θρομβοφιλίας και αποβολής πρωιμότερα κατά την εγκυμοσύνη με μια υπόθεση ότι η έλλειψη της αντιθρομβίνης μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο.

Μια άλλη μελέτη με πάνω από 490 ασθενείς κατέδειξε πως δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ μητρικής θρομβοφιλίας και πρόωρη απώλειας της εγκυμοσύνης (75). Στην πραγματικότητα, οι ερευνητές ανέφεραν ότι ίσως υπάρχει ένα προστατευτικό πλεονέκτημα κατά την ύπαρξη θρομβοφιλίας για την επιβίωση των πρώιμων κύσεων με χαμηλότερο ποσοστό επαναλαμβανόμενων απωλειών. Ωστόσο, η μελέτη έβρισκε μια μέτρια συσχέτιση με δυσμενή αποτελέσματα της εγκυμοσύνης συμπεριλαμβανομένης της όψιμης απώλειας εμβρύου ή ακόμα και θνησιγενείας μετά από 14 εβδομάδες κύησης. Συνολικά, αυτές οι μελέτες υποδηλώνουν ότι η ύπαρξη υποκείμενης θρομβοφιλίας συνδέεται με όψιμη

αποβολή ή με θνησιγενεία, αλλά όχι με αυξημένο κίνδυνο πρόωρων αποβολών.

3.4.2. Θρομβοφιλία και αποκόλληση του πλακούντα

Η αποκόλληση πλακούντα έχει επίσης συσχετιστεί με υποκείμενη κατάσταση θρομβοφιλίας σε έγκυο ασθενή αν και δεν υπάρχει σαφής συσχέτιση. Αυτό υποστηρίχτηκε πρόσφατα από τον Roqu'e και τους συνεργάτες του που ερεύνησαν έναν αριθμό ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων στον πλακούντα σε γυναίκες με θρομβοφιλία (74). Σε αυτή τη μελέτη διαπιστώθηκε ότι ο κίνδυνος της αποκόλλησης αυξάνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των θρομβοφιλικών επεισοδίων του ασθενή με μια δοσοεξαρτώμενη σχέση. Η πιο σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αποκόλλησης πλακούντα και της θρομβοφιλίας παρατηρήθηκε για τους ασθενείς με ανεπάρκεια αντιθρομβίνης. Άλλες μελέτες εξέτασαν επίσης αυτόν τον κίνδυνο, αλλά δεν αποκάλυψαν σαφή σχέση. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερομοκυστειναιμία, αλλά όχι η μετάλλαξη MTHFR, μπορεί να σχετίζεται με τον αποκόλληση πλακούντα τόσο σε μια συνδυαστική μελέτη όσο και σε μια μετα-ανάλυση (75,76). Επομένως, φαίνεται ότι η έλλειψη της αντιθρομβίνης και η υπερομοκυστεναιμία μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο αποκόλλησης του πλακούντα, αλλά δεν υπάρχει στατιστική σημαντικότητα.

3.4.3. Θρομβοφιλία και προεκλαμψία

Μια άλλη παθολογία του πλακούντα που έχει συσχετιστεί με τη θρομβοφιλία είναι η προεκλαμψία και εκτιμάται ότι το 40% του πληθυσμού των ασθενών που παρουσιάζουν προεκλαμψία έχουν υποκείμενη

θρομβοφιλία (77, 78). Όπως και με τα άλλα αρνητικά αποτελέσματα της εγκυμοσύνης, ωστόσο, τα δεδομένα εξακολουθούν να είναι διφορούμενα. Οι περιπτώσεις που σχετίζονται με τη θρομβοφιλία εμφανίζονται να έχουν σοβαρής μορφής φαινότυπο με αυξημένο κίνδυνο HELLP (υπέρταση, διαταραχές ηπατικής βιοχημείας και χαμηλά επίπεδα αιμοπεταλίων). Μελέτες που έχουν εξετάσει αυτές τις συσχετίσεις είναι δύσκολο να ερμηνευθούν, λόγω ζητημάτων στατιστικής ανάλυσης συμπεριλαμβανομένης της ανομοιογένειας μεταξύ των διαφόρων μελετών. Μια μεγάλη μέτα-ανάλυση διαπίστωσε ότι ο παράγοντας V Leiden συνδέθηκε με την προεκλαμψία με αναλογία πιθανοτήτων 2,5 για σοβαρή υπέρταση κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (79). Ωστόσο, άλλες μελέτες δεν παρείχαν τόσο πειστικές αποδείξεις, με μόνο ένα μικρό αυξημένο κίνδυνο να αποδίδεται στον παράγοντα V Leiden για την εμφάνιση προεκλαμψίας (80-82). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν στην περίπτωση της μετάλλαξης προθρομβίνης G20210A, με μόνο ένα μικρό κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας να σχετίζεται με αυτήν την υπερπηκτική κατάσταση (83-85). Άλλα αίτια θρομβοφιλίας μπορούν επίσης να συσχετιστούν με την προεκλαμψία, όπως προτείνεται από μια πρόσφατη μέτα-ανάλυση η οποία βρήκε μια αναλογία πιθανοτήτων 12,7 για συσχέτιση με την έλλειψη πρωτεΐνης S και μια αναλογία πιθανοτήτων 21,5 για συσχέτιση με έλλειψη της πρωτεΐνης C (75). Δυστυχώς, αυτή η ανάλυση περιελάμβανε πολλές μικρές μελέτες που εξασθένησαν συνολικά τη στατιστική ανάλυση και έτσι δεν μπορούν να εξαχθούν οριστικά συμπεράσματα.

Άλλοι εξέτασαν επίσης εάν υπάρχει κάποιος ρόλος της θρομβοφιλίας με αρνητικά αποτελέσματα της εγκυμοσύνης που προκύπτουν σε βρέφη με

χαμηλό βάρος κατά τη γέννηση ή με καθυστέρηση της ενδομήτριας ανάπτυξης τους. Μια μέτα-ανάλυση που εξέταζε τους ρόλους του παράγοντα V Leiden και της μετάλλαξης προθρομβίνης G20210A, όπως και την ομόζυγη κατάσταση του MTHFR και τον κίνδυνο ενδομήτριας καθυστέρησης της ανάπτυξης του εμβρύου δεν αποκαλύπτουν μια υποκείμενη συσχέτιση (69). Μια άλλη μέτα-ανάλυση βρήκε συσχέτισμό μεταξύ της έλλειψης της πρωτεΐνης S και της καθυστερημένης ανάπτυξης του εμβρύου με αναλογία πιθανοτήτων 10,2 (75). Και πάλι, αυτές οι αναλύσεις δεν είναι οριστικές λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος των διαφόρων μελετών και των ευρέων διαστημάτων εμπιστοσύνης κατά την στατιστική ανάλυση που μειώνουν την απήχηση των διαφόρων ευρημάτων.

Αν και αυτές οι μελέτες έχουν συμπεριλάβει πολλούς από τους συσχετισμούς μεταξύ των αιτίων θρομβοφιλίας και πτωχής πρόγνωσης της εγκυμοσύνης, πολλές θεραπευτικές αποφάσεις βασίζονται ακόμα σε αυτά τα ελάχιστα συμπερασματικά στατιστικά στοιχεία. Λόγω αυτών των συσχετίσεων, κάποιοι μάλιστα έχουν προτείνει ότι ο έλεγχος για κληρονομική θρομβοφιλία θα πρέπει να γίνεται τακτικά στο γενικό πληθυσμό. Αυτό ωστόσο, είναι απίθανο να αποφέρει σημαντικά θεραπευτικά οφέλη, καθώς οι συνθήκες αυτές είναι πολύ σπάνιες στο γενικό πληθυσμό και ακόμη λιγότερο πιθανό να συσχετιστεί με τροποποιήσιμα δυσμενή αποτελέσματα της εγκυμοσύνης. Οι πιο πρόσφατες οδηγίες από το Αμερικανικό Κολέγιο Μαιευτικής και Γυναικολογίας αξιολογούν πως σε γυναίκες στις οποίες υπάρχει γνωστή κληρονομική θρομβοφιλία και θα υπάρχουν άμεσες επιδράσεις στην κλινική διαχείριση τους, θα πρέπει να γίνει άμεσα έλεγχος (86). Ως εκ τούτου, οι γυναίκες με ιστορικό τυχαίας εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης (VTE) ή

συγγενείς πρώτου βαθμού με σημαντικό ιστορικό θρόμβωσης θα πρέπει να ελέγχονται. Οι ACOG κατευθυντήριες γραμμές δεν συνιστούν τον έλεγχο των γυναικών με ιστορικό επαναλαμβανόμενων ή μη επαναλαμβανόμενων πρώιμων αποβολών ή δυσμενών συνεπειών της εγκυμοσύνης λόγω έλλειψης ενδείξεων από κλινικά δεδομένα. Ο έλεγχος είναι αμφιλεγόμενος στις γυναίκες που βιώνουν την απώλεια σε μεταγενέστερα στάδια της εγκυμοσύνης και ποιοι έχουν παθολογικό πλακούντα, κάτι που υποδηλώνει ότι η ισχαιμία, το έμφρακτο, ή η θρόμβωση των αγγείων μπορεί να έχει συμβάλει στην αποβολή του εμβρύου, δεδομένου ότι υπάρχει χαμηλό ποσοστό επανάληψης αυτών των αποτελεσμάτων και τα κλινικά δεδομένα εξακολουθούν να είναι ελλιπή.

Όλοι οι έλεγχοι για αυτές τις θρομβοφιλικές διαταραχές θα πρέπει γίνονται τυχαία καθώς η ύπαρξη θρομβωτικών επεισοδίων και η εγκυμοσύνη μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα των μελετών. Επίσης, οι ασθενείς δεν θα πρέπει να λαμβάνουν αντιπηκτική αγωγή κατά τη διεξαγωγή της μελέτης, καθώς τα επίπεδα αντιθρομβίνης μπορεί να είναι ανακριβή σε ασθενείς που χρησιμοποιούν προϊόντα ηπαρίνης και τα επίπεδα πρωτεΐνης C και πρωτεΐνης S θα είναι χαμηλότερα σε ασθενείς που λαμβάνουν βαρφαρίνη.

3.5. Χορήγηση αντιπηκτικής αγωγής κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης

Χαντιπηκτική θεραπεία επιλογής κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη (LMWH), αν και μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και μη κλασματοποιημένη προσαρμοσμένη σε δόση ηπαρίνη (UHF). Η χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη (LMWH) προτιμάται λόγω της

παρατεταμένης ημίσειας ζωής της, της καλύτερης βιοδιαθεσιμότητας, της ευκολίας χρήσης και της μειωμένης συχνότητας εμφάνισης οξυτικής απώλειας σε σύγκριση με τη μη κλασματοποιημένη ηπαρίνη. Η βενζυλική αλκοόλη χρησιμοποιείται συχνά ως συντηρητικό σε φιαλίδια πολλαπλών δόσεων μη κλασματοποιημένης ηπαρίνης και όταν χορηγείται σε νεογνά μπορεί να τα οδηγήσει σε αναπνευστική δυσχέρεια και ακόμη και σε θάνατο. Η μη κλασματοποιημένη ηπαρίνη που διατηρείται με βενζυλική αλκοόλη θα πρέπει να χρησιμοποιείται προσεκτικά αμέσως πριν από τη χορήγησή της. Η βαρφαρίνη συνήθως αποφεύγεται μετά από το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης εξαιτίας της ανησυχίας για πιθανή εμβρυοπάθεια εξαιτίας της βαρφαρίνης. Η αντιπηκτική αγωγή με χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη (LMWH) συνήθως ξεκινά κατά τη διάρκεια της περιόδου πριν τον τοκετό και αλλάζει σε μη κλασματοποιημένη ηπαρίνη στη 36η εβδομάδα της εγκυμοσύνης, προκειμένου να αποφευχθεί η ανησυχία για τις πιθανές επιπλοκές της χρήσης επισκληρίδιας αναισθησίας, που μπορεί να συμβεί με τη χορήγηση της μεγαλύτερης σε διάρκεια ημιζωής χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνης. Η αντιπηκτική αγωγή για την εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση (VTE) θα πρέπει να συνεχιστεί για τουλάχιστον 3-6 μήνες από την εκδήλωση της εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης (VTE), αλλά εάν η εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση (VTE) παρατηρηθεί νωρίς στην κύηση, η αντιπηκτική αγωγή θα πρέπει να συνεχιστεί μέχρι τον τοκετό και για τουλάχιστον 4-6 εβδομάδες μετά τον τοκετό, ανάλογα με τη βελτίωση μετά από τη γέννα και τις υποκείμενες θρομβοφιλικές συνθήκες. Κατά την περίοδο μετά τον τοκετό, είτε η συνέχιση της χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνης (LMWH) είτε η γέφυρα με χορήγηση βαρφαρίνης, είναι αποδεκτές επιλογές (87).

Η βέλτιστη προφυλακτική δόση χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνης (LMWH) δεν έχει προσδιοριστεί για έγκυες γυναίκες. Οι έγκυες γυναίκες έχουν αποδειχθεί ότι απαιτούν υψηλότερες δόσεις μη κλασματοποιημένης ηπαρίνης (UFH) προκειμένου να επιτύχουν προφυλακτικά όσο και θεραπευτικά αντιπηκτικά επίπεδα (88). Η θεραπευτική δόση χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνης (LMWH) απαιτεί προσαρμογή της δόσης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης καθώς το βάρος της εγκύου αυξάνεται. Η μέγιστη αντι-Χα δραστηριότητα έχει βρεθεί να είναι χαμηλότερη στις εγκύους γυναίκες μετά από τον τοκετό (89). Ενώ πολλοί μηχανισμοί, όπως αυξημένη νεφρική κάθαρση, αυξημένος όγκος πλάσματος και αυξημένα επίπεδα προπηκτικών πρωτεϊνών, φαίνεται ότι παίζουν κάποιο ρόλο στην ανάγκη για αυξημένη δόση ηπαρίνης ή LMWH, είναι δύσκολο να γίνουν μελέτες σε έγκυους γυναίκες. Η χρήση ενδιάμεσης δόσης UFH ή LMWH είναι μια αποδεκτή στρατηγική για προφύλαξη από VTE σε έγκυες γυναίκες με αυξημένο κίνδυνο επαναλαμβανόμενης VTE, και αυτή εγκρίνεται από τις κατευθυντήριες γραμμές του ACCP (90).

Για ασθενείς με μέτριο έως υψηλό κίνδυνο επαναλαμβανόμενης VTE (προγενέστερη DVT και ισχυρή θρομβοφιλική διάθεση), η ενδιάμεσης δόσης αντιπηκτική αγωγή συνίσταται. Η ενδιάμεση δόση μπορεί να είναι είτε 40 mg ενοξαπαρίνη κάθε 12 ώρες ή enoxaparin 1 mg / kg άπαξ ημερησίως. Οι προτεινόμενες αντιπηκτικές δόσεις βρίσκονται στον **Πίνακα 3.3**.

Τα επίπεδα-στόχος αντι-Χα για την προφυλακτική δόση LMWH είναι 0.1-0,3 τέσσερις ώρες μετά τη χορήγησή της. Για εκείνες που απαιτούν θεραπευτική δόση, η δοσολογία με βάση το βάρος είτε η ενοξαπαρίνη (1 mg / kg κάθε 12 ώρες) είτε η ντελτεπαρίνη (100 U / kg κάθε 12 ώρες) μπορούν να

χρησιμοποιηθούν, με ένα επίπεδο-στόχο για αντι-Χα δραστικότητα 0,6-1,0, τέσσερις ώρες μετά τη χορήγηση (91). Η μη κλασματοποιημένη ηπαρίνη μπορεί να ρυθμιστεί ως προς τη δόση της για να επιτευχθεί μια PTT από 1,5 έως 2,5 φορές των παραμέτρων ελέγχου.

Ενώ υπάρχει σημαντικό ενδιαφέρον για τη χορήγηση των νέων από του στόματος αντιπηκτικών φαρμάκων (οι άμεσοι αναστολείς του παράγοντα Χα rivaroxaban και apixaban και ο άμεσος αναστολέας της θρομβίνης dabigatran), μόνο το rivaroxaban έχει εγκριθεί από την FDA για τη θεραπεία των θρομβοεμβολικών επεισοδίων και έτσι μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν σαφή στοιχεία που να υποστηρίζουν τη χρήση τους κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Οι έγκυες γυναίκες αποκλείστηκαν από τις μελέτες που οδήγησαν στην έγκριση αυτών των παραγόντων για την αντιμετώπιση καρδιαγγειακών και θρομβωτικών συμβαμάτων. Τα νέα αντιπηκτικά από το στόμα δεν περιλαμβάνονται στις συστάσεις του ACOG για τη θεραπεία των θρομβοεμβολικών επεισοδίων, και δε συνιστώνται κατά τη διάρκεια τόσο της εγκυμοσύνης όσο και του θηλασμού βάσει των στοιχείων βαθμού 1C στο πλαίσιο τωνκατευθυντήριων γραμμών του ACCP του 2012.

	Προφυλακτική δόση	Ενδιάμεση δόση	Θεραπευτική δόση
Μη κλασματοποιημένη ηπαρίνη	5000 U δύο φορές ημερησίως	10,000 U δύο φορές ημερησίως	Έλεγχος τιτλοποίησης PTT 1.5–2.5*
Ενοξαπαρίνη	40 mg ημερησίως	40 mg κάθε 12 ώρες ή 1 mg/kg ημερησίως	1 mg/kg κάθε 12 ώρες
Δαλτεπαρίνη	5000 U ημερησίως	5000 U κάθε 12 ώρες	100 U/kg κάθε 12 ώρες

Πίνακας 3.3: Δόσεις χορήγησης διαφόρων μορφών ηπαρίνης

3.6. Μοντέλο με βάση τους παράγοντες κινδύνου για τη χορήγηση αντιπηκτικής αγωγής

Ενώ οι ασθενείς που αναπτύσσουν VTE κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης τους πρέπει να αντιμετωπίζονται με παρόμοιο τρόπο ανεξάρτητα από το αν έχουν ή δεν έχουν υποκείμενη θρομβοφιλία, οι ασθενείς με κληρονομική ή επίκτητη θρομβοφιλία αλλά χωρίς οξύ θρομβωτικό επεισόδιο δε χρειάζονται απαραίτητα αντιπηκτική αγωγή. Ένας συγκεκριμένος αριθμός μελετών έχουν προσπαθήσει να ταξινομήσουν τη σημασία της θρομβοφιλίας για τον πιθανό κίνδυνο θρόμβωσης της εγκύου ασθενούς. Μια προοπτική μελέτη ενέταξε εγκύους με επιβεβαιωμένο ιστορικό θρομβοφιλίας ή προηγούμενο επεισόδιο VTE σε διαφορετικά επίπεδα για

χορήγηση αντιπηκτικής αγωγής, χρησιμοποιώντας βαθμολογία που βασίζεται στο ιστορικό VTE, τον τύπο της θρομβοφιλίας, την ηλικία, το δείκτη μάζας βάρους σώματος (BMI), τους πολλούς τοκετούς και την ακινητοποίηση (92). Οι χαμηλού κινδύνου ασθενείς δεν έλαβαν αντιπηκτική αγωγή πριν από τη γέννα, οι ασθενείς με ενδιάμεσο κίνδυνο ξεκίνησαν αντιπηκτική αγωγή με LMWH κατά το στην τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης και οι ασθενείς με υψηλό κίνδυνο ξεκίνησαν αντιπηκτική αγωγή από τη στιγμή της ένταξής τους στη μελέτη. Το ποσοστό της VTE ήταν πολύ χαμηλό, με την εμφάνιση μόνο 3 επεισοδίων εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης σε ολόκληρη την μελέτη. Αυτή η μελέτη υποστηρίζει τη χρήση της εκτίμησης κινδύνου κατά την κλινική αντιμετώπιση ασθενών με θρόμβωση κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Μια άλλη μελέτη αφορούσε την μη χορήγηση αντιπηκτικής αγωγής σε εγκύους ασθενείς με ιστορικό VTE (93). Ο ρυθμός των θρομβωτικών επεισοδίων ήταν χαμηλός ακόμη και σε ασθενείς με ένα προγενέστερο ιστορικό VTE που δεν έλαβαν αντιπηκτική αγωγή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Η κύρια κριτική αντιμετώπιση αυτής της μελέτης, ωστόσο, είναι ότι συμμετείχε ένας μικρός αριθμός ασθενών με ιστορικό κληρονομικής θρομβοφιλίας. Τέλος, μια μετα-ανάλυση πραγματοποιήθηκε για να αντιμετωπιστεί αυτό το ζήτημα το οποίο περιελάμβανε σχεδόν 65 μελέτες και συνολικά 2777 εγκυμοσύνες στις οποίες χορηγήθηκε αντιπηκτική αγωγή επιτυχώς τόσο για προφύλαξη όσο και για θεραπεία (94).

Ως μια πιθανή κατευθυντήρια γραμμή για το πώς θα πρέπει να ταξινομούνται οι ασθενείς με θρομβοφιλία κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, οι Fogerty και Connors ανέπτυξαν κατηγορίες αξιολόγησης κινδύνου για να

βοηθήσει στην κλινική διαχείριση τέτοιων περιστατικών (87). Παρακάτω, εμφανίζεται ο πίνακας των κατηγοριών κινδύνου (**Πίνακας 3.4**).

	Υψηλού κινδύνου	Ενδιάμεσου κινδύνου	Χαμηλού κινδύνου
Τύπος θρομβοφιλίας	Παράγοντας VLeiden-ομόζυγοι, Προθρομβίνη G20210A-ομόζυγοι, Συνδυαστικά ετερόζυγοι, Έλλειψη αντιθρομβίνης, οποιαδήποτε θρομβοφιλία + ιστορικό ΕΦΘ	Χαμηλού κινδύνου θρομβοφιλία με ισχυρό οικογενειακό ιστορικό ΕΦΘ	Παράγοντας VLeiden-ετερόζυγοι, Προθρομβίνη G20210A-ετερόζυγοι, έλλειψη πρωτεΐνης C ₃ S, κανένα ατομικό/οικογενειακό ιστορικό ΕΦΘ
Θεραπευτική αντιμετώπιση	Ενδιάμεση ή θεραπευτική δόση χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνης προ του τοκετού και για 4-6 εβδομάδες μετά τοκετού	Προφυλακτική δόση χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνης προ του τοκετού και 4-6 εβδομάδες μετά τοκετού	Κλινική παρακολούθηση προ τοκετού και αντιπηκτική θεραπεία για 4-6 εβδομάδες μετά τοκετού

Πίνακας 3.4: Συστάσεις για την περίπτωση κληρονομικής θρομβοφιλίας αναλόγως της κατηγορίας κινδύνου (87)

3.7. Προφυλακτική αντιπηκτική αγωγή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης

Ενώ είναι σαφές ότι η σχέση μεταξύ της πρώιμης απώλειας εγκυμοσύνης και η ύπαρξη θρομβοφιλίας δεν εγγυώνται τη γενικευμένη χρήση

αντιπηκτικής αγωγής, η χρήση αντιπηκτικής αγωγής για γυναίκες με ιστορικό όψιμης απώλειας του εμβρύου είναι αμφιλεγόμενη (74). Υπάρχει ένας αριθμός μελετών που αφορούν τη χρήση της αντιπηκτικής αγωγής κατά την κύηση σε ασθενείς με ιστορικό θρομβοφιλίας και τα δυσμενή αποτελέσματα της εγκυμοσύνης. Μια μελέτη 160 γυναικών με ιστορικό απώλειας εμβρύου μετά από 10 εβδομάδες κύησης και η ύπαρξη μιας υπερπηκτικής κατάστασης συμπεριλαμβανομένων του Παράγοντα V Leiden, της μετάλλαξης του γονιδίου της προθρομβίνης ή της ανεπάρκειας της πρωτεΐνης S, τυχαιοποίησε γυναίκες στο να λάβουν είτε χαμηλή δόση ασπιρίνης είτε προφυλακτικές δόσεις θεραπείας με ενοξαπαρίνη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (95). Οι γυναίκες στην ομάδα της ενοξαπαρίνης είχαν 86% τοκετούς με ζωντανό κύημα σε σύγκριση με ποσοστό 28% σε αυτές που έλαβαν ασπιρίνη. Ωστόσο, αυτή η μελέτη δεν ήταν χωρίς προβλήματα, καθώς το ποσοστό γεννήσεων στην ομάδα που έλαβε την ασπιρίνη ήταν χαμηλότερο από το αναμενόμενο και η μελέτη δεν ήταν επίσης τυφλή. Ένα όφελος παρατηρήθηκε επίσης σε μια μελέτη γυναικών με ανεπάρκεια πρωτεΐνης C, ανεπάρκεια πρωτεΐνης S, ή ανεπάρκεια αντιθρομβίνης (96). Η χρήση θρομβοπροφύλαξης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης οδήγησε σε σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό απώλειας εμβρύου (0% έναντι 45%), αλλά αυτή η μελέτη είναι επίσης δύσκολη στο να επεξηγηθεί διότι ήταν μικρή και μη τυχαιοποιημένη ή τυφλή. Μια άλλη κλινική μελέτη έδειξε ότι οι γυναίκες με θρομβοφιλία και ιστορικό απώλειας κατά την πρώτη εγκυμοσύνη ήταν σε θέση να τεκνοποιήσουν χωρίς καμία ανεπιθύμητη έκβαση στην επόμενη εγκυμοσύνη τους σε περίπτωση μη χορήγησης αντιπηκτικής αγωγής (97). Έτσι, καθώς τα δεδομένα που διερευνούν τη σχέση μεταξύ θρομβοφιλίας και εγκυμοσύνης με δυσμενή

αποτελέσματα, είναι συγκεχυμένα, έτσι συγκεχυμένα είναι και τα δεδομένα για χορήγηση αντιπηκτικής αγωγής για τη διόρθωση της υποκείμενης υπερπηκτικής τάσης.

Η χρήση της αντιπηκτικής αγωγής σε γυναίκες με ιστορικό αποβολών κατά την εγκυμοσύνη αλλά χωρίς γνωστή θρομβοφιλία δεν έχει δείξει σημαντικό όφελος (98-100). Μια συστηματική ανασκόπηση τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων μελετών που εξετάζουν τη χρήση χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνης σε γυναίκες με επαναλαμβανόμενες ή όψιμες αποβολές χωρίς ιστορικό θρομβοφιλίας ήταν ασαφής, χωρίς κανένα ευδιάκριτο όφελος από την χρήση αντιπηκτικής αγωγής σε αυτήν την ομάδα (101). Σαφώς, απαιτούνται περισσότερες κλινικές μελέτες σε γυναίκες τόσο με όσο και χωρίς θρομβοφιλία στο πλαίσιο των επαναλαμβανόμενων επεισοδίων απώλειας εγκυμοσύνης.

Η χορήγηση αντιπηκτικής αγωγής για το γνωστό αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο είναι πολύ πιο απλή, καθώς συνδυάζεται με σημαντικές επιπτώσεις στην έκβαση της εγκυμοσύνης. Μια μελέτη με γυναίκες με θετικά αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα και επαναλαμβανόμενες αποβολές, παρουσίασε σημαντικά και βελτιωμένα αποτελέσματα με τη χρήση τόσο της ασπιρίνης όσο και της ηπαρίνης σε σύγκριση με τη χορήγηση ασπιρίνης μόνο, με 71% ζωντανούς τοκετούς σε γυναίκες που έλαβαν συνδυασμένη θεραπεία έναντι 42% ζωντανών γεννήσεων σε αυτές που έλαβαν μόνο ασπιρίνη (102). Μια άλλη μελέτη έδειξε παρόμοια αύξηση της τάξης του 50% ζωντανών γεννήσεων σε γυναίκες που έλαβαν συνδυαστική θεραπεία (103). Αυτό το ζήτημα δεν υφίσταται όμως χωρίς διαμάχη, καθώς έχει δειχθεί σε κλινική μελέτη πως παρατηρήθηκαν παρόμοια ποσοστά ζωντανών

γεννήσεων στις γυναίκες με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ηπαρίνη και ασπιρίνη ή μόνο ασπιρίνη, γεγονός που υποδηλώνει πως δεν υπάρχει κάποιο πρόσθετο όφελος από τη χρήση ηπαρίνης (104).

Προκειμένου να αναπτυχθούν οδηγίες για την κλινική διαχείριση των γυναικών με θρομβοφιλία και με δυσμενή αποτελέσματα εγκυμοσύνης, το American College of Chest Physicians έχει καθιερώσει κατευθυντήριες γραμμές ως προς τη θεραπεία που βασίζονται τόσο στο οικογενειακό όσο και στο ατομικό ιστορικό με VTE (90). Αυτές οι οδηγίες αναφέρουν πως οι γυναίκες με ιστορικό αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου που αποδεικνύεται από τις εργαστηριακές τιμές και με προηγούμενο ιστορικό αποβολών θα πρέπει να λάβουν προφυλακτική αντιπηκτική αγωγή τόσο με προφυλακτική δόση χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνης όσο και χαμηλή δόση ασπιρίνης (ή προφυλακτική ή ενδιάμεση δόση μη κλασματοποιημένης ηπαρίνης). Αυτοί με γνωστή ομοζυγωτία για τον παράγοντα V Leiden ή για την προθρομβίνη 20210 και με θετικό οικογενειακό ιστορικό για VTE προτείνεται να λάβουν προ του τοκετού και μετά χορήγηση προφύλαξης με προφυλακτική ή ενδιάμεση δόση χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνης ή βαρφαρίνης, ενώ εκείνοι με ομόζυγες μεταλλάξεις και χωρίς οικογενειακό ιστορικό για VTE προτείνεται να λάβουν μόνο μετά τον τοκετό προφύλαξη για 6 εβδομάδες. Γυναίκες με όλες τις άλλες γνωστές αιτίες θρομβοφιλίας - είτε έχουν οικογενειακό ιστορικό VTE είτε όχι - συνιστάται να υποβάλλονται σε στενή παρακολούθηση μόνο. Προφύλαξη μετά τον τοκετό με προφυλακτική ή ενδιάμεση δόση χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνης ή βαρφαρίνης προτείνεται για τις έγκυες γυναίκες με προηγούμενο ατομικό ιστορικό VTE.

Με βάση όλα τα στοιχεία που παρουσιάζονται, είναι σαφές ότι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την αντιμετώπιση των ζητημάτων γύρω από το ρόλο της αντιπηκτικής αγωγής στην πρόληψη περαιτέρω αποβολών κατά την εγκυμοσύνη. Ενώ συλλέγονται περισσότερες πληροφορίες, θα πρέπει να λαμβάνονται κλινικές αποφάσεις με βάση την αξιολόγηση κάθε περίπτωσης ξεχωριστά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΘΡΟΜΒΟΦΙΛΙΑ ΚΑΙ ΚΥΗΣΗ- Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΤΗΣ ANNEΞΙΝΗΣ

4.1 Εισαγωγή

Σε μια φυσιολογική εγκυμοσύνη, η ικανότητα πήξης του αίματος στη μήτρα και τον πλακούντα καταστέλλεται. Το χωρίς θρόμβους αίμα κυκλοφορεί ελεύθερα και περνάει στην εμβρυϊκή κυκλοφορία. Σε μερικές μητέρες, λόγω διαφόρων καταστάσεων, τόσο επίκτητων όσο και κληρονομικών, η πήξη του αίματος που περνάει στην εμβρυϊκή κυκλοφορία δεν καταστέλλεται. Αυτή η αυξημένη τάση για την πήξη του αίματος ονομάζεται **θρομβοφιλία**. Οι προκύπτοντες θρόμβοι μπορεί να προκαλέσουν τις ακόλουθες επιπλοκές:

1. Αποτυχία εμφύτευσης
2. Αποβολές
3. Προεκλαμψία
4. Ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης
5. Ολιγοϋδράμνιο (χαμηλά επίπεδα αμνιακού υγρού)
6. Ρήξη του πλακούντα
7. Πρόωρη εργασία (συχνά προκαλούνται ανίκανους σύνδρομο του τραχήλου της μήτρας)
8. Ανεξήγητο ενδομήτριο θάνατο του εμβρύου
9. Θρομβοφλεβίτιδα (θρόμβοι αίματος στις φλέβες και τις αρτηρίες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης)

Κάθε γυναίκα που βιώνει οποιαδήποτε από αυτές τις επιπλοκές θα πρέπει να αξιολογείται για θρομβοφιλία.

4.1.1 Διάγνωση της κληρονομικής θρομβοφιλίας

1. Μετάλλαξη του παράγοντα Leiden R560Q (δοκιμή DNA με PCR)?
2. Υπερομοκυστεΐναιμία MTHFR C677T και A1298C μεταλλάξεις (τεστ DNA με PCR)
3. Γονιδιακή μετάλλαξη Προθρομβίνης 20210 (GA) (τεστ DNA με PCR)
4. Επίπεδα πρωτεΐνης C
5. Επίπεδα πρωτεΐνης S
6. Δραστικότητα ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C
7. Μετάλλαξη του γονιδίου PAI-1
8. Μετάλλαξη του Παράγοντα XIII
9. Βήτα-2 γλυκοπρωτεΐνη

4.1.2 Διάγνωση της επίκτητης θρομβοφιλίας (αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα)

1. Αντισώματα σε έξι φωσφολιπίδια των τάξεων IgM, IgG και IgA
2. Αντίσωμα αντιπηκτικό του ερυθματώδους λύκου
3. Russell Viper Venom Time
4. Χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (aPTT)
5. Χρόνος προθρομβίνης (PT)
6. Μερικός χρόνος προθρομβίνης (PTT)

4.2 Επαναλαμβανόμενες αποβολές και γονιδιακοί πολυμορφισμοί

Οι επαναλαμβανόμενες αποβολές, ή οι επαναλαμβανόμενες απώλειες εγκυμοσύνης (RPL) είναι η εμφάνιση τριών ή περισσότερων εγκυμοσύνων που καταλήγουν σε αποβολή του εμβρύου πριν από τη πιθανότητα γέννησης βιώσιμου εμβρύου (για παράδειγμα 24 εβδομάδες κύησης στο Ηνωμένο Βασίλειο). (105) Περίπου το 1% των ζευγαριών που προσπαθούν να αποκτήσουν παιδιά επηρεάζονται από **καθ'έξιν αποβολές**. (105, 106)

Όπως προαναφέρθηκε υπάρχει αύξηση του κινδύνου αποβολής σε γυναίκες με θρομβοφιλία. Το πιο κοινό πρόβλημα είναι ο παράγοντας V Leiden και η μετάλλαξη της προθρομβίνης G20210A. (107) Μερικές αρχικές μελέτες δείχνουν ότι η χορήγηση αντιπηκτικών φαρμάκων μπορεί να βελτιώσει τις πιθανότητες επιτυχούς κύησης, αλλά οι μελέτες αυτές θα πρέπει να επιβεβαιωθούν πριν από την έγκρισή τους στην κλινική πράξη. (108) Είναι αξιοσημείωτο ότι πολλές γυναίκες με θρομβοφιλία περνούν μία ή περισσότερες εγκυμοσύνες χωρίς ιδιαίτερες δυσκολίες, ενώ άλλες μπορεί να έχουν επιπλοκές κατά την εγκυμοσύνη. Η θρομβοφιλία μπορεί να εξηγήσει έως 15% των επαναλαμβανόμενων αποβολών.

Οι επιτυχείς εγκυμοσύνες φαίνεται να απαιτούν καλά ισορροπημένη ρύθμιση της πήξης του αίματος της μητέρας προκειμένου να αποφευχθεί η υπερβολική συσσώρευση ινώδους στο πλακούντα, όπως και να διασφαλιστεί ο πολυμερισμός του ινώδους και η σταθεροποίηση της βασικής μεμβράνης του πλακούντα. (109) Κατά συνέπεια, αρκετοί γενετικοί παράγοντες κινδύνου για φλεβικά θρομβοεμβολικά επεισόδια (VTE) έχουν επίσης μελετηθεί σχετικά με τις επιπτώσεις τους στην πήξη κατά την αρχή της εγκυμοσύνης. (110,111) Αρκετά υποψήφια γονίδια, των οποίων οι πολυμορφισμοί εμφανίζονται ως

πιθανοί παράγοντες κινδύνου για VTE, έχουν αρχίσει να αξιολογούνται στις καθ' ἑξιν αποβολές (RPL). Πολυμορφισμοί στο γονίδιο της θρομβομοδουλίνης (TM) και διαφορετικοί απλοτύποι στο γονίδιο EPCR έχουν πρόσφατα μελετηθεί από τους Kaare και συνεργάτες για το ρόλο τους στην ανάπτυξη πρόωρων αγγειακών επιπλοκών της κύησης. (112)

Η θρομβομοδουλίνη (TM) και ο EPCR είναι γλυκοπρωτεϊνικοί υποδοχείς που διαδραματίζουν βασικούς ρόλους στην αντιθρομβωτική οδό της Πρωτεΐνης C, του σημαντικότερου μηχανισμού που καταστέλλει την πήξη. Η TM είναι ένας ενδοθηλιακός υποδοχέας της κυτταρικής επιφάνειας και εκφράζεται κυρίως επί των ενδοθηλιακών επιφανειών των αιμοφόρων αγγείων και στον πλακούντα. Η TM σχηματίζει ένα σύμπλοκο με θρομβίνη, η οποία στη συνέχεια μετατρέπει την πρωτεΐνη C σε ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C. (113-115) Ο EPCR είναι ένας τύπου 1 διαμεμβρανικός υποδοχέας, που εκφράζεται κυρίως σε ενδοθηλιακά κύτταρα μεγάλων αιμοφόρων αγγείων και στον πλακούντα, και εμπλέκεται στην ανάπτυξη του καρδιαγγειακού συστήματος στο έμβρυο. Ο EPCR δρα στο μονοπάτι της πρωτεΐνης C, δεσμεύοντας την πρωτεΐνη C και παρουσιάζοντάς το στο σύμπλοκο TM-θρομβίνης στο ενδοθήλιο, αυξάνοντας έτσι το ποσοστό ενεργοποίησης της πρωτεΐνης C. (116-118)

Ενώ οι Kaare και συνεργάτες βρήκαν συγκρίσιμες γονοτυπικές συχνότητες του EPCR 4678GC και του 4678CC (A1 απλότυπος) σε ασθενείς και φυσιολογικά άτομα (112), υπάρχουν δεδομένα που υποδεικνύουν μια πιθανή προστατευτική δράση του 4678C αλληλόμορφου κατά των καθ' ἑξιν αποβολών. Τα ευρήματα αυτά είναι σύμφωνα με στοιχεία που δημοσιεύθηκαν από τους Medina και συνεργάτες για VTE, οι οποίοι απέδωσαν αυτό το

προστατευτικό αποτέλεσμα στα αυξημένα επίπεδα των κυκλοφορούντων APC, τα οποία οφείλονται στην αυξημένη έκφραση των EPCR σε φορείς του A1 απλότυπου. (119)

Σε ότι αφορά στον απλότυπο A3 EPCR και τη θρομβοφιλία, τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι αντικρουόμενα. Συγκεκριμένα, οι Uitte de Willige και συνεργάτες αναφέρουν ότι τα υψηλότερα επίπεδα sEPCR συσχετίζονται με το αλληλόμορφο 4600G (απλότυπος A3) και αυξημένο κίνδυνο για θρομβοεμβολικά επεισόδια, σε αντίθεση με το μειωμένο κίνδυνο που παρατήρησαν σε φορείς χαμηλών επιπέδων sEPCR. (120) Αν και οι Medina και συνεργάτες επιβεβαίωσαν τη συσχέτιση αυξημένων επιπέδων μεταξύ του sEPCR με τον απλότυπο A3, ωστόσο δεν ανέδειξαν αυξημένο κίνδυνο για θρόμβωση. (119) Οι συχνότητες του A4600G γονότυπου ήταν παρόμοιες σε συμπτωματικούς και ασυμπτωματικούς φορείς του FV Leiden. (121) Επιπλέον, συγκριτική κατανομή του απλοτύπου A3 μεταξύ των εξεταζόμενων πληθυσμών αναφέρεται στη μελέτη των Kaare και συνεργατών. (109) Ομοίως, βρέθηκε μόνο μια μικρή διαφορά στη συχνότητα του αλληλόμορφου 4600G στις γυναίκες με ή χωρίς καθ'έξιν αποβολές (RPL), και υπήρχε μόνο μια μικρή αλλαγή στο σχετικό κίνδυνο για καθ'έξιν αποβολές (RPL) για το συνδυασμό της με τον A3 απλοτύπο FV Leiden συγκριτικά με μεμονωμένους φορείς του παράγοντα FV Leiden. Αν και τα επίπεδα sEPCR βρέθηκαν να είναι υψηλότερα σε φορείς με το αλληλόμορφο 4600G (119,120), καμία σχέση δόσης-απόκρισης με τον κίνδυνο θρομβοεμβολικών επεισοδίων δεν μπορούσε να ανιχνευθεί στην μεγάλη μελέτη των Uitte de Willige και συνεργατών. (120)

Επίσης, σε διάφορες μελέτες έχει αναφερθεί ότι οι αποβολές 1^{ου} τριμήνου είναι μάλλον συχνές σε γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS). (122-124)

4.3 Επαναλαμβανόμενες αποβολές- Ο ρόλος της αννεξίνης και οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της

Σε πρόσφατες μελέτες πρωτεομικής ανάλυσης αναφέρεται ότι η αννεξίνη A5 (ANXA5) υπερεκφράζεται σε λιπώδη ιστό σε ασθενείς με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. (125,126) Επιπλέον, η μειωμένη έκφραση της ANXA5 στον πλακούντα έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APS), (127) προεκλαμψία (PE), (128,129) περιορισμό της ανάπτυξης εμβρύου (FGR), (130,131) καθώς και σε μη εγκυμονούσες γυναίκες, οι οποίες όμως έχουν προηγούμενη καθ'έξιν αποβολή (RPL). (131) Ο πρώτος απλότυπος της ANXA5 περιγράφηκε το 2007 από τους Bogdanova και συνεργάτες και φαίνεται να επάγει την υπερέκφραση του γονιδίου. (132,133) Ο απλότυπος αυτός ονομάστηκε M2 και έχει συσχετισθεί με καθ'έξιν αποβολές (RPL) σε μελέτες που αφορούν πληθυσμούς της Κεντρικής Ευρώπης,(132,134) ενώ πρόσφατα αναφέρεται και σε μια μελέτη Ιαπωνέζικου πληθυσμού. (135)

Η αννεξίνη A5 είναι ένα τυπικό μέλος της οικογενείας των αννεξινών. Είναι μια πρωτεΐνη εξαρτώμενη από το ασβέστιο και συνδέεται με τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης και είναι μία από τις λίγες αννεξίνες που μπορούν να βρεθούν εξωκυττάρια. (136) Η αννεξίνη A5 πιστεύεται ότι λειτουργεί ως αναστολέας της πήξης λόγω της ικανότητάς της να δεσμεύεται στα ανιονικά

φωσφολιπίδια που εκτίθενται στην κυτταρική επιφάνεια, για παράδειγμα, των αιμοπεταλίων, αναστέλλοντας έτσι την συσσωμάτωση τους (137) και / ή περιορίζοντας την παρουσία του ιστικού παράγοντα στην κυτταρική επιφάνεια. (138) Το γονίδιο της αννεξίνης A5 (ANXA5) καλύπτει ~ 9 kb του ανθρώπινου χρωμοσώματος 4q27 και αποτελείται από ένα μη μεταφραζόμενο εξόνιο και 12 κωδικά εξώνια. (139) Μέχρι σήμερα, λίγα είναι γνωστά για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του ANXA5. Η αννεξίνη A5 είναι μια άφθονη και πανταχού παρούσα πρωτεΐνη που εμφανίζει τα υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης της στα νεφρά, το ήπαρ και τον π्लाκούντα. (140) Το ανθρώπινο γονίδιο ANXA5 παράγει αρκετά μετάγραφα και διαθέτει έναν πολύπλοκο υποκινητή ο οποίος υπόκειται σε περίπλοκη γονιδιακή ρύθμιση. (141) Μέχρι σήμερα, οι μεταλλάξεις του ANXA5 δεν έχουν συσχετιστεί με φαινοτυπική έκφραση σε ασθένειες, με εξαίρεση την παραλλαγή - 1C → T που αναφέρεται πως ευθύνεται για την προστασία των νεαρών ατόμων από έμφραγμα του μυοκαρδίου συνδέοντας την με υψηλότερα επίπεδα στο πλάσμα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε φορείς του αλληλόμορφου T. (142) Ωστόσο, η εγκυρότητα αυτού του συμπεράσματος έχει αμφισβητηθεί πρόσφατα. (143,144)

Για να εξεταστεί η υπόθεση του κατά πόσο οι διάφορες παραλλαγές του γονιδίου της ANXA5 θα μπορούσαν να επηρεάσουν τον κίνδυνο για εκδήλωση καθ'έξιν αποβολών (RPL), ελέγχθηκε η κωδική περιοχή του γονιδίου της ANXA5 και του βασικού υποκινητή της (141) σε 70 ασθενείς με καθ'έξιν αποβολές (RPL), οι οποίοι είχαν προηγουμένως εξεταστεί και δεν είχαν κάποια μετάλλαξη της προθρομβίνης ή μεταλλάξεις του παράγοντα V Leiden. Έτσι, βρέθηκαν δύο κοινοί απλότυποι (M1 και M2) στον υποκινητή του

γονιδίου της ANXA5 (συνίστανται σε συνδυασμό γονιδιακών πολυμορφισμών) και διερευνήθηκε η επίδραση αυτών των απλοτύπων στην έκφραση του γονιδίου ANXA5 και στο συσχετισμό της με αυξημένο κίνδυνο για καθ'έξιν αποβολές (RPL). (132) Ο M2/ANXA5 απλότυπος αποτελείται από τους ακόλουθους πολυμορφισμούς: SNP1: (-) 467G → A (chr4: 121697056, dbSNP: rs112782763) και SNP2: (-) 448A → C, (chr4: 121697037, dbSNP: rs28717001) στην μη μεταγραφείσα περιοχή του υποκινητή, SNP3: (-) 422T → C (chr4: 121697011, dbSNP: rs28651243) , και SNP4: -373G>A εντός της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής του εξονίου. Ο απλότυπος M1 / ANXA5 περιλαμβάνει δύο αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων: τις (-)448A→C και (-)422 T→C. **(Εικόνα 4.1)** Από τη συγκεκριμένη μελέτη των Bogdanov και συνεργατών (132) διαπιστώθηκε πως ο M2/ANXA5 αποτελεί ένα παράγοντα προδιάθεσης για εκδήλωση καθ'έξιν αποβολών (RPL), ενώ αντιθέτως ο M1/ANXA5, όχι.

Από τη μελέτη δε, των Miyamura και συνεργατών (135), φαίνεται ότι απλότυπος M2 της αννεξίνης, δρα μάλλον και ως ανεξάρτητος παράγοντας για καθ'έξιν αποβολές (RPL). Αυτοί εξέτασαν και τη συσχέτιση άλλων δύο πολυμορφισμών του υποκινητή της αννεξίνης A5: των SNP5 (g.-302T>G, rs1050606) που εντοπίζεται εντός της περιοχής του εξωνίου 1 και του SNP6 g.-1C>T (rs11538099), που εντοπίζεται ένα νουκλεοτίδιο πριν από το κωδικόνιο έναρξης στο εξώνιο 2. Αυτοί διεπίστωσαν πως ο SNP5 πολυμορφισμός του υποκινητή του γονιδίου της αννεξίνης A5 δρα ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για καθ'έξιν αποβολές (RPL) σε σχέση με τον M2/ANXA5.

1 CCGAGCCCTG GACAGCTCCC CAGGCCCTTC CCGCGGCGCG AGGACAAGAG

-202

51 GTC|TCCGGGG CCCTCGGGG AGCGGCCTT CCTCCTGGTT CCAGCAGCTC

101 TGCGCCCGCT CCCACCCAG GCCCGCGAGA CCAGCGGGAC AGTCCGCGCC
NotI

151 GCGGGAGACC AACTGGGACG AGCCGCGACC CACGCAGGCG CGCTGAGGCC

201 GGGCAGGGG *MTF-1* *MTF-1* **A** *MTF-1*
CgggccCGC tggcgcgGCC GGCCTGCGGT TGgggccctg

251 gcgGGGTGG **tsp1** *C* *HNF-3* *Sp1* *Sp1* *C* **tsp2**
G**A**CgggccA GCCgggcagG GCcggggtgg gGCCCGCTGgc

301 *Myb* **tsp3** *AP-4, MED-1* **A**
gtttCCGTTG CTTGGATCAG TCTAGGTgca gctgccc**GAT** CC|TTCAGCGT
BamHI +79

351 CTGCATCTCG GCGTCGCCCC GCGTACCGTC GCCCGGCTCT CCGCCGCTCT

401 CCCGGGGGTT CGGGGCACTT GGGTCCCACA GTCTGGGTGA GTGGTCGCAG

451 CCCGGGAGG GGGCTCCTTC TGGAGAGGAG AGCGTGGTTC CGGGG

Εικόνα 4.1: Δομή της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου της ANXA5. Τα όρια σημαδεύονται από κατακόρυφες γραμμές και αριθμούνται σύμφωνα με τη θέση του πρώτου σημείου έναρξης της μεταγραφής (tsp1). Το μη μεταφραζόμενο εξώνιο 1 είναι σκιασμένο με γκρι χρώμα. Τα συντηρητικά μοτίβα του μεταγραφικού παράγοντα και οι συντομογραφίες των των αντίστοιχων μεταγραφικών παραγόντων εμφανίζονται με πλάγιους χαρακτήρες πάνω από την γενωμική αλληλουχία. Οι θέσεις δράσης των περιοριστικών ενδονουκλεασών NotI και BamHI είναι υπογραμμισμένες και η αλληλουχία της ελικοποίησης του Z-DNA στον υποκινητή δίνεται με πλάγιους χαρακτήρες. Τα νουκλεοτίδια που σηματοδοτούν τα σημεία έναρξης της μεταγραφής (tsp) είναι υπογραμμισμένα. Περιοχές σημαντικές για τη λειτουργία του υποκινητή (μοτίβα A και B) καλύπτουν τις θέσεις νουκλεοτιδίων 295-311 και 328-337. Τα νουκλεοτίδια που έχουν αλλάξει στον απλοτύπο του υποκινητή: M2 ANXA5 είναι σημειωμένα με έντονα γράμματα και τα νουκλεοτίδια υποκατάστασης σημειώνονται με έντονα κεφαλαία γράμματα στην κορυφή των αντίστοιχων θέσεων.

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η αυτόματη διακοπή της κύησης πριν το έμβρυο να είναι βιώσιμο (έως την 24η εβδομάδα), είναι μια από τις συχνότερες επιπλοκές της κύησης. Ως υποτροπιάζουσες αυτόματες αποβολές ορίζονται οι δύο ή περισσότερες διαδοχικές αποβολές. Τα αίτια των υποτροπιαζουσών αποβολών κατατάσσονται σε γενετικά, ανατομικά, λοιμώδη, ενδοκρινολογικά και ανοσολογικά. Διαταραχές κληρονομικής και επίκτητης θρομβοφιλίας, με πιο σημαντικές τον παράγοντα V Leiden, τη μετάλλαξη της προθρομβίνης G20210A και το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, μπορεί να εξηγήσουν έως και 15% των επαναλαμβανόμενων αποβολών. Η αννεξίνη (ANXA5) εμφανίζεται φυσιολογικά στον πλακούντα και η έκφρασή της φαίνεται να μειώνεται παρουσία των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων. Δρα ως αναστολέας της πήξης μέσω προσκόλλησης στα ανιονικά φωσφολιπίδια στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί που εντοπίζονται στην περιοχή του υποκινητή του ANXA5 σχετίζονται σημαντικά με την εμφάνιση καθ'έξιν αποβολών και πως γυναίκες με τον απλότυπο M2/ANXA5 έχουν 2,42 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο αποβολής εμβρύου σε σχέση με τις φυσιολογικές.

Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτελεί η διερεύνηση της ύπαρξης του απλοτύπου M2/ANXA5 [SNP1: (-)467G>A, SNP2: (-)448A>C, SNP3: (-)422T>C and SNP4:(-)373G] σε γυναίκες με καθ'έξιν αποβολές (RPL). Επιπλέον, δύο πρόσθετα SNPs: SNP5: (-) 302T> G, τα οποία βρίσκονται εντός του εξονίου 1 του γονιδίου της αννεξίνης και SNP6: (-) 1C> T που

βρίσκεται ένα νουκλεοτίδιο μπροστά από το κωδικόνιο έναρξης στο εξόνιο 2, έχουν επίσης αξιολογηθεί για την πρόκληση καθ' έξην αποβολών (RPL) και μάλιστα το SNP5: (-) 302T> G συσχετίστηκε στενά με αποβολές ανεξάρτητα από τον απλότυπο M2 / ANXA5 (Miyamura et al 2011, Hayashietal 2013). Παρότι πολλές εκθέσεις υποστηρίζουν αυτό το αρχικό εύρημα στη βιβλιογραφία (Bogdanova et al 2007), υπάρχουν μελέτες που δεν το επιβεβαίωσαν (Nagirnaja et al., 2015). Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση της συχνότητας αυτών των έξι πολυμορφισμών του γονιδίου ANXA5 σε μια ομάδα ελληνικών γυναικών με RPL, καθώς και σε ασθενείς με καθ'έξιν υποτροπιάζουσες αποβολές στις οποίες είχαν αποκλειστεί όλοι οι γνωστοί επιβαρυντικοί παράγοντες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

2.1 Ασθενείς-Δείγματα

Συνολικά μελετήθηκαν 100 γυναίκες με καθ'έξιν αποβολές (RPL) από το Σεπτέμβριο του 2007 ως το Μάρτιο του 2008. Συγκεκριμένα, το 91,1% έχει ιστορικό αποβολής πρώτου τριμήνου και το 14,4% είχε ιστορικό αποβολής δεύτερου τριμήνου της κυήσεως (5,5% είχαν αποβολές και κατά τα δύο τρίμηνα). Η μέση ηλικία ήταν τα 36 έτη (εύρος: 20-50 έτη).

Σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε θρομβοφιλικός έλεγχος και αποκλείσθηκαν όλα τα γνωστά αίτια θρομβοφιλίας (μετάλλαξη παράγοντα V Leiden, μετάλλαξη παράγοντα II G20210A, ανεπάρκειες πρωτεΐνης C, πρωτεΐνης S και ATIII), καθώς επίσης αποκλείστηκαν και άλλοι αιτιολογικοί παράγοντες, όπως αναφέρθηκαν παραπάνω (αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, ενδοκρινικές δυσλειτουργίες, μολύνσεις από τη μητέρα, σακχαρώδης διαβήτης, μυελουπερπλαστικά νεοπλασμάτα, ανωμαλίες της μήτρας και γονεϊκές χρωμοσωμικές ανωμαλίες).

Επιπλέον μελετήθηκαν 70 γυναίκες (μέσης ηλικίας 32 ετών, με ηλικιακό εύρος 22-45), χωρίς ιστορικό καθ'έξιν αποβολών και με τουλάχιστον 1 φυσιολογική κύηση, και έχοντας αποκλειστεί επίσης το ενδεχόμενο θρομβοεμβολικών επεισοδίων. Οι γυναίκες αυτές προέρχονται από την τράπεζα ομφαλοπλακουντιακού αίματος (ΕΛ.ΤΡ.ΟΠ.Α)

Για τη μελέτη απομονώθηκε DNA από δείγματα περιφερικού αίματος. Η ανίχνευση πολυμορφισμών στον υποκινητή του ANXA5 έγινε με ανάλυση της καμπύλης τήξης (HRMA) των προϊόντων που προέκυψαν ύστερα από

αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) με κατάλληλους εκκινητές για μία περιοχή 199 βάσεων ανοδικά του γονιδίου (ευαισθησία>2,5%). Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με προσδιορισμό της αλληλούχησης κατά Sanger, προκειμένου να έχουμε όλα τα στοιχεία για τα τελικά μας αποτελέσματα.

Οι ασθενείς που μελετήθηκαν προέρχονταν από το Τμήμα Ανοσοβιολογίας του Νοσοκομείου “Έλενα Βενιζέλου” και το Παθολογοανατομικό Τμήμα του Νοσοκομείου Αθηνών Λαϊκό. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι από όλους τους ασθενείς που εντάχθηκαν στην μελέτη ζητήθηκε έγγραφη συγκατάθεση.

2.2 Πρωτόκολλο μελέτης

Το πρωτόκολλο μελέτης εγκρίθηκε από τα εσωτερικά συμβούλια αξιολόγησης όλων των συμμετεχόντων ισοτιούτων. Έγιναν γραπτές ενημερωτικές συγκαταθέσεις από όλους τους συμμετέχοντες και η μελέτη διεξήχθη σύμφωνα με τη διεθνή συνθήκη του Ελσίνκι. Το DNA απομονώθηκε με πρότυπες μεθόδους μετά την απομόνωση των συνολικών λευκοκυττάρων από το περιφερικό αίμα μετά από λύση ερυθρών κυττάρων. Όλα τα δείγματα ερευνήθηκαν για την παρουσία και των έξι σχετιζόμενων με καθ’ έξιν αποβολές (RPL) SNPs του γονιδίου της αννεξίνης: ANXA5 με αλληλούχηση κατά Sanger. Μια γονιδιωματική περιοχή 752bp του υποκινητή της ANXA5 ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές: ANXA5.v5.SF: GGCGCGAGGACAAGAGGT και ANXA5.v5.SR: AAAAGTCCCTCGTCGCAGCATACAAA. Τα προϊόντα PCR καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το κιτ εκχύλισης γέλης αγαρόζης QiaQuick (Qiagen)

σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μονή αλληλούχιση με τον εκκινητή ANXA5.v5.SF, έγινε με το BigDye Terminator, v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) χρησιμοποιώντας τον αναλυτή ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό Chromas v.2.4.3 (Technelysium).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ

3.1 Απομόνωση γενωμικού DNA

Η απομόνωση του ολικού γενωματικού DNA έγινε σε δείγματα περιφερικού αίματος χρησιμοποιώντας standard μεθόδους (CVD strip assay, A. Viennalab, Austria).

Πειραματική πορεία:

Σε 2ml δείγματος αίματος προστίθενται 3ml διάλυμα λύσης I (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 1mM EDTA), για τη λύση του κυττάρου και το δείγμα τοποθετείται για 30 min σε πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 3000 rpm για 15min στους 40C. Στο ίζημα προστίθενται 2ml διάλυμα λύσης I και τα δείγματα ανακινούνται προσεκτικά. Κατόπιν ακολουθεί φυγοκέντριση όπως παραπάνω. Επαναλαμβάνεται το ίδιο βήμα με προσθήκη στο ίζημα 0.5ml διάλυμα λύσης I και φυγοκέντριση.

Στη συνέχεια προστίθενται στο ίζημα 0.6ml διάλυμα λύσης II (400mM NaCl, 10mM Tris HCl pH 8.2, 2mM EDTA), 250μg/ml πρωτεΐνάση K και 0.6% SDS. Ακολουθεί επώαση στους 370C και ανακίνηση για 24 ώρες. Η πρωτεΐνάση K είναι μία μη ειδική πρωτεάση σερίνης. Η δραστικότητα της μπορεί να αυξάνεται με προσθήκη αποδιατακτικών παραγόντων όπως SDS και ουρία. Η πρωτεΐνάση K χρησιμοποιείται για την απενεργοποίηση ενδογενών νουκλεασών όπως RNA ή DNA από ιστούς και κυτταρικές σειρές. Η περιεκτικότητα του δείγματος σε DNA μπορεί να υπολογιστεί με μέτρηση της απορρόφησής του στα 260nm με βάση τη σχέση: μία οπτική πυκνότητα

(OD) αντιστοιχεί σε 50μg/ml DNA. Στη συνέχεια αραιώνονται ώστε η τελική συγκέντρωση σε DNA να είναι 50ng/μl πριν αποθηκευτούν στους -200C.

3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR-Polymerase Chain Reaction) (Mullis KB and Fallona FA, 1987)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια ενζυμική μέθοδος *in vitro* πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων τμημάτων του γενετικού υλικού, μιμούμενη τον *in vivo* διπλασιασμό του DNA. Μέσω της PCR καθίσταται δυνατή η παραγωγή τεράστιου αριθμού πιστών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA, χρησιμοποιώντας μικρές ποσότητες (0.1-1 μg) DNA ανάλογα με το αν αυτό είναι πλασμιδιακό ή γενωμικό DNA.

Η ευρεία εφαρμογή της μεθόδου ξεκίνησε αφού πρώτα ανακαλύφθηκε η θερμοανθεκτική Taq DNA-πολυμεράση (Chain et al., 1976). Με την νέα πολυμεράση, από τη μία πλευρά το ένζυμο δεν καταστρεφόταν στο τέλος κάθε κύκλου λόγω θερμοκρασίας και από την άλλη δεν υπήρχε η ανάγκη να χρησιμοποιούνται χαμηλές θερμοκρασίες πρόσδεσης εκκινητών και επιμήκυνσης. Έτσι η μέθοδος έγινε πιο ακριβής και αποδοτική.

Γενικά, μια DNA-πολυμεράση καταλύει την αντίδραση σύνθεσης με κατεύθυνση 5'-3' μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA με μήτρα μονόκλωνο υπόστρωμα, ξεκινώντας όμως την αντιγραφή από ένα δίκλωνο τμήμα (εκκινητής-μήτρα). Η ίδια διαδικασία επιμήκυνσης του εκκινητή είναι η αρχή της μεθόδου της PCR και πολλών άλλων μοριακών τεχνικών σήμανσης του DNA ή ανάλυσης της πρωτοδιάταξής του. Τα απαραίτητα συστατικά του διαλύματος της αντίδρασης, είναι τα εξής:

A) DNA- πολυμεράση

B) Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοσίδια (dNTPs: ATP, CTP, GTP, TTP)

Γ) Διάλυμα αντίδρασης: MgCl₂ και 10X buffer

Δ) Εκκινητές (primers)

Ε) DNA υπόστρωμα

Ένας από τους σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την πιστότητα της Taq πολυμεράσης είναι, εκτός των άλλων που αναφέρθηκαν, και οι θερμοκρασίες δράσης του ενζύμου.

3.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – Αρχή της μεθόδου

Η αντίδραση στηρίζεται στην κυκλική επανάληψη τριών αντιδράσεων, η κάθε μία από τις οποίες πραγματοποιείται στο ίδιο διάλυμα αλλά σε διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους. Η όλη διαδικασία έχει ως εξής:

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation): Η αποδιάταξη γίνεται σε πολύ υψηλή θερμοκρασία (94-96°C).

2. Πρόσδεση εκκινητών (annealing): Στο στάδιο αυτό, κατάλληλα επιλεγμένοι εκκινητές (primers), οριοθετημένοι για την αλληλουχία που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε, υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες πάνω στη μήτρα DNA.

3. Πρόσδεση της πολυμεράσης στο 3'-OH κάθε εκκινητή και επιμήκυνση των αλυσίδων (extension): Η Taq πολυμεράση προσδένεται στους εκκινητές και επιμηκύνει προς το 3' άκρο τους, αντιγράφοντας την μήτρα (γενομικό DNA). Η αντιγραφή γίνεται σε σχετικά υψηλή θερμοκρασία (περίπου 60°C) ώστε να μη δημιουργούνται δευτεροταγείς δομές που εμποδίζουν την αναγνώση.

Η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται κυκλικά, με τη μόνη διαφορά ότι σε κάθε κύκλο ως μήτρα, εκτός από το αρχικό DNA, χρησιμοποιούνται και οι

αλυσίδες που έχουν συντεθεί. Σε κάθε κύκλο η επιθυμητή αλληλουχία αυξάνεται με γεωμετρική πρόοδο. Έτσι, μετά από 25-35 κύκλους που πραγματοποιούνται συνήθως μέσα στο διάλυμα της αντίδρασης, έχουν παραχθεί κάποια εκατομμύρια αντίγραφα.

4. Τελική επιμήκυνση: Το τελευταίο στάδιο της όλης διαδικασίας περιλαμβάνει την τελική επιμήκυνση των παραχθέντων αλυσίδων, όπου αυτό χρειάζεται, σε θερμοκρασία περίπου 720C. (McPherson M.J., Quirke P. and Taylor G.R. (1991). PCR. A Practical Approach. Oxford University).

Ο έλεγχος του προϊόντος της αντίδρασης γίνεται ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα αγαρόζης και βρωμιούχο αιθίδιο και παρατήρηση σε υπεριώδες φως.

3.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - Η μέθοδος

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια ενζυμική μέθοδος που επιτρέπει την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Μέσω της PCR καθίσταται δυνατή η παραγωγή τεράστιου αριθμού πιστών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA, χρησιμοποιώντας μικρές ποσότητες (0.1-1 μg) DNA. Όλα τα συστατικά της αντίδρασης αναδεύονται και φυγοκεντρώνται σύντομα πριν τη χρήση.

Ταυτόχρονα, πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις ελέγχου:

α) Μία αντίδραση με όλα τα συστατικά εκτός του DNA, ως αρνητικός μάρτυρας. Για κάθε αντίδραση προστίθενται και αναμειγνύονται σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο για PCR χωρητικότητας 0,2ml τα εξής:

1)	Ρυθμιστικό δ/μα της PCR (-MgCl ₂): C αρχ= 10X, C τελ= 1X → 10 μl από τα 100 μl της συνολικής αντίδρασης
2)	MgCl ₂ : C αρχ= 50mM, C τελ=1.5mM → 5 μl από τα 100 μl της συνολικής αντίδρασης
3)	μείγμα dNTPs: C αρχ= 10mM, C τελ=0.2mM → 1 μl από τα 100 μl της συνολικής αντίδρασης
4)	5' εκκινητής: C αρχ=100pmol/ μl, C τελ= 1pmol/ μl → 1 μl (25pmol) από τα 100 μl της συνολικής αντίδρασης
5)	3' εκκινητής: C αρχ=100pmol/ μl, C τελ=1pmol/ μl → 1 μl (25pmol) από τα 100 μl της συνολικής αντίδρασης
6)	Taq DNA πολυμεράση: C αρχ=5 U/ μl, C τελ=0.05 U/ μl → 0.5 μl από τα 100 μl της συνολικής αντίδρασης
7)	DNA (0,1- 0,5 μg): ω μg ανάλογα με τη συγκέντρωσή του
8)	Αποστειρωμένο ddH ₂ O: X=100-(18,25+ω) μl, ανάλογα με την αντίδραση
V ΤΕΛΙΚΟΣ= 100 μl συνολικής αντίδρασης	

Πίνακας 3.1: Τα συστατικά της PCR

Πρακτικά, ετοιμάζεται ένα μείγμα της αντίδρασης με όλα τα συστατικά πλην του DNA υπολογισμένα για n+2 αντιδράσεις (όπου n ο πραγματικός αριθμός αντιδράσεων). Το μείγμα διαμοιράζεται σε n+1 σωληνάρια PCR και σε αυτά προστίθεται το DNA σε n σωληνάρια, ενώ στον αρνητικό μάρτυρα προστίθεται ίσος όγκος αποστειρωμένο ddH₂O.

Το προϊόν της αντίδρασης αναλύεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης κατάλληλης πυκνότητας.

Για την αντίδραση της PCR, σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι 500 µl προστίθενται:

0.1-0.5 µg DNA που περιλαμβάνει την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί.
• 1 µl μείγματος dNTPs 10 mM (τελική συγκέντρωση 0.1 mM)
• 1 µl primer-forward 25 pmol/µl
• 1 µl primer-reverse 25 pmol/µl
• 5 µl διαλύματος MgCl ₂ 50 mM (τελική συγκέντρωση 2.5 mM)
• 10 µl 10X ρυθμιστικού διαλύματος πολυμεράσης.
• 0.5 µl Taq DNAπολυμεράση (5 U).
Ο απαιτούμενος όγκος ds H ₂ O μέχρι να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος των 100 µl.

Αποδιάταξη: 94 °C για 45 sec → για 3 κύκλους
Υβριδισμός: 45 °C για 30 sec → για 3 κύκλους
Επιμήκυνση: 72 °C για 1 min → για 3 κύκλους
Αποδιάταξη: 94 °C για 45 sec → για 25 κύκλους
Υβριδισμός: 56 °C για 30 sec → για 25 κύκλους
Επιμήκυνση: 72 °C για 1 min → για 25 κύκλους
Τελική επιμήκυνση: 72 °C για 10 min

Πίνακας 3.2: Το πρόγραμμα που χρησιμοποιείται για την PCR

3.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε γέλη αγαρόζης

Ο έλεγχος του γενωμικού DNA μετά την απομόνωσή του από τα κύτταρα, πραγματοποιείται με οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η τελική συγκέντρωση της αγαρόζης είναι 0.8-1% w/v, ενώ ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται 0.5X TBE. Η τάση που εφαρμόζεται είναι 60 volt με σταθερή ένταση.

Η ανίχνευση γίνεται με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο, τελικής συγκέντρωσης 0.5 µg/ml, το οποίο εισχωρεί και δεσμεύεται στην διπλή έλικα του DNA. Κατόπιν το σύμπλοκο DNA-βρωμιούχου αιθιδίου ανιχνεύεται σε λάμπα υπεριώδους, όπου καθίσταται ορατό με μορφή πορτοκαλόχρωμων ή ρόδιων ζωνών.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

Διάλυμα TBE (Tris-borate): 0.89 M Tris-base, 0.89 M Boric acid, 0.02 M EDTA, pH 8.3 → Το διάλυμα παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 20 φορές μεγαλύτερη της τελικής (10X) και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Το τελικό διάλυμα (0.5X) παρασκευάζεται λίγο πριν την ηλεκτροφόρηση με κατάλληλη αραίωση του διαλύματος 10X.

Για να παρασκευαστεί 1lt, διαλύεται σε 800ml ddH₂O: 108gr Trisbase με M.B: 121.1, 55gr boric acid (βορικού οξέος) με M.B: 61.84 και 7.44gr EDTA με M.B: 372.2). Το pH προσαρμόζεται στο 8,3 με HCl και ογκομετρείται στο 1lt. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου: 3 mg/ml (w/v) pH 8.0 (διατηρείται στους 4 °C)

Διάλυμα φόρτωσης (Gel Loading Buffer, GLB): 0.25% (w/v) κυανού της βρωμοφαινόλης, 0.25% (w/v) κυανολικό ξυλένιο, 30% γλυκερόλη.

Παρασκευή γέλης αγαρόζης:

Ζυγίζονται 2 gr αγαρόζης και διαλύονται σε 200ml διαλύματος 1XTBE σε κωνική φιάλη. Η φιάλη θερμαίνεται με ταυτόχρονη ανάδευση, μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Προστίθεται το βρωμιούχο αιθίδιο (10λ) (φθορίζουσα χρωστική που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA, γεγονός που το καθιστά ισχυρά καρκινογόνο. Φυλάσσεται υπό μορφή διαλύματος 10mg/ml στο ψυγείο, σε σκουρόχρωμη φιάλη). Στη συνέχεια, το διάλυμα, αφού κρυώσει λίγο, ρίχνεται σε κατάλληλα προετοιμασμένο εκμαγείο, στο οποίο έχει τοποθετηθεί ειδική 'χτένα' για δημιουργία των θέσεων (slots), στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα. Αφού πήξει το πήκτωμα, αφαιρούμε τη χτένα, απομακρύνουμε το πήκτωμα από το εκμαγείο και για να αποφύγουμε την αφυδάτωση, καλύπτουμε το πήκτωμα με διαφανή μεμβράνη για να διατηρηθεί για μερικές μέρες στο ψυγείο (περίπου 1 εβδομάδα). Τέλος, πριν την ηλεκτροφόρηση, βγάζουμε το πήκτωμα από το ψυγείο, κόβουμε το πήκτωμα κατάλληλα ώστε να δημιουργηθούν όσες θέσεις για 'φόρτωμα' δειγμάτων θέλουμε κάθε φορά και το τοποθετούμε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Παράγοντες που επηρεάζουν την ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης:

- 1) Το μέγεθος του DNA:** Δίκλιωνα, γραμμικά κομμάτια κινούνται με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του log του μοριακού τους βάρους.
- 2) Η συγκέντρωση της αγαρόζης:** Η κινητικότητα ενός τμήματος DNA διαφέρει ανάλογα με τη συγκέντρωση της αγαρόζης του πηκτώματος.

Παρακάτω στον πίνακα βλέπουμε το εύρος των διαφόρων συγκεντρώσεων πηκτώματος που απαιτείται για αρκετά καλό διαχωρισμό συγκεκριμένου εύρους μεγεθών DNA.

3) Η στερεοδιάταξη του DNA: Η ηλεκτροφορητικότητα γραμμικού ή χαλαρού ή κυκλικού DNA ίδιου μοριακού βάρους διαφέρει και εξαρτάται από το βαθμό υπερελίκωσης.

4) Η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος: Η ταχύτητα με την οποία κινείται το DNA στο πήκτωμα κατά την ηλεκτροφόρηση είναι ανάλογη με την τάση του ρεύματος που εφαρμόζεται (ανάλογη και με την αντίστοιχη ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος που διαπερνά το πήκτωμα). Αν αυξηθεί η τάση αυτό οδηγεί σε αύξηση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας κάθε τμήματος DNA ανάλογα πάντα με το μοριακό βάρος του κάθε κομματιού του DNA. Έτσι, μεγάλη αύξηση της τάσης οδηγεί σε μείωση της διαχωριστικής ικανότητας του πηκτώματος. Η ηλεκτροφορητική συμπεριφορά του DNA δεν επηρεάζεται αισθητά από τη θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση.

3.4 Αλληλούχηση κατά SANGER της περιοχής του υποκινητή και του γονιδίου της αννεξίνης A5 (ANXA5) με πρωτόκολλο SEQ

3.4.1 Αρχή της μεθόδου

1. Σχεδιασμός των ολιγονουκλεοτιδίων χρησιμοποιώντας το κατάλληλο λογισμικό:

- Oligo7
- Pyromark

Παραγγελία τους (Macrogen Inc.)

- <https://dna.macrogen.com/eng/member/login.jsp>
- Κόστος: 0,1 ευρώ / βάση

2. Κατά την άφιξη των PCR ολιγονουκλεοτιδίων

- Κάντε spin με πλήρη ταχύτητα το φιαλίδιο με κλειστό καπάκι για να καθιζάνει ο λυοφιλοποιημένος εκκινητής
- Προσθέστε τον απαιτούμενο όγκο νερού για PCR (ή νερού ίσης καθαρότητας), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή
- Αφήστε 2 λεπτά για επώαση του RT
- Ανακατεύετε με Vortex μερικά δευτερόλεπτα
- Αφήστε άλλα 2 λεπτά για να επωαστεί το RT
- Στη συνέχεια, κάντε spin με πλήρη ταχύτητα
- Αραιώστε το απόθεμα των ολιγονουκλεοτιδίων (100 μM) στην απαιτούμενη συγκέντρωση αραίωσης προς εργασία, συνήθως 25 μM.

$$100 \mu\text{M} * x = 25 \mu\text{M} * 100 \mu\text{L} \Rightarrow x = 25 \mu\text{L of stock oligos} + 75 \mu\text{L H}_2\text{O}$$

Qiagen (SafeBlood Bioanalytica)
 203205
Qiagen HotStart DNA Polymerase (1,000 U)
 515.00 € (NO VAT included)

Thermo-Fischer Scientific (Antisel)
 10297-018
100mM (4x25μmol) dNTP Set, PCR Grade 4x250 μL
 46.75 € (NO VAT included)

- Παρασκευάστε 40 mM dNTPs (από αρχικό απόθεμα 100 mM)

$$100 \text{ mM} * x = 40 \text{ mM} * 100 \text{ uL} \Rightarrow x = 40 \text{ uL αποθέματος dNTPs} + 60 \text{ uL H}_2\text{O}$$

3. Έλεγχος DNA

- Ποσοτικοποιήστε το DNA είτε χρησιμοποιώντας είτε ένα φασματοφωτόμετρο είτε άλλα μέσα προσδιορισμού της ποσότητας (Qubit, picogreen κ.λπ.)
- Αφού ποσοτικοποιηθούν, υπολογίζονται και παρασκευάζονται αραιώσεις του DNA κατάλληλες για PCR (π.χ. 10 ng / uL. π.χ. για ένα δείγμα DNA 256 ng / uL συμπυκνωμένο, παρασκευάστε 100 uL αραιώσεως 10 ng / uL DNA $256 \text{ ng / uL} * \chi = 10 \text{ ng / uL} * 100 \text{ uL} \Rightarrow \chi = 3.9 \text{ uL αρχικού DNA} + 96.1 \text{ uL H}_2\text{O}$

4. Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR είναι τα εξής:

ANXA5.v5.SF GGCGCGAGGACAAGAGGT 18

ANXA5.v5.SR AAAAGTCCCTCGTCGCAGCATACAAA 26

Αυτοί οι εκκινητές παράγουν ένα προϊόν PCR μήκους 752 νουκλεοτιδίων.

5. PCR με κλίση θερμοκρασίας Rxn

Το DNA προστίθεται στο Mastermix κατά την προετοιμασία του, παράλληλα με τα υπόλοιπα αναλώσιμα υλικά

Πίνακας 3.3: Δημιουργία Mastermix

c1	10ng/uL	10x	25mM	25uM	25uM	40mM	5x	-	-	-
c2	1ng/uL	1x (+1.5mM MgCl ₂)	1mM	400nM	400nM	1mM	1x	-	-	-
Αναλώσιμο	DNA	10x buf.	MgCl₂	pF	pR	dNTPs	5xQ	TaqP	H₂O	TV(v2)
v1	1	1	0.4	0.16	0.16	0.25	2	0.05	4.98	10
					10 rxn					
	10	10	4	1.6	1.6	2.5	20	0.5	49.8	100
Θερμοκρασία	Κλίση									
			1	2	3	4	5	6	7	8
			52.0	53.1	54.9	57.7	61.1	64.0	65.9	67.0
Κύκλος	Συνθήκες									
αρχικές	αποδιάταξη	95oC	15'	>	1 κυκλος					
	αποδιάταξη	95oC	/ 1'	\						
	υβριδισμός	52-67oC	- 1'	- >	43 κυκ.					
	επιμήκυνση	72oC	\ 1'	/						
τελικές	επιμήκυνση	72oC	10'	>	1 κυκλος					
	συντήρηση	16oC	συνέχεια							

Πίνακας 3.4: Συνθήκες PCR

6.Προετοιμασία 3% γέλης αγαρόζης χρησιμοποιώντας TBE 1x για διάλυμα προς αναλύσεις ηλεκτροφόρησης

Sigma-Aldrich (Life Science Chemilab SA)

B6768

Βορικόοξύ (2 Kg)

47.00 € (NO VAT included)

Sigma-Aldrich (Life Science Chemilab SA)

T1503-1KG

Trizma base (1 Kg)

60.00 € (NO VAT included)

PanReac AppliChem (BIOLine Scientific)

A1104

EDTA disodium (1 Kg)

52.91 € (NO VAT included)

7. Προετοιμασία 1 Lt Stock διαλύματος TBE 5x με ανάμειξη των παρακάτω:

- 54.0g Trizma base
- 27.5g βορικό οξύ
- 3.7224g EDTA disodium
- 1000 mL ddH₂O

8. Προετοιμασία 2 Lt διαλύματος TBE 1x:

$5x * y = 1x * 2000 \text{ mL} \Rightarrow y = 400 \text{ mL}$ από TBE 5x + 1600 mL ddH₂O

9. Γέλεσαγαρόζης (3%)

Sigma-Aldrich (Life Science Chemilab SA)

A9539-500GR

Agarose Molecular Biology Reagent (500 g)

236.00 € (NO VAT included)

Σε μια μεγάλη φιάλη, αναμειγνύονται τα παρακάτω:

- 450 mg αγαρόζη
- 150 mL TBE 1x

Ζεστό μείγμα

Αφήνουμε το RT 2-3 λεπτά για να κρυώσει:

- Προσθέτουμε 2.5 uL EtBr

Το χύνουμε σε πλαστικό εκμαγείο για να λάβει την κατάλληλη διαμόρφωση

Thermo-Fischer Scientific (Antisel)

15585-011

Βρωμιούχοαιθίδιο (10 mg/mL) (10 mL)

80.44 € (NOVATincluded)

10, Ηλεκτροφόρηση σε 3% γέλης αγαρόζης

NEB (BIOLineScientific)

N3231S

100 bpDNA δείκτης (ladder) (0.1 to 1.5 kb) 500μg/mL (συν βαφή κατά τη φόρτωση της γέλης αγαρόζης 6x, noSDS) (100 μL)

55.00 € (NO VAT included)

Panreac-Applichem (BIOLine Scientific)

A2331,0025

Bromophenol blue (25 g)

66.30 € (NO VAT included)

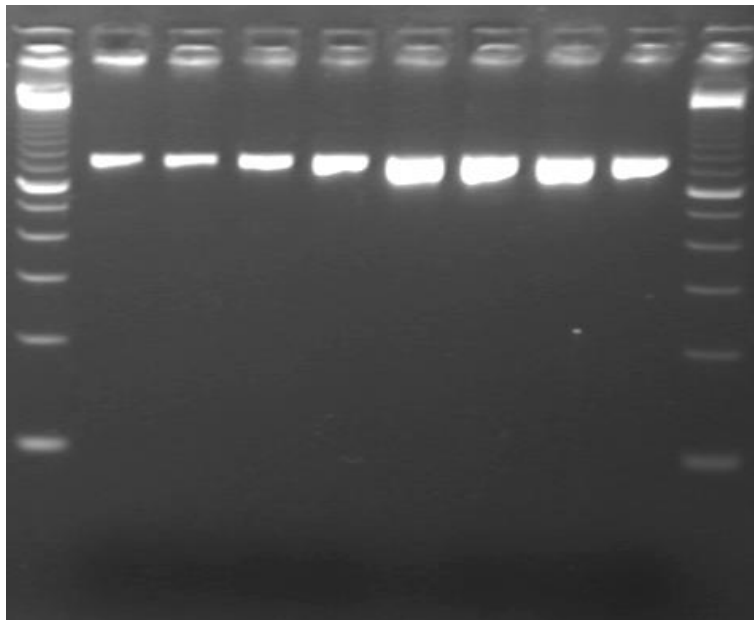
11. Προετοιμασία 50 mL 5xBblue αναμειγνύοντας:

- 10 g (20%) Ficoll 400
- 10 mL EDTA disodium
- 62.5 mg Bromophenol blue
- 40 mL H₂O

12. Προετοιμασία 100 mL Bblue 1x:

$5x * y = 1x * 100 \text{ mL} \Rightarrow y = 20 \text{ mL}$ από **Bblue** 5x + 80 mL ddH₂O

- 3% γέληαγαρόζης
- Προσθήκη 1μL από Bblue 1x για 10 μL του PCR Rxn
- Τρέχουμε τις γέλες για 2h σε 70V
- Αφήνουμε το δείκτη (ladder) να προωθηθεί καλά



Εικόνα 3.1: Γέλη αγαρόζης

Οι βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας για υβριδοποίηση είναι: 64°C !!!

Πίνακας 3.5: PCRRXNS

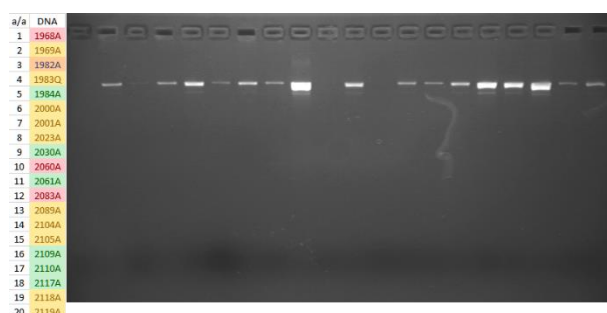
***2.5 uLDNA προστίθεται στο τέλος, εντός των αντίστοιχων 0.2 PCR σωληναρίων, όπου τα 47.5 uLMastermix έχουν ήδη τοποθετηθεί.**

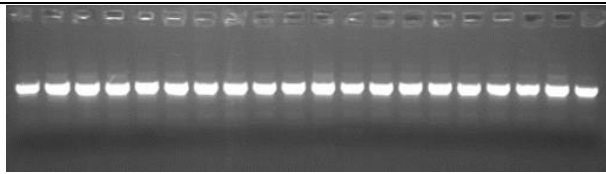
ΟΧΙ ΕΝΤΟΣ ΤΟΥ MASTERMIX, ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΡΧΗ, ΟΠΩΣ ΣΤΗ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΜΕΝΗ PCR.

		Mastermix								
c1	10ng/uL	10x	25mM	25uM	25uM	40mM	5x	-	-	-
c2	1ng/uL	1x (+1.5mM MgCl2)	1mM	500nM	500nM	1mM	1x	-	-	-
ΑΝΑΛΩΣΙΜΟ	DNA	10x buf.	MgCl2	pF	pR	dNTPs	5xQ	TaqP	H2O	TV(v2)
v1	2.5	5	2	1	1	1.25	10	0.25	27	50
Κύκλος	Συνθήκες									
αρχικές	αποδιάταξη	95oC	15'	>	1 cycle					
	αποδιάταξη	95oC	/ 1'	\						
	υβριδοποίηση	64oC	- 1'	- >	40 cyc.					
	αποδιάταξη	72oC	\ 1'	/						
τελικές	αποδιάταξη	72oC	10'	>	1 cycle					
	συντήρηση	16oC	συνέχεια							

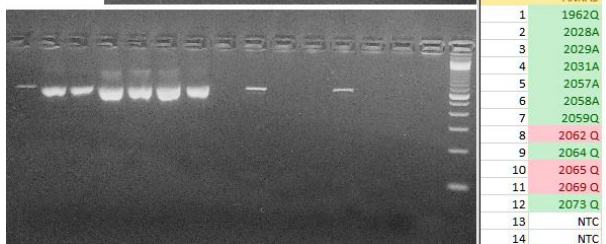
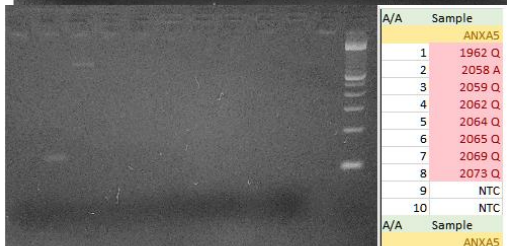
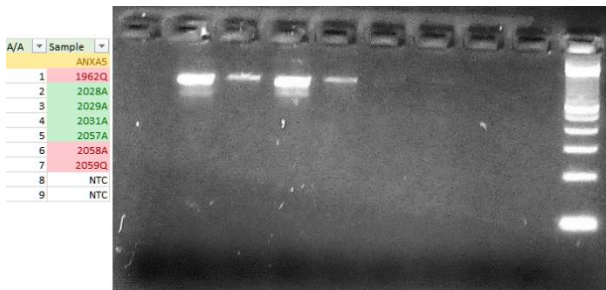
13. Προετοιμασία 3% γελών αγαρόζης χρησιμοποιώντας TBE 1x για διάλυση προς ηλεκτροφόρησης

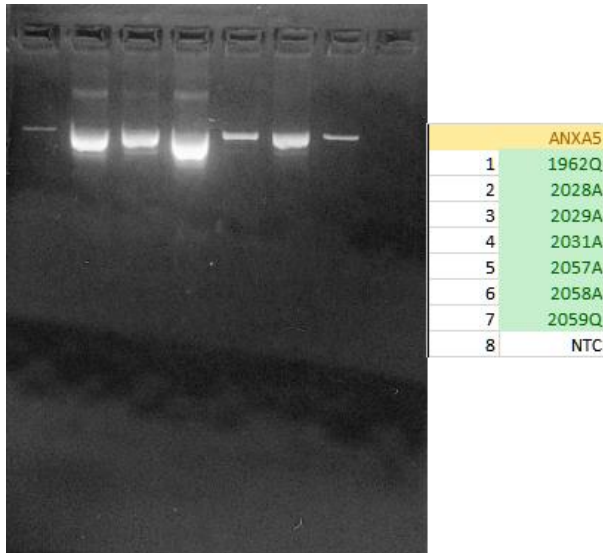
- Προσθέστε το DNA στους αντίστοιχους σωλήνες PCR των 0,2mL που έχουν καθοριστεί για τα δείγματα του DNA
- Προσθέστε H2O μέσα σε σωλήνες PCR των 0,2mL που έχουν καθοριστεί για τα NTC rxns
- Μετά από PCR, χρησιμοποιήστε 5 uL (από 50 uL PCR προϊόντων για ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης)
- Αργότερα, μέσω καθαρισμού των σφαιριδίων, καθαρίζονται τα υπόλοιπα 45 uL





- 8640 CBM-043246
- 8641 CBM-042978
- 8642 CBM-044900
- 8643 CBM-043019
- 8644 CBM-045708
- 8645 CBM-044590
- 8646 CBM-011443
- 8647 CBM-044979
- 8648 CBM-045400
- 8649 CBM-043050
- 8650 CBM-044537
- 8651 CBM-042820
- 8652 CBM-045182
- 8653 CBM-045642
- 8654 CBM-045337
- 8655 CBM-045606
- 8656 CBM-044198
- 8657 CBM-042210
- 8658 CBM-045005
- 8659 CBM-043293





Εικόνα 3.2: Διαδοχικές γέλες αгарόζης όπου έχουν τρέξει οι PCR για τους διάφορους πολυμορφισμούς του υποκινητή του γονιδίου της ANXA5

3.4.2 Καθαρισμός μαγνητικών σφαιριδίων (πρωτόκολλο επιλογής διπλού μεγέθους 0,4-1,0x)

Macherey-Nagel (Lab Supplies Scientific)

744970.5

NucleoMag NGS Clean-up and Size Select (150-800 bp) (5 mL)

160.00 €

Προετοιμάζουμε 85% EtOH (αιθανόλη) αναλόγως:

85% όγκος EtOH = [(αριθμός δειγμάτων) + (1)] * 360 μ L

Βήμα 1

- ✓ 45 μ L προϊόντα PCR * 0.4 = 18 μ L μείγμα σφαιριδίων
- ✓ Μείξη
- ✓ 5' επώασης RT
- ✓ Στη συνέχεια, μαγνητικός διαχωρισμός για 5'

- ✓ Κρατάμε το υπερκείμενο => Μεταφέρουμε σε ΝΕΟ προκαθορισμένο σωληνάριο 0,2mL

Βήμα 2

- ✓ 45 uL προϊόντα PCR (αρχικό όγκος) * 0.6 = 27 uL σφαιριδίων αναμιγνύονται
- ✓ Μείξη
- ✓ 5' επώασης RT
- ✓ Στη συνέχεια, μαγνητικός διαχωρισμός για 5 '
- ✓ Κρατάμε τα σφαιρίδια => απορρίπτουμε το υπερκείμενο υγρό

Βήμα 3

- ✓ Ενώ τα σωληνάρια παραμένουν στη μαγνητική βάση, προσθέτουμε 180 uL 85% EtOH
 - ✓ Επιάζουμε στον μαγνήτη για 30 "
 - ✓ Αφαιρούμε EtOH
- Επαναλαμβάνουμε ξανά το βήμα 3
 - Συνεχίζουμε στο βήμα 4

Βήμα 4

- ✓ 8' ξηραίνουμε στον αέρα τα σφαιρίδια για απομάκρυνση της περίσσειας EtOH
- Αν χρειάζεται, αφαιρούμε την EtOH από τον πυθμένα του σωληναρίου, χρησιμοποιώντας πιπέτα
 - Τα σφαιρίδια πρέπει να έχουν ανοικτό καφέ χρώμα
 - Εάν αυτό εξακολουθεί να είναι σκούρο καφέ, χρειάζεται περαιτέρω ξήρανση από την EtOH για 1-5 '

- Προσέχουμε να μην υπερβούμε! Η υπερβολική ξήρανση μπορεί να σχηματίσει ρωγμές στην επιφάνεια του σφαιριδίου

Βήμα 5

- ✓ Αφαιρούμε τα σωληνάρια από το μαγνητικό ράφι
- ✓ Προσθέτουμε 28 μL H_2O
- ✓ 5' επώασης RT
- ✓ Στη συνέχεια, μαγνητικός διαχωρισμός για 5'

Βήμα 6

- ✓ Εισάγουμε με πιπέτα 26 μL σε ένα πρόσφατα προετοιμασμένο σωληνάριο 2,0 mL.
- ✓ Προχωρούμε στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και στη συνέχεια στον προσδιορισμό της αλληλούχησης κατά Sanger.

Ολιγονουκλεοτίδιο που χρησιμοποιούνται για τις αντιδράσεις αλληλούχησης κατά Sanger

ANXA5.v5.SF

GGCGCGAGGACAAGAGGT

18

Αυτό το ολιγονουκλεοτίδιο μελετά μια περιοχή μήκους 729 νουκλεοτιδίων.

Βήμα 7

- ✓ Κατά την άφιξη των ολιγονουκλεοτιδίων για την αλληλούχηση κατά Sanger
- Κάνουμε spin με πλήρη ταχύτητα το φιαλίδιο με κλειστό καπάκι για να καθιζάνει ο λυοφιλοποιημένος εκκινητής

- Προσθέτουμε τον απαιτούμενο όγκο νερού για PCR (ή νερού ίσης καθαρότητας), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή
- Αφήνουμε 2 λεπτά για επώαση του RT
- Ανακατεύουμε με Vortex μερικά δευτερόλεπτα
- Αφήνουμε άλλα 2 λεπτά για να επωαστεί το RT
- Στη συνέχεια, κάνουμε spin με πλήρη ταχύτητα
- Αραιώνουμε το απόθεμα των ολιγονουκλεοτιδίων (100 μM) στην απαιτούμενη συγκέντρωση αραίωσης των 10 μM.

$100 \mu\text{M} * x = 10 \mu\text{M} * 20 \mu\text{l} \Rightarrow x = 2 \mu\text{l}$ ολιγονουκλεοτιδίων + 18 uL H₂O

- **ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια αποστέλλονται στη Macrogen μαζί με τα καθαρά προϊόντα PCR κάθε φορά. Έτσι προετοιμάζουμε αρκετή ποσότητα για όλες τις απαραίτητες αντιδράσεις. **Προετοιμάζουμε 20 uL για μερικές 1-5 αντιδράσεις, 30 uL για 5-10 αντιδράσεις, κλπ.**

Οι υπηρεσίες αλληλούχησης κατά Sanger κοστίζουν 4,5 ευρώ το καθένα δείγμα και χρειάζονται συνήθως 3-4 ημέρες για να ολοκληρωθούν. Μετά την ολοκλήρωση υπάρχει μια μικρή πιθανότητα ότι ορισμένα δείγματα μπορεί να χρειαστούν επανεξέταση υπό διαφορετικές συνθήκες.

Η πρώτη επαναληλούχηση γκν παρέχεται ευγενικά από το Macrogen χωρίς κόστος και εκτελείται κάθε Παρασκευή (τα αποτελέσματα είναι συνήθως διαθέσιμα τη Δευτέρα).

Macrogen Useful Contacts

Οικονομικές πληροφορίες

payment@macrogen.com

Υπηρεσίες επαναληλούχησης

support@macrogen.com

Κάθε άλλη απαιτούμενη πληροφορία

info@macrogen-europe.com

3.5 Στατιστική ανάλυση

- **Περιγραφική στατιστική**

Για την περιγραφή των ποιοτικών χαρακτηριστικών (μεταβλητών) χρησιμοποιήθηκαν πίνακες (εκατοστιαίων) συχνοτήτων.

Για τις συνεχείς ποσοτικές μεταβλητές, οι οποίες ακολουθούν την κανονική κατανομή, τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή± τυπική απόκλιση (mean±SD).

Για τις συνεχείς ποσοτικές μεταβλητές, οι οποίες δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή, η παρουσίαση των δεδομένων έγινε με τη βοήθεια της διάμεσης τιμής (median) και του εύρους τιμών (range). (145,146)

- **Στατιστική συμπερασματολογία**

Ως κριτήριο συσχέτισης ποιοτικών χαρακτηριστικών χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2 κατά Pearson.

Οι αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE) μεταξύ της συχνότητας των αλληλόμορφων SNPs, των συχνοτήτων των απλότυπων και της σύγκρισης των γονότυπων αξιολογήθηκαν με το χ^2 -test.

Για την παρουσίαση της σχέσης ποιοτικών χαρακτηριστικών υπολογίσθηκαν οι σχετικοί λόγοι συμπληρωματικών πιθανοτήτων (μονοπαραμετρικό oddsratio) και τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης (95% confidenceinterval).

Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν τα στατιστικά πακέτα SAS και SPSS για Windows.

Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά εάν το p-value ήταν μικρότερο του 0,05.(145, 146)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αναλύσαμε την περιοχή του υποκινητή του γονιδίου ANXA5 σε 100 Ελληνίδες με καθ'έξιν αποβολές (RPL) και 70 γόνιμες υγιείς γυναίκες και συνεπώς τους ακόλουθους πολυμορφισμούς: SNP1: (-) 467G → A (chr4: 121697056, dbSNP: rs112782763) και SNP2: (-) 448A → C, (chr4: 121697037, dbSNP: rs28717001) στην μη μεταγραφείσα περιοχή του υποκινητή, SNP3: (-) 422T → C (chr4: 121697011, dbSNP: rs28651243), και SNP4: -373G>A εντός της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής του εξονίου. Αυτοί είναι σε ανισορροπία σύνδεσης με τον απλότυπο M1 / ANXA5 [ο M1 απλότυπος περιλαμβάνει δύο αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων ((-)448A→C and (-)422 T→C) και είναι γνωστό ότι οι M1 και M2 απλότυποι είναι κοινοί στο φυσιολογικό πληθυσμό] ενώ ο SNP5: (-) 302T> G (chr4: 121696891, dbSNP: rs1050606) βρίσκεται στο εξόνιο 1 και ο SNP6 g.-1C>T (rs11538099) εντοπίζεται ένα νουκλεοτίδιο πριν από το κωδικόνιο έναρξης στο εξώνιο 2. Η εξέταση του απλότυπου M1 δεν συμπεριλήφθηκε στην τελική μας ανάλυση, διότι, όπως έχει ήδη αναφερθεί από πολλές μελέτες, δεν αποτελεί ένας παράγοντα προδιάθεσης για εκδήλωση καθ'έξιν αποβολών (RPL). (132)

Ελέγξαμε επίσης ένα άλλο κοινό γενετικό πολυμορφισμό (SNP) που συνδέεται με τον κίνδυνο καθ'έξιν αποβολών (RPL) και το οποίο αναφέρεται στη βιβλιογραφία: τον SNP6: (-) 1C> T σε όλα τα δείγματα μας(περιπτώσεις καθ'έξιν αποβολών (RPL) και γόνιμοι-υγιείς μάρτυρες) και συμπληρώνει τον απλότυπο M2 / ANXA5 (135). Επιπλέον, εντοπίσαμε τρεις σπάνιους

πολυμορφισμούς (SNPs) που δεν έχουν αναφερθεί προηγουμένως: τον SNP 7: (-) 404C> A σε μία μόνο γόνιμη γυναίκα ως ετεροζυγώτης, τον SNP8: (-) 399C> A, σε δύο περιπτώσεις καθ'έξιν αποβολών (RPL) ως ετεροζυγώτες και τον SNP9: (+) 27C> G, σε τρεις περιπτώσεις καθ'έξιν αποβολών (RPL) ως ετεροζυγώτες. Αυτές οι σπάνιες παραλλαγές εξαιρέθηκαν από τη μελέτη μας με την υπόθεση κοινών γονιδιακών πολυμορφισμών. **(Εικόνα 4.1)**

Οι συχνότητες των γονοτύπων για όλα τα έξι υπολειπόμενα αλληλόμορφα των εξεταζόμενων πολυμορφισμών: SNPs βρέθηκαν να βρίσκονται σε HWE (Hardy-WeinbergEquilibrium), γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν υπήρξε ούτε δειγματοληψία ούτε λανθασμένη χρήση των γονοτύπων.

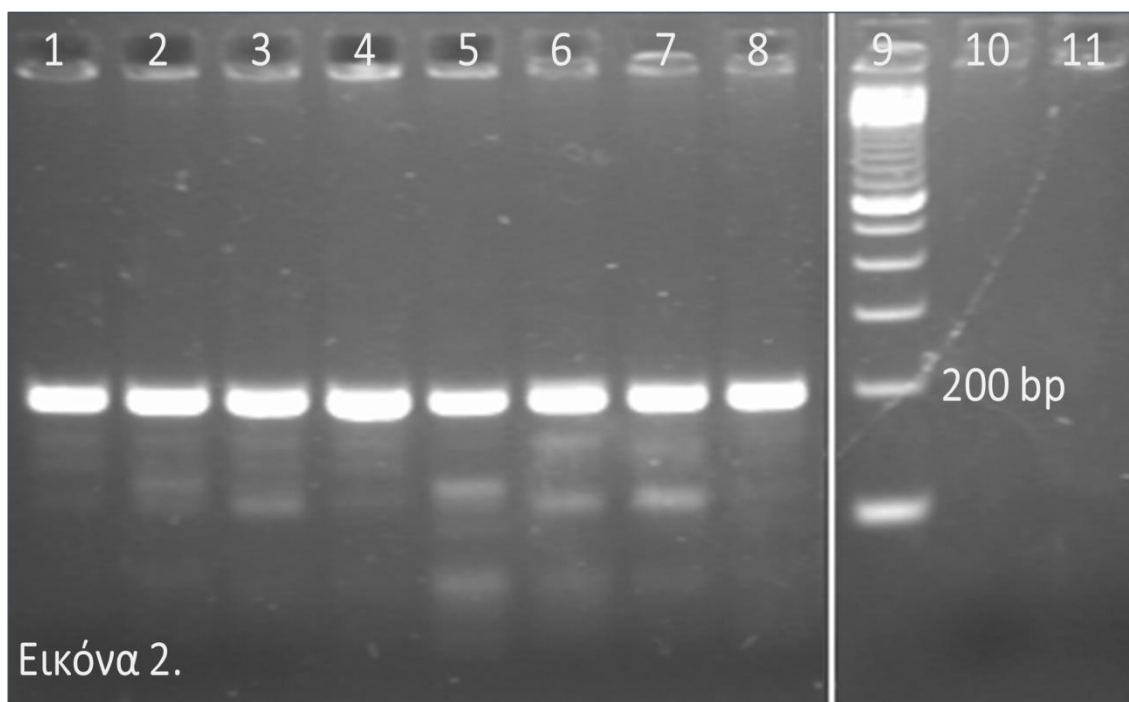
```
Dec.2013(GRCh38/hg38):chr4:121,696,553-121,697,231 (Reverse strand)
121,697,231_GGGAGCGGCGCCTCCTCCTGGTTCCAGCAGCTCTGCGGC
CGCTCCCCACCCAGGCCCGCGAGACCAGCGGGACAGTCCGCGCCGCG
GGAGACCAACTGGGACGAGCCGCGACCCACGCAGGCGCGCTGAGGCC
GGGGCAGGGGCGGGCCCGGCTGGCGCGGCCGGCCTGCGGTTGRGGC
CCTGGCGGGGGTGGGMCGGGCCAAGCCGGGCAGGGCCGRGGYGGGG
CCGCTGGCGTTTCYGTTGCTTGGATCAGTCTAGGTGCAGCTGCCRGATC
CTTCAGCGTCTGCATCTCGGGCGTCGCCCCGCGTACBGTCGSCCGGCTC
TCCGCCGCTCTMCCGGGGKTTCCGGGGCMKTGGGTCCCACAGTCTGG
GTGAGTGGTCGCAGCCCGGGGAGGGGGCTCCTTCTGGAGAGGAGAGC
GTGGTCGCGGGGCACTGGATTCGCGCGGACGCTCGGCCGAGAGCTGTC
CCGGTAGCTGCGAGAGGGCGGGTCGGCCCCGTGGCGGGGCCCTCCGG
GCTGTCTGAGCGCCGCCGGGTCCCCGCGGACCTGCGCTTGGGGAGGG
CACGAGTTGCAAATGGCGCGCTAAGCCCGAGGTTTCTTCTTTTGCAGT
YTGCTTCAYCTTYCYKGACCTSAGWAGTCGCNATGGCACAGGTAAGG
CCGTGCGCCCCCACTGCGCTG_121,696,553
```

Εικόνα 4.1. Περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *ANXA5*, όπου έχουν παρατηρηθεί πολυμορφισμοί (SNPs), οι οποίοι απεικονίζονται ως υπογραμμισμένα μπλε σύμβολα. Ορισμένοι από αυτούς έχουν σχετιστεί με επαναλαμβανόμενες καθ'έξιν αποβολές (RPLSNPs), όπως είναι οι SNP1 (g.-467G>A, chr4:121697056,

dbSNP:rs112782763), SNP2 (g.-448A>C, chr4:121697037, dbSNP:rs28717001), SNP3 (g.-422T>C, chr4:121697011, dbSNP:rs28651243) και SNP4 (g.-373G>A, chr4:121696962, dbSNP:rs113588187), που εμφανίζονται με ροζ χρώμα. Τα λιγότερο συχνά εμφανιζόμενα αλληλία (minoralleles) αυτών (A-C-C-A), όταν εμφανίζονται ταυτόχρονα, απαρτίζουν τον απλότυπο M2. Μία ακόμη θέση που φαίνεται να σχετίζεται με υψηλό κίνδυνο εκδήλωσης RPL, είναι ο πολυμορφισμός SNP5 (g.-302T>G, chr4:121696891, dbSNP:rs1050606). Το σημείο έναρξης της μετάφρασης απεικονίζεται με κίτρινο χρώμα, ενώ το καφέ αντιστοιχεί σε εξονικές περιοχές. Με πράσινο χρώμα παρουσιάζονται οι εκκινήτες για την ανάλυση καμπύλης τήξης και για την ανάλυση αλληλουχίας κατά Sanger.

Επεξήγηση συμβόλων που αντιστοιχούν σε SNPs: **R**: A/G, **M**: A/C, **Y**: C/T, **B**: G/T/C, **S**:C/G, **K**:G/T, **W**: A/T, **N**: G/A/T/C. Τα δεδομένα για τους πολυμορφισμούς που δίνονται βασίστηκαν στη βάση dbSNP εκδόσεις (builds) 141 και 142, ενώ τα δεδομένα για τις χρωμοσωμικές περιοχές προέρχονται από τη βάση του NCBI, έκδοση (assembly) GRCh38, Dec.2013.

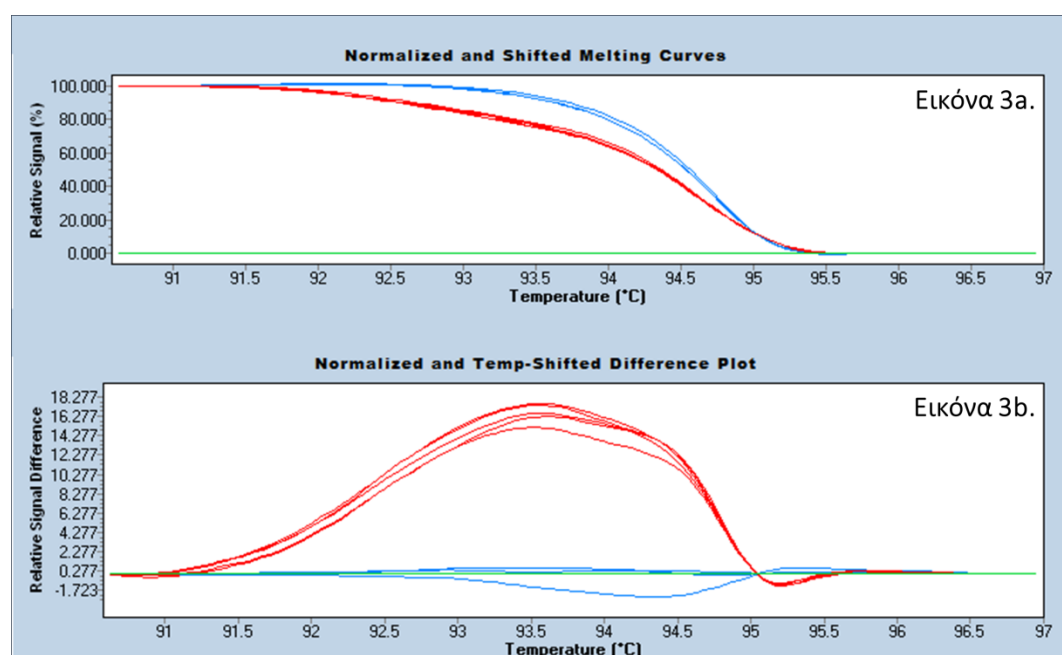
Ο ποιοτικός έλεγχος των προϊόντων της PCR έγινε με ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 4.1 η περιοχή του υποκινητή, του γονιδίου *ANXA5*, που επεκτάθηκε με PCR και αναλύθηκε ως προς την καμπύλη τήξης, έχει μέγεθος 199 βάσεις. Ένας DNA μάρτυρας με γνωστού μεγέθους τμήματα χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της ενίσχυσης του σωστού τμήματος. Τα μικρότερης έντασης μη ειδικά τμήματα της αντίδρασης εξαιρούνται της ανάλυσης αφού βρίσκονται εκτός των θερμοκρασιακών ορίων που θέτουμε, έτσι δεν επηρεάζουν τη μελέτη. Τα δείγματα 1 και 2 φέρουν SNP5 σε ομόζυγη κατάσταση, το δείγμα 3 SNP5 σε ετερόζυγη κατάσταση, τα δείγματα 4 και 5 φέρουν απλότυπο M2, με και χωρίς SNP5, αντίστοιχα, ενώ τα δείγματα 6,7 και 8 είναι χωρίς πολυμορφισμούς που να σχετίζονται με RPL. Ο DNA μάρτυρας (100bpDNALadder, ThermoFisherScientific), αναλύθηκε στην σειρά 9, ενώ δύο αντιδράσεις χωρίς υπόστρωμα είναι στις θέσεις 10 και 11 (**Εικόνα 4.2**).



Εικόνα 4.2: Πήκτωμα αγαρόζης με προϊόντα PCR μεγέθους 199 βάσεων από την περιοχή του υποκινητή M2/ANXA5

Η ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων της PCR έγινε έπειτα από: **(a)** εξομάλυνση των δεδομένων του φθορισμού και **(b)** του επιπέδου θορύβου της αντίδρασης, καθώς και ταξινόμηση των προϊόντων σε διακριτές κατηγορίες με βάση την ύπαρξη ή όχι πολυμορφικών θέσεων. Η ανάλυση έγινε με χρήση λογισμικού της εταιρείας Roche στην οποία ανήκει και η συσκευή cobasz4800 που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται δείγματα χωρίς πολυμορφισμούς (δείγματα 6,7 και 8), ενώ με κόκκινο εκείνα που φέρουν κάποια πολυμορφική θέση (δείγματα 1, 2, 3, 4 και 5). Το πράσινο αποδίδεται σε αντιδράσεις χωρίς υπόστρωμα (θέσεις 10 και 11 στο πήκτωμα αγαρόζης) (**Εικόνα 4.3**). Με τον τρόπο αυτό πραγματοποιείται μία αξιόπιστη, γρήγορη και οικονομική αρχική ανάλυση (pre-screening) των δειγμάτων πριν από ανάλυση της αλληλουχίας κατά Sanger η οποία απαιτεί

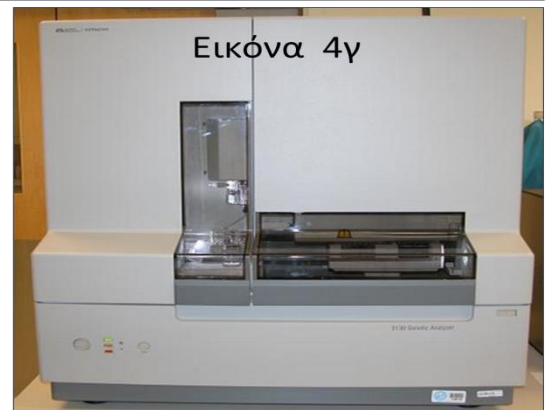
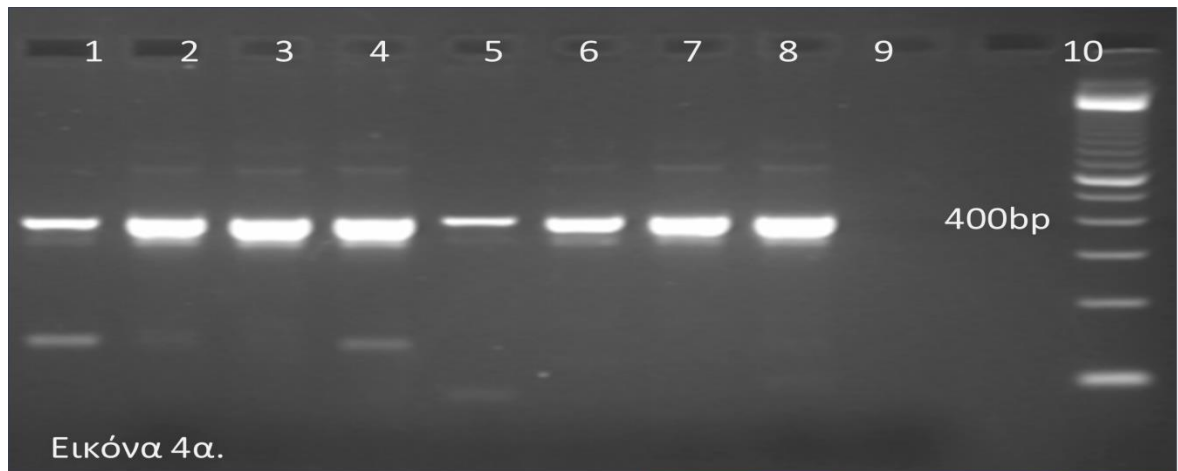
περισσότερο χρόνο και αναλώσιμα. Έτσι η τελευταία πραγματοποιείται μόνο για δείγματα με πολυμορφισμούς.



Εικόνα 4.3

Τα δείγματα που επιλέχθηκαν για τη μελέτη της αλληλουχίας του υποκινητή του γονιδίου ANXA5, ενισχύθηκαν με PCR για μία περιοχή 387 βάσεων που περιλαμβάνει πέντε πολυμορφισμούς που έχουν σχετιστεί με καθ' ἑξιν αποβολές (RPL). Στην **εικόνα 4.4α** φαίνεται μία μικρή ποσότητα των προϊόντων της αντίδρασης που ελέγχονται ποιοτικά με ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, σε υψηλής καθαρότητας χαμηλού σημείου τήξης πήκτωμα αγαρόζης (UltraClean Low Melt Agarose, MO BIO Laboratories, Inc.). Οι αλληλουχίες ενδιαφέροντος αποκόπηκαν από το πήκτωμα και καθαρίστηκαν (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN). Στη συνέχεια ακολούθησε ποσοτικοποίηση σε nanodrop (NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) (**Εικόνα 4.4β**) και ανάλυση της αλληλουχίας κατά Sanger σε αναλυτή ABI

Prism 3100 Genetic Analyzer (**Εικόνα 4.4γ**). Οι αναλύσεις των χρωματογραφημάτων έγιναν με το πρόγραμμα Chromas της εταιρείας TechneLysium. Τα δείγματα 1 και 2 φέρουν το SNP5 σε ομόζυγη κατάσταση, το δείγμα 3 το SNP5 σε ετερόζυγη κατάσταση, τα δείγματα 4 και 5 τον απλότυπο M2/ANXA5, με και χωρίς SNP5, αντίστοιχα, ενώ τα δείγματα 6, 7 και 8 είναι χωρίς πολυμορφισμούς που να σχετίζονται με καθ'έξιν αποβολές (RPL). Μία αντίδραση χωρίς υπόστρωμα φαίνεται στην θέση 9, ενώ ο DNA μάρτυρας (100bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) στη σειρά 11 (**Εικόνα 4.4α**).

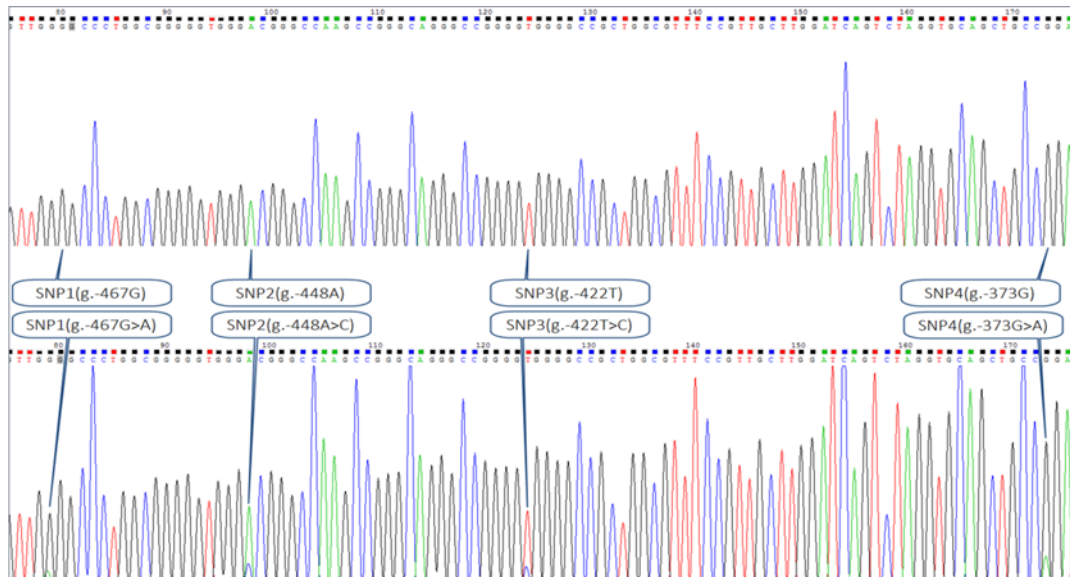


Εικόνα 4.4: **4.α:** Ανάλυση των δειγμάτων που επιλέχθηκαν για τη μελέτη της αλληλουχίας του υποκινητή του γονιδίου ANXA5, και ενισχύθηκαν με PCR για μία περιοχή 387 βάσεων που περιλαμβάνει τους πέντε πολυμορφισμούς που έχουν σχετιστεί με καθ'έξιν αποβολές (RPL).

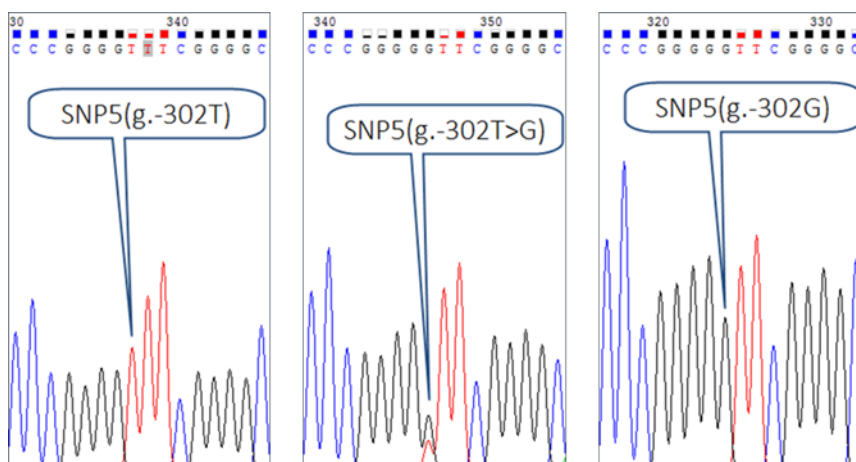
4β: NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific

4γ:Αναλυτής ABI Prism 3100 Genetic Analyzer

Στη συνέχεια, η ανάλυση των δεδομένων μας συνοψίζεται στα χρωματογράφημα που φαίνονται στις εικόνες 4.5 και 4.6.



Εικόνα 4.5. (επάνω) Χρωματογράφημα χωρίς πολυμορφισμούς και (κάτω) χρωματογράφημα με απλότυπο M2, που φέρει τέσσερεις πολυμορφισμούς, SNP1 (g.-467G>A), SNP2 (g.-448A>C), SNP3 (g.-422T>C), SNP4 (g.-373G>A).



Εικόνα 4.6. (από αριστερά προς τα δεξιά) Χρωματογράφημα φυσιολογικού δείγματος, καθώς και δείγματα με SNP5 (g.-302T>G) σε ετερόζυγη και σε ομόζυγη κατάσταση, αντίστοιχα.

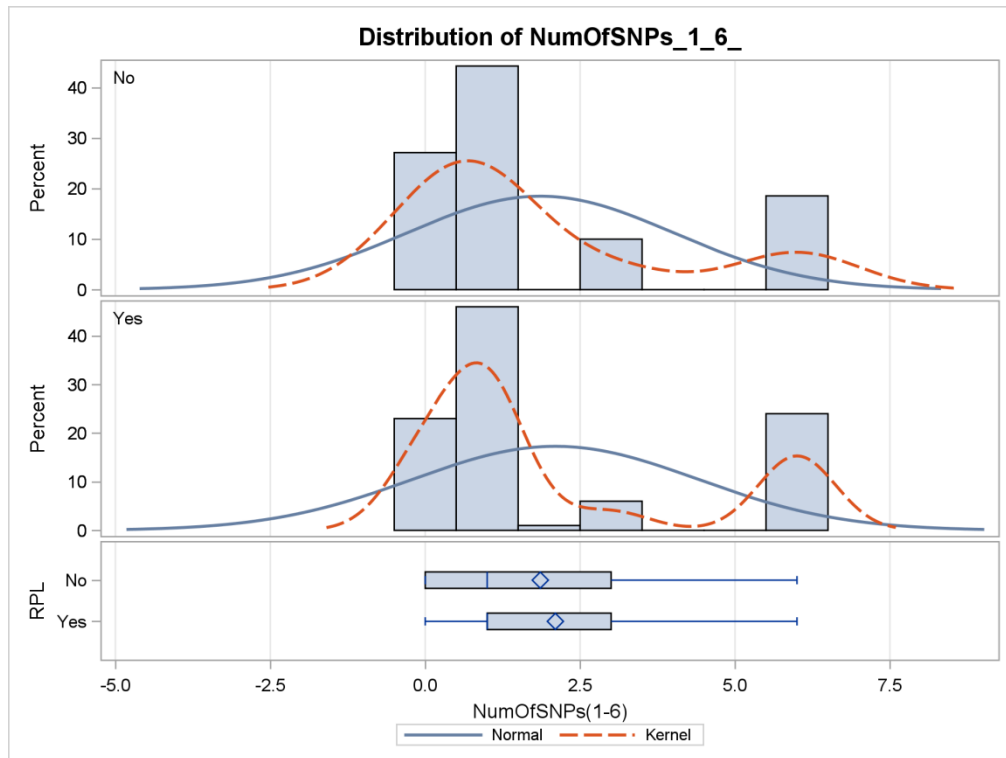
Κατά τη διεξαγωγή της μελέτης περίπτωσης-ελέγχου για τους έξι κοινούς πολυμορφισμούς (SNPs) στην περιοχή του υποκινητή ANXA5 στους ασθενείς με καθ'έξιν αποβολές (RPL) και στις υγιείς-γόνιμες γυναίκες, από τα συνολικά (N = 100) περιστατικά με καθ'έξιν αποβολές (RPL) διαπιστώθηκε ότι σε 23 (23%) των περιπτώσεων δεν υπήρχε κάποιος πολυμορφισμός (SNP) ενώ 46 (46%), 1 (1%), 6 (6%) είχαν 1, 2, 3 ή 6 SNPs. Αντίθετα, από τις 70 περιπτώσεις των υγιών γόνιμων γυναικών 17 (24.3%) δεν είχαν κάποιο πολυμορφισμό (SNP) και 31 (44.28%) και 13 (28.57%) είχαν 1 ή 6 SNPs, αντίστοιχα (**Πίνακας 4.1**). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο συνολικό αριθμό SNPs μεταξύ των γυναικών με καθ'έξιν αποβολές (RPL) και της ομάδας ελέγχου.

Number of SNPs(1-6)	No SNPs	1	2	3	6	Grand Total
Yes	23	46	1	6	24	100
No	19	31	0	7	13	70
Grand Total	42	77	1	13	37	170
Percentage of SNPs(1-6)	No SNPs	1	2	3	6	Grand Total
Yes	23.00%	46.00%	1.00%	6.00%	24.00%	100.00%
No	27.14	44.29	0.00%	10.00	18.57	100.00%
Grand Total	24.71%	45.29%	0.59%	7.65%	21.76%	100.00%
Comparison of proportions between the two groups						
P-value	0.6633	0.9490	0.8573	0.5012	0.5121	

Πίνακας 4.1: Σύγκριση του συνολικού αριθμού των SNPs (1-6) μεταξύ των δύο ομάδων, βάση του αριθμού των υπαρχόντων SNPs και ενός σχετικού ποσοστού

Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε μια τάση ότι οι γυναίκες είχαν είτε μόνο ένα πολυμορφισμό SNP [46% και 40% στην ομάδα με καθ'έξιν αποβολές (RPL) και στην ομάδα ελέγχου αντίστοιχα] ή 6 SNPs [24% και 25% στην ομάδα με καθ'έξιν αποβολές (RPL) και στην ομάδα ελέγχου αντίστοιχα].

(**Εικόνα 4.7**)



Εικόνα 4.7:Το διάγραμμα δείχνει την κατανομή του αριθμού των SNPs ομάδα με καθ'έξιν αποβολές (RPL) και στην ομάδα ελέγχου αντίστοιχα

Είναι αξιοσημείωτο ότι δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστική διαφορά στα ποσοστά που παρατηρήθηκαν για τους πολυμορφισμούς: SNP1, SNP2, SNP3, SNP4, SNP5 και SNP6 μεταξύ των δύο ομάδων (Πίνακας 4.2).

RPL	N	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4	SNP5	SNP6	SNP7	SNP8	SNP9
Yes	100	24	30	30	24	77	25	0	2	3
No	70	13	20	20	13	51	13	1	0	0
PRL in %										
Yes(%)		24.00%	30.00%	30.00%	24.00%	77.00%	24.00%	0.00%	2.00%	3.00%
No(%)		18.57%	28.57%	28.57%	18.57%	72.86%	18.57%	1.43%	0.00%	0.00%
Statistics										
Test for proportions p-value		0.5121	0.9758	0.9758	0.5121	0.6633	0.5121	0.8564	0.6401	0.3841
Chi-square (p-value)		0.3986	0.8406	0.8406	0.3986	0.5376	0.3986	0.2306	0.2340	0.1437
Odds Ratio		1.3846	1.0714	1.0714	1.3846	1.2472	1.3846	0.2305	0.3787	5.0615
95% CI		0.6493 to 2.9527	0.5471 to 2.0984	0.5471 to 2.0984	0.6493 to 2.9527	0.6174 to 2.5195	0.6493 to 2.9527	0.0093 to 5.7419	0.1692 to 75.6993	0.2573 to 99.5552

Πίνακας 4.2: Σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων ως προς τον αριθμό κάθε μεμονωμένου πολυμορφισμού: SNP (1-6), ποσοστό των παρατηρούμενων SNPs (1-6), αναλογία πιθανοτήτων, επίπεδο σημαντικότητας και διαστήματα εμπιστοσύνης.

Στη συνέχεια έγινε στατιστική ανάλυση της συχνότητας των αλληλόμορφων για τους πολυμορφισμούς SNPs 1-6 μεταξύ των δύο ομάδων και δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις αναλογίες της συχνότητας των αλληλόμορφων μεταξύ των δύο ομάδων. (Πίνακας 4.3).

Συχνότητα αλληλομόρφων					
	Περιπτώσεις	Υγιείς Μάρτυρες	% Περιπτώσεις	% Υγιείς μάρτυρες	p-value
SNP1 G>A	23/200	13/140	11.50%	9.29%	0.6364
SNP2 A>C	29/200	20/140	14.50%	14.29%	0.9183
SNP3 T>C	29/200	20/140	14.50%	14.29%	0.9183
SNP4 G>A	23/200	13/140	11.50%	9.29%	0.6364
SNP5 T>G	117/200	71 / 140	58.50%	50.71%	0.1898
SNP6 C>T	24/200	18/140	12.00%	12.86%	0.944

Πίνακας 4.3: Πίνακας που δείχνει τον αριθμό των αλληλόμορφων, τα ποσοστά τους και την τιμή p-value μεταξύ των δύο ομάδων

Επιπλέον, πραγματοποιήσαμε ανάλυση των απλοτύπων στον ελληνικό πληθυσμό για όλους αυτούς τους έξι πολυμορφισμούς (SNPs) και για τους πρώτους τέσσερις SNPs (G-A-T-G) που αποτελούν τον γνωστό N απλότυπο που περιγράφεται από τους Bogdanov και συνεργάτες το 2007. Οι G-A-T-G-T-C και G-A-T-G-G-C ήταν οι δύο κύριοι απλότυποι και αντιπροσώπευαν για το 84% των περιπτώσεων RPL γυναικών και για το 75.72% των γυναικών-μαρτύρων. Ο απλότυπος A-C-C-A-G-T που περιλαμβάνει τα έξι υπολειπόμενα αλληλόμορφα ήταν ο τρίτος πιο κοινός και για τις δύο ομάδες (11,5% των ασθενών με RPL έναντι 9,29% των μαρτύρων). Ωστόσο, οι G-C-C-G-G-C και G-A-T-G-G-T βρέθηκαν μόνο στις περιπτώσεις RPL γυναικών που αντιπροσώπευαν το 4,5% έναντι του 0% των ελέγχων. Ο απλότυπος M2: A-C-C-Aδε βρέθηκε να εμφανίζει στατιστικά σημαντικές διαφορές στις δύο ομάδες (11,5% στους ασθενείς με RPL έναντι 9,29% στους μάρτυρες). Επιπλέον, ο απλότυπος G-A-T-G-G-C που περιλαμβάνει όλα τα κύρια αλληλόμορφα εκτός από το SNP5, δε δείχνει να καταδεικνύει την ύπαρξη διαφορετικού κινδύνου για εκδήλωση καθ'έξιν αποβολών (RPL) στους φορείς από ό, τι στους μη φορείς (28,5% έναντι 26,43%) (p-value: 0.7666). Συνοπτικά, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στους παρατηρούμενους απλότυπους μεταξύ των δύο ομάδων (**Πίνακας 4.4**).

Απλότυπος 1-6	Περιπτώσεις	Υγιείς μάρτυρες	% Περιπτώσεων	% Μάρτυρων	p- value
G-A-T-G-T-C	111/200	69/140	55.50%	49.29%	0.3084
G-A-T-G-G-C	57/200	37/140	28.50%	26.43%	0.7666
A-C-C-A-G-T	23/200	13/140	11.50%	9.29%	0.6364
G-C-C-G-G-C	8/200	4/140	4.00%	2.86%	0.1865
G-A-T-G-G-T	1/200	4/140	0.50%	2.86%	

Απλότυπος 1-4	Περιπτώσεις	Υγιείς μάρτυρες	% Περιπτώσεων	% Μαρτύρων	p- value
G-A-T-G	177/200	120/140	88.50%	85.71%	0.5512
A-C-C-A	23/200	13/140	11.50%	9.29%	0.6364

Πίνακας 4.4: Ποσοστό των απλοτύπων μεταξύ των δύο ομάδων

Επιπρόσθετα, συγκρίναμε τους γονότυπους για τις δύο ομάδες, μελετώντας οποιαδήποτε σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομόζυγη και ετερόζυγη κατάσταση των SNP-αλληλομόρφων που παρουσιάστηκε και στις δύο ομάδες. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοστών των γονότυπων για κάθε πολυμορφισμό (SNP) μεταξύ των δύο ομάδων (πίνακας 4.5)

		Γονότυποι (N)				Γονότυποι (%) και p-value για τον έλεγχο των ποσοστών					
		N	M/M	M/m	m/m	M/M	p	M/m	p	m/m	p
SNP1: (-)467G>A	Περιπτώσεις	N	M/M	M/m	m/m	M/M	p 0.8573	M/m	p 0.8454	m/m	0.7251
	Μάρτυρες	100	1	21	78	1.00%		21.00%		78.00%	
SNP2: (-)448A>C	Περιπτώσεις	70	0	13	57	0.00%	0.8573	18.57%	0.9593	81.43%	0.9268
	Μάρτυρες	100	1	27	72	1.00%		27.00%		72.00%	
SNP3: (-)422 T>C	Περιπτώσεις	70	0	20	50	0.00%	0.8573	28.57%	0.9593	71.43%	0.9268
	Μάρτυρες	100	1	27	72	1.00%		27.00%		72.00%	
SNP4: (-)373G>A	Περιπτώσεις	70	0	20	50	0.00%	0.8573	28.57%	0.8454	71.43%	0.7251
	Μάρτυρες	100	1	21	78	1.00%		21.00%		78.00%	
SNP5: (-)302 T>G	Περιπτώσεις	70	0	13	57	0.00%	0.2658	18.57%	0.1399	81.43%	0.6633
	Μάρτυρες	100	20	57	23	20.00%		57.00%		23.00%	
SNP6: (-)1 C>T	Περιπτώσεις	70	20	31	19	28.57%	0.8573	44.29%	0.7058	27.14%	0.8255
	Μάρτυρες	100	1	22	77	1.00%		22.00%		77.00%	

M/M: ομόζυγωτία για το αλληλόμορφο, **M/m:** ετεροζυγωτία για το αλληλόμορφο, **m/m:** άγριος τύπος

Πίνακας 4.5: Σύγκριση των γονοτύπων μεταξύ των δύο ομάδων με αριθμούς και ποσοστά, τα p-values καταδεικνύουν τη στατιστική σημαντικότητα της σύγκρισης των ποσοστών για κάθε SNP και γονότυπο.

Τέλος, είναι αξιοσημείωτο ότι το ποσοστό για την ύπαρξη ομοζυγωτίας του αλληλόμορφου του SNP5 ήταν πολύ υψηλότερο τόσο για την ομάδα με RPL όσο και για τις περιπτώσεις ελέγχου (20% και 28.57% αντίστοιχα) από τα ποσοστά SNPs 1,2,3,4 & 6 ($\leq 1\%$ για όλα ($p < 0.05$ για όλες τις συγκρίσεις). Παρομοίως, τα ποσοστά για την ετεροζυγωτία του αλληλόμορφου του SNP5 βρέθηκαν υψηλότερα (57% και 44,29% των περιπτώσεων και των ελέγχων αντίστοιχα) από τους SNPs 1,2,3,4 & 6 ($p < 0.05$ για τις περιπτώσεις RPL εντούτοις όχι για τους ελέγχους). Τέλος, τα ποσοστά του αλληλομόρφου του SNP5 για τους γονοτύπους του άγριου τύπου ήταν χαμηλότερα για τον SNP5 (23% και 27,14% περιπτώσεις και έλεγχοι) από τους υπόλοιπους SNPs ($> 70\%$ σε όλες τις περιπτώσεις) ($p < 0,05$ για όλες τις συγκρίσεις).

Επίσης, ήταν ενδιαφέρον ότι η συχνότητα του αλληλόμορφου SNP5 ήταν υψηλότερη στις περιπτώσεις ασθενών με RPL (0,485) από όλα τα άλλα SNPs (0,125-0155) ($p < 0,05$ για όλες τις συγκρίσεις). (Πίνακας 4.5).

Τέλος, συγκρίναμε τους γονότυπους για τις δύο ομάδες. Ούτε ο απλότυπος M2 / ANXA5, ούτε τα SNP5 και το SNP6 ως ανεξάρτητοι παράγοντες για εμφάνιση RPL φαίνεται να καταδεικνύουν αυξημένο κίνδυνο για επαναλαμβανόμενες απώλειες εγκυμοσύνης (λόγος πιθανοτήτων: SNP5: περιπτώσεις RPL: 0,485 έναντι μάρτυρες: 0,507, λόγος πιθανοτήτων: SNP6: περιπτώσεις RPL: 0,171 έναντι μαρτύρων: 0,257). (Πίνακας 4.5).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Είναι πλέον γνωστό ότι ο απλότυπος M2 / ANXA5 του υποκινητή του γονιδίου της αννεξίνης A5 εμφανίστηκε τα τελευταία χρόνια ως δείκτης για την ύπαρξη πρόωρων μαιευτικών επιπλοκών που σχετίζονται με την υποκείμενη ύπαρξη θρομβοφιλίας (134). Πολλές μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι ο συγκεκριμένος M2 / ANXA5 που αποτελείται από τα υπολειπόμενα αλληλόμορφα τεσσάρων διαδοχικών πολυμορφισμών συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καθ'έξιν αποβολών (RPL) σε διάφορους πληθυσμούς (132, 134, 135, 147, 148), αποκλείοντας οποιοδήποτε άλλο πιθανό αίτιο επαναλαμβανόμενων καθ'έξιν αποβολών. Έτσι, η παρούσα μελέτη στοχεύει στην μελέτη της συμβολής του απλοτύπου M2/ ANXA5 που αποτελείται από τα υπολειπόμενα αλληλόμορφα των τεσσάρων διαδοχικών πολυμορφισμών στην εμφάνιση επαναλαμβανόμενων καθ'έξιν αποβολών (RPL) στον ελληνικό πληθυσμό και των υπολειπόμενων αλληλόμορφων του πολυμορφισμού SNP5: (-) 302 T> G και πολυμορφισμού SNP6: (-) 1C> T ως ανεξάρτητων παραγόντων κινδύνου για καθ'έξιν αποβολές (RPL) (135). Επίσης, δεν υπάρχουν άλλοι βιοδείκτες που να έχουν μελετηθεί στον ελληνικό πληθυσμό ως αίτιο που να συσχετίζεται με επαναλαμβανόμενες απώλειες εγκυμοσύνης.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, για την έρευνά μας αποκλείσαμε οποιαδήποτε άλλη πιθανή αιτία επαναλαμβανόμενων αποβολών, όπως χρωμοσωμικές ανωμαλίες των γονέων και του εμβρύου, κληρονομική θρομβοφιλία (Παράγοντας V Leiden, προθρομβίνη G20210A), καθώς και άλλες ανεπάρκειες σε αντιθρομβωτικούς παράγοντες (ρεδουκτάση του μεθυλενο τετραϋδροφυλλικού C677T-A1298C, τα επίπεδα ορού της

αντιθρομβίνης III, της πρωτεΐνης C, της πρωτεΐνης S, του παράγοντα VIII και της αντίστασης στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C). Επίσης αποκλείστηκαν οι ασθενείς με μυελοϋπερπλαστικό σύνδρομο (ιδιοπαθής μυελοίνωση, αληθής πολυκυτταραιμία) και άλλες ανατομικές ανωμαλίες όπως ανωμαλίες της μήτρας, ενδοκρινικές δυσλειτουργίες (σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, δυσλειτουργίες του θυρεοειδούς και θυρεοειδικά αυτοαντισώματα).

Στην παρούσα μελέτη μας οι γυναίκες με τον απλότυπο M2 / ANXA5 [που αποτελείται από τα υπολειπόμενα αλληλόμορφα των τεσσάρων πολυμορφισμών SNPs του υποκινητή της αννεξίνης A5: SNP1: (-) 467G> A, SNP2: (-) 448A> C, SNP3: (-) 422T> C και SNP4: (-) 373G> A] και με τα αλληλόμορφα των πολυμορφισμών SNP5: (-) 302 T> G και SNP6: (-) 1 C> T ελέγχθηκαν με ανάλυση RFLP και αλληλούχησης κατά Sanger ακολουθούμενη από πλήρη ανάλυση των δεδομένων. Η συχνότητα του απλότυπου M2 / ANXA5 στον ελληνικό πληθυσμό ήταν 11.5% στις περιπτώσεις των RPL ατόμων (έναντι 9.29 % στον πληθυσμό ελέγχου), παρόμοια με εκείνη που έχει αναφερθεί και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες. Δεδομένου ότι υπήρχαν 70 υγιείς-γόνιμες γυναίκες, το μέγεθος δείγματος των γυναικών με επαναλαμβανόμενες απώλειες εγκυμοσύνης (100) ήταν αρκετά μεγάλο για να επισημάνει μια σημαντική διαφορά, αν υπήρχε κάποια. Οι παρατηρήσεις μας είναι σύμφωνες με μια πρόσφατη μελέτη του Hayashi et al (2013) (149) η οποία έδειξε ελαφρά υψηλότερο επιπολασμό στους ιαπωνικούς ασθενείς σε σύγκριση με τις φυσιολογικές γυναίκες (11.4% έναντι 9.7%) χωρίς στατιστικά σημαντική σημασία, σε μία από τις μεγαλύτερες μελέτες στη βιβλιογραφία. Υπάρχουν επίσης και άλλες μελέτες που απέτυχαν να επιβεβαιώσουν το ρόλο του απλότυπου M2 / ANXA5 ως παράγοντα

κινδύνου για επαναλαμβανόμενες απώλειες εγκυμοσύνης, όπως η πρόσφατη μελέτη των Nagirnaia και συνεργάτες το 2015 (150), η οποία έδειξε χαμηλότερο επιπολασμό του συγκεκριμένου απλότυπου σε ασθενείς με RPL στην Εσθονία σε σύγκριση με τις φυσιολογικές γυναίκες (8.1% έναντι 15.2%, αντίστοιχα) και επίσης χαμηλότερο επιπολασμό του συγκεκριμένου απλότυπου σε ασθενείς με RPL στο Δανέζικο πληθυσμό συγκριτικά με τον πληθυσμό ελέγχου (9.7% έναντι 12.6%). Η διαφορά μεταξύ της παρούσας μελέτης μας και της μελέτης των Nagirnaia και συνεργατών (150) ήταν ότι ο Nagirnaia δεν έλαβε υπόψη τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες του εμβρύου ως κριτήριο αποκλεισμού για την ύπαρξη ανεξήγητων υποτροπιάζοντων αποβολών, όπως κάναμε εμείς στην παρούσα μελέτη (**Πίνακας 5.1**).

Επίσης, συγκρίσιμα αποτελέσματα έχουν βρεθεί σε πληθυσμούς Κινέζικων RPL γυναικών-ασθενείς σε σύγκριση με γόνιμες γυναίκες (12.2% έναντι 14.2%) (151), αλλά αυτή η μελέτη περιλαμβάνει τον επιπολασμό συχνότητας του πολυμορφισμού M2 SNP 76 (G / A). Επιπλέον, η μελέτη μας είναι σύμφωνη με τις εκτιμήσεις της βάσης δεδομένων 1000G σε ομάδες πληθυσμών σχετικά με τη συχνότητα του απλότυπου M2/ ANXA σε γόνιμες γυναίκες (Ευρωπαϊκές 12.4%, Ιαπωνέζες 9.6% και Κινέζες 16%) και σε συμφωνία με των δεδομένα από Ολλανδικό πληθυσμό (11%). (152) Ωστόσο, αυτές οι ομάδες πληθυσμού, όπως η βάση δεδομένων 1000G (που αποτελείται από άτομα από 26 παγκόσμιους πληθυσμούς), είναι περιορισμένες εξαιτίας του μεγέθους και της ανισορροπίας σύνδεσης των πληθυσμών που διαφέρει ανάλογα με την καταγωγή τους (The Consortium Project 1000 Genomes, 2012) (153) (**Πίνακας 5.1**).

Πίνακας 5.1: Επιπολασμός του απλοτύπου M2/ANXA5 του υποκινητή του γονιδίου της αννεξίνης A5 στη συγκεκριμένη μελέτη μας και σε προηγούμενες μελέτες σε σύγκριση με παγκόσμιες πληθυσμιακές ομάδες

Ατομα που συμμετέχουν στην μελέτη						Συχνότητα απλοτύπου (%) ¹	
Βιβλιογραφική αναφορά	Πληθυσμός	Ασθενείς	Αριθμός ασθενών	Πληθυσμός υγιών ατόμων-ελέγχου	Αριθμός υγιών ατόμων v-ελέγχου	M2 ασθενείς	M2 υγιή άτομα-πληθυσμός ελέγχου
Η συγκεκριμένη μελέτη μας							
Ελλάδα		RPL γυναίκες	100	Υγιή άτομα	20	21 ²	25 ²
Προηγούμενες μελέτες							
Bogdanova et al. 2007	Δυτική Γερμανία	Περιπτώσεις ³	70	Δυτική Γερμανία πληθυσμός υγιών-γόνιμων γυναικών ⁴	500 ⁵	14.3	5.1
				Βόρεια Γερμανία πληθυσμός υγιών-γόνιμων γυναικών ⁶	533 ⁵		8.2
Tiscia et al.2009	Νότια Ιταλία	RPL γυναίκες	103	Υγιείς-Γόνιμες γυναίκες	195	18.9	7.7
Miyamura et al.2011	Κεντρική Ιαπωνία	RPL γυναίκες	243	Υγιείς-Γόνιμες γυναίκες	119	10.7	5.5
Rogenhofer et al.2012	Νότια Γερμανία	RPL ζευγάρια	30	Υγιείς-Γόνιμες Γυναίκες	90	16.7	8.3
				Δυτική Γερμανία υγιείς-γόνιμες γυναίκες ⁴	500 ⁵		5.1
				Βόρεια Γερμανία υγιείς-γόνιμες γυναίκες ⁶	533 ⁵		8.2
Tuttelmann et al.2013	Δυτική Γερμανία	RPL γυναίκες	243	Δυτική Γερμανία υγιείς-γόνιμες γυναίκες ⁴	500 ⁵	11.7	5.1
				Βόρεια Γερμανία υγιείς-γόνιμες γυναίκες ⁶	533 ⁵		8.2

	Βουλγαρία	RPL γυναίκες	236	Υγιή άτομα ⁷	200	11.2	7.5
Hayashi et al. 2013	Κεντρική Ιαπωνία	RPL γυναίκες	264	Υγιείς- Γόνιμες γυναίκες	195	11.4	9.7
Cao et al.2013	Ανατολική Κίνα	RPL γυναίκες	94	Υγιείς- Γόνιμες γυναίκες	169	12.2	14.2
Nagirnaja et al.2015	Εσθονία	RPL γυναίκες	86	Υγιείς- Γόνιμες γυναίκες	99	8.1	15.2
	Δανία	RPL γυναίκες	227	Υγιείς- Γόνιμες γυναίκες	115	9.7	12.6
Δείγματα βασισμένα σε δεδομένα πληθυσμών							
Hiddink et al.2012 ⁸	Ολλανδία	n.a	n.a	Υγιή άτομα	131	n.a	11
Hock et al. 2015	Μαλαισία	RPL γυναίκες	77	Πληθυσμό ς ελέγχου	360	44.2 ¹⁰	42.2 ¹⁰
		RPL ζευγάρια	82 ⁹			57.3 ¹⁰	42.2 ¹⁰
Demetriou et al.2015	Ευρώπη	Ζευγάρια α Ευρωπαίων	996 ¹¹	Πληθυσμός ς Βόρειας Γερμανίας ⁶	533 ⁴	19 ¹²	13.5 ¹²
1000 Genomes ¹³	Ευρώπη	n.a	n.a	Πληθυσμός ς	85	n.a	12.4
	Κεντρική Ιαπωνία	n.a	n.a	Πληθυσμός ς	89	n.a	9.6
	Βόρεια Κίνα	n.a	n.a	Πληθυσμός ς	97	n.a	16.0

¹ Συχνότητα του απλοτύπου όπως δίνεται στην αντίστοιχη μελέτη. Αν δεν εμφανίζεται, τότε οι συχνότητες των απλοτύπων έχουν υπολογιστεί βασισμένες σε βιβλιογραφικά δεδομένα αναφοράς για τους απλότυπους.

² M2 απλότυπος με 1-6 SNPs: (-)467G>A, (-)448A>C, (-)422T>C, (-)373G>A, (-)302T>G and (-)1C>T

³ RPL ομάδα ασθενών περιλαμβάνει γυναίκες με αποβολές τόσο κατά το πρώτο όσο και κατά το δεύτερο τρίμηνο κύησης (n=56) καθώς και γυναίκες με γεννήσεις νεκρών κυημάτων (n=14)

⁴ Ομάδα υγιών ατόμων από το αρχείο του Institute of Human Genetics, University of Muenster, Δυτική Γερμανία

⁵ Οι ίδιοι πληθυσμοί χρησιμοποιήθηκαν σε τρεις μελέτες (Bogdanova et al. 2007; Rogenhof et al. 2012; Tuttelmann et al. 2013)

⁶ Πληθυσμός γυναικών από την PopGen βιοτράπεζα πληθυσμών του University Klinik Schleswig-Holstein Kiel, Βόρεια Γερμανία

⁷ Ο πληθυσμός ελέγχου αποτελείται από 33 υγιείς-γόνιμες γυναίκες και 167 υγιή άτομα (102 άνδρες και 65 γυναίκες) από το αρχείο του National Genetics Laboratory

⁸ Στατιστική ανάλυση διενεργήθηκε για 131 υγιή άτομα από το Nijmegen, Ολλανδία και περιλάμβανε 67 άνδρες και 64 γυναίκες

⁹ PRL ζευγάρια περιλαμβάνοντας 41 γυναίκες και 41 άνδρες

¹⁰ % Συχνότητα των M2 φορέων

¹¹ PRL ασθενείς περιλαμβάνοντας 501 γυναίκες και 495 άνδρες

¹² Γονότυπος ατόμων WT/M2

¹³ Δείγματα βασισμένα σε δεδομένα πληθυσμών από τη βάση δεδομένων του 1000 Genomes Project. Η Ευρώπη αντιπροσωπεύεται από πολίτες της Utah (CEPH) με Βόρειο- και Δυτικό-Ευρωπαϊκή καταγωγή (CEU)

Αντίθετα, τα ευρήματά μας είναι σε αντίθεση με άλλες μελέτες στις οποίες ο απλότυπος M2 / ANXA5 έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο σε γυναίκες με επαναλαμβανόμενες απώλειες εγκυμοσύνης σε σύγκριση με τις υγιείς-μάρτυρες, όπως: σε πληθυσμό της Δυτικής Γερμανίας με 14,3% έναντι 5.1% (132) και 11.7% έναντι 5.1% (154), σε πληθυσμό της Βόρειας Γερμανίας με 16.7% έναντι 8.3% (155), σε πληθυσμό της Βουλγαρίας με 11.2% vs 7.5% (154), σε πληθυσμό της Ιταλίας με 18.9% έναντι 7.7% (134), σε άλλο ιαπωνέζικο πληθυσμό με 10.7% έναντι 5.5% (135) και στον πληθυσμό της Μαλαισίας με 42.2% έναντι 34.9% (156). Επιπλέον, η μελέτη μας είναι αντίθετη σε σχέση με νεώτερες μελέτες που έχουν μελετήσει τη φορεία του απλότυπου M2 / ANXA5 τόσο στα μητρικά όσο και στα πατρικά αλληλόμορφα του γονιδίου ANXA5 σε ζευγάρια με καθ'έξιν αποβολές (RPL) και επιβεβαιώνουν ότι ο απλότυπος M2 / ANXA5 προσδίδει τον ίδιο σχετικό κίνδυνο στους φορείς και των δύο φύλων σε αυτά τα ζευγάρια [500 ζευγάρια- (157), 41 ζευγάρια- (158)] και συμφωνούν και με προηγούμενες μελέτες. (153, 154) Οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες έχουν δείξει ότι ο απλότυπος M2 / ANXA5 σχετίζεται με «πρώιμες» επαναλαμβανόμενες αυθόρμητες αποβολές και όχι με «όψιμες» (134, 153, 157) και ιδιαίτερα τον υψηλότερο σχετικό κίνδυνο για τα άτομα με τον απλότυπο M2 / ANXA5 (153, 157) σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες κινδύνου για καθ'έξιν αποβολές (RPL) που αυξάνει περαιτέρω αυτόν τον επιπολασμό (**Πίνακας 5.1**). Θα θέλαμε, ωστόσο, να τονίσουμε τη σημασία της διαπίστωσής μας, δεδομένου ότι όλοι οι γνωστοί παράγοντες για την ύπαρξη καθ'έξιν αποβολών (RPL) έχουν αποκλειστεί από τον πληθυσμό της μελέτης μας, αποφεύγοντας έτσι οποιοδήποτε πιθανό καθοδηγούμενο αποτέλεσμα της μελέτης μας.

Επιπλέον, στη συγκεκριμένη μελέτη μας αξιολογήθηκε το υπολειπόμενο αλληλίο του SNP5: (-) 302T> G του γονιδίου ANXA5 και διαπιστώθηκε ότι δεν αποτελεί ένα πιθανό ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για εκδήλωση RPL (αναλογία πιθανοτήτων: 1,2472), χωρίς στατιστικά σημαντική σημασία. Αυτή η συσχέτιση αξιολογείται για πρώτη φορά σε ευρωπαϊκό πληθυσμό και είναι αντίθετη με τα αποτελέσματα των Miyamura et al (2011) και Hayashi et al (2013), οι οποίοι πρότειναν ότι το SNP5 θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό καθοριστικό παράγοντα για τον κίνδυνο RPL, ανεξάρτητα από τον απλότυπο M2 / ANXA5. [στη μελέτη μας, η συχνότητα του αλληλόμορφου SNP5 ήταν υψηλότερη για τις περιπτώσεις RPL (0,485) από ό, τι για όλους τους άλλους πολυμορφισμούς: SNPs (0,125-0155) ($p < 0,05$ για όλες τις συγκρίσεις)]. Επειδή αυτό είναι ένα νέο εύρημα για το ANXA5, ίσως κάτι τέτοιο να είναι εγγενές για τον ελληνικό πληθυσμό.

Επίσης, όσο αφορά στο υπολειπόμενο αλληλόμορφο του πολυμορφισμού SNP6: (-) 1 C> T, δεν υπήρξαν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων (αναλογία πιθανοτήτων: 1,3846).

Αν και στη μελέτη μας διαπιστώσαμε ότι ούτε ο απλότυπος M2 / ANXA5 ούτε το SNP5 (και το SNP6) φαίνεται να αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες για αυξημένο κίνδυνο όσο αφορά την εκδήλωση επαναλαμβανόμενων απωλειών εγκυμοσύνης, υπάρχουν διαφορές που προκύπτουν μεταξύ όλων των σχετικών μελετών στην αναφερθείσα σχέση μεταξύ του απλότυπου του υποκινητή: M2 / ANXA5, την πιθανή συσχέτιση του SNP5: (-) 302T> G (αναφορά σε δύο σχετικές μελέτες: Miyamura et al., 2011 και Hayashi et al., 2013) και τις επαναλαμβανόμενες αυθόρμητες αποβολές. Οι διαφορές αυτές οφείλονται σε διάφορους παράγοντες όπως: α)

η διαφορετική εθνική καταγωγή και το ιστορικό του πληθυσμού μελέτης (150), β) τα ποικίλα κριτήρια επιλογής μεταξύ των γυναικών με καθ'έξιν αποβολές (RPL) και των γόνιμων φυσιολογικών γυναικών, η γενετική ανομοιογένεια για τις καθ'έξιν αποβολές (RPL), γ) ο αριθμός και η χρονική στιγμή των απωλειών εγκυμοσύνης («πρώιμες» απώλειες ή «όψιμες» απώλειες), δ) η αφθονία του mRNA ANXA5 επί των χορίων που φέρουν τον απλότυπο M2/ ANXA5 και τα επίπεδα της πρωτεΐνης ANXA5 στον πλακουντιακό ιστό των φορέων M2/ ANXA5, η πειραματική μεθοδολογία [ανάλυση RFLP, ο αριθμός των πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου που περιλαμβάνονται στην περιοχή του υποκινητή M2 / ANXA5, τα συγκριτικά δεδομένα των γονότυπων] και στ) λόγω της ασαφούς βιολογικής επίδρασης του απλοτύπου M2/ ANXA5 (132, 152, 159-161). Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι πολυμορφισμοί που καθορίζουν τον απλότυπο M2 / ANXA5 βρίσκονται εντός της νησίδας CpG του υποκινητή του γονιδίου της αννεξίνης A5, μπορεί να είναι πιθανό ότι διάφορα αίτια γενετικής ποικιλότητας όπως η μεθυλίωση του DNA θα μπορούσαν να διαφοροποιήσουν την ευαισθησία των ατόμων προς εκδήλωση καθ'έξιν αποβολών (RPL).

Εν κατακλείδι, παρόλο που συζητείται η προέλευση της αννεξίνης V στον συνκυτιοτροποφωβλάστη (μητρική ή εμβρυϊκή), οι πολυμορφισμοί του γονιδίου της αννεξίνης μπορεί να είναι χρήσιμοι για τον εντοπισμό των γυναικών που διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για την εκδήλωση καθ'έξιν αποβολών (RPL) και την ανάλογη αντιμετώπισή τους. Η έλλειψη συσχέτισης των περιπτώσεων RPL στην Ελλάδα με τον απλότυπο M2 / ANXA5 μπορεί να οφείλεται στον υπερβολικό έλεγχο εκ μέρους μας, δεδομένων των εκτεταμένων κριτηρίων αποκλεισμού που θέσαμε ως προϋπόθεση για

συμμετοχή γυναικών με RPL στη μελέτη μας (δηλαδή, ο απλότυπος θα μπορούσε να είναι λειτουργικός εφόσον συμπεριλαμβανόταν μία από τις εξαιρούμενες συνθήκες, με αποτέλεσμα τον αποκλεισμό των σχετικών περιπτώσεων).

Επίσης, είναι η πρώτη φορά που τα υπολειπόμενα αλληλόμορφα των SNP5 και SNP6 αξιολογήθηκαν εκτενώς σε έναν ευρωπαϊκό πληθυσμό με επαναλαμβανόμενες απώλειες εγκυμοσύνης (RPL) και δεν φαίνεται να αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου στην εμφάνιση καθ'έξιν αποβολών στον ελληνικό πληθυσμό. Καθώς πρόκειται για μια μικρή «πιλοτική» μελέτη στον ελληνικό πληθυσμό, θα μπορούσαμε να βασιστούμε σε πιθανές μελλοντικές μελέτες. Εναλλακτικά, η συσχέτιση των περιπτώσεων καθ'έξιν αποβολών (RPL) με τον απλότυπο M2 / ANXA5 στις προηγούμενες μελέτες μπορεί να οφείλεται σε συσχέτιση ή τροποποίηση του τελικού αποτελέσματος εξαιτίας του πολυμορφισμού SNP5. Προς αυτή την κατεύθυνση και ο πολυμορφισμός SNP5: (-) 302T> G θα πρέπει να αξιολογηθεί σε περαιτέρω δοκιμές σε πληθυσμούς της Δυτικής Ευρώπης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Πρόσφατα ευρήματα δείχνουν ότι ένας αριθμός μονών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) εντός της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου αννεξίνης-A5 (ANXA5) μειώνει την έκφραση του γονιδίου αναφοράς και έτσι αυτά παρουσιάζουν σημαντική συσχέτιση με την ύπαρξη επαναλαμβανόμενων απωλειών εγκυμοσύνης (RPL).

Σκοπός: Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθεί η συσχέτιση του απλοτύπου M2/ ANXA5 που αποτελείται από τέσσερα υπολειπόμενα αλληλόμορφα: [(SNP1: (-) 467G> A, SNP2: (-) 448A> C, SNP3: (-) 422T> C και SNP4: (-) 373G> A)] με την εμφάνιση επαναλαμβανόμενων απωλειών εγκυμοσύνης στον ελληνικό πληθυσμό, καθώς και των υπολειπόμενων αλληλόμορφων δύο περαιτέρω πολυμορφισμών (SNPs): του SNP5: (-) 302T> G και του SNP6: (-) 1C> T, ως ανεξάρτητων παραγόντων κινδύνου για RPL.

Μέθοδοι: Μια γονιδιωματική περιοχή 752bp του υποκινητή του ANXA5 γονιδίου ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές. Για τα έξι αυτά SNPs (υπολειπόμενα αλληλία) στην περιοχή του υποκινητή γονιδίου της ANXA5, έγινε γονοτυπική ανάλυση με Sanger ακολουθία σε εκατό (100) Ελληνίδες γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποβολές (διάμεση τιμή = 3) και εβδομήντα (70) γόνιμες γυναίκες. Η στατιστική ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας το SAS 9.3 για τα Windows (SAS Institute Inc. NC, ΗΠΑ) και τα πακέτα SPSS για Windows (C.DiMaggio 2013, SAS Institute 2014).

Αποτελέσματα:

Αυτή η μελέτη ελέγχου αποκάλυψε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντικά αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης καθ'έξιν αποβολών (RPL) μεταξύ των φορέων του M2 / ANXA5 (υπολειπόμενα αλληλόμορφα των SNP1-4) στον ελληνικό πληθυσμό, καθώς δεν υπήρχαν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ασθενών με επαναλαμβανόμενες απώλειες εγκυμοσύνης και των γόνιμων μαρτύρων (11,5% στο RPL περιπτώσεις έναντι 9,29% στους μάρτυρες, p -τιμή: 0,6364). Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά όσο αφορά τον ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα κινδύνου για τα SNP5 και SNP6 μεταξύ των δύο ομάδων. Συγκεκριμένα, οι φορείς των SNP5 και SNP6 είχαν αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καθ'έξιν αποβολών (RPL) με αναλογία πιθανοτήτων: 1,2472 και 1,3846 αντίστοιχα, αλλά χωρίς στατιστικά σημαντική σημασία.

Συμπεράσματα:

Ο απλότυπος M2 / ANXA5 δεν διαφέρει όσο αφορά το μέγεθος κινδύνου μεταξύ των ασθενών με RPL και των γόνιμων γυναικών στον ελληνικό πληθυσμό. Επίσης, είναι η πρώτη φορά που τα υπολειπόμενα αλληλία των SNP5 και SNP6 αξιολογήθηκαν εκτενώς σε γυναίκες ευρωπαϊκής προέλευσης με επαναλαμβανόμενες απώλειες εγκυμοσύνης (RPL) και δεν φαίνεται να αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου στην εμφάνιση RPL στον ελληνικό πληθυσμό. Ωστόσο, αυτό πρέπει να επιβεβαιωθεί σε περαιτέρω και μεγαλύτερες κλινικές δοκιμές σε γυναίκες ευρωπαϊκής προέλευσης.

Λέξεις-κλειδιά: Επαναλαμβανόμενες απώλειες εγκυμοσύνης/ αννεξίνη A5/ υποκινητής/ απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί/ απλότυπος

SUMMARY

Background: Recent findings show that a number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the promoter region of the annexin A5-gene (ANXA5) reduce the expression of the reporter gene and so they display a significant association with recurrent pregnancy loss (RPL).

Objective: The objective of the present study aimed to address the contribution of ANXA5 M2 haplotype consisting of four minor alleles: (SNP1: (-)467G>A, SNP2: (-)448A>C, SNP3: (-)422T>C and SNP4:(-)373G>A) in the occurrence of recurrent pregnancy losses in the Greek population, and the role of further two minor alleles: SNP5:(-)302 T>G and SNP6: (-)1C>T as independent risk factors for RPL.

Methods: A 752bp genomic region of ANXA5 promoter was amplified by PCR using specific primers. Genotypic analysis by Sanger sequencing was performed for these six SNPs (minor alleles) in the promoter region of ANXA5 gene, in one hundred (100) Greek women with recurrent miscarriages (median=3) and seventy (70) fertile controls. Statistical analysis was done using the SAS 9.3 for Windows (SAS Institute Inc. NC, USA) and SPSS packages for Windows (C.DiMaggio 2013, SAS Institute 2014).

Results: This case-control study revealed that there is not any significantly increased risk of RPL among the M2/ANXA5 haplotype carriers in the Greek population, as there were no statistical differences between the patients with recurrent pregnancy losses and the fertile controls (11.5% in RPL cases vs 9.29% in controls, p-value: 0.6364). There was no difference in SNP5 and SNP6 minor carriership between the two groups. In particular, carriers of

SNP5 and SNP6 had an increased risk for RPL state with odds ratio: 1.2472 and 1.3846 respectively, however without statistically significant importance.

Conclusion: The M2/ANXA5 haplotype does not differ between RPL patients and controls in the Greek population. Also, it is the first time that SNP5 and SNP6 minor alleles were evaluated extensively in women of European origin with recurrent pregnancy losses (RPL), and they do not seem to be independent risk factors in the occurrence of RPL in the Greek population. Though, this has to be confirmed in further and larger clinical trials with women of European origin.

Key words: Recurrent pregnancy loss/ annexin A5/ promoter/ single nucleotide polymorphisms/ haplotype

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Macklon NS, Geraedts JPM, Fauser BCJM. Conception to ongoing pregnancy: the “black box” of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update*. 2002;8:333–343.
2. Stephenson MD. Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril*. 1996;66:24–29.
3. Management of Recurrent Early Pregnancy Loss. Washington, DC: The American College of Obstetricians and Gynecologists; 2001. The American College of Obstetricians and Gynecologists. (ACOG Practice Bulletin No. 24).
4. Lin PC. Reproductive outcomes in women with uterine anomalies. *J Womens Health*. 2004;13:33–39.
5. Raga F, Bauset C, Remohi J, et al. Reproductive impact of congenital Müllerian anomalies. *Hum Reprod*. 1997;12:2277–2281.
6. Bajekal N, Li TC. Fibroids, infertility and pregnancy wastage. *Hum Reprod Update*. 2000;6:614–620.
7. Grimbizis GF, Camus M, Tarlatzis BC, et al. Clinical implications of uterine malformations and hysteroscopic treatment results. *Hum Reprod Update*. 2001;7:161–174.
8. Fox-Lee L, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss. In: Berek JS, editor. *Berek and Novak’s Gynecology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. pp. 1277–1322.
9. Bussen S, Sutterlin M, Steck T. Endocrine abnormalities during the follicular phase in women with recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod*. 1999;14:18–20.
10. Watson H, Kiddy DS, Hamilton-Fairley D, et al. Hypersecretion of luteinizing hormone and ovarian steroids in women with recurrent early miscarriages. *Hum Reprod*. 1993;8:829–833.
11. Rai R, Backos M, Rushworth F, Regan L. Polycystic ovaries and recurrent miscarriage—a reappraisal. *Hum Reprod*. 2000;15:612–615.
12. Glueck CJ, Wang P, Goldenberg N, Sieve-Smith L. Pregnancy outcomes among women with polycystic ovary syndrome treated with metformin. *Hum Reprod*. 2002;17:2858–2864.

13. Mills JL, Simpson JL, Driscoll SG, et al. Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin-dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. *N Engl J Med.* 1988;319:1617–1623.
14. Vaquero E, Lazzarin N, De Carolis H, et al. Mild thyroid abnormalities and recurrent spontaneous abortion: diagnostic and therapeutical approach. *Am J Reprod Immunol.* 2000;43:204–208.
15. Kutteh WH, Yetman DL, Carr AC, et al. Increased prevalence of antithyroid antibodies identified in women with recurrent pregnancy loss but not in women undergoing assisted reproduction. *Fertil Steril.* 1999;71:843–848.
16. Rushworth FH, Backos M, Rai R, et al. Prospective pregnancy outcome in untreated recurrent miscarriers with thyroid autoantibodies. *Hum Reprod.* 2000;15:1637–1639.
17. Poppe K, Velkeniers B, Glinoer D. The role of thyroid autoimmunity in fertility and pregnancy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4:394–405.
18. Negro R, Formoso G, Coppola L, et al. Euthyroid women with autoimmune disease undergoing assisted reproduction technologies: the role of autoimmune disease and thyroid function. *J Endocrinol Invest.* 2007;30:3–8.
19. Summers PR. Microbiology relevant to recurrent miscarriage. *Clin Obstet Gynecol.* 1994;37:722–729.
20. Thellin O, Coumans B, Zorzi W, et al. Tolerance of the feto-placental “graft”: ten ways to support a child for nine months. *Curr Opin Immunol.* 2000;12:731–737.
21. Porter TF, LaCoursiere Y, Scott JR. Immunotherapy for recurrent miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006;2 CD000112.
22. Derksen RHWM. The obstetric antiphospholipid syndrome. *J Reprod Immunol.* 2008;77:41–50.
23. Greer IA. Thrombophilia: implications for pregnancy outcome. *Thromb Res.* 2003;109:73–81.
24. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood.* 2000;95:1517–1532.

25. Burton G, Hempstock J, Jauniaux E. Nutrition of the human fetus during the first trimester—a review. *Placenta*. 2001;22:S70–S76.
26. Kovalevsky G, Gracia CR, Berlin JA, et al. Evaluation of the association between hereditary thrombophilias and recurrent pregnancy loss. *Arch Intern Med*. 2004;164:558–563.
27. Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet*. 2003;361:901–908.
28. Robertson L, Wu O, Langhorne P, et al. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol*. 2006;132:171–196.
29. De la Calle M, Usandizaga R, Sancha M, et al. Homocysteine, folic acid and B-group vitamins in obstetrics and gynaecology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003;107:125–134.
30. Abel EL. Maternal alcohol consumption and spontaneous abortion. *Alcohol Alcohol*. 1997;32:211–219.
31. Windham GC, Von Behren J, Fenster L, et al. Moderate maternal alcohol consumption and risk of spontaneous abortion. *Epidemiology*. 1997;8:509–514.
32. Rasch V. Cigarette, alcohol, and caffeine consumption: risk factors for spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2003;82:182–188.
33. Kline J, Levin B, Kinney A, et al. Cigarette smoking and spontaneous abortion of known karyotype: precise data but uncertain inferences. *Am J Epidemiol*. 1995;141:417–427.
34. Ness RB, Grisso JA, Hirschinger N. Cocaine and tobacco use and the risk of spontaneous abortion. *N Engl J Med*. 1999;340:333–339.
35. Mills JL, Holmes LB, Aarons JH. Moderate caffeine use and the risk of spontaneous abortion and intrauterine growth retardation. *JAMA*. 1993;269:593–597.
36. Cnattingius S, Signorello LB, Anneren G, et al. Caffeine intake and the risk of first-trimester spontaneous abortion. *N Engl J Med*. 2000;343:1839–1845.
37. Domínguez-Rojas V, de Juanes-Pardo JR, Astasio-Arbiza P, et al. Spontaneous abortion in a hospital population: are tobacco and coffee intake risk factors? *Eur J Epidemiol*. 1994;10:665–668.

38. Haas DM, Ramsey PS. Progestogen for preventing miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008;2CD003511.
39. Rai R, Backos M, Baxter N, et al. Recurrent miscarriage-an aspirin a day? *Hum Reprod.* 2000;15:2220–2223.
40. Tulppala M, Marttunen M, Söderström-Anttila V, et al. Low-dose aspirin in prevention of miscarriage in women with unexplained or autoimmune related recurrent miscarriage: effect on prostacyclin and thromboxane A₂ production. *Hum Reprod.* 1997;12:1567–1572.
41. 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;148:140–146.
42. Stephenson MD, Sierra S. Reproductive outcomes in recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a structural chromosome rearrangement. *Hum Reprod.* 2006;21:1076–1082.
43. Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Suzumori N, Suzumori K. Poor prognosis of recurrent aborters with either maternal or paternal reciprocal translocations. *Fertil Steril.* 2004;81:367–373.
44. Clifford K, Rai R, Regan L. Future pregnancy outcome in unexplained recurrent first trimester miscarriage. *Hum Reprod.* 1997;12:387–389.
45. J. A. Heit, C. E. Kobbervig, A. H. James, T. M. Petterson, K. R. Bailey, and L. J. Melton III, “Trends in the incidence of venous thromboembolism during pregnancy or postpartum: a 30-year population-based study,” *Annals of Internal Medicine*, vol. 143, no. 10, pp. 697–706, 2005.
46. K. A. Bremme, “Haemostatic changes in pregnancy,” *Best Practice and Research*, vol. 16, no. 2, pp. 153–168, 2003.
47. A. Antovic, M. Blombäck, K. Bremme, and S. He, “The assay of overall haemostasis potential used to monitor the low molecular mass (weight) heparin, dalteparin, treatment in pregnant women with previous thromboembolism,” *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, vol. 13, no. 3, pp. 181–186, 2002.
48. F. Cerneca, G. Ricci, R. Simeone, M. Malisano, S. Alberico, and S. Guaschino, “Coagulation and fibrinolysis changes in normal pregnancy increased levels of procoagulants and reduced levels of inhibitors

- during pregnancy induce a hypercoagulable state, combined with a reactive fibrinolysis,” *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 73, no. 1, pp. 31–36, 1997.
49. S. Z. Goldhaber and V. F. Tapson, “A prospective registry of 5,451 patients with ultrasound-confirmed deep vein thrombosis,” *American Journal of Cardiology*, vol. 93, no. 2, pp. 259–262, 2004.
50. N. S. Macklon and I. A. Greer, “The deep venous system in the puerperium: an ultrasound study,” *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, vol. 104, no. 2, pp. 198–200, 1997.
51. J. S. Ginsberg, P. Brill-Edwards, R. F. Burrows et al., “Venous thrombosis during pregnancy: leg and trimester of presentation,” *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 67, no. 5, pp. 519–520, 1992.
52. A. H. James, M. G. Jamison, L. R. Brancazio, and E. R. Myers, “Venous thromboembolism during pregnancy and the postpartum period: incidence, risk factors, and mortality,” *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 194, no. 5, pp. 1311–1315, 2006.
53. I. Pabinger, H. Grafenhofer, P. A. Kyrle et al., “Temporary increase in the risk for recurrence during pregnancy in women with a history of venous thromboembolism,” *Blood*, vol. 100, no. 3, pp. 1060–1062, 2002.
54. S. Miyakis, M. D. Lockshin, T. Atsumi et al., “International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS),” *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 4, no. 2, pp. 295–306, 2006.
55. L. Opatrny, M. David, S. R. Kahn, I. Shrier, and E. Rey, “Association between antiphospholipid antibodies and recurrent fetal loss in women without autoimmune disease: a metaanalysis,” *Journal of Rheumatology*, vol. 33, no. 11, pp. 2214–2221, 2006.
56. A. A. Long, J. S. Ginsberg, P. Brill-Edwards et al., “The relationship of antiphospholipid antibodies to thromboembolic disease in systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study,” *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 66, no. 5, pp. 520–524, 1991.

57. R. M. Bertina, B. P. C. Koeleman, T. Koster et al., "Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C," *Nature*, vol. 369, no. 6475, pp. 64–67, 1994.
58. S. R. Poort, F. R. Rosendaal, P. H. Reitsma, and R. M. Bertina, "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*, vol. 88, no. 10, pp. 3698–3703, 1996.
59. C. Otto and W. O. Richter, "Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction," *The New England Journal of Medicine*, vol. 333, no. 6, pp. 389–390, 1995.
60. A. Gerhardt, R. E. Scharf, M. W. Beckmann et al., "Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium," *The New England Journal of Medicine*, vol. 342, no. 6, pp. 374–380, 2000.
61. S. Middeldorp, E. J. Libourel, K. Hamulyak, J. D. Van Meer, and H. R. Büller, "The risk of pregnancy-related venous thromboembolism in women who are homozygous for factor V Leiden," *British Journal of Haematology*, vol. 113, no. 2, pp. 553–555, 2001.
62. L. Robertson, O. Wu, P. Langhorne et al., "Thrombophilia in pregnancy: a systematic review," *British Journal of Haematology*, vol. 132, no. 2, pp. 171–196, 2006.
63. C. Benedetto, L. Marozio, A. M. Tavella, L. Salton, S. Grivon, and F. Di Giampaolo, "Coagulation disorders in pregnancy: acquired and inherited thrombophilias," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1205, pp. 106–117, 2010.
64. A. M. Cotter, A. M. Molloy, J. M. Scott, and S. F. Daly, "Elevated plasma homocysteine in early pregnancy: a risk factor for the development of severe preeclampsia," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 185, no. 4, pp. 781–785, 2001.
65. F. J. M. Van der Meer, T. Koster, J. P. Vandenbroucke, E. Briet, and F. R. Rosendaal, "The Leiden Thrombophilia Study (LETS)," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 78, no. 1, pp. 631–635, 1997.

66. J. R. Meinardi, S. Middeldorp, P. J. de Kamet et al., "Increased risk for fetal loss in carriers of the factor V Leiden mutation," *Annals of Internal Medicine*, vol. 130, no. 9, pp. 736–739, 1999.
67. D. Tormene, P. Simioni, P. Prandoni et al., "The risk of fetal loss in family members of probands with factor V Leiden mutation," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 82, no. 4, pp. 1237–1239, 1999.
68. O. Kocher, C. Cirovic, E. Malynn et al., "Obstetric complications in patients with hereditary thrombophilia identified using the LCx microparticle enzyme immunoassay: a controlled study of 5,000 patients," *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 127, no. 1, pp. 68–75, 2007.
69. G. Sottilotto, V. Oriana, C. Latella et al., "Genetic prothrombotic risk factors in women with unexplained pregnancy loss," *Thrombosis Research*, vol. 117, no. 6, pp. 681–684, 2006.
70. G. Lissalde-Lavigne, P. Fabbro-Peray, E. Cochery-Nouvellon et al., "Factor V Leiden and prothrombin G20210A polymorphisms as risk factors for miscarriage during a first intended pregnancy: the matched case-control "NOHA First" study," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 3, no. 10, pp. 2178–2184, 2005.
71. M. A. Rodger, M. T. Betancourt, P. Clark et al., "The association of factor V Leiden and prothrombin gene mutation and placenta-mediated pregnancy complications: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies," *PLoS Medicine*, vol. 7, no. 6, Article ID e1000292, 2010.
72. E. Rey, S. R. Kahn, M. David, and I. Shrier, "Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis," *The Lancet*, vol. 361, no. 9361, pp. 901–908, 2003.
73. F. E. Preston, F. R. Rosendaal, I. D. Walker et al., "Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia," *The Lancet*, vol. 348, no. 9032, pp. 913–916, 1996.
74. H. Roqu'e, M. J. Paidas, E. F. Funai, E. Kuczynski, and C. J. Lockwood, "Maternal thrombophilias are not associated with early pregnancy loss," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 91, no. 2, pp. 290–295, 2004.

75. Z. Alfirevic, D. Roberts, and V. Martlew, "How strong is the association between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? A systematic review," *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 101, no. 1, pp. 6–14, 2002.
76. J. G. Ray and C. A. Laskin, "Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, preeclampsia and spontaneous pregnancy loss: a systematic review," *Placenta*, vol. 20, no. 7, pp. 519–529, 1999.
77. B. Brenner, N. Lanir, and I. Thaler, "HELLP syndrome associated with factor V R506Q mutation," *British Journal of Haematology*, vol. 92, no. 4, pp. 999–1001, 1996.
78. M. G. van Pampus, G. A. Dekker, H. Wolf et al., "High prevalence of hemostatic abnormalities in women with a history of severe preeclampsia," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 180, no. 5, pp. 1146–1150, 1999.
79. I. P. Kosmas, A. Tatsioni, and J. P. A. Ioannidis, "Association of Leiden mutation in factor V gene with hypertension in pregnancy and preeclampsia: a meta-analysis," *Journal of Hypertension*, vol. 21, no. 7, pp. 1221–1228, 2003.
80. T. Dudding, J. Heron, A. Thakkinstian et al., "Factor V Leiden is associated with pre-eclampsia but not with fetal growth restriction: a genetic association study and meta-analysis," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 6, no. 11, pp. 1868–1875, 2008.
81. T. E. Dudding and J. Attia, "The association between adverse pregnancy outcomes and maternal factor V Leiden genotype: a meta-analysis," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 91, no. 4, pp. 700–711, 2004.
82. J. Lin and P. August, "Genetic thrombophilias and preeclampsia: a meta-analysis," *Obstetrics and Gynecology*, vol. 105, no. 1, pp. 182–192, 2005.
83. A. V. D'Elia, L. Driul, R. Giacomello et al., "Frequency of factor V, prothrombin and methylenetetrahydrofolate reductase gene variants in preeclampsia," *Gynecologic and Obstetric Investigation*, vol. 53, no. 2, pp. 84–87, 2002.

84. E. R. Morrison, Z. H. Miedzybrodzka, D. M. Campbell et al., "Prothrombotic genotypes are not associated with preeclampsia and gestational hypertension: results from a large population-based study and systematic review," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 87, no. 5, pp. 779–785, 2002.
85. R. M. Silver, Y. Zhao, C. Y. Spong et al., "Prothrombin gene G20210A mutation and obstetric complications," *Obstetrics and Gynecology*, vol. 115, no. 1, pp. 14–20, 2010.
86. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Practice Bulletins-Obstetrics, "ACOG Practice Bulletin No. 111: inherited thrombophilias in pregnancy," *Obstetrics and Gynecology*, vol. 115, no. 4, pp. 877–887, 2010.
87. A. E. Fogerty and J. M. Connors, "Management of inherited thrombophilia in pregnancy," *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, vol. 16, no. 6, pp. 464–469, 2009.
88. L. R. Brancacio, K. A. Roperti, R. Stierer, and S. A. Laifer, "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of subcutaneous heparin during the early third trimester of pregnancy," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 173, no. 4, pp. 1240–1245, 1995.
89. V. Sephton, R. G. Farquharson, J. Topping et al., "A longitudinal study of maternal dose response to low molecular weight heparin in pregnancy," *Obstetrics and Gynecology*, vol. 101, no. 6, pp. 1307–1311, 2003.
90. S. M. Bates, A. Greer, S. Middeldorp et al., "VTE, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy—antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines," *Chest*, vol. 141, no. 2, pp. e691–e736, 2012.
91. A. James and Committee on Practice Bulletins—Obstetrics, "Practice Bulletin 123: thromboembolism in pregnancy," *Obstetrics and Gynecology*, vol. 118, pp. 718–729, 2011.
92. Y. Dargaud, L. Rugeri, M. C. Vergnes et al., "A risk score for the management of pregnant women with increased risk of venous

- thromboembolism: a multicentre prospective study,” *British Journal of Haematology*, vol. 145, no.6, pp. 825–835, 2009.
93. P. Brill-Edwards, J. S. Ginsberg, M. Gent et al., “Safety of withholding heparin in pregnant women with a history of venous thromboembolism,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 343, no. 20, pp. 1439–1444, 2000.
94. I. A. Greer and C. Nelson-Piercy, “Low-molecular-weight heparins for thromboprophylaxis and treatment of venous thromboembolism in pregnancy: a systematic review of safety and efficacy,” *Blood*, vol. 106, no. 2, pp. 401–407, 2005.
95. J.-C. Gris, E. Mercier, I. Qu´er´e et al., “Low-molecular-weight heparin versus low-dose aspirin in women with one fetal loss and a constitutional thrombophilic disorder,” *Blood*, vol. 103, no. 10, pp. 3695–3699, 2004.
96. N. Folkeringa, J. L. P. Brouwer, F. J. Korteweg et al., “Reduction of high fetal loss rate by anticoagulant treatment during pregnancy in antithrombin, protein C or protein S deficient women,” *British Journal of Haematology*, vol. 136, no.4, pp. 656–661, 2007.
97. M. Coppens, N. Folkeringa, M. J. Teune et al., “Outcome of the subsequent pregnancy after a first loss in women with the factor V Leiden or prothrombin 20210A mutations,” *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 5, no. 7, pp. 1444–1448, 2007.
98. A. M. Badawy, M. Khiary, L. S. Sherif, M. Hassan, A. Ragab, and I. Abdelall, “Low-molecularweight heparin in patients with recurrent early miscarriages of unknown aetiology,” *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, vol. 28, no. 3, pp. 280–284, 2008.
99. M. Dolitzky, A. Inbal, Y. Segal, A. Weiss, B. Brenner, and H. Carp, “A randomized study of thromboprophylaxis in women with unexplained consecutive recurrent miscarriages,” *Fertility and Sterility*, vol. 86, no. 2, pp. 362–366, 2006.
100. J. E. Warren, S. E. Simonsen, D. W. Branch, T. F. Porter, and R.M. Silver, “Thromboprophylaxis and pregnancy outcomes in asymptomatic women with inherited thrombophilias,” *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 200, no. 3, pp.e281–e285, 2009.

101. S. Mantha, K. A. Bauer, and J. I. Zwicker, "Low molecular weight heparin to achieve live birth following unexplained pregnancy loss: a systematic review," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 8, no. 2, pp. 263–268, 2010.
102. R. Raj, H. Cohen, M. Dave, and L. Regan, "Randomised controlled trial of aspirin and aspirin plus heparin in pregnant women with recurrent miscarriage associated with phospholipid antibodies (or antiphospholipid antibodies)," *British Medical Journal*, vol. 314, no. 7076, pp. 253–257, 1997.
103. W. H. Kutteh, "Antiphospholipid antibody-associated recurrent pregnancy loss: treatment with heparin and low-dose aspirin is superior to low-dose aspirin alone," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 174, no. 5, pp. 1584–1589, 1996.
104. R. G. Farquharson, S. Quenby, and M. Greaves, "Antiphospholipid syndrome in pregnancy: a randomized, controlled trial of treatment," *Obstetrics and Gynecology*, vol. 100, no. 3, pp. 408–413, 2002.
105. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG) (April 2011). "The investigation and treatment of couples with recurrent first-trimester and second-trimester miscarriage". *Green-top Guideline No. 17*. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG). Retrieved 2 July 2013.
106. "The Investigation and Treatment of Couples with Recurrent Miscarriage: Guideline No 17" (PDF). Royal College of Obstetricians and Gynaecologists.
107. "Management of Early Pregnancy Loss". *ACOG Practice Bulletin* (American College of Obstetricians and Gynecologists) 24 (February). 2001.
108. Rodger MA, Paidas M, McLintock C, *et al.* (August 2008). "Inherited thrombophilia and pregnancy complications revisited". *Obstet Gynecol* 112 (2 Pt 1): 320–4.

109. Craven CM, Chedwick LR, Ward K. Placental basal plate formation is associated with fibrin deposition in decidual veins at sites of trophoblast cell invasion. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:291–6.
110. Goodman, Coulam CB, Jeyendram RS, Acosta VA, Roussev R. Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? *Am J Reprod Immunol* 2006;56:230–6.
111. Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 2003;361:901–8.
112. Craven CM, Chedwick LR, Ward K. Placental basal plate formation is associated with fibrin deposition in decidual veins at sites of trophoblast cell invasion. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:291–6.
113. Maruyama I, Bell CE and Majerus PW (1985) Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. *J Cell Biol* 101,363–371.
114. Van de Wouwer M, Collen D and Conway EM (2004) Thrombomodulin protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24,1374–1383.
115. Dahlbäck B and Villoutreix BO (2005) The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett* 579,3310–3316.
116. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL and Esmon CT (1996) The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93,10212–10216.
117. Laszik Z, Mitro A, Taylor FB Jr, Ferrell G and Esmon CT (1997) Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation* 96,3633–3640.
118. Crawley JT, Gu JM, Ferrell G and Esmon CT (2002) Distribution of endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR) during mouse embryo development. *Thromb Haemost* 88,259–266.

119. Medina P, Navarro S, Estellés A, et al. Contribution of polymorphisms in the endothelial protein C receptor gene to soluble endothelial protein C receptor and circulating activated protein C levels, and thrombotic risk. *Thromb Haemost* 2004; 91:905–11.
120. Uitte deWillige S, Van Marion V, Rodendaal FR, Vos HL, de Visser MCH. Haplotypes of the EPCR gene, plasma sEPCR levels and the risk of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2004;2:1305–10.
121. Medina P, Navarro S, Estellés A, Vayá A, Bertina RM, España F. Influence of the 4600A/G and 4678G/C polymorphisms in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene on the risk of venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden. *Thromb Haemost* 2005;94:389–94.
122. Glueck CJ, Wang P, Bornovali S, et al. Polycystic ovary syndrome, the G1691A factor V Leiden mutation, and plasminogen activator inhibitor activity: associations with recurrent pregnancy loss. *Metabolism* 2003;52:1627–32.
123. Glueck CJ, Phillips H, Cameron D, et al. 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: 46–52.
124. Homburg R. Pregnancy complications in PCOS. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;20:281–92.
125. Cortón M, Botella-Carretero JI, López JA, et al. Proteomic analysis of human omental adipose tissue in the polycystic ovary syndrome using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Hum Reprod* 2008;23: 651–61.
126. Rogenhofer N, Engels L, Bogdanova N, Tüttelmann F, Thaler CJ, Markoff A. Independent association of the M2/ANXA5 haplotype with recurrent pregnancy loss (RPL) in PCOS patients. *Metabolism*. 2013 Aug;62(8):1057-60.
127. Rand JH, Wu XX, Guller S, et al. Reduction of annexin-V (placental anticoagulant protein-I) on placental villi of women with

- antiphospholipid antibodies and recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:1566–72.
128. Shu F, Sugimura M, Kanayama N, et al. Immunohistochemical study of annexin V expression in placentae of preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2000;49:17–23.
 129. Chinni E, Tiscia GL, Colaizzo D, et al. Annexin V expression in human placenta is influenced by the carriership of the common haplotype M2. *Fertil Steril* 2009;91:940–2.
 130. Sifakis S, Soufla G, Koukoura O, et al. Decreased annexin A5 mRNA placental expression in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Thromb Res* 2010;125:326–31.
 131. Rand JH, Arslan AA, Wu XX, et al. Reduction of circulating annexin A5 levels and resistance to annexin A5 anticoagulant activity in women with recurrent spontaneous pregnancy losses. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:182–8.
 132. Bogdanova N, Horst J, Chlystun M, et al. A common haplotype of the annexin A5 (ANXA5) gene promoter is associated with recurrent pregnancy loss. *Hum Mol Genet* 2007;16:573–8.
 133. Markoff A, Gerdes S, Feldner S, et al. Reduced allele specific annexin A5 mRNA levels in placentas carrying the M2/ANXA5 allele. *Placenta* 2010;31:937–40.
 134. Tiscia G, Colaizzo D, Chinni E, et al. Haplotype M2 in the annexin A5 (ANXA5) gene and the occurrence of obstetric complications. *Thromb Haemost* 2009;102:309–13.
 135. Miyamura H, Nishizawa H, Ota S, et al. Polymorphisms in the annexin A5 gene promoter in Japanese women with recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 2011;17:447–52.
 136. Gerke V., Creutz C.E., Moss S.E.. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* , 2005, vol. 6 (pg. 449-461)
 137. Thiagarajan P., Tait J.F.. Binding of annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidylserine

- exposure in the procoagulant response of activated platelets, *J. Biol. Chem.* , 1990, vol. 265 (pg. 17420-17423)
138. Ravassa S., Bennaghmouch A., Kenis H., Lindhout T., Hackeng T., Narula J., Hofstra L., Reutelingsperger C.. Annexin A5 down-regulates surface expression of tissue factor: a novel mechanism of regulating the membrane receptor repertoire, *J. Biol. Chem.* , 2005, vol. 280 (pg. 6028-6035)
139. Cookson B.T., Engelhardt S., Smith C., Bamford H.A., Prochazka M., Tait J.F.. Organization of the human annexin V (ANX5) gene, *Genomics* , 1994, vol. 20 (pg. 463-467)
140. Morgan R.O., Bell D.W., Testa J.R., Fernandez M.P.. Genomic locations of ANX11 and ANX13 and the evolutionary genetics of human annexins, *Genomics* , 1998, vol. 48 (pg. 100-110)
141. Carcedo M.T., Iglesias J.M., Bances P., Morgan R.O., Fernandez M.P.. Functional analysis of the human annexin A5 gene promoter: a downstream DNA element and an upstream long terminal repeat regulate transcription, *Biochem. J.* , 2001, vol. 356 (pg. 571-579)
142. Gonzalez-Conejero R., Corral J., Roldan V., Martinez C., Marin F., Rivera J., Iniesta J.A., Lozano M.L., Marco P., Vicente V.. A common polymorphism in the annexin V Kozak sequence (-1C > T) increases translation efficiency and plasma levels of annexin V, and decreases the risk of myocardial infarction in young patients, *Blood* , 2002, vol. 100 (pg. 2081-2086)
143. Kozak M., Neufeld E.. Not every polymorphism close to the AUG codon can be explained by invoking context effects on initiation of translation, *Blood* , 2002, vol. 101 pg. 1202
144. Van Heerde W.L., Kenis H., Schoormans S., Lap P., Reutelingsperger C.P.M.. The -1C > T mutation in the annexin A5 gene does not affect plasma levels of annexin A5, *Blood* , 2002, vol. 101 (pg. 4223-4224)
145. C. DiMaggio, *SAS for epidemiologists : applications and methods*. New York: Springer, 2013.

146. SAS Institute. (2014). SAS Home Page. Available: <http://www.sas.com>
147. Rogenhofer N, Engels L, Bogdanova N, et al (2013a). The haplotype M2 of the ANXA5 gene is not associated with antitrophoblast antibodies. *J Assist Reprod Genet* Jun;30(5):711-6. <https://doi.org/10.1177/1076029613516189>
148. Rogenhofer N, Engels L, Bogdanova N, et al (2013b). Independent association of the M2/ANXA5 haplotype with recurrent pregnancy loss (RPL) in PCOS patients. *Metabolism* Aug;62(8):1057-60.
149. Hayashi Y, Sasaki H, Suzuki S, et al (2013). Genotyping analyses for polymorphisms of ANXA5 gene in patients with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* Oct;100(4):1018-24. PMID: 23850300 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.06.020
150. Nagirnaja L, Nömmemees D, Rull K, et al (2015). Annexin A5 Promoter Haplotype M2 Is Not a Risk Factor for Recurrent Pregnancy Loss in Northern Europe. *PLoS One* Jul 2;10(7): e0131606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131606>
151. Cao Y1, Zhang Z, Xu J, Yuan W, Wang J, Huang X, Shen Y, Du J (2013). The association of idiopathic recurrent pregnancy loss with polymorphisms in hemostasis-related genes. *Gene*. 2013 Nov 10;530(2):248-52. doi: 10.1016/j.gene.2013.07.080. Epub 2013 Aug 14.
152. Hiddink L, de Visser MC, van Heerde WL (2012). Polymorphisms in the Annexin A5 gene influence circulating Annexin A5 levels in healthy controls. *Thromb Res* Jun;129(6):815-7. PMID: 22512896 DOI: 10.1016/j.thromres.2012.03.022
153. The 1000 Genomes Project Consortium. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. (2012) *Nature* volume 491, pages 56–65 (01 November 2012), doi:10.1038/nature11632
154. Tüttelmann F, Ivanov P, Dietzel C, et al (2013). Further insights into the role of the annexin A5 M2 haplotype as recurrent pregnancy loss factor, assessing timing of miscarriage and partner risk. *Fertil*

- Steril Nov;100(5):1321-5. PMID: 23899942 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.06.046
155. Rogenhofer N, Engels L, Bogdanova N, et al (2012). Paternal and maternal carriage of the annexin A5 M2 haplotype are equal risk factors for recurrent pregnancy loss: a pilot study. *Fertil Steril* Aug;98(2):383-8. PMID: 22624674 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.04.026
156. Ang KC, Kathirgamanathan S, Chang ES, et al (2017). Genetic analysis of the M2/ANXA5 haplotype as recurrent pregnancy loss predisposition in the Malay population. *J Assist Reprod Genet* Apr;34(4):517-524. (PMID:28108842) DOI: 10.1007/s10815-017-0871-0
157. Demetriou C, Abu-Amero S, White S, et al (2015). Investigation of the Annexin A5 M2 haplotype in 500 white European couple who have experienced recurrent spontaneous abortion. *Reprod. Biomed. Online* 31, pp. 681-688.<http://dx.doi.org/10.2016/j.rbmo.2015.07.004>
158. Thean Hock T, Bogdanova N, Kai Cheen A, et al (2015). M2/ANXA5 haplotype as a predisposition factor in Malay women and couples experiencing recurrent spontaneous abortion: a pilot study. *Reprod Biomed Online* Apr;30(4):434-9. PMID: 25682309 DOI: 10.1016/j.rbmo.2014.12.014
159. Gourvas V, Soultzis N, Konstantinidou A, et al (2014). Reduced ANXA5 mRNA and protein expression in pregnancies complicated by preeclampsia. *Thromb Res* Mar;133(3):495-500. PMID 24393658
160. Markoff A, Gerdes S, Feldner S, et al (2010). Reduced allele specific annexin A5 mRNA levels in placentas carrying the M2/ANXA5 allele. *Placenta*;31:937–40.
161. Ota S, Miyamura H, Nishizawa H, et al (2013). Contribution of fetal ANXA5 gene promoter polymorphisms to the onset of pre-eclampsia. *Placenta* Dec;34(12):1202-10. PMID: 24140079 DOI: 10.1016/j.placenta.2013.09.010