

Genetika ponavljajućih spontanih pobačaja: napredci i prijepori

Genetics of recurrent spontaneous abortion: advances and controversies

Nina Pereza^{1*}, Saša Ostojić¹, Miljenko Kapović¹, Borut Peterlin²

Sažetak. U ovom kratkom preglednom članku prikazani su trenutni prijepori i napredci vezani uz definiciju i uzroke ponavljajućih spontanih pobačaja, s posebnim osvrtom na genetičke čimbenike. Prikazane spoznaje temeljene su na najnovijim rezultatima opažajnih i pokusnih istraživanja te sustavnih pregleda i metaanaliza.

Ključne riječi: genetika; medicina temeljena na dokazima; ponavljajući spontani pobačaji

Abstract. The aim of this mini-review is to give an overview of the current controversies and advances regarding the definition and causes of recurrent spontaneous abortion, with particular emphasis on genetic factors. The presented knowledge is based on the most recent findings of observational and experimental studies, as well as systematic reviews and meta-analyses.

Key words: evidence based medicine; genetics; recurrent miscarriage

¹Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

²Klinički institut za medicinsku genetiku, Klinika za ginekologiju i porodništvo, Univerzitetni medicinski centar Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

***Dopisni autor:**

Dr. sc. Nina Pereza, dr. med.
Zavod za biologiju i medicinsku genetiku
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Braće Branchetta 20, 51 000 Rijeka
e-mail: nina.pereza@medri.uniri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

DEFINICIJA

Prema Europskom udruženju za humanu reprodukciju i embriologiju (engl. *European Society of Human Reproduction and Embryology*; ESHRE) ponavljajući spontani pobačaji su tri ili više uzastopnih spontanih pobačaja i obuhvaćaju 1 % plodnih parova¹.

Prijepori: U svijetu nema jedinstvene definicije PSP-a te se ona razlikuje između smjernica različitih strukovnih udruženja i znanstvene zajednice s

S obzirom na prijepore i velike razlike u definiciji ponavljajućih spontanih pobačaja, dijagnostičkim i terapijskim postupcima, kao i kriterijima odabira ispitanika u znanstvenim istraživanjima, potrebna je što skorija standardizacija pristupa području.

obzirom na najmanji broj, redosljed i gestacijsko razdoblje spontanih pobačaja, kao i podatak jesu li spontani pobačaji s istim partnerom¹⁻³.

Napredak: S obzirom na veliki broj različitih definicija PSP-a sve više stručnjaka ističe važnost usuglašavanja smjernica na temelju rezultata dobro provedenih znanstvenih istraživanja^{4,5}. U izradi su nove ESHRE smjernice.

Najmanji broj spontanih pobačaja

Prijepori: Najveći prijepor pri postavljanju kriterija potrebnih za dijagnozu PSP-a odnosi se na najmanji broj spontanih pobačaja. Prema ESHRE i RCOG smjernicama (engl. *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists*; Kraljevski zbor porodničara i ginekologa) to su barem tri spontana pobačaja, a prema ASRM smjernicama (engl. *American Society for Reproductive Medicine*; Američko udruženje za reproduktivnu medicinu) dva spontana pobačaja, iako se u potonjima navodi da bi u epidemiološka istraživanja trebalo uključiti parove s barem tri spontana pobačaja¹⁻³.

Napredak: Iako postoji mali broj istraživanja o tome postoje li razlike u prevalenciji uzročnih čimbenika između parova s dva i tri spontana pobačaja, rezultati upućuju na to da razlika nema te da klinička obrada parova može započeti nakon drugog spontanog pobačaja⁶⁻⁹.

Redosljed spontanih pobačaja

Prijepori: Definicija navedena u ESHRE i RCOG smjernicama obuhvaća uzastopne spontane pobačaje, dok redosljed u ASRM smjernicama nije preciziran¹⁻³.

Napredak: Kao i za najmanji broj spontanih pobačaja, malobrojna su istraživanja u kojima se ispituju razlike u prevalenciji uzročnih čimbenika između parova s uzastopnim i neuzastopnim spontanim pobačajima. No, dosad provedena istraživanja upućuju na to da redosljed spontanih pobačaja nije čimbenik rizika za status nositeljstva za kromosomske aberacije i antifosfolipidni sindrom^{7,10,11}.

Gestacijsko razdoblje spontanog pobačaja

Prijepori: Gornja granica za gestacijsko razdoblje u kojem se gubitak trudnoće određuje kao spontani pobačaj razlikuje se između smjernica strukovnih udruženja (ESHRE 22. tjedan, RCOG 24. tjedan, ASRM ne precizira tjedan)¹⁻³. Izrazitije razlike vidljive su u znanstvenoj literaturi te se kao gornja granica može pronaći gotovo svaki gestacijski tjedan.

Napredak: Utvrđeno je da se spontani pobačaji u parova s PSP-ima većinom ponavljaju u istom gestacijskom razdoblju, od čega oko 90 % u prvom tromjesečju¹²⁻¹⁵. Također, uzročni čimbenici mogu se razlikovati s obzirom na gestacijsko razdoblje spontanih pobačaja. Primjerice, kromosomske aberacije većinom su uzrok ranih spontanih pobačaja, u prvih 12 tjedana, a genski poremećaji u drugom ili trećem tromjesečju trudnoće¹⁶⁻¹⁸. Stoga je važno klasificirati spontane pobačaje prema gestacijskom razdoblju kako bi se pravilno usmjerilo genetičko savjetovanje i znanstvena istraživanja^{4,11,18}.

Partnerstvo

Prijepori: Nije poznato jesu li PSP-i poremećaj koji je specifičan za iste partnere ili promjena partnera dovodi do uspješnog ishoda sljedeće trudnoće. Provedeno je svega nekoliko istraživanja, a rezultati su oprečni^{19,20}.

UZROCI I SMJERNICE ZA KLINIČKU OBRADU PAROVA

Uzroci PSP-a mogu se pronaći u oko 40 – 50 % parova. Najčešći uzroci u žene su anomalije materice i antifosfolipidni sindrom te kromosomske

abercije u jednog od partnera¹. Rjeđi uzroci su monogeneske bolesti (alfa-talasemija i miotonična distrofija u jednog od partnera te određene X-vezane dominantne bolesti u žena)¹⁷, kao i izloženost toksinima, neliječena hipotireoza i šećerna bolest tipa 2 u žena.

Prijepori: U svijetu nema jedinstvenih smjernica o tome koje bi dijagnostičke pretrage trebale biti uključene u kliničku obradu parova s PSP-ima¹⁻³, a posljedično tome razlikuju se i klinički postupnici. Naime, iako se u svim smjernicama preporučuju dijagnostičke pretrage za spomenute uzroke kao dio uobičajene kliničke obrade, razlike postoje s obzirom na pretrage za poremećaje za koje nije nedvosmisleno utvrđena povezanost s PSP-ima, poput nasljednih trombofilija. Također, u velikom istraživanju provedenom u Nizozemskoj pokazano je da se kliničari ne drže zadanih postupnika, odnosno da se parovi s PSP-ima upućuju na različite dijagnostičke pretrage neovisno o indikacijama²¹. Nadalje, predlaže se izrada novih smjernica za testiranje žena s PSP-ima na prisutnost antifosfolipidnih protutijela zbog brojnih nedosljednosti i razlika u odabiru ispitanika između izvornih znanstvenih istraživanja, kao i odabiru laboratorijskih metoda²².

Napredak: Brojna istraživanja usmjerena su na otkrivanje molekularnih patofizioloških mehanizama kojima poznati uzroci, posebice antifosfolipidni sindrom, dovode do spontanijh pobačaja^{23,24}.

Kromosomske aberacije u parova

Balansirane strukturne kromosomske aberacije prisutne su u oko 4 % parova s PSP-ima u usporedbi s 0,2 % ljudi u općoj populaciji^{9,25-28}. Mirnim nositeljima preporučuje se prenatalna dijagnostika u sljedećim trudnoćama.

Prijepori: Učestalost živorođenosti u parova u kojijh je jedan partner mirni nositelj balansirane strukturne kromosomske aberacije ne razlikuje se značajno od onih koji imaju uredan kariotip^{29,30}. Iako je preimplantacijska genetička dijagnostika uvedena kao metoda probira zametaka u parova s PSP-ima u kojijh jedan partner ima balansiranu strukturnu kromosomsku aberaciju, rezultati pojedinačnih istraživanja i metaanaliza pokazuju da ova metoda u usporedbi sa spontanijm začećem ne povećava broj živorođenosti u tih parova³¹⁻³³.

Kromosomske aberacije u spontano pobaćenijh zametaka/plodova

Napredak: Preimplantacijska genetička dijagnostika u kojoj se koriste novije molekularno-genetičke metode (npr. komparativna genomna hibridizacija na mikroćipu, engl. *array comparative genomic hybridization*, aCGH; sekvenciranje sljedeće generacije, engl. *next generation sequencing*) omogućuje preciznije i sveobuhvatnije otkrivanje nebalansiranih kromosomskih aberacija i genskih mutacija u blastocista^{16,34}. Tako je utvrđeno da su nebalansirane kromosomske aberacije prisutne u oko 50 % spontanijh pobaćenijh zametaka i plodova parova s PSP-ima^{16,35-37}. Spontano pobaćeni zametci i plodovi normalnog kariotipa češći su u žena mlađijh od 36 godina te parova s većijm brojem spontanijh pobaćaja³⁸.

Prijepori: Iako prema smjernicama strukovnijh udruženja citogenetička analiza spontanijh pobaćenijh zametaka i plodova nije dio uobičajene kliničke obrade parova s PSP-ima¹, s obzirom na visok udio kromosomskih aberacija, istiće se kako bi kariotipizacija (npr. kvantitativna fluorescentna lanćana reakcija polimerazom i aCGH) zametaka i plodova nakon drugog spontanog pobaćaja mogla pravilno usmjeriti daljnju kliničku obradu i smanjiti broj pretraga u tih parova^{29,37,39,40}.

PONAVLJAJUĆI SPONTANI POBAĆAJI NEPOZNATOG UZROKA

Hipoteze

Predložene su brojne hipoteze koje bi mogle objasniti nastanak PSP-a u preostalih 50 – 60 % parova u kojijh su isključeni poznati uzroci spontanijh pobaćaja. Pretpostavlja se da su PSP-i nepoznatog uzroka ili idiopatski PSP-i (IPSP-i) raznovrsna skupina poremećaja, a uzroci se moguće razlikuju ovisno o gestacijskom razdoblju u kojem se spontani pobaćaji ponavljaju^{18,41}. Kao mogući uzroci ili ćimbenici podloženosti predloženi su imunosni poremećaji (promjene u broju i aktivnosti perifernih i uterinih prirodnoćubilaćkih stanica, stvaranju ćitokina i protutijela), endokrini poremećaji (autoimune bolesti šćitnjaće, sindrom policistićnih jajnika, insuficijencija ųutog tijela, hiper i hipoprolaktinemija), stećene trombofilije (hiperhomocisteinemija, stećena otpornost na

aktivirani protein C) i genetički čimbenici¹. Također, istraživana je povezanost IPSP-a s indeksom tjelesne mase žene, uzimanjem kofeina i pušenjem cigareta¹.

Prijepori: Rezultati provedenih istraživanja oprečni su te niti za jednu od navedenih hipoteza nema konačnih dokaza o povezanosti s IPSP-ima^{1,42-49}.

Terapija

Uz gotovo svaku hipotezu o uzrocima IPSP-a predložena je i odgovarajuća terapija koja bi mogla povećati broj živorodstava. Najčešće primjenjivane terapije u žena s IPSP-ima su aspirin, heparin, progesteron i imunosna terapija.

Prijepori: Proveden je velik broj istraživanja o utjecaju aspirina i/ili heparina, prednizona, progesterona, intavenskih imunoglobulina, imunizacije leukocitima muškog partnera ili nesrodnih davatelja, infuzije membrana trofoblata i preimplantacijske genetičke dijagnoze na smanjenje broja spontanih pobačaja i povećanje broja živorodstava. No, prema rezultatima metaanaliza i dobro provedenih pojedinačnih randomiziranih kontroliranih istraživanja, niti jedno od navedenih liječenja ne utječe na ishod sljedeće trudnoće u žena s IPSP-ima, odnosno povećanje broja živorođene djece^{1,50-59}.

Napredci: Iako nije pronađena terapija koja bi povećala broj živorodstava u parova s IPSP-ima, napredak čini (postepeno) napuštanje primjene terapija za koju u parova s IPSP-ima nema dokaza o učinkovitosti. Jedina terapija za koju je znanstveno dokazano da pozitivno utječe na ishod sljedeće trudnoće je psihološka potpora (engl. *tender loving care*)^{1,60,61}.

Genetički čimbenici

Pretpostavka o genetičkoj podložnosti za IPSP-e temelji se na činjenicama da se rizik od ponovnog gubitka trudnoće povećava s brojem prethodnih spontanih pobačaja neovisno o dobi trudnice^{62,63}, da je prevalencija spontanih pobačaja u srodnika prvog koljena osoba s PSP-ima do sedam puta veća nego u ostaloj populaciji^{20,43,63-65}, te da se u istog para spontani pobačaji većinom ponavljaju u istom gestacijskom razdoblju¹²⁻¹⁵, upućujući na postojanje genetičkih čimbenika koji sprječavaju napredovanje trudnoće.

Povezanost s IPSP-ima istraživana je za mutacije gena, genetičku varijabilnost (varijacije broja kopija i polimorfizmi jednog nukleotida), heteromorfizme kromosoma i fragmentaciju DNK molekule spermija⁶⁶. Istraživani su i epigenetički čimbenici, uključujući metilaciju DNK molekule u korionskim resicama spontano pobačenih zametaka i genomu spermija, te nenasumičnu inaktivaciju X kromosoma u žena.

Oblikovanje genetičkih istraživanja i odabir ispitanika

Prijepori: Shvaćanje neuspješne trudnoće kao problema koji zahvaća samo ženu koja spontano pobacuje pridonijelo je neuređenosti područja u kojem se genetička, ali i ostala istraživanja većinom provode samo u žena, a ne u oba partnera. Iako je takav pristup zastario, u svijetu i dalje prevladava, što možemo potvrditi kroz stalne upite stručnih recenzenata o tome zašto smo u naša istraživanja uključili i muškarce⁶⁷⁻⁷¹ kad je žena ta koja spontano pobacuje.

Nadalje, između znanstvenih istraživanja postoje velike razlike s obzirom na definiciju PSP-a, dijagnostičke postupke koji se provode u parova s PSP-ima te kriterije odabira kontrolne skupine. Takva nejednačenost u kriterijima odabira ispitanika otežava usporedbu rezultata i donošenje valjanih zaključaka o povezanosti genetičkih čimbenika s IPSP-ima i njihovom kliničkom značaju, na što redovito upozoravamo kroz sustavne preglede literature i metaanalize⁷²⁻⁷⁵. Također, rezultati pojedinačnih istraživanja su oprečni, a određeni čimbenici ispitani su u malom broju istraživanja, koja su često provedena na malom broju ispitanika⁴³.

Napredak: Najveći iskorak napravljen je s obzirom na tehnologiju koja se koristi za analizu genetičkog materijala, a koja omogućuje pretraživanje čitavog ili većeg dijela genoma, poput aCGH, mikročipova za analizu polimorfizama jednog nukleotida, egzomskog sekvenciranja i drugih⁷⁶⁻⁸⁰.

Genetička varijabilnost i mutacije gena

Najveći dio genetičkih istraživanja obuhvaća istraživanja genetičke povezanosti (engl. *genetic association study*) u kojima se ispituje ovisnost između genetičke varijabilnosti i IPSP-a, s ciljem utvrđivanja gena kandidata ili područja genoma

koji bi mogli pridonijeti spontanom pobačajima. Dosad je ispitana varijabilnost u oko 180 gena kandidata. Proizvodi ovih gena većinom su uključeni u imunost i endokrini sustav, koagulaciju, metabolizam, angiogenezu i nadzor funkcije krvotoknog sustava^{43,81,82}.

Prijepori: Većina ispitanih gena kandidata odabrana je na temelju njihove uloge u ranoj trudnoći (engl. *hypothesis-based research*), no patofiziološki mehanizmi kojima bi pojedine genetičke varijante mogle pridonijeti spontanom pobačajima još su uvijek neistraženi.

Nasljedne trombofilije

Nasljedne ili prirođene trombofilije obuhvaćaju prirođeni nedostatak proteina C i S, mutacije u genima za čimbenik zgrušavanja II i V te varijabilnost gena PAI-1, (engl. *plasminogen activator inhibitor-1*), ACE (engl. *angiotensin-converting enzyme*) i MTHFR (*methylenetetrahydrofolate reductase*). Ovi poremećaji povezani su s nastankom venskih tromboembolija⁸³, ali je njihov doprinos komplikacijama u trudnoći prijeporan. Također, iako genetičko testiranje za ove poremećaje nije dio uobičajene kliničke obrade žena s IPSP-ima^{1,84}, potreba provođenja ovog testiranja čest je predmet rasprave.

Prijepori: Iako je u pojedinim istraživanjima utvrđena povećana učestalost određenih nasljednih trombofilija u žena s IPSP-ima u usporedbi s kontrolnom skupinom, klinički značaj ovih rezultata nije poznat. Kao glavni nedostaci provedenih istraživanja navode se nedosljednosti u metodologiji, neujednačeni kriteriji odabira i mali broj ispitanica. Nadalje, nasljedne trombofilije prisutne su u oko 20 % normalne populacije, a apsolutni rizik za razvoj spontanog pobačaja je nizak^{43,85-87}. Naposlijetku, terapija za nasljedne trombofilije ženama se daje neovisno o tome postoji li za to znanstveno utemeljena podloga.

Napredak: Rezultati randomiziranih kontroliranih istraživanja i metaanaliza pokazali su da liječenje aspirinom i/ili niskomolekularnim heparinom ne utječe na ishod trudnoće u žena s nasljednom trombofilijom^{55,86,88-91}.

ZAKLJUČAK

Ponavljajući spontani pobačaji čine razmjerno neuređeno područje s kliničkog i znanstvenog gledi-

šta. Uzroci PSP-a mogu se pronaći u svega 40 – 50 % parova, a ne postoje nedvosmisleni dokazi o povezanosti dosad istraživanih čimbenika podložnosti s IPSP-ima, kao niti učinkovitosti postojećih terapija u povećanju broja živorođene djece. Razlike u definiciji poremećaja i odabiru ispitanika između znanstvenih istraživanja onemogućavaju smislenu usporedbu dobivenih rezultata i donošenje zaključaka o njihovoj primjenjivosti u kliničkoj praksi te ukazuju na važnost usuglašavanja u donošenju jedinstvenih smjernica.

Djelomičan napredak pronalaženju genetičke uzročnosti ponavljajućih spontanih pobačaja omogućen je razvojem i primjenom novih molekularno-genetičkih tehnologija koje se koriste za analizu genetičkog materijala, uključujući komparativnu genomsku hibridizaciju na mikročipu i sekvenciranje sljedeće generacije.

Uvođenje novijih molekularno-genetičkih metoda omogućilo je otkrivanje uloge genetičkih čimbenika u etiologiji IPSP-a, poput nebalansiranih kromosomskih aberacija i genskih mutacija u spontano pobačenih zametaka i plodova. Stoga je sljedeći izazov kako ovo područje što brže uključiti u nove trendove translacijske medicine.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2006;21:2216-22.
2. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. The investigation and treatment of couples with recurrent first-trimester and second-trimester miscarriage (Green-top Guideline No. 17). London: RCOG Press, 2011.
3. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98:1103-11.
4. Kolte AM, Bernardi LA, Christiansen OB, Quenby S, Farquharson RG, Goddijn M et al. Terminology for pregnancy loss prior to viability: a consensus statement from the ESHRE early pregnancy special interest group. *Hum Reprod* 2015;30:495-8.
5. Vlaanderen W. Recurrent miscarriage: guidelines could be improved. *Hum Reprod* 2014;29:1344-5.
6. Bhattacharya S, Townend J, Bhattacharya S. Recurrent miscarriage: Are three miscarriages one too many?

- Analysis of a Scottish population-based database of 151,021 pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;150:24-7.
7. van den Boogaard E, Cohn DM, Korevaar JC, Dawood F, Vissenberg R, Middeldorp S et al. Number and sequence of preceding miscarriages and maternal age for the prediction of antiphospholipid syndrome in women with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2013;99:188-92.
 8. Coulam CB. Epidemiology of recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 1991;26:23-7.
 9. Franssen MT, Korevaar JC, Leschot NJ, Bossuyt PM, Knecht AC, Gerssen-Schoorl KB et al. Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *BMJ* 2005;331:137-41.
 10. van den Boogaard E, Kaandorp SP, Franssen MT, Mol BW, Leschot NJ, Wouters CH et al. Consecutive or non-consecutive recurrent miscarriage: is there any difference in carrier status? *Hum Reprod* 2010;25:1411-4.
 11. van den Boogaard E. Optimizing quality of care for couples with recurrent miscarriage. Amsterdam: University of Amsterdam, 2014. PhD thesis.
 12. Heuser C, Dalton J, Macpherson C, Branch DW, Porter TF, Silver RM. Idiopathic recurrent pregnancy loss recurs at similar gestational ages. *Am J Obstet Gynecol* 2010;203:343.e1-5.
 13. Ticconi C, Giuliani E, Sorge R, Patrizi L, Piccione E, Pietropoli A. Gestational age of pregnancy loss in women with unexplained recurrent miscarriage. *J Obstet Gynecol Res* 2016;42:239-45.
 14. Liu Y, Liu Y, Zhang S, Chen H, Liu M, Zhang J. Etiology of spontaneous abortion before and after the demonstration of embryonic cardiac activity in women with recurrent spontaneous abortion. *Int J Gynaecol Obstet* 2015;129:128-32.
 15. Coccia ME, Rizzello F, Capezuoli T, Spitaleri M, Riviello C. Recurrent pregnancy losses and gestational age are closely related: an observational cohort study on 759 pregnancy losses. *Reprod Sci* 2015;22:556-62.
 16. van den Berg MM, van Maarle MC, van Wely M, Goddijn M. Genetics of early miscarriage. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:1951-9.
 17. Laurino MY, Bennett RL, Saraiya DS, Baumeister L, Doyle DL, Leppig K et al. Genetic evaluation and counseling of couples with recurrent miscarriage: recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns* 2005;14:165-81.
 18. McPherson E. Recurrence of stillbirth and second trimester pregnancy loss. *Am J Med Genet A* 2016; Forthcoming.
 19. Coulam CB, McIntyre JA, Faulk WP. Reproductive performance in women with repeated pregnancy losses and multiple partners. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1986;12:10-2.
 20. Christiansen OB, Mathiesen O, Lauritsen JG, Grunnet N. Idiopathic recurrent spontaneous abortion. Evidence of a familial predisposition. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1990;69:597-601.
 21. van den Boogaard E, Hermens RP, Franssen AM, Doornbos JP, Kremer JA, van der Veen F et al. Recurrent miscarriage: do professionals adhere to their guidelines. *Hum Reprod* 2013;28:2898-904.
 22. Wong LF, Porter TF, de Jesús GR. Recurrent early pregnancy loss and antiphospholipid antibodies: where do we stand? *Lupus* 2014;23:1226-8.
 23. Viall CA, Chamley LW. Histopathology in the placentae of women with antiphospholipid antibodies: A systematic review of the literature. *Autoimmun Rev* 2015;14:446-71.
 24. Tong M, Viall CA, Chamley LW. Antiphospholipid antibodies and the placenta: a systematic review of their in vitro effects and modulation by treatment. *Hum Reprod Update* 2015;21:97-118.
 25. ESHRE Capri Workshop Group. Genetic aspects of female reproduction. *Hum Reprod Update* 2008;14:293-307.
 26. Flynn H, Yan J, Saravelos SH, Li TC. Comparison of reproductive outcome, including the pattern of loss, between couples with chromosomal abnormalities and those with unexplained repeated miscarriages. *J Obstet Gynecol Res* 2014;40:109-16.
 27. Tunç E, Tanrıverdi N, Demirhan O, Süleymanova D, Çetinel N. Chromosomal analyses of 1510 couples who have experienced recurrent spontaneous abortions. *Reprod Biomed Online* 2016; Forthcoming.
 28. Dutta UR, Rajitha P, Pidugu VK, Dalal AB. Cytogenetic abnormalities in 1162 couples with recurrent miscarriages in southern region of India: report and review. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:145-9.
 29. Barber JC, Cockwell AE, Grant E, Williams S, Dunn R, Ogilvie CM. Is karyotyping couples experiencing recurrent miscarriage worth the cost? *BJOG* 2010;117:885-8.
 30. Carp H, Feldman B, Oelsner G, Schiff E. Parental karyotype and subsequent live births in recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2004;81:1296-301.
 31. Ikuma S, Sato T, Sugiura-Ogasawara M, Nagayoshi M, Tanaka A, Takeda S. Preimplantation Genetic Diagnosis and Natural Conception: A Comparison of Live Birth Rates in Patients with Recurrent Pregnancy Loss Associated with Translocation. *PLoS One* 2015;10:e0129958.
 32. Franssen MT, Musters AM, van der Veen F, Repping S, Leschot NJ, Bossuyt PM et al. Reproductive outcome after PGD in couples with recurrent miscarriage carrying a structural chromosome abnormality: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011;17:467-75.
 33. Vissenberg R, Goddijn M. Is there a role for assisted reproductive technology in recurrent miscarriage? *Semin Reprod Med* 2011;29:548-56.
 34. Tan Y, Yin X, Zhang S, Jiang H, Tan K, Li J et al. Clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis and screening using next generation sequencing. *Gigascience* 2014;3:30.
 35. Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, Suzumori N, Kitaori T, Mizutani E. Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2012;27:2297-303.
 36. Hodes-Wertz B, Grifo J, Ghadir S, Kaplan B, Laskin CA, Glassner M et al. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. *Fertil Steril* 2012;98:675-80.
 37. Shen J, Wu W, Gao C, Ochin H, Qu D, Xie J et al. Chromosomal copy number analysis on chorionic villus samples from early spontaneous miscarriages by high throughput genetic technology. *Mol Cytogenet* 2016;9:7.
 38. Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM, Macklon N. New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Med* 2013;11:154.
 39. Hogge WA, Byrnes AL, Lanasa MC, Surti U. The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:397-400; discussion 400-2.

40. Bernardi LA, Plunkett BA, Stephenson MD. Is chromosome testing of the second miscarriage cost saving? A decision analysis of selective versus universal recurrent pregnancy loss evaluation. *Fertil Steril* 2012;98:156-61.
41. Choi TY, Lee HM, Park WK, Jeong SY, Moon HS. Spontaneous abortion and recurrent miscarriage: A comparison of cytogenetic diagnosis in 250 cases. *Obstet Gynecol Sci* 2014;57:518-25.
42. Moffett A, Shreeve N. First do no harm: uterine natural killer (NK) cells in assisted reproduction. *Hum Reprod* 2015;30:1519-25.
43. Rull K, Nagirnjaja L, Laan M. Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions. *Front Genet* 2012;3:34.
44. Seshadri S, Sunkara SK. Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2014;20:429-38.
45. Laird SM, Tuckerman EM, Cork BA, Linjawi S, Blakemore AI, Li TC. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 2003;9:163-74.
46. van den Boogaard E, Vissenberg R, Land JA, van Wely M, van der Post JA, Goddijn M et al. Significance of (sub)clinical thyroid dysfunction and thyroid autoimmunity before conception and in early pregnancy: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011;17:605-19.
47. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. The clinical relevance of luteal phase deficiency: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98:1112-7.
48. Bukulmez O, Arici A. Luteal phase defect: myth or reality. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2004;31:727-44, ix.
49. Egli M, Leeners B, Kruger TH. Prolactin secretion patterns: basic mechanisms and clinical implications for reproduction. *Reproduction* 2010;140:643-54.
50. Wong LF, Porter TF, Scott JR. Immunotherapy for recurrent miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;10:CD000112.
51. Egerup P, Lindschou J, Gluud C, Christiansen OB; ImmuReM IPD Study Group. The Effects of Intravenous Immunoglobulins in Women with Recurrent Miscarriages: A Systematic Review of Randomised Trials with Meta-Analyses and Trial Sequential Analyses Including Individual Patient Data. *PLoS One* 2015;10:e0141588.
52. Musters AM, Repping S, Korevaar JC, Mastenbroek S, Limpens J, van der Veen F et al. Pregnancy outcome after preimplantation genetic screening or natural conception in couples with unexplained recurrent miscarriage: a systematic review of the best available evidence. *Fertil Steril* 2011;95:2153-7, 2157.e1-3.
53. Ober C, Karrison T, Odem RR, Barnes RB, Branch DW, Stephenson MD et al. Mononuclear-cell immunisation in prevention of recurrent miscarriages: a randomised trial. *Lancet* 1999;354:365-9.
54. Christiansen OB, Larsen EC, Egerup P, Lunoe L, Egestad L, Nielsen HS. Intravenous immunoglobulin treatment for secondary recurrent miscarriage: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *BJOG* 2015;122:500-8.
55. de Jong PG, Kaandorp S, Di Nisio M, Goddijn M, Middeldorp S. Aspirin and/or heparin for women with unexplained recurrent miscarriage with or without inherited thrombophilia. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;7:CD004734.
56. Zhang T, Ye X, Zhu T, Xiao X, Liu Y, Wei X et al. Antithrombotic Treatment for Recurrent Miscarriage: Bayesian Network Meta-Analysis and Systematic Review. *Medicine (Baltimore)* 2015;94:e1732.
57. Schleussner E, Kamin G, Seliger G, Rogenhofer N, Ebner S, Toth B et al. Low-molecular-weight heparin for women with unexplained recurrent pregnancy loss: a multicenter trial with a minimization randomization scheme. *Ann Intern Med* 2015;162:601-9.
58. Pasquier E, de Saint Martin L, Bohec C, Chauleur C, Bretelle F, Marhic G et al. Enoxaparin for prevention of unexplained recurrent miscarriage: a multicenter randomized double-blind placebo-controlled trial. *Blood* 2015;125:2200-5.
59. Coomarasamy A, Williams H, Truchanowicz E, Seed PT, Small R, Quenby S et al. A Randomized Trial of Progesterone in Women with Recurrent Miscarriages. *N Engl J Med* 2015;373:2141-8.
60. Craig M. Stress and recurrent miscarriage. *Stress* 2001;4:205-13.
61. Kolte AM, Olsen LR, Mikkelsen EM, Christiansen OB, Nielsen HS. Depression and emotional stress is highly prevalent among women with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2015;30:777-82.
62. Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* 2000;320:1708-12.
63. Brigham SA, Conlon C, Farquharson RG. A longitudinal study of pregnancy outcome following idiopathic recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 1999;14:2868-71.
64. Christiansen OB, Pedersen B, Mathiesen O, Huth M, Grunnet N. Maternal HLA class II alleles predispose to pregnancy losses in Danish women with recurrent spontaneous abortions and their female relatives. *Am J Reprod Immunol* 1996;35:239-44.
65. Kolte AM, Nielsen HS, Moltke I, Degn B, Pedersen B, Sunde L et al. A genome-wide scan in affected sibling pairs with idiopathic recurrent miscarriage suggests genetic linkage. *Mol Hum Reprod* 2011;17:379-85.
66. Pereza N. Varijabilnost gena matriks metaloproteinaza i tkivnih inhibitora metaloproteinaza u parova s ponavljajućim spontanim pobačajima nepoznate etiologije. Rijeka: Medicinski fakultet, 2013. PhD thesis.
67. Pereza N, Ostojić S, Smirčić A, Hodžić A, Kapović M, Peterlin B. The -2549 insertion/deletion polymorphism in the promoter region of the VEGFA gene in couples with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *J Assist Reprod Genet* 2015;32:1789-94.
68. Pereza N, Volk M, Zrakić N, Kapović M, Peterlin B, Ostojić S. Genetic variation in tissue inhibitors of metalloproteinases as a risk factor for idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* 2013;99:1923-9.
69. Pereza N, Ostojić S, Volk M, Kapović M, Peterlin B. Matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 functional single-nucleotide polymorphisms in idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Reprod Biomed Online* 2012;24:567-75.
70. Pereza N, Ostojić S, Volk M, Maver A, Kapović M, Peterlin B. The insulin-like growth factor 2 receptor gene Gly1619Arg polymorphism and idiopathic recurrent spontaneous abortion. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25:429-31.

71. Ostojić S, Pereza N, Volk M, Kapović M, Peterlin B. Genetic predisposition to idiopathic recurrent spontaneous abortion: contribution of genetic variations in IGF-2 and H19 imprinted genes. *Am J Reprod Immunol* 2008;60:111-7.
72. Pereza N, Ostojić S, Zdravčević M, Volk M, Kapović M, Peterlin B. Insertion/deletion polymorphism in intron 16 of ACE gene in idiopathic recurrent spontaneous abortion: case-control study, systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2016;32:237-46.
73. Pereza N, Peterlin B, Volk M, Kapović M, Ostojić S. A critical update on endothelial nitric oxide synthase gene variations in women with idiopathic recurrent spontaneous abortion: genetic association study, systematic review and meta-analyses. *Mol Hum Reprod* 2015;21:466-78.
74. Pereza N, Črnjar K, Buretić-Tomljanović A, Volk M, Kapović M, Peterlin B et al. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions are not associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion in a Slovenian population: association study and literature review. *Fertil Steril* 2013;99:1663-7.
75. Medica I, Ostojic S, Pereza N, Kastrin A, Peterlin B. Association between genetic polymorphisms in cytokine genes and recurrent miscarriage—a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2009;19:406-14.
76. Rodrigo L, Mateu E, Mercader A, Cobo AC, Peinado V, Milán M et al. New tools for embryo selection: comprehensive chromosome screening by array comparative genomic hybridization. *Biomed Res Int* 2014;2014: 517125.
77. Kudesia R, Li M, Smith J, Patel A, Williams Z. Rescue karyotyping: a case series of array-based comparative genomic hybridization evaluation of archival conceptual tissue. *Reprod Biol Endocrinol* 2014;12:19.
78. Maslow BS, Budinetz T, Sueldo C, Anspach E, Engmann L, Benadiva C et al. Single-Nucleotide Polymorphism-Microarray Ploidy Analysis of Paraffin-Embedded Products of Conception in Recurrent Pregnancy Loss Evaluations. *Obstet Gynecol* 2015;126:175-81.
79. Qiao Y, Wen J, Tang F, Martell S, Shomer N, Leung PC et al. Whole exome sequencing in recurrent early pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 2016; Forthcoming.
80. Kosova G, Stephenson MD, Lynch VJ, Ober C. Evolutionary forward genomics reveals novel insights into the genes and pathways dysregulated in recurrent early pregnancy loss. *Hum Reprod* 2015;30:519-29.
81. Daher S, Mattar R, Gueuvoghlian-Silva BY, Torloni MR. Genetic polymorphisms and recurrent spontaneous abortions: an overview of current knowledge. *Am J Reprod Immunol* 2012;67:341-7.
82. Ostojić S, Peterlin B. Genetski čimbenici u etiologiji učestalih spontanih pobačaja. *Medicina* 2004;4:256-64.
83. Martinelli I, De Stefano V, Mannucci PM. Inherited risk factors for venous thromboembolism. *Nat Rev Cardiol* 2014;11:140-56.
84. Davenport WB, Kutteh WH. Inherited thrombophilias and adverse pregnancy outcomes: a review of screening patterns and recommendations. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2014;41:133-44.
85. Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, Clark P, Lowe GD et al. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol* 2006;132:171-96.
86. Bradley LA, Palomaki GE, Bienstock J, Varga E, Scott JA. Can Factor V Leiden and prothrombin G20210A testing in women with recurrent pregnancy loss result in improved pregnancy outcomes?: Results from a targeted evidence-based review. *Genet Med* 2012;14:39-50.
87. Grand BE, Voto LS. Maternal issues in thrombosis and thrombophilia. In: Krujak A, Chervenak F (eds). *Textbook of perinatal medicine*. Third edition. New Delhi, London, Philadelphia, Panama: Jaypee brothers medical publishers, 2015;1738-42.
88. Simcox LE, Ormsher L, Tower C, Greer IA. Thrombophilia and Pregnancy Complications. *Int J Mol Sci* 2015;16:28418-28.
89. Grandone E, Villani M, Tiscia GL. Aspirin and heparin in pregnancy. *Expert Opin Pharmacother* 2015;16: 1793-803.
90. Middeldorp S. Anticoagulation in pregnancy complications. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014; 2014:393-9.
91. McNamee K, Dawood F, Farquharson R. Recurrent miscarriage and thrombophilia: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2012;24:229-34.