

Varijabilnost gena matriks metaloproteinaza i tkivnih inhibitora metaloproteinaza u parova s ponavljajućim spontanim pobačajima nepoznate etiologije

Pereza, Nina

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:259290>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Nina Pereza

**VARIJABILNOST GENA MATRIKS METALOPROTEINAZA I
TKIVNIH INHIBITORA METALOPROTEINAZA
U PAROVA S PONAVLJAJUĆIM SPONTANIM POBAČAJIMA
NEPOZNATE ETIOLOGIJE**

Doktorski rad

Rijeka, 2013.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Nina Pereza

**VARIJABILNOST GENA MATRIKS METALOPROTEINAZA I
TKIVNIH INHIBITORA METALOPROTEINAZA
U PAROVA S PONAVLJAJUĆIM SPONTANIM POBAČAJIMA
NEPOZNATE ETIOLOGIJE**

Doktorski rad

Rijeka, 2013.

Mentor rada: izv.prof.dr.sc. Saša Ostojić, dr.med.

Doktorski rad obranjen je dana_____ 2013. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci,
pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof.dr.sc. Elvira Mustać, dr.med.
2. Prof.dr.sc. Marija Heffer, dr.med.
3. Prof.dr.sc. Oleg Petrović, dr.med.
4. Izv.prof.dr.sc. Saša Ostojić, dr.med.

Rad ima 149 listova.

UDK:_____

*Mojim voljenim roditeljima,
bez čije beskrajne ljubavi
ne postojim*

ZAHVALE

Neizmjerno se zahvaljujem *izv.prof.dr.sc. Saši Ostojiću* na vodstvu prilikom izrade ovog doktorskog rada, kao i desetogodišnjem zajedničkom radu tijekom kojeg sam učila o znanosti kao nerazdvojivom dijelu svakodnevnog života. Zahvaljujem se na uloženoj energiji, poticanju razvoja kreativnog razmišljanja i vjeri u moj uspjeh.

Iskreno se zahvaljujem pročelniku Zavoda za biologiju i medicinsku genetiku, *prof.dr.sc. Miljenku Kapoviću*, na pruženoj prilici za rad u području genetike čovjeka, velikodušnoj podršci, poštovanju te poticanju slobode odabira.

Izrazito sam zahvalna pročelniku Kliničkog inštituta za medicinsku genetiku, Univerzitetnog kliničnog centra u Ljubljani, *prof.dr.sc. Borutu Peterlinu*, na dugogodišnjoj suradnji, povjerenju, vrijednim znanstvenim i stručnim savjetima, kao i iskrenoj podršci u mom znanstvenom razvoju, još od studentskih dana.

Zahvaljujem se mojim *kolegicama i kolegama sa Zavoda za biologiju i medicinsku genetiku*, kao i *suradnicima s Kliničkog inštituta za medicinsku genetiku, Univerzitetnog kliničnog centra u Ljubljani*.

SAŽETAK

Cilj: Osnovni cilj ovog rada bio je utvrditi povezanost varijabilnosti gena *matriks metaloproteinaza (MMP)* i *tkivnih inhibitora metaloproteinaza (TIMP)* i etiologije idiopatskih ponavljajućih spontanih pobačaja (IPSP). Dodatno je istražena povezanost varijabilnosti navedenih gena i podložnosti za primarni i sekundarni IPSP.

Ispitanici: U istraživanje su bile uključene dvije skupine ispitanika, uključujući parove s IPSP-om i kontrolne ispitanike. Skupinu parova s IPSP-om činilo je 149 žena i njihovih 149 reproduktivnih partnera sa tri ili više uzastopnih spontanih pobačaja nepoznate etiologije. Kontrolnu skupinu sačinjavalo je 149 zdravih žena i 149 zdravih muškaraca koji imaju barem dva živorođena djeteta, bez spontanih pobačaja i ostalih komplikacija u trudnoći.

Metode: Za genotipizaciju *MMP-1* -1607 1G/2G, *MMP-2* -735 C/T, *MMP-2* -1306 C/T, *MMP-3* -1612 5A/6A, *MMP-9* -1562 C/T, te *TIMP-1* -372 C/T, *TIMP-2* -303 C/T, *TIMP-3* -915 A/G, *TIMP-3* -1296 C/T i *TIMP-4* -3'-UTR C/T polimorfni varijanti korištena je kombinacija metoda lančane reakcije polimerazom i polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata.

Rezultati: U žena s IPSP-om, u usporedbi s kontrolnom skupinom, pronađena je statistički značajno veća učestalost pojedinačnih *MMP-2* -735 CT ($P=0,006$), *MMP-2* -1306 CC ($P=0,037$) i *MMP-9* -1562 CC ($P=0,010$) genotipova. Osim toga, izgledi za IPSP su dva puta veći u žena koje imaju *MMP-2* -735 CT i TT u usporedbi s CC genotipom (OR=2,15; 95 % CI=1,34-3,45; $P=0,001$), *MMP-2* -1306 CC u usporedbi s CT i TT genotipovima (OR=2,08; 95 % CI=1,17-3,69; $P=0,012$), kao i *MMP-9* -1562 CC u usporedbi s CT i TT genotipovima (OR=2,21; 95 % CI=1,30-3,80; $P=0,004$). Međusobne kombinacije navedenih rizičnih genotipova, kao i njihove kombinacije s genotipovima drugih polimorfni varijanti gena *MMP* i *TIMP* obitelji ne povećavaju izgleda za IPSP u usporedbi s pojedinačnim rizičnim *MMP-2* i -9 genotipovima. Raspodjele učestalosti genotipova, alela i haplotipova preostalih polimorfni varijanti gena *MMP* i *TIMP* obitelji nisu se statistički značajno razlikovale između žena, kao niti muškaraca skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine.

U muških partnera žena sa sekundarnim IPSP-om, u usporedbi s primarnim IPSP-om, utvrđena je statistički značajno veća učestalost *MMP-9* -1562 CC genotipa ($P=0,015$), koji povećava izgleda za sekundarni IPSP 3,81 puta u usporedbi s CT i TT genotipovima (95 % CI=1,47-9,84;

P=0,006). Kombinacije *MMP-9* -1562 CC genotipa s genotipovima drugih polimorfni varijanti gena *MMP* i *TIMP* obitelji ne povećavaju dodatno izgleda za IPSP. Raspodjele učestalosti genotipova, alela i haplotipova preostalih polimorfni varijanti gena *MMP* i *TIMP* obitelji nisu se statistički značajno razlikovale između žena, kao niti muškaraca podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova.

Zaključak: Pojedinačni *MMP-2* -735 CT, *MMP-2* -1306 CC ili *MMP-9* -1562 CC genotipovi mogući su čimbenici podložnosti za IPSP u žena. Također, *MMP-9* -1562 CC genotip u muškaraca mogući je čimbenik podložnosti za sekundarni IPSP.

Ključne riječi: matriks metaloproteinaze; polimorfizam, genetički; spontani pobačaj, ponavljajući; tkivni inhibitor metaloproteinaza; trudnoća.

**Variation of the matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase genes
in couples with recurrent spontaneous abortion of unknown etiology**

SUMMARY

Objective: The main objective of this study was to determine the association of variation of *matrix metalloproteinase (MMP)* and *tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)* genes and the etiology of idiopathic recurrent spontaneous abortion (IRSA). Additionally, the association of variability in the afore-mentioned genes and susceptibility to primary and secondary IRSA was investigated.

Patients: Two groups of cases were included in this study, including the group of couples with IRSA and control group. A total of 149 women and 149 of their reproductive partners with three or more consecutive spontaneous abortions of unknown etiology comprised the group of couples with IRSA. The control group included 149 healthy women and 149 healthy men with at least two live births and no history of pregnancy losses or any other pregnancy complications.

Methods: Genotyping of *MMP-1* -1607 1G/2G, *MMP-2* -735 C/T, *MMP-2* -1306 C/T, *MMP-3* -1612 5A/6A, *MMP-9* -1562 C/T, as well as *TIMP-1* -372 C/T, *TIMP-2* -303 C/T, *TIMP-3* -915 A/G, *TIMP-3* -1296 C/T and *TIMP-4* -3'-UTR C/T polymorphisms was performed using the combination of polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism methods.

Results: Statistically significant higher frequency of individual *MMP-2* -735 CT (P=0.006), *MMP-2* -1306 CC (P=0.037) and *MMP-9* -1562 CC (P=0.010) genotypes was found in women with IRSA compared with control women. Moreover, twofold increased odds of IRSA were determined in women with *MMP-2* -735 CT and TT compared to CC genotype (OR=2.15; 95 % CI=1.34-3.45; P=0.001), *MMP-2* -1306 CC compared to CT and TT genotypes (OR=2.08; 95 % CI=1.17-3.69; P=0.012), as well as *MMP-9* -1562 CC compared to CT and TT genotypes (OR=2.21; 95 % CI=1.30-3.80; P=0.004). Combined analysis of these risk genotypes, as well as their combination with genotypes of other *MMP* and *TIMP* gene polymorphisms did not increase the odds of IRSA in comparison with individual *MMP-2* and -9 risk genotypes. No statistically significant differences were

determined in the distribution of genotypes, alleles and haplotypes frequencies of other *MMP* and *TIMP* gene polymorphisms between IRSA patients and controls.

A statistically significant higher frequency of *MMP-9* -1562 CC genotype was found in male partners of women with secondary IRSA compared with primary IRSA (P=0.015). Men with *MMP-9* -1562 CC genotype had 3,81 increased odds of secondary IRSA compared to men with CT and TT genotypes (95 % CI=1.47-9.84; P=0.006). The combinations of *MMP-9* -1562 CC genotype with genotypes of other *MMP* and *TIMP* gene polymorphisms did not increase the odds of IRSA. No significant differences were found in the distribution of genotypes, alleles and haplotypes frequencies of other *MMP* and *TIMP* gene polymorphisms between the patients with primary and secondary IRSA.

Conclusion: Individual *MMP-2* -735 CT, *MMP-2* -1306 CC or *MMP-9* -1562 CC genotypes could be factors of predisposition to IRSA in women. Additionally, *MMP-9* -1562 CC genotype in men might be a factor of predisposition to secondary IRSA.

Key words: matrix metalloproteinases; miscarriage, recurrent; polymorphism, genetic; pregnancy; tissue inhibitor of metalloproteinases.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. PONAVLJAJUĆI SPONTANI POBAČAJI.....	2
1.2. PONAVLJAJUĆI SPONTANI POBAČAJI POZNATE ETIOLOGIJE.....	2
1.2.1. Negenetički čimbenici u žene.....	2
1.2.1.1. Anomalije maternice.....	3
1.2.1.2. Antifosfolipidni sindrom.....	3
1.2.1.3. Izloženost okolišnim toksinima.....	4
1.2.2. Genetički čimbenici u žene.....	4
1.2.2.1. Dominantne monogenske bolesti vezane uz kromosom X.....	4
1.2.3. Genetički čimbenici u jednog ili oba partnera.....	5
1.2.3.1. Aberacije kromosoma.....	5
1.2.3.1.1. Sporadični spontani pobačaji.....	6
1.2.3.1.2. Ponavljajući spontani pobačaji.....	6
1.2.3.1.2.1. Zametci i plodovi.....	6
1.2.3.1.2.2. Reproduktivni parovi.....	6
1.2.3.1.2.3. Citogenetička analiza.....	7
1.2.3.2. Monogenski poremećaji.....	7
1.2.3.2.1. Alfa-talasemije.....	8
1.2.3.2.2. Miotonična distrofija tipa I.....	8
1.3. PONAVLJAJUĆI SPONTANI POBAČAJI NEPOZNATE ETIOLOGIJE.....	9
1.3.1. Negenetički čimbenici.....	9
1.3.1.1. Endokrinološki poremećaji.....	9
1.3.1.1.1. Šećerna bolest tipa I.....	9
1.3.1.1.2. Hipotireoza.....	9
1.3.1.1.3. Autoimune bolesti štitne žlijezde.....	10
1.3.1.1.4. Sindrom policističnih jajnika.....	10
1.3.1.1.5. Insuficijencija žutog tijela.....	11
1.3.1.1.6. Hiperprolaktinemija i hipoprolaktinemija.....	11
1.3.1.2. Imunosni poremećaji.....	11
1.3.1.2.1. Promjene u broju i aktivnosti perifernih i uterinih NK stanica.....	12
1.3.1.2.2. Promjene u stvaranju citokina.....	12
1.3.1.2.3. Promjene u stvaranju protutijela.....	13
1.3.1.2.4. Imunosno liječenje.....	13
1.3.1.3. Trombofilije.....	13
1.3.1.3.1. Prirodne trombofilije.....	14
1.3.1.3.2. Stečene trombofilije.....	14
1.3.1.3.2.1. Hiperhomocisteinemija.....	14
1.3.1.3.2.2. Stečena rezistencija na protein C.....	15
1.3.1.4. Infektivni čimbenici.....	15
1.3.1.5. Ostali negenetički čimbenici.....	15
1.3.1.5.1. Starosna dob trudnice.....	15
1.3.1.5.2. Indeks tjelesne mase trudnice.....	16
1.3.1.5.3. Izloženost stresu.....	16
1.3.1.5.4. Okolišni čimbenici.....	16
1.3.2. Epigenetički čimbenici.....	16
1.3.2.1. Metilacija DNA molekule.....	17
1.3.2.2. Nenasumična inaktivacija kromosoma X.....	17
1.3.3. Genetički čimbenici.....	17
1.3.3.1. Heteromorfizmi kromosoma.....	18
1.3.3.2. Fragmentacija DNA molekule spermija.....	18
1.3.3.3. Mutacije gena.....	18
1.3.3.4. Genetička varijabilnost.....	19
1.3.3.4.1. Varijacije broja kopija.....	19
1.3.3.4.2. Polimorfizmi jednog nukleotida.....	20

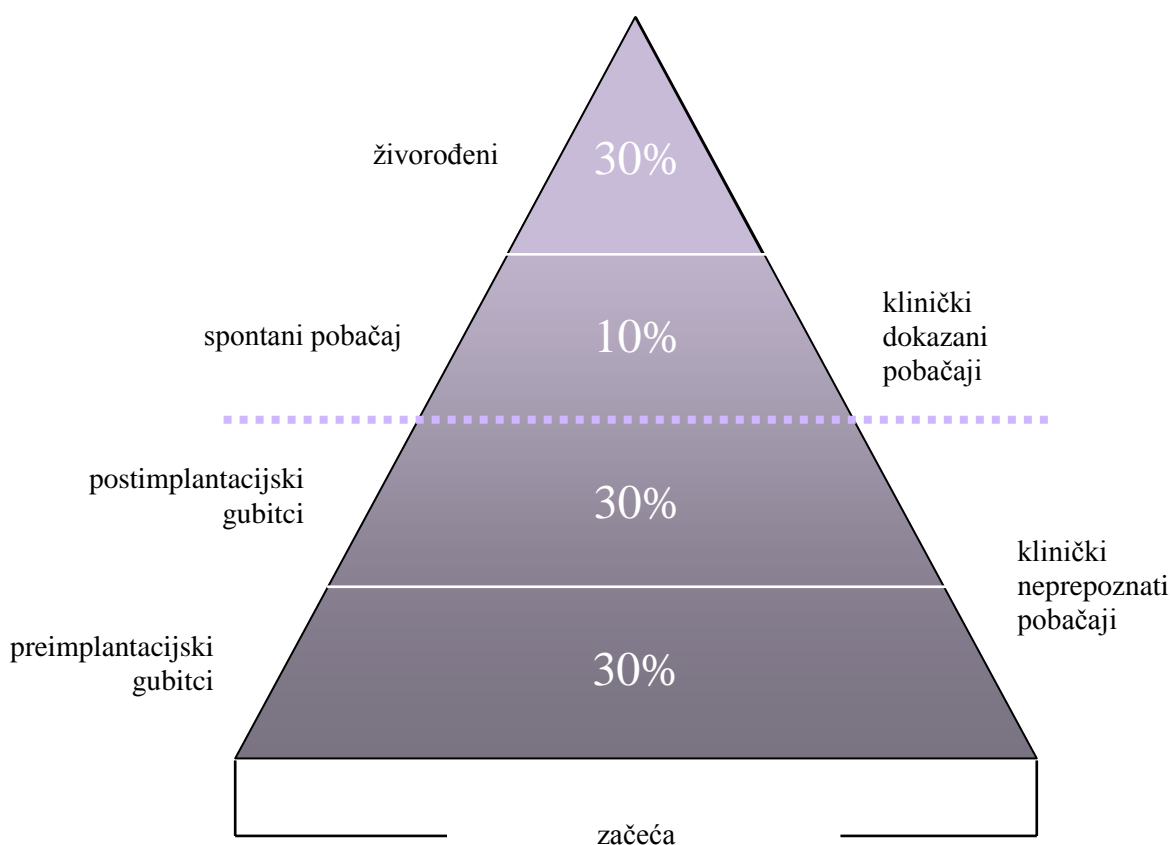
1.3.3.4.2.1. Cjelogenomske analize povezanosti.....	20
1.4. IZVANSTANIČNI MATRIKS ENDOMETRIJA U REPRODUKCIJI ČOVJEKA.....	20
1.4.1. Preoblikovanje izvanstaničnog matriksa endometrija tijekom procesa pre-decidualizacije.....	21
1.4.2. Preoblikovanje izvanstaničnog matriksa endometrija tijekom implantacije i placentacije.....	22
1.4.3. Uloga izvanstaničnog matriksa u patogenezi ponavljajućih spontanih pobačaja nepoznate etiologije.....	23
1.5. ENZIMI OBITELJI MATRIKS METALOPROTEINAZA.....	24
1.5.1. Supstrati.....	25
1.5.2. Odredište djelovanja.....	25
1.5.3. Struktura.....	25
1.5.3.1. Osnovne domene.....	25
1.5.3.2. Dodatne domene.....	26
1.5.4. Mehanizam aktivacije.....	29
1.5.4.1. Aktivacija unutar stanice.....	29
1.5.4.2. Aktivacija izvan stanice.....	29
1.5.4.2.1. Aktivacija pomoću serinskih proteaza.....	29
1.5.4.2.2. Aktivacija pomoću aktiviranih matriks metaloproteinaza.....	30
1.5.5. Uloge.....	30
1.5.5.1. Cijepanje strukturnih proteina izvanstaničnog matriksa.....	30
1.5.5.2. Pretvaranje strukturnih proteina izvanstaničnog matriksa u signalne molekule.....	30
1.5.5.3. Uređivanje aktivnosti nestrukturnih proteina izvanstaničnog matriksa....	31
1.5.6. Nadzor aktivnosti.....	31
1.5.6.1. Razgradnja.....	31
1.5.6.2. Endogeni inhibitori.....	32
1.5.7. Geni obitelji matriks metaloproteinaza.....	33
1.5.7.1. Nadzor izražaja.....	33
1.5.7.1.1. Transkripcijska razina nadzora.....	33
1.5.7.1.2. Funkcionalne polimorfne varijante.....	34
1.6. PROTEINI OBITELJI TKIVNIH INHIBITORA METALOPROTEINAZA.....	35
1.6.1. Struktura.....	36
1.6.2. Mehanizam inhibicije matriks metaloproteinaza.....	36
1.6.3. Uloge.....	36
1.6.3.1. Sprječavanje djelovanja matriks metaloproteinaza.....	36
1.6.3.2. Djelovanje neovisno o inhibiciji matriks metaloproteinaza.....	37
1.6.3.2.1. Vezanje inaktivnih preteča matriks metaloproteinaza.....	37
1.6.3.2.2. Posredovanje staničnih funkcija.....	37
1.6.4. Geni obitelji tkivnih inhibitora metaloproteinaza.....	37
1.6.4.1. Nadzor izražaja.....	37
1.6.4.1.1. Polimorfne varijante.....	38
1.7. ULOGA MATRIKS METALOPROTEINAZA I TKIVNIH INHIBITORA METALOPROTEINAZA U REPRODUKCIJI ČOVJEKA.....	39
1.7.1. Endometrijski ciklus.....	39
1.7.1.1. Izražaj.....	40
1.7.1.1.1. Nadzor izražaja.....	40
1.7.1.2. Uloge tijekom sekretorne faze.....	40
1.7.2. Razdoblje trudnoće.....	41
1.7.2.1. Nadzor izražaja.....	41
1.7.2.2. Decidua.....	42
1.7.2.3. Posteljica podrijetlom od zametka.....	42
1.8. POREMEĆAJ IZRAŽAJA GENA MATRIKS METALOPROTEINAZA I TKIVNIH INHIBITORA METALOPROTEINAZA U PONAVLJAJUĆIM SPONTANIM POBAČAJIMA NEPOZNATE ETIOLOGIJE.....	42

2. PRETPOSTAVKA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	44
3. ISPITANICI I METODE.....	46
3.1. ISPITANICI.....	46
3.2. METODE.....	47
3.2.1. Izolacija genomske DNA molekule.....	47
3.2.2. Analiza genetičke varijabilnosti gena matriks metaloproteinaza i tkivnih inhibitora metaloproteinaza.....	47
3.2.2.1. Lančana reakcija polimeraze.....	47
3.2.2.2. Polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata.....	48
3.2.2.3. Elektroforeza na agaroznom gelu.....	48
3.2.3. Etički aspekti istraživanja.....	55
3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	55
3.3.1. Analiza genotipova i alela.....	56
3.3.2. Analiza haplotipova.....	56
4. REZULTATI.....	57
4.1. ANALIZA POLIMORFNIH VARIJANTI GENA MATRIKS METALOPROTEINAZA.....	58
4.1.1. Ispitanici skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine.....	58
4.1.1.1. Snaga testa.....	58
4.1.1.2. Hardy-Weinbergova ravnoteža.....	58
4.1.1.3. Analiza pojedinačnih genotipova i alela.....	59
4.1.1.4. Analiza kombinacija genotipova.....	64
4.1.1.5. Analiza haplotipova.....	64
4.1.2. Ispitanici podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova.....	66
4.1.2.1. Hardy-Weinbergova ravnoteža.....	66
4.1.2.2. Analiza pojedinačnih genotipova i alela.....	67
4.1.2.3. Analiza kombinacija genotipova.....	72
4.1.2.4. Analiza haplotipova.....	72
4.2. ANALIZA POLIMORFNIH VARIJANTI GENA TKIVNIH INHIBITORA METALOPROTEINAZA.....	74
4.2.1. Ispitanici skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine.....	74
4.2.1.1. Snaga testa.....	74
4.2.1.2. Hardy-Weinbergova ravnoteža.....	74
4.2.1.3. Analiza pojedinačnih genotipova i alela.....	75
4.2.1.4. Analiza kombinacija genotipova.....	81
4.2.1.4.1. Analiza kombinacija genotipova polimorfnih varijanti gena <i>MMP</i> i <i>TIMP</i> obitelji.....	81
4.2.1.5. Analiza haplotipova.....	81
4.2.2. Ispitanici podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova.....	83
4.2.2.1. Hardy-Weinbergova ravnoteža.....	83
4.2.2.2. Analiza pojedinačnih genotipova i alela.....	84
4.2.2.3. Analiza kombinacija genotipova.....	89
4.2.2.3.1. Analiza kombinacija genotipova polimorfnih varijanti gena <i>MMP</i> i <i>TIMP</i> obitelji.....	89
4.2.2.4. Analiza haplotipova.....	90
5. RASPRAVA.....	91
5.1. VARIJABILNOST GENA <i>MMP</i> OBITELJI U PAROVA S IPSP-OM.....	92
5.2. VARIJABILNOST GENA <i>TIMP</i> OBITELJI U PAROVA S IPSP-OM.....	105
5.3. VARIJABILNOST GENA <i>MMP</i> I <i>TIMP</i> OBITELJI U PAROVA S PRIMARNIM I SEKUNDARNIM IPSP-OM.....	108
5.4. NEDOSTACI I PREDNOSTI ISTRAŽIVANJA.....	110
5.5. BUDUĆE SMJERNICE.....	111
6. ZAKLJUČCI.....	112
7. LITERATURA.....	113
8. ŽIVOTOPIS.....	143

1. UVOD

U usporedbi s drugim vrstama reprodukcija u čovjeka je relativno neuspješan proces (1,2). Vjerojatnost začeća u odnosu na pojedini menstruacijski ciklus, izražena kao mjesečni stupanj plodnosti (engl. *monthly fecundity rate*), iznosi 20 %, a iznad 40. godine svega 5 % (3). Nadalje, oko 20 % reproduktivnih parova je neplodno, dok je u nekim državama plodnost nesrazmjerna održivosti populacije (4). Osim toga, uz trudnoću su vezana brojna patološka stanja, uključujući spontani pobačaj kao najčešću komplikaciju (1,2).

Spontani pobačaj je neželjeni gubitak zametka, odnosno ploda težine manje od 500 grama prije 22. tjedna gestacije (1,2,5). Otprilike 70 % svih trudnoća završava spontanim pobačajem, što upućuje na visoku selektivnost toga procesa (slika 1) (6,7). Mogući mehanizmi kontrole uspješnosti, odnosno nadzora probira zametaka i plodova posebno su važni u ranoj trudnoći, s obzirom na to da se oko 90 % spontanih pobačaja dogodi prije 12. tjedna gestacije (1,2,6,8).



Slika 1. Piramida ishoda trudnoće u čovjeka (preuzeto iz ref. 3 i 6)

1.1. PONAVLJAJUĆI SPONTANI POBAČAJI

Prema obrascu pojavljivanja, spontani pobačaji se dijele na sporadične i ponavljajuće. Sporadični spontani pobačaji (SSP) se odnose na jedan ili više pojedinačnih, neuzastopnih gubitaka trudnoće, koji nastaju kao posljedica neponavljajućih poremećaja u razvoju zametka ili ploda, od kojih su najčešće aberacije kromosoma (1,2,6). Za razliku od SSP-a, unatoč smjernicama različitih strukovnih udruženja, ne postoji jedinstveno određenje niti usuglašen postupnik za kliničku obradu i liječenje parova s ponavljajućim spontanim pobačajima (PSP; engl. *recurrent spontaneous abortion, recurrent miscarriage, habitual miscarriage*) (9-14). Razlike između smjernica posebno se očituju u određenju PSP-a s obzirom na broj i slijed spontanih pobačaja (1,15,16). Također, mnogi su klinički testovi i metode liječenja uvršteni u određene postupnike unatoč nedostatku znanstvenih dokaza (15).

Prema smjernicama Europskog Udruženja za Humanu Reprodukciju i Embriologiju (engl. *European Society of Human Reproduction and Embryology; ESHRE*) kriteriji za dijagnozu PSP-a uključuju reproduktivne parove s tri ili više uzastopnih spontanih pobačaja, uz prevalenciju od 1 % plodnih parova (9). Dosljednost navedenih smjernica za kliničku obradu i liječenje parova s PSP-om temelji se na dokazima izvedenim iz randomiziranih kontroliranih istraživanja i meta-analiza (9). Nadalje, PSP se dijeli na primarni i sekundarni, ovisno imaju li parovi isključivo uzastopne spontane pobačaje ili, uz to, i barem jedno živorođeno dijete (2,17).

Ponavljajući spontani pobačaji čine skupinu raznorodne i uglavnom nepoznate etiologije. Poznati uzroci PSP-a mogu se pronaći u 50 % parova, dok se preostali svrstavaju u skupinu ponavljajućih spontanih pobačaja nepoznate etiologije ili idiopatskih PSP-a (IPSP) (2,9,13,15).

1.2. PONAVLJAJUĆI SPONTANI POBAČAJI POZNATE ETIOLOGIJE

Poznati uzroci PSP-a uključuju negenetičke i genetičke čimbenike u žene, kao i genetičke čimbenike u jednog ili oba partnera (9,18).

1.2.1. NEGENETIČKI ČIMBENICI U ŽENE

Dokazani negenetički uzroci PSP-a u žena su anomalije maternice, antifosfolipidni sindrom i izloženost okolišnim toksinima (9).

1.2.1.1. Anomalije maternice

Anomalije maternice čine raznovrsnu skupinu prirodnih i stečenih poremećaja strukture maternice. Mogu biti bez simptoma ili, pak, uzrokom menstruacijskih poremećaja, kao i različitih poremećaja reprodukcije, uključujući PSP (19). Prirodene anomalije povezane s PSP-om su arkuatna, jednoroga, dvoroga i dvostruka maternica te različiti stupnjevi pregrađene maternice, a nastaju zbog poremećaja u razvoju Müllerovih kanala (19-22). Stečeni poremećaji koji mogu biti uzrokom PSP-a su dobroćudne novotvorine - submukozni miomi i polipi, te intrauterine adhezije, koje nastaju kao posljedica kiretaže ili endometritisa (21). Učestalost anomalija maternice u žena opće populacije je oko 4 %, a onih s PSP-om oko 15 % (1,19,20,23).

Spontani pobačaji u žena s anomalijama maternice najčešće se događaju krajem prvog ili u drugom tromjesečju trudnoće zbog smanjene veličine materišta, nedostatne sposobnosti rastezanja maternice, kao i poremećaja razvoja i funkcije endometrija, miometrija i/ili vrata maternice (19,23). Dijagnostička obrada se preporučuje nakon drugog spontanog gubitka trudnoće (24), a izbor u liječenju za određene anomalije je kirurški zahvat, koji dovodi do uspješnog ishoda naredne trudnoće u oko 85 % žena (19,20).

1.2.1.2. Antifosfolipidni sindrom

Antifosfolipidni sindrom je najčešća stečena trombofilija, obilježena trajnom prisutnošću protutijela protiv negativno nabijenih fosfolipida membrana i proteina vezanih za njih (25,26). Zajedničkim nazivom antifosfolipidna protutijela obuhvaćeni su lupus antikoagulans, antikardiolipinska, β 2-glikoprotein-1 i brojna druga protutijela. Osnovna klinička obilježja antifosfolipidnog sindroma su barem dva pozitivna laboratorijska nalaza antifosfolipidnih protutijela u razmaku od najmanje 12 tjedana, uz komplikacije u trudnoći i/ili vaskularnu trombozu (25,26). Komplikacije u trudnoći povezane s antifosfolipidnim sindromom su tri ili više spontanih pobačaja prije 10. tjedna trudnoće, smrt jednog ili više morfološki normalnih plodova iza 10. tjedna trudnoće ili barem jedan prijevremeni porod morfološki normalnog nedonošeta prije 34. tjedna trudnoće zbog preeklampsije, eklampsije ili insuficijencije posteljice (25,26). Antifosfolipidni sindrom prisutan je u

otprilike 15 % žena s PSP-om, a pretrage na antifosfolipidna protutijela dio su uobičajene kliničke obrade nakon drugog uzastopnog ili neuzastopnog spontanog pobačaja (9,27,28).

Patogeneza PSP-a u žena s antifosfolipidnim protutijelima nije poznata, no predloženo je nekoliko mehanizama, uključujući trombozu krvnih žila posteljice i promjenu bioloških svojstava trofoblasta (29). Naime, antifosfolipidna protutijela se vežu na aktivirane endotelne stanice potičući nastanak krvnog ugruška i sprječavajući angiogenezu (30). Istovremeno, antifosfolipidna protutijela se vežu na stanice trofoblasta sprječavajući njihovu proliferaciju, diferencijaciju i invazivnost, kao i stvaranje brojnih molekula važnih u trudnoći (29-31).

Liječenje trudnica s antifosfolipidnim sindromom i PSP-om bez prethodnih tromboza uključuje kombinaciju aspirina i heparina, što dovodi do uspješnog ishoda trudnoće u oko 80 % žena u usporedbi s manje od 50 % žena bez liječenja (26,30,32,33).

1.2.1.3. Izloženost okolišnim toksinima

Izloženost trudnice ionizirajućem zračenju ili raznim okolišnim toksinima, uključujući organska otapala, alkohol, živu i/ili olovo, može uzrokovati spontani pobačaj (9,34). Utjecaj na ishod trudnoće ovisi o duljini izloženosti i tjednu trudnoće u kojem je trudnica bila izložena (34). Mehanizmi kojima toksini uzrokuju spontani pobačaj nisu potpuno razjašnjeni.

1.2.2. GENETIČKI ČIMBENICI U ŽENE

Genetički čimbenici u žena koji izravno pridonose PSP-u su dominantne monogenske bolesti vezane uz kromosom X (35).

1.2.2.1. Dominantne monogenske bolesti vezane uz kromosom X

Dominantne monogenske bolesti vezane uz kromosom X nastaju kao posljedica mutacija jednog ili oba alela nekog gena na kromosomu X u žena, odnosno jedinog alela u muškaraca. Neke od tih bolesti spojive su sa životom isključivo u žena, dok su u njihovih muških potomaka koji naslijede mutaciju letalne, očitujući se kao PSP u drugom ili trećem tromjesečju trudnoće (35,36). Primjeri, lokusi uzročnih gena i osnovna obilježja bolesti letalnih za muškarce prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Dominantne bolesti vezane uz kromosom X, letalne u plodova muškog spola (37)

Naziv bolesti	OMIM ^a	Gen	Lokus	Obilježja u žena
Aicardi sindrom	%304050	?	Xp22	ageneza korpusa kalozuma, infantilni spazmi, korioretinalne lakune
Fokalna dermalna hipoplazija	#305600	<i>PORCN</i> ^b	Xp11.23	atrofija i linearna pigmentacija kože, multipli papilomi, anomalije šake
Hondrodisplazija punktata tip 2	#302960	<i>EBP</i> ^c		punktiformne kalcifikacije u epifizama, niski rast, poremećaji pigmentacije kože
Incontinentia pigmenti	#308300	<i>NEMO</i> ^d	Xq28	poremećaj pigmentacije kože, anomalije oči, zubi, srca
Orofaciodigitalni sindrom tip 1	#311200	<i>OFD1</i> ^e	Xp22.2	sinehije u usnoj šupljini, anomalije prstiju, kraniofacijalna dismorfija
Rett sindrom	#312750	<i>MeCP2</i> ^f	Xq28	mentalna retardacija, stereotipni pokreti rukama, dispraksija

^aengl. *Online Mendelian Inheritance in Man*; ^bengl. *Porcupine homolog of Drosophila*; ^cengl. *Delta(8)-delta(7) sterol isomerase emopamil-binding protein*; ^dengl. *NF-kappa-B essential modulator*; ^eengl. *Orofaciodigital syndrome 1*; ^fengl. *Methyl-CpG-binding protein 2*

1.2.3. GENETIČKI ČIMBENICI U JEDNOG ILI OBA PARTNERA

Genetički čimbenici koji dokazano uzrokuju PSP ako su prisutni u jednog ili oba partnera uključuju aberacije kromosoma i monogenske poremećaje (9).

1.2.3.1. Aberacije kromosoma

Visoka učestalost promjena broja i/ili strukture kromosoma pridonosi neuspješnoj reprodukciji u ljudi, u usporedbi s drugim vrstama (6). Aberacije kromosoma u najranijem razdoblju razvoja čovjeka su česte i složene, a posljedica su pogrešaka u mejotičkim ili postzigotnim mitotičkim diobama (38,39). Iako je precizna učestalost kromosomskih aberacija u prirodno začetih zametaka nepoznata, otprilike 90 % zametaka začetih metodama potpomognute oplodnje ima različite numeričke i strukturne promjene kromosoma (38). Aberacije kromosoma zametaka i plodova uzrok su oko 50 % spontanih pobačaja, većinom u prvih 12 tjedana trudnoće (40). Incidencija nebalansiranih aberacija kromosoma opada s trajanjem trudnoće te u živorođene djece iznosi oko 0,5 % (6,41,42).

1.2.3.1.1. Sporadični spontani pobačaji

Aberacije kromosoma najčešći su uzrok SSP-a u ljudi, s prevalencijom od 50 % spontano pobačenih zametaka i plodova (40). Oko 90 % čine numeričke aberacije, većinom trisomije tjelesnih kromosoma, monosomija kromosoma X i poliploidije, dok su u preostalim slučajevima prisutne strukturne aberacije, mozaicizam te složene trisomije (40,42-44). Kariotipizacija spontano pobačenih plodova i reproduktivnih parova nakon jednog spontanog pobačaja nije dio uobičajene kliničke obrade, s obzirom na to da numeričke aberacije većinom nastaju kao posljedica *de novo* mutacija, a mirni nositelji strukturnih aberacija kromosoma čine svega 2,2 % parova sa SSP-om (40,42-45).

1.2.3.1.2. Ponavljajući spontani pobačaji

1.2.3.1.2.1. Zametci i plodovi

Slično kao u SSP-u, aberacije kromosoma su prisutne u oko 60 % spontano pobačenih zametaka i plodova reproduktivnih parova s PSP-om (40,46,47). Obrazac aberacija također je usporediv s onim u SSP-u. Tako, numeričke aberacije čine oko 90 % od ukupnih, uključujući trisomije tjelesnih kromosoma, monosomiju kromosoma X i poliploidije, a strukturne aberacije 3 % slučajeva (40,43,48). Spontano pobačeni plodovi euploidnog kariotipa češći su u žena mlađih od 36 godina, a učestalost raste i s brojem spontanih pobačaja, upućujući na druge uzročne čimbenike PSP-a (1,48).

1.2.3.1.2.2. Reproductivni parovi

Balansirane strukturne aberacije kromosoma prisutne su u jednog od partnera u oko 4 % reproduktivnih parova s PSP-om u usporedbi s 0,2 % ljudi u općoj populaciji (18,43,45,49,50). Oko 80 % strukturnih aberacija kromosoma u parova s IPSP-om čine recipročne i Robertsonove translokacije, dok su paracentrične i pericentrične inverzije rjeđe (45,49). Iako se drži da balansirane strukturne aberacije kromosoma ne uzrokuju fenotipske promjene u mirnih nositelja, ovisno o razdvajanju kromosoma tijekom mejotičkih dioba mogu nastati spolne stanice s normalnim, balansiranim ili nebalansiranim kariotipom (43). Potonji može uzrokovati spontani pobačaj, mrtvorodenost ili razvojne anomalije zametka (49).

1.2.3.1.2.3. Citogenetička analiza

Citogenetička analiza spontano pobačenih plodova nije uobičajena pretraga u kliničkoj obradi reproduktivnih parova s PSP-om (9). Unatoč tome, neki znanstvenici ističu važnost kariotipizacije plodova nakon drugog spontanog pobačaja s obzirom na visok postotak numeričkih aberacija, čime bi se pravilno usmjerila daljnja klinička obrada (8,51-53).

S obzirom na visoku učestalost strukturnih aberacija kromosoma u reproduktivnih parova s PSP-om, kariotipizacija oba partnera čini dio osnovne kliničke obrade (9,54). Kariotipizacija se provodi ciljano, kada je vjerojatnost da je jedan od partnera mirni nositelj veća od 2,2 %, što je incidencija nositeljstva nakon jednog spontanog pobačaja (9,45) (tablica 2). Na povećan rizik za nositeljstvo, osim broja spontanih pobačaja, utječe mlađa dob žene pri drugom spontanom pobačaju (≤ 36 godina), kao i dva ili više spontanih pobačaja u brata, sestre ili roditelja jednog od partnera (9,45). Oprečno, rezultati pojedinih istraživanja upućuju da nalaz kariotipizacije reproduktivnih parova s PSP-om nije predskazatelj ishoda narednih trudnoća, jer je učestalost živorođenosti ista u parova u kojih je jedan partner mirni nositelj balansirane strukturne aberacije kromosoma, kao i onih koji imaju uredan kariotip (45,51,55,56).

Ako je jedan od partnera mirni nositelj, u narednim trudnoćama se preporučuje prenatalna dijagnostika (18,49,55). Uvođenjem preimplantacijske genetičke dijagnostike, metode genetičkog probira zametaka prije implantacije, držalo se kako će utvrđivanje nebalansiranih strukturnih aberacija kromosoma u zametaka smanjiti učestalost spontanih pobačaja u parova s PSP-om u kojih je jedan od partnera mirni nositelj (49). Međutim, preimplantacijska genetička dijagnostika, u usporedbi sa spontanim začećem, ne povećava broj živorođenosti u tih parova (1,43,49,57,58).

1.2.3.2. Monogeniski poremećaji

Alfa-talasemija i miotonična distrofija tip 1 su monogenske bolesti koje pridonose povećanom riziku za spontani pobačaj u drugom ili trećem tromjesečju trudnoće (35).

Tablica 2. Vjerojatnost nositeljstva u parova s dva ili više spontana pobačaja (prema ref. 9 i 45)

Dob žene pri drugom SP-u (godine)	≥2 SP-a u brata ili sestre	≥2 SP-a u roditelja para s PSP-om			
		+		-	
		Par s ≥3 SP-a (%)	Par s 2 SP-a (%)	Par s ≥3 SP-a (%)	Par s 2 SP-a (%)
<23	+	10,2	7,3	7,3	5,2
	-	5,7	4,0	4,1	2,8
23-33	+	10,0	7,2	7,2	5,1
	-	5,7	4,0	4,0	2,8
34-36	+	5,8	4,1	4,1	2,9
	-	3,2	2,2	2,2	1,6
37-38	+	4,0	2,8	2,8	2,0
	-	2,2	1,5	1,5	1,1
≥39	+	1,8	1,2	1,3	0,9
	-	1,0	0,7	0,7	0,5

SP - spontani pobačaj; Siva područja –kariotipizacija nije obavezna, jer je vjerojatnost za nositeljstvo manja od 2,2 %

1.2.3.2.1. Alfa-talasemije

Talasemije su raznovrsna skupina genetičkih poremećaja nedostatnog stvaranja globinskih lanaca, koji izgrađuju hemoglobin. Nedostatno ili odsutno stvaranje α -globinskog lanca obilježje je alfa-talasemija, skupine autosomno recesivnih poremećaja uzrokovanih različitim stupnjevima delecija gena *HBA* (engl. *hemoglobin-alpha locus*)-1 i/ili -2, smještenih u α -globinskom klasteru gena na kromosomu 16p13.3 (37). Ako su oba reproduktivna partnera heterozigoti za delecije *HBA-1* i -2 gena ili uzvodne nadzorne regije na istom kromosomu, zametak može naslijediti deleciju sva četiri alela *HBA-1* i -2 u homozigotnom obliku. Navedeno je uzrok letalnog oblika α -talasemije, sindroma fetalnog hidropsa hemoglobina Bart, koji završava spontanim pobačajem zbog posljedica generaliziranih edema uzrokovanih teškom anemijom i zatajenjem srca (35,37).

1.2.3.2.2. Miotonična distrofija tipa I

Miotonična distrofija tipa I je autosomno dominantni poremećaj uzrokovan produljenjem trinukleotidnih ponavljanja slijeda citozina, timina i gvanina u 3' neprevedenoj regiji gena *DMPK*

(engl. *dystrophia myotonica-protein kinase*), smještenog na kromosomu 19q13.3 (37). Osobe s miotoničnom distrofijom tipa I imaju povećan rizik od spontanih pobačaja. Naime, zbog produljenja uzročnih ponavljanja tijekom mejotičkih dioba, potomci mogu naslijediti alele veće duljine, koji dovode do ranije pojave i teže kliničke slike nego u roditelja (59). Krajnja produljenja, s više od 150 ponavljanja, uzrok su težih oblika bolesti, koji često završavaju spontanim pobačajem (37).

1.3. PONAVLJAJUĆI SPONTANI POBAČAJI NEPOZNATE ETIOLOGIJE

U reproduktivnih parova s IPSP-om predložene su brojne hipoteze i istraživani razni negenetički, epigenetički i genetički čimbenici koji bi mogli pridonijeti razumijevanju etiologije IPSP-a, ali niti za jedne nije utvrđena konačna i nedvosmislena povezanost (1,9).

1.3.1. NEGENETIČKI ČIMBENICI

Negenetički čimbenici koji su istraživani kao mogući čimbenici podložnosti za IPSP uključuju endokrinološke i imunosne poremećaje, trombofilije, te infektivne i ostale čimbenike.

1.3.1.1. Endokrinološki poremećaji

1.3.1.1.1. Šećerna bolest tipa I

Povezanost šećerne bolesti tipa I i IPSP-a nije dovoljno istražena, iako oko 20 % trudnoća u žena s neliječenom ili nedostatno liječenom šećernom bolešću ovisnom o inzulinu završava spontanim pobačajem (27,60,61). Iz navedenog je razloga, kao i mogućnosti pravovremenog liječenja, određivanje glikoziliranog hemoglobina (Hb_{A1c}) dio uobičajene kliničke obrade žena s PSP-om (9). Međutim, dobro nadzirana šećerna bolest i normalne razine glukoze prije i tijekom trudnoće ne pridonose etiologiji spontanog pobačaja (9,12,16,27,61). Mehanizmi kojima povišene razine glukoze u krvi dovode do spontanog pobačaja nisu posve poznati (60).

1.3.1.1.2. Hipotireoza

Klinički izražena hipotireoza u žena, kao i subklinička hipotireoza, koja se očituje isključivo povišenim razinama tireostimulirajućeg hormona, povezivane su s različitim komplikacijama u

trudnoći. Međutim, utjecaj kliničke i subkliničke hipotireoze na rizik za SSP i IPSP je prijeporan s obzirom na to da nije jednoznačno utvrđen u svim istraživanjima, a patogenetski mehanizmi nisu razjašnjeni (62). Također, dobro liječeni poremećaji funkcije štitne žlijezde ne uzrokuju spontani pobačaj (1,9,12,27,63). No, s obzirom na mogućnost liječenja klinički izražene hipotireoze, uobičajena klinička obrada žena s PSP-om uključuje ispitivanje funkcije štitne žlijezde (9,64).

1.3.1.1.3. Autoimune bolesti štitne žlijezde

Autoimune bolesti štitne žlijezde, obilježene prisutnošću autoprotutijela protiv njenih sastavnica, najčešći su autoimuni poremećaji u žena reproduktivne dobi, s incidencijom do 15 % (63). Navedena protutijela mogu uzrokovati poremećaj funkcije štitne žlijezde, ali mogu biti i bez simptoma. Žene s autoprotutijelima protiv sastavnica štitne žlijezde, neovisno o njenoj funkciji, imaju tri puta veći rizik za SSP te dva puta veći rizik za PSP i prijevremeni porod u usporedbi sa ženama bez autoprotutijela (63,65,66). Unatoč tome, povezanost s IPSP-om se drži prijepornom zbog oprečnih rezultata i malog broja istraživanja iz kojih su zaključci izvedeni (18,66,67).

Spontani pobačaj u žena s navedenim autoprotutijelima moguće je posljedica subkliničke hipotireoze ili poremećene funkcije imunskih stanica na majčino-fetalnom spoju, kao i stvaranja ključnih molekula u trudnoći (68). Iako liječenje levotiroksinom umanjuje rizik za spontani pobačaj za 52 %, rezultati su izvedeni iz svega dva istraživanja (63-65).

1.3.1.1.4. Sindrom policističnih jajnika

Sindrom policističnih jajnika je najčešći endokrini poremećaj u žena reproduktivne dobi, s prevalencijom od 15 % (69). Obilježen je povećanim stvaranjem androgena, izostankom ovulacije i policističnim jajnicima. Iako je etiologija nepoznata, drži se kako su prekomjerno stvaranje luteinizacijskog hormona, kao i promjene u signalnom putu inzulina i metabolizma glukoze u podlozi nastanka sindroma. Naime, neosjetljivost na inzulin i posljedična hiperinzulinemija sprječavaju stvaranje globulina koji veže spolne hormone, povećavajući razinu slobodnog testosterona i stvaranje androgena u teka stanicama jajnika, koji negativno utječu na sazrijevanje endometrija tijekom sekretorne faze (69). Stoga je infertilitet često obilježje u žena sa sindromom policističnih jajnika, a

predložena je i uzročna povezanost s IPSP-om. Međutim, učestalost spontanih pobačaja i živorođenosti u tih žena jednaka je onoj u općoj populaciji (9,69).

1.3.1.1.5. Insuficijencija žutog tijela

Insuficijencija žutog tijela je poremećaj u kojem razine progesterona koje stvara žuto tijelo jajnika nisu dostatne ili se ne stvaraju kroz dovoljno dugo razdoblje da bi održale normalnu funkciju endometrija tijekom sekretorne faze (70). Posljedično, sazrijevanje endometrija je usporeno, što sprječava normalnu implantaciju i razvoj zametka (70,71). Stoga se drži kako bi insuficijencija žutog tijela mogla biti uzrokom IPSP-a, međutim, dokazi o uzročnoj povezanosti nisu pronađeni, a liječenje progesteronom ne utječe na ishod trudnoće (9,18). Štoviše, navedeni je poremećaj opisan i u žena normalne reproduktivne sposobnosti (70). Nadalje, ne postoje ujednačeni kriteriji za postavljanje dijagnoze insuficijencije žutog tijela, pa mjerenje razine progesterona i biopsija endometrija tijekom sekretorne faze nisu dio kliničke obrade žena s PSP-om (9,70,71).

1.3.1.1.6. Hiperprolaktinemija i hipoprolaktinemija

Iako precizne uloge hormona prolaktina u reprodukciji čovjeka nisu dovoljno istražene, poznato je da sudjeluje u nadzoru funkcije jajnika, kao i procesa pre-decidualizacije (72). Povišene i snižene razine prolaktina u serumu žena predložene su kao uzročni čimbenik IPSP-a, no rezultati istraživanja su oprečni (9,18,73). Nadalje, utjecaj povišenih i sniženih razina prolaktina u serumu na održanje trudnoće nije dovoljno istražen, a drži se kako su za uspješnu pre-decidualizaciju i implantaciju važnije njegove razine u endometriju (72).

1.3.1.2. Imunosni poremećaji

Obilje literature o uzročnosti IPSP-a čine istraživanja moguće povezanosti s različitim poremećajima imunskog sustava u žena. Pretpostavka o IPSP-u posredovanom imunskim mehanizmima proizšla je iz opažanja da je zametak, odnosno plod, trudnici antigeno djelomično nepoznat, jer na stanicama trofoblasta izražava antigene glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. *human leukocyte antigens*; HLA) nasljeđene od muškog partnera (74,75). Drži se da imunski sustav

trudnice s IPSP-om potiče neprimjeren imunski odgovor, odbacivanje ploda i spontani pobačaj (76,77). Međutim, s obzirom na to da je imunski odgovor jedan od izvršnih sustava nadzora trudnoće, nedostaje odgovor na pitanje što je uzrok takvom poremećenom odgovoru. Također, postoji težnja primjene rezultata dobivenih na životinjskim modelima na ljude (3,76). Konačno, poseban problem čine istraživanja spontanih pobačaja u miševa, u kojih je većina zametaka normalnog kariotipa, što u ljudi nije slučaj (8).

Imunski poremećaji povezivani s IPSP-om u žena uključuju promjene u broju i aktivnosti perifernih i uterinih prirodnoćeljskih stanica (engl. *natural killer cells*; NK), stvaranju citokina, kao i protutijela. No, unatoč opsežnim istraživanjima, meta-analize nisu pokazale uzročnu povezanost, osim za antifosfolipidna protutijela (67). Kao nedostaci istraživanja navode se nedosljednosti u metodologiji i kriterijima odabira žena s IPSP-om, neprovođenje kariotipizacije spontano pobačenih zametaka, oprečni rezultati te njihovo neujednačeno tumačenje (67,76).

1.3.1.2.1. Promjene u broju i aktivnosti perifernih i uterinih NK stanica

Prirodnoćeljske stanice su vrsta limfocita važna u urođenoj imunosti, a dijele se na periferne (pNK) i uterine NK stanice (uNK), koje se razlikuju fenotipski i funkcionalno (78). Uterine NK stanice ulaze u endometrij tijekom procesa (pre)decidualizacije, čineći za vrijeme implantacije i rane trudnoće 40 % ukupnih i 70 % bijelih krvnih stanica (79). Na majčino-fetalnom spoju djeluju zajedno sa stanicama trofoblasta, sudjelujući u invaziji, preoblikovanju izvanstaničnog matriksa decidue, angiogenezi, kao i uređivanju imunskog odgovora (74,79-81). Međutim, promjene broja i aktivnosti pNK i uNK stanica prije implantacije nisu povezane s IPSP-om, odnosno nemaju predviđajnu vrijednost za uspješan ishod narednih trudnoća (78). Također, osim prethodno istaknutih nedostataka opazajnih istraživanja, navodi se nepostojanje normiranih vrijednosti pNK i uNK stanica (76,78).

1.3.1.2.2. Promjene u stvaranju citokina

Citokini su signalne molekule koje djeluju kao proupalni i protuupalni posrednici imunskog odgovora (82,83). U normalnoj trudnoći, snošljivost genetički djelomično nesrodnog ploda ovisi o međudjelovanju niza citokina koje stvaraju stanice trofoblasta i decidue, uključujući T-limfocite,

makrofage i uNK stanice (82). Glavni izvor citokina na majčino-fetalnom spoju su pomagački T-limfociti (engl. *T-helper cells*; Th), koji se prema vrsti stvorenih posrednika dijele na Th1 i Th2 stanice (82,83). Iako se prvotno pretpostavljalo da je za uspješan tijek trudnoće nužno stvaranje odgovarajućeg omjera Th1 i Th2 citokina (74), otkrićem važnih uloga proupalnih Th17 i regulatornih T stanica (engl. *regulatory T cells*; T_{reg}), Th1/Th2 paradigma proširena je u Th1/Th2/Th17 i paradigmu T_{reg} stanica (82,84). U žena s IPSP-om istraživane su razine Th1 i Th2 citokina, kao i broj Th17 i T_{reg} stanica u perifernoj krvi i decidui, ali rezultati istraživanja nisu jednoznačni (76,82).

1.3.1.2.3. Promjene u stvaranju protutijela

Kao mogući uzročni čimbenik IPSP-a predložena je prisutnost različitih auto- ili aloprotutijela u žena, uključujući protutijela protiv sastavnica trofoblasta, spermija, endotelne stanice i HLA muškog partnera (67). Međutim, njihov doprinos IPSP-u nije konačno utvrđen, uz iznimku antifosfolipidnih protutijela, prethodno opisanih na str. 3.

1.3.1.2.4. Imunosno liječenje

S obzirom na to da su poremećaji imunskog sustava predloženi kao mogući uzrok IPSP-a, pretpostavljalo se kako bi različite vrste imunskog liječenja, pojedinačno ili u kombinaciji, mogle povećati broj uspješno iznesenih trudnoća u žena s IPSP-om. Proveden je niz istraživanja utjecaja prednizona, intravenskih imunoglobulina, imunizacije leukocitima muškog partnera ili nesrodnih davatelja, kao i infuzije membrana trofoblasta, na smanjenje broja spontanih pobačaja (1). Međutim, niti jedno od navedenih liječenja ne utječe na ishod naredne trudnoće u žena s IPSP-om (18,85-88).

1.3.1.3. Trombofilije

Uspostavljanje pravilnog protoka krvi na majčino-fetalnom spoju nužno je za normalan razvoj posteljice i ploda, odnosno uspješnost trudnoće. Stoga su brojna istraživanja etiologije IPSP-a usmjerena na trombofilije, raznovrsnu skupinu prirođenih i stečenih poremećaja zgrušavanja krvi koji povećavaju rizik od nastanka tromboze. Drži se kako fiziološko stanje povećane sklonosti zgrušavanja

krvi u trudnoći udruženo s trombofilijom dovodi do znatno povišenog rizika za stvaranje ugrušaka u krvnim žilama posteljice te, posljedično, insuficijencije posteljice (89).

1.3.1.3.1. Prirodene trombofilije

Prirodene trombofilije nastaju kao posljedica mutacija u genima koji kodiraju čimbenike zgrušavanja i druge molekule važne u zgrušavanju krvi. Unatoč potvrđenoj povezanosti prirodnih trombofilija i venske tromboembolije, uzročna povezanost s IPSP-om je prijeporna. Proveden je niz istraživanja povezanosti IPSP-a i prirodnog nedostatka proteina C i S, mutacija u genima za čimbenike zgrušavanja II i V, kao i varijabilnosti gena *PAI-1* (engl. *plasminogen activator inhibitor-1*) i *MTHFR* (engl. *methylenetetrahydrofolate reductase*). Iako žene s nekom od prirodnih trombofilija imaju povećan relativni rizik od razvoja venskih tromboembolija i komplikacija u trudnoći, apsolutni rizik je nizak (90,91). Osim toga, rezultati probira za trombofiliju mogu biti promijenjeni u otprilike 20 % žena bez komplikacija u trudnoći (92). Također, nedosljednosti u metodologiji, neujednačeni kriteriji odabira i mali broj ispitanica glavni su nedostaci provedenih istraživanja (93). Stoga, genetičko testiranje za prirodene trombofilije nije dio uobičajene kliničke obrade žena s PSP-om (9,89,90,93). Naposljetku, liječenje aspirinom i/ili niskomolekularnim heparinom ne utječe na ishod naredne trudnoće u tih žena (1,89-91,93,94).

1.3.1.3.2. Stečene trombofilije

Od stečenih trombofilija istraživana je povezanost IPSP-a i antifosfolipidnog sindroma, hiperhomocisteinemije te stečene rezistencije na aktivirani protein C (90,95). Jedina stečena trombofilija izravno povezana s IPSP-om je antifosfolipidni sindrom, prethodno opisan na str. 3.

1.3.1.3.2.1. Hiperhomocisteinemija

Homocistein je aminokiselina čije povišene razine mogu biti posljedica različitih okolišnih čimbenika, poput nedostatnog unosa folne kiseline, vitamina B6 ili 12 (95). Hiperhomocisteinemija moguće sprječava aktivaciju proteina C i neovisni je čimbenik rizika za venske tromboembolije. Iako meta-analize upućuju da je hiperhomocisteinemija u žena mogući čimbenik rizika za PSP, kriteriji

odabira ispitanika i tumačenje rezultata se razlikuju te se ne mogu izvući konačni zaključci (9,90,96). Također, za razliku od potvrđene dobrobiti preparata folne kiseline u prevenciji poremećaja zatvaranja neuralne cijevi, učinak na prevenciju spontanog pobačaja nije poznat (1,97).

1.3.1.3.2.2. Stečena rezistencija na protein C

Protein C je prirodni antikoagulans koji sprječava pretvorbu fibrinogena u fibrin razgradnjom čimbenika V i VIII. Stečena rezistencija na aktivirani protein C očituje se nemogućnošću razgradnje navedenih čimbenika, a nastaje kao posljedica različitih uzroka. Povezanost s PSP-om u žena je dvojbeno s obzirom na oprečne rezultate, kao i mali broj istraživanja (95).

1.3.1.4. Infektivni čimbenici

Zaraze različitim bakterijama (npr. *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Listeria monocytogenes*), virusima (npr. Herpes simplex virus, Parvovirus B19, Citomegalovirus) i parazitima (npr. *Toxoplasma gondii*) potvrđeni su uzrok SSP-a (18). Patogeneza spontanog pobačaja je raznovrsna i nije potpuno poznata, a moguće je posredovana imunskim mehanizmima. Međutim, s obzirom na to da se većina navedenih infekcija ne ponavlja, nema dokaza o izravnoj povezanosti s IPSP-om (9,16,18,27,35). Stoga, mikrobiološke pretrage, uključujući pretrage za TORCH (toksoplazmoza, ostali, rubella, citomegalovirus, herpes simplex virus), nisu dio uobičajene kliničke obrade žena s PSP-om (9).

1.3.1.5. Ostali negenetički čimbenici

1.3.1.5.1. Starosna dob trudnice

Starosna dob trudnice je neovisni čimbenik rizika za spontani pobačaj (7). U žena mlađih od 24 godine taj rizik iznosi oko 9 %, a u onih iznad 45 godina oko 74 %. Visokom riziku za spontani pobačaj povezanom s dobi trudnice, posebice nakon 40. godine života, pridonosi pad u kvaliteti i količini oocita, promjene u funkciji jajnika i stvaranju hormona, te povećana učestalost nerazdvajanja kromosoma oocita tijekom mejotičke diobe (7).

1.3.1.5.2. Indeks tjelesne mase trudnice

S obzirom na to da trudnice indeksa tjelesne mase većeg od 30 imaju dva puta veći rizik od spontanog pobačaja u usporedbi sa ženama normalne tjelesne težine, drži se da je povećana tjelesna masa neovisni čimbenik rizika za spontani pobačaj, iako nema konačnih dokaza o uzročnoj povezanosti (18,27,98). Štoviše, mehanizmi kojima povećan indeks tjelesne mase uzrokuje spontani pobačaj, kao niti utjecaj gubitka tjelesne težine na ishod narednih trudnoća nisu poznati.

1.3.1.5.3. Izloženost stresu

Ponavljajući spontani pobačaji predstavljaju fizički i emotivni gubitak za reproduktivne partnere. Međutim, otprilike 84 % parova koji dobivaju psihološku potporu u obliku razgovora s psihologom ili liječnikom ima uspješan ishod naredne trudnoće u usporedbi s parovima koji ne dobivaju psihološku potporu (99). Stoga je upravo psihološka potpora jedino dokazano liječenje koje povećava broj živorođenosti u parova s IPSP-om (9). Mehanizmi kojima stres pridonosi IPSP-u nisu poznati, iako se pretpostavlja negativni utjecaj na endokrini, imunosni i živčani sustav (18,99).

1.3.1.5.4. Okolišni čimbenici

Uzimanje kofeina i pušenje cigareta istraživani su kao mogući čimbenici koji utječu na ishod trudnoće, međutim, nije dokazano da povećavaju rizik od PSP-a (1,9,27,100).

1.3.2. EPIGENETIČKI ČIMBENICI

Epigenetičke modifikacije su nasljedne i povratne promjene izražaja gena bez promjena u slijedu nukleotida DNA molekule, a uključuju DNA metilaciju, preoblikovanje kromatina i posredovanje RNA molekulama. Navedene modifikacije dovode do različitih epigenetičkih fenomena, poput genomskog upisa i inaktivacije kromosoma X. Unatoč istom ukupnom sadržaju gena, genomi reproduktivnih partnera imaju različiti obrazac epigenetičkih oznaka, zbog čega se funkcionalno razlikuju, utječući na genski izražaj u zametka i posteljice (101). Posljedično, prisustvo haploidnih genoma oba partnera u jednakovrijednom omjeru u zigoti nužan je preduvjet za uspješnu trudnoću u sisavaca. Stoga, iako se većina istraživanja uzroka IPSP-a provodi samo na ženama, ne treba

zanemariti doprinos muškog (epi)genoma u održanju trudnoće (101,102). Kao mogući uzročni čimbenici IPSP-a istraživani su metilacija DNA molekule i nenasumična inaktivacija kromosoma X.

1.3.2.1. Metilacija DNA molekule

Metilacija DNA molekule je kovalentno vezanje metilne skupine na citozin koji prethodi gvaninu unutar CpG (engl. *cytosine-phosphate-guanine*) dinukleotida. S obzirom na to da se obrazac metilacije DNA molekule mijenja ovisno o razdoblju razvoja, drži se da poremećena metilacija može uzrokovati IPSP u zametaka euploidnog kariotipa (103). U korionskim resicama spontano pobačenih zametaka parova s IPSP-om te genomu spermija muških partnera žena s IPSP-om pronađen je promijenjen obrazac metilacije na razini čitavog genoma, kao i pojedinačnih gena (103,104).

1.3.2.2. Nenasumična inaktivacija kromosoma X

Inaktivacija kromosoma X je epigenetički fenomen kojim se u tjelesnim stanicama žena jedan od dva kromosoma X transkripcijski utišava epigenetičkim modifikacijama. Proces započinje u prenatalnom razdoblju usklađeno s razdobljem implantacije, nasumičnom inaktivacijom između dva kromosoma X u jednakovrijednim omjerima (105). Međutim, u nekih se žena namjerno utišava isti kromosom X u više od 75 % stanica, što se naziva nenasumičnom inaktivacijom (engl. *skewed X chromosome inactivation*). Proces može biti slučajan, ali i posljedica mutacija gena ili aberacija kromosoma X (105). Stoga se pretpostavlja da na kromosomu X postoje letalni aleli koji se u žena heterozigota ne očituju fenotipski, ali uzrokuju spontani pobačaj ako se prenesu zametku muškog spola (106). Iako žene s nenasumičnom inaktivacijom kromosoma X imaju oko dva puta veći rizik od IPSP-a u usporedbi s kontrolnom skupinom, istraživanja nisu dosljedna u metodologiji i kriterijima odabira ispitanica, a uzrok nenasumične inaktivacije nije poznat.

1.3.3. GENETIČKI ČIMBENICI

Pretpostavka o genetičkoj podložnosti za IPSP proizlazi iz nekoliko činjenica. Prvo, rizik od ponovnog gubitka trudnoće raste s brojem prethodnih spontanih pobačaja neovisno o dobi trudnice (7,12,18,107). Tako, incidencija u nulipara nakon prvog spontanog pobačaja iznosi 12,4 %, nakon

drugog 22,7 %, a nakon trećeg 44,6 %, dok u multipara nakon prvog iznosi 11,8 %, drugog 17,7 %, a trećeg 35,4 % (7). Drugo, prevalencija spontanih pobačaja u srodnika prvog koljena osoba s IPSP-om je do sedam puta veća u usporedbi s ostalom populacijom (7,92,107-110). Konačno, s obzirom na to da se većina IPSP-a ponavlja u istom gestacijskom razdoblju, od čega oko 90 % u prvom tromjesečju, izgledno je postojanje genetičkih čimbenika koji sprječavaju napredovanje trudnoće (27,111,112). Kao mogući uzročni čimbenici IPSP-a istraživani su heteromorfizmi kromosoma, fragmentacija DNA molekule spermija, mutacije gena i genetička varijabilnost.

1.3.3.1. Heteromorfizmi kromosoma

Heteromorfizmi kromosoma su promjenjive količine nekodirajućih ponavljajućih DNA slijedova u genomu čovjeka, organiziranih u visokokondenzirani konstitutivni heterokromatin (113). Prisutnost heteromorfizama na jednom homolognom kromosomu moguće ometa normalno uparivanje i razdvajanje od drugog homologa tijekom mejoze, uzrokujući aneuploidiju. Iako se pretpostavljalo kako nemaju učinak na fenotip, istraživana je povezanost s infertilitetom i komplikacijama u trudnoći, uključujući IPSP, no rezultati su oprečni (114).

1.3.3.2. Fragmentacija DNA molekule spermija

Cjelovitost genoma spermija nužan je preduvjet svrsishodnog međudjelovanja sa sekundarnom oocitom prilikom oplodnje, a utječe i na preživljavanje zametka do razdoblja implantacije. Fragmentacija DNA molekule spermija uključuje jednolančane i/ili dvolančane lomove, a muškarci s teškim oštećenjima imaju otprilike dva puta veći rizik od spontanog pobačaja u usporedbi s onima koji imaju blaga oštećenja (115). Međutim, klinički značaj rezultata nije poznat.

1.3.3.3. Mutacije gena

Mutacije su promjene u slijedu nukleotida, s učestalošću rjeđeg alela manjom od 1 % u općoj populaciji. Kao uzrok IPSP-a predložene su mutacije u genima *NLRP7* (engl. *NOD-like receptor proteins family, pyrin domain containing 7*), *SYCP3* (engl. *synaptonemal complex protein 3*) i čimbenika zgrušavanja (str. 14) (92). Međutim, rezultati ne upućuju na uzročnu povezanost.

1.3.3.4. Genetička varijabilnost

Redosljed 99 % nukleotida DNA molekule jezgre identičan je u svih ljudi. Razvojem molekularnih genetičkih metoda, otkriveno je kako je preostalih 1 % izvor različitih varijacija, koje klasičnim metodama citogenetike, najmanje razlučivosti od tri do pet megabaza, nije moguće otkriti (116). Takve submikroskopske genetičke varijante dijele se na polimorfizme jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*; SNP) i strukturne varijante, koje obuhvaćaju insercijsko-delecijske polimorfizme, zamjene blokova, inverzije i varijacije broja kopija (engl. *copy number variation*; CNV) (116). Drži se kako upravo promjenjivost u slijedovima DNA molekule pridonosi različitoj podložnosti poremećajima u ljudi. Unatoč činjenici da su pojedine varijante dokazani uzrok određenih genetičkih poremećaja, za većinu nije poznato kako utječu na fenotip (116,117).

Normalna trudnoća je složen fenomen koji zahtjeva niz vremenski i prostorno genetički precizno nadziranih i usklađenih molekularskih procesa u imunom, endokrinom, krvožilnom i brojnim drugim sustavima (118,119). Uloge varijabilnosti gena u tim procesima tijekom gametogeneze i trudnoće, kao i način na koji genomi zametka i oba reproduktivna partnera pridonose nadzoru funkcija na majčino-fetalnom spoju, većinom su nepoznati (112,119,120). S obzirom na to da varijabilnost gena može utjecati na izražaj mijenjajući količinu i funkciju RNA i/ili proteina, s posljedičnim negativnim učinkom na tijek trudnoće, za razumijevanje uloge genetičkih čimbenika u etiologiji IPSP-a posebno su važna istraživanja varijabilnosti potencijalnih gena kandidata (92).

Utvrđivanje doprinosa varijabilnosti potencijalnih gena kandidata etiologiji IPSP-a temelji se na istraživanjima genetičke povezanosti (engl. *genetic association study*) (120). No, unatoč nizu objavljenih rezultata, nisu pronađeni jednoznačni čimbenici podložnosti za IPSP.

1.3.3.4.1. Varijacije broja kopija

Varijacije broja kopija odnose se na promijenjen broj kopija ponavljanja identičnih ili gotovo identičnih DNA slijedova, a prisutne su u otprilike 5 % spontano pobačenih zametaka (40,116). Drži se kako bi CNV-ovi gena čiji proizvodi sudjeluju u razvoju posteljice i zametka mogli pridonijeti IPSP-u. Povezanost IPSP-a i CNV-ova ispitana je u samo jednom istraživanju, u kojem je u spontano pobačenih plodova parova s IPSP-om pronađeno 11 CNV-ova (121). Nadalje, od doprinosa

pojedinačnih CNV-ova etiologiji IPSP-a, najbolje su istražene mikroleucije kromosoma Y, za koje je dokazano da nisu povezane s IPSP-om (122).

1.3.3.4.2. Polimorfizmi jednog nukleotida

Polimorfizmi jednog nukleotida su najčešća vrsta genetičke varijabilnosti između pojedinaca, u kojoj dolazi do promjene samo jednog nukleotida, učestalosti rjeđeg alela veće od 1 % u općoj populaciji (116). Ovisno o utjecaju na genski izražaj, dijele se na funkcionalne i neutralne. Povezanost IPSP-a i SNP-ova ispitana je u žena i/ili muškaraca za stotinjak pojedinačnih gena kandidata čiji su proizvodi uključeni u imunski odgovor, stvaranje i djelovanje hormona te angiogenezu (92,112,120). Međutim, rezultati su najčešće oprečni, a ako je povezanost isključivo potvrđna, istraživanja nisu ponovljena na drugim populacijama niti većem broju uzoraka (92,120). Nedosljednosti u rezultatima posljedica su neujednačenih kriterija odabira parova s IPSP-om, uključivanja samo žena s IPSP-om, razlike u raspodjeli učestalosti SNP-ova u pojedinim etničkim skupinama te nedovoljne snage testa zbog malog broja ispitanika (92).

1.3.3.4.2.1. Cjelogenomske analize povezanosti

Cjelogenomske analize povezanosti (engl. *genome-wide association study*) su istraživanja u kojima se genotipiziraju SNP-ovi na razini čitavog genoma u skupine ispitanika i kontrola, sa ciljem pronalazjenja genetičkih biljega povezanih s određenom osobinom ili poremećajem (116). Dosad su provedene dvije cjelogenomske analize povezanosti u žena s IPSP-om, od kojih je jedna obiteljsko istraživanje, no nisu pronađeni jednoznačni lokusi podložnosti za IPSP (110,123).

1.4. IZVANSTANIČNI MATRIKS ENDOMETRIJA U REPRODUKCIJI ČOVJEKA

S obzirom na to da se većina spontanih pobačaja dogodi u prvih 12 tjedana, razdoblju obilježenom uspostavljanjem majčino-fetalnog spoja, drži se kako bi IPSP mogao biti posljedica poremećene funkcije gena i genskih proizvoda u trudnice i/ili zametka, odnosno ploda (spoja genoma oba partnera), ponajprije uključenih u uređivanje (pre)decidualizacije, implantacije i placencije (2,3,9,92,111,118,124-126). Navedeni procesi obilježeni su opsežnim, ali strogo nadziranim

preoblikovanjem izvanstaničnog matriksa (ISM) endometrija, ovisnim o specifičnim izvršnim proteolitičkim enzimima koji se stvaraju i otpuštaju na zahtjev određenih stanica (118,126-128).

Razvoj višestaničnog organizma izravno ovisi o strukturi i funkciji ISM-a, koji omogućava organizaciju stanica u složene funkcionalne jedinice, poput tkiva i organa (129). Iako se pretpostavljalo kako je ISM pasivna struktura koja pruža isključivo mehaničku potporu stanicama, a tkivima strukturu, otpornost i cjelovitost, otkriveno je da su u ISM-u pohranjene brojne molekule koje se oslobađaju cijepanjem njegovih proteinskih sastavnica (129). Osim toga, međudjelovanje ISM-a i stanica potiče signalizaciju koja uređuje funkcije stanica, uključujući proliferaciju, diferencijaciju, preživljavanje i migraciju (130).

Izvanstanični matriks je dinamična struktura bez stanica koja se sastoji od vezivnih vlakana i osnovne tvari (127,130,131). Vezivna vlakna imaju strukturnu ulogu, a dijele se na kolagena, retikulinska i elastična vlakna (130,131). Osnovna tvar je hidrofilna i viskozna struktura koja određuje čvrstoću i krutost ISM-a, a izgrađena od anionskih makromolekula (glikozaminoglikani i proteoglikani) i multiadhezivnih glikoproteina (laminin, fibronektin i drugi). Ovisno o vrsti tkiva i razdoblju razvoja, omjer sastavnica ISM-a se razlikuje i ovisi o svojstvenim funkcijama stanice (131). Posebnu vrstu ISM-a čini bazalna lamina, koju stvaraju i na kojoj leže epitelne stanice. Izgrađena je uglavnom od kolagena tipa IV, laminina, nidogena te perlekana (127). S vanjske strane je pričvršćena uz vezivno tkivo pomoću sidrenih vlakana, izgrađenim od posebne vrste kolagena tipa VII. Bazalna lamina čini selektivnu pregradu između vezivnog tkiva i drugih stanica, utječe na staničnu polarnost, prilagođava proliferaciju i diferencijaciju stanica, potiče stanični metabolizam te djeluje na preraspodjelu proteina u priležećoj staničnoj membrani (127).

1.4.1. PREOBLIKOVANJE IZVANSTANIČNOG MATRIKSA ENDOMETRIJA TIJEKOM PROCESA PRE-DECIDUALIZACIJE

Endometrij je višeslojno, aktivno tkivo izgrađeno od epitelnih stanica i strome u kojoj se nalaze fibroblasti, imunosne stanice i krvne žile (132). Broj, aktivnost, struktura i funkcija navedenih stanica se mijenjaju tijekom menstruacijskog ciklusa, kao i tijekom trudnoće. Endometrij je podijeljen

na bazalni i funkcionalni sloj, od kojih potonji svakog mjeseca prolazi niz promjena tijekom proliferativne, sekretorne i menstruacijske faze ciklusa.

U čovjeka, priprema endometrija za implantaciju počinje sredinom sekretorne faze svakog menstruacijskog ciklusa pod posrednim utjecajem progesterona zahvaćajući sve stanice endometrija, neovisno o oplodnji (3,124,125,133). Takav spontani proces pre-decidualizacije je rijedak fenomen, koji se odvija u svega nekoliko vrsta (133). U endometriju žene započinje oko spiralnih arteriola, postupno se šireći na čitav površinski endometrij (3,124,125). U slučaju oplodnje, pre-decidualizacija se nastavlja kao proces decidualizacije, međudjelovanjem stanica decidue trudnice i trofoblasta zametka, kasnije ploda (3,118,124-126). Pravilan molekulski i histološki preobražaj fibroblasta strome u pre-decidualne stanice odredit će trajanje implantacijskog prozora, prijemljivost i selektivnost endometrija za blastocistu, dok će u trudnoći decidualne stanice nadzirati doseg invazije trofoblasta (3,118,124,126). Također, pre-decidualne stanice imaju sposobnost migracije i invazivnosti, pridonoseći preoblikovanju ISM-a endometrija tijekom trudnoće (134). Ako oplodnja izostane, pre-decidualno tkivo se odbacuje procesom menstruacije (3,118,124).

U proliferativnoj fazi, ISM endometrija je izgrađen od fibronektina i kolagena tipa I, III, V i VI, koje stvaraju fibroblasti strome. Suprotno, u sekretornoj fazi, navedene sastavnice se razgrađuju, a pre-decidualne stanice mijenjaju strukturu ISM-a, stvarajući oko svake stanice posebnu vrstu bazalne lamine koja olakšava implantaciju, izgrađenu od laminina, kolagena tipa IV i V, proteoglikana bogatih heparan sulfatom, osteonektina i fibronektina (118,135,136). Također, ISM postaje izrazito hidratiziran zbog povećanog stvaranja hijaluronske kiseline (136).

1.4.2. PREOBLIKOVANJE IZVANSTANIČNOG MATRIKSA ENDOMETRIJA TIJEKOM IMPLANTACIJE I PLACENTACIJE

Za razliku od ostalih sisavaca, implantacija i placencija u čovjeka su izrazito invazivni procesi, tijekom kojih se zametak potpuno ukopa unutar strome endometrija i gornje trećine miometrija (128,137). Stoga će odgovarajući izražaj molekula trofoblasta koje određuju invazivni fenotip omogućiti razvoj majčino-fetalnog spoja prodiranjem kroz ISM endometrija (126).

Oblikovanje hemokorijalne posteljice iz stanica trofoblasta i decidue ovisi o njihovoj suptilnoj parakrinoj i endokrinoj signalizaciji, ali i fizičkom dodiru stanica trofoblasta s ISM-om decidue (138). Nakon prolaska blastociste između epitelnih stanica endometrija, stanice citotrofoblasta sidre posteljicu u ISM decidue stvarajući fibrinoidni matriks, te se diferenciraju u stanice viloznog i ekstraviloznog trofoblasta (EVT). Prve izgrađuju korionske resice, dok se druge dalje diferenciraju na intersticijske (iEVT), koje migriraju u stromu decidue okružujući spiralne arteriole, te endovaskularne (eEVT) stanice, koje prodiru u lumen spiralnih arteriola (118,128,138,139).

Preoblikovanje spiralnih arteriola je ključan proces za uspostavu krvnog optoka posteljice, a pod istovremenim je nadzorom trudnice i zametka (128,140). Naime, decidualne stanice započinju promicanje oticanja i gubitka organizacije glatkih mišićnih stanica, dok nakon prodora stanice iEVT-a i eEVT-a nastavljaju proširenje spiralnih arteriola i zamjenjuju endotelni sloj, stvarajući visokoprotodne krvne žile smanjenog otpora (81,139,140). Nadalje, stanice eEVT-a se organiziraju u trofoblastne čepove unutar spiralnih arteriola tijekom prvog tromjesečja trudnoće, a konačno uspostavljanje cirkulacije u uteroplacentnom sustavu odvija se njihovom razgradnjom oko 12. tjedna gestacije (2,128,139). Migracija trofoblasta prestaje do 20. tjedna trudnoće, s oko 120 preinačenih spiralnih arteriola, upućujući na važnost neprekinutog preoblikovanja posteljice (128,138).

1.4.3. ULOGA IZVANSTANIČNOG MATRIKSA U PATOGENEZI PONAVLJAJUĆIH SPONTANIH POBAČAJA NEPOZNATE ETIOLOGIJE

Pretpostavka o odbacivanju normalnih zametaka i plodova zbog poremećene imunosne reakcije trudnice donedavno je bila vodeća teorija o patogenezi IPSP-a. Međutim, najnovija otkrića poremećene prijemljivosti endometrija u žena s IPSP-om, kao i visokog udjela kromosomskih aberacija u zametaka i plodova parova s IPSP-om doveli su do uvođenja nove paradigme o patogenezi IPSP-a, kao poremećaja preoblikovanja ISM-a endometrija (8). Naime, drži se da IPSP nastaje kao posljedica poremećenog procesa pre-decidualizacije, što dovodi do gubitka nadzora probira kvalitete zametaka te posljedično implantacije zametaka lošije kvalitete i, naposljetku, spontanog pobačaja (8).

U žena s IPSP-om, u usporedbi sa ženama normalne plodnosti, utvrđena je povećana prijemljivost endometrija, što je posljedica produženog trajanja implantacijskog prozora zbog

poremećenog preoblikovanja i sazrijevanja endometrija tijekom sekretorne faze, kao i neodgovarajuće preobrazbe fibroblasta strome u pre-decidualne stanice (3,8,124-126,141). Posljedično, te stanice nemaju sposobnost prilagođavanja migracije i stvaranja ključnih molekula, što dovodi do implantacije blastocista slabije kvalitete i spontanog pobačaja (1,3,124,125,134,141). S druge strane, nedostatna invazivnost trofoblasta uvjetovana molekulskim signalima zametka, koja neizbježno dovodi do nepravilnog preoblikovanja spiralnih arteriola, također je predložena kao mogući mehanizam nastanka IPSP-a (108,142). Stoga bi genetička podložnost trudnice i zametka za poremećaje preoblikovanja ISM-a endometrija mogla biti čimbenik rizika za IPSP.

Preoblikovanje ISM-a razgradnjom i pregradnjom strukturnih proteinskih sastavnica tijekom (pre)decidualizacije, implantacije i placentacije posredovane su proteolitičkim enzimima obitelji matriks metaloproteinaza (MMP; engl. *matrix metalloproteinases*), kao i njihovim specifičnim inhibitorima, proteinima obitelji tkivnih inhibitora metaloproteinaza (TIMP; engl. *tissue inhibitors of metalloproteinases*).

1.5. ENZIMI OBITELJI MATRIKS METALOPROTEINAZA

Proteolitički enzimi kataliziraju hidrolizu peptidnih veza polipeptida ili proteina, a prema reaktivnim kemijskim skupinama u aktivnom mjestu dijele se na serinske, cisteinske, aspartatne, treoninske i metaloproteinaze (143). Metaloproteinaze obuhvaćaju višedomenske egzo- i endopeptidaze svrstane u pet superobitelji, kojima je za enzimsku aktivnost potreban metalni ion, smješten u aktivnom mjestu katalitičke domene (144).

Obitelj MMP enzima dio je metzincin superobitelji metaloproteinaza, koja obuhvaća ukupno sedam obitelji endopeptidaza ovisnih o cinku, uključujući astacine, adamalizine, leišmanolizine, papalizine, seralizine i snapalizine (145-147). Metzincini posreduju nespecifično cijepanje peptida i proteina u njihovoj neposrednoj blizini, ali i strogo nadziranu hidrolizu točno određenih peptidnih veza, sprječavajući ili potičući aktivnost brojnih proteina (145). U čovjeka, obitelj MMP enzima obuhvaća 23 proteolitička enzima, čije je stvaranje vremenski i prostorno precizno nadzirano, promičući ograničenu proteolizu (147-149). Glasničke RNA (engl. *messenger RNA*; mRNA) gena

MMP obitelji prevode se u inaktivne preteče (zimogeni ili pre-pro-enzimi), nakon čega podliježu nepovratnoj aktivaciji hidrolizom, unutar ili izvan stanice (148,149).

1.5.1. SUPSTRATI

Matriks metaloproteinaze prema različitom afinitetu cijepaju strukturne i nestrukturne proteine ISM-a, bazalnih membrana, međustaničnih spojeva, kao i druge MMP-ove (146,147,150). Tradicionalna podjela prema supstratu svrstava MMP-ove u šest skupina: kolagenaze, želatinaze, stromelizini, matrilizini, membranski i ostali MMP-ovi (tablica 3) (146). No, s obzirom na to da različiti MMP-ovi imaju sklonost prema istim supstratima, upućujući na redundanciju, granice između tih skupina sve su manje izražene (150).

1.5.2. ODREDIŠTE DJELOVANJA

S obzirom na odredište djelovanja, MMP-ovi se dijele na topive i membranske (engl. *membrane-type MMP*; MT-MMP), koji omogućavaju prostorno ograničeno cijepanje supstrata. Topivi MMP-ovi se izlučuju izvan stanice i djeluju u ISM-u, iako se neki od njih mogu vezati za MT-MMP-ove ili druge molekule u staničnoj membrani, djelujući pericelularno (150,151). Membranski MMP-ovi su usidreni u staničnu membranu i djeluju pericelularno, a prema organizaciji domena dijele se na transmembranske i periferne.

1.5.3. STRUKTURA

Matriks metaloproteinaze su višedomenski proteini čije su osnovne domene, od amino prema karboksilnom-kraju - signalni slijed, propeptidna i katalitička domena (146,149). Pojedini MMP-ovi imaju dodatne domene, prema kojima su svrstani u sedam skupina (slika 2) (152,153).

1.5.3.1. Osnovne domene

Na amino-kraju MMP-ova nalazi se signalni slijed ili pre-domena, koja se uklanja nakon usmjeravanja translacije u endoplazmatski retikulum (144). Propeptidna domena prisutna je u inaktivnim pretečama, a njenim uklanjanjem ili konformacijskom promjenom dolazi do aktivacije

enzima (153,154). Metaloproteinazna aktivnost posredovana je katalitičkom domenom, u kojoj su smješteni katalitički i strukturni ion cinka, kao i dva do tri iona kalcija nužna za stabilizaciju strukture enzima (144,146,153-155). Katalitički ion cinka vezan je pomoću četiri liganda, od kojih jedan čini molekula vode koju u inaktivnom obliku enzima mijenjaju drugi ligandi, a preostala tri aminokiseline histidini u slijedu HEXXHXXGXXH (H-histidin, E-glutamična kiselina, X–bilo koja aminokiselina, G-glicin) (144,145,148,156). Cijepanje supstrata zahtijeva aktivaciju molekule vode vezane na ion cinka, što posreduje karboksilna skupina glutamata (157). Konačno, u istoj domeni, stabilnost enzima promiče metioninski okret, 1,4- β -okret smješten ispod katalitičkog iona cinka (144,145,148,156). Navedena obilježja katalitičke domene zajednička su svim MMP-ovima, dok razlike u preostalim obilježjima strukture, poput prostorne organizacije, određuju specifičnost prema supstratima (144).

1.5.3.2. Dodatne domene

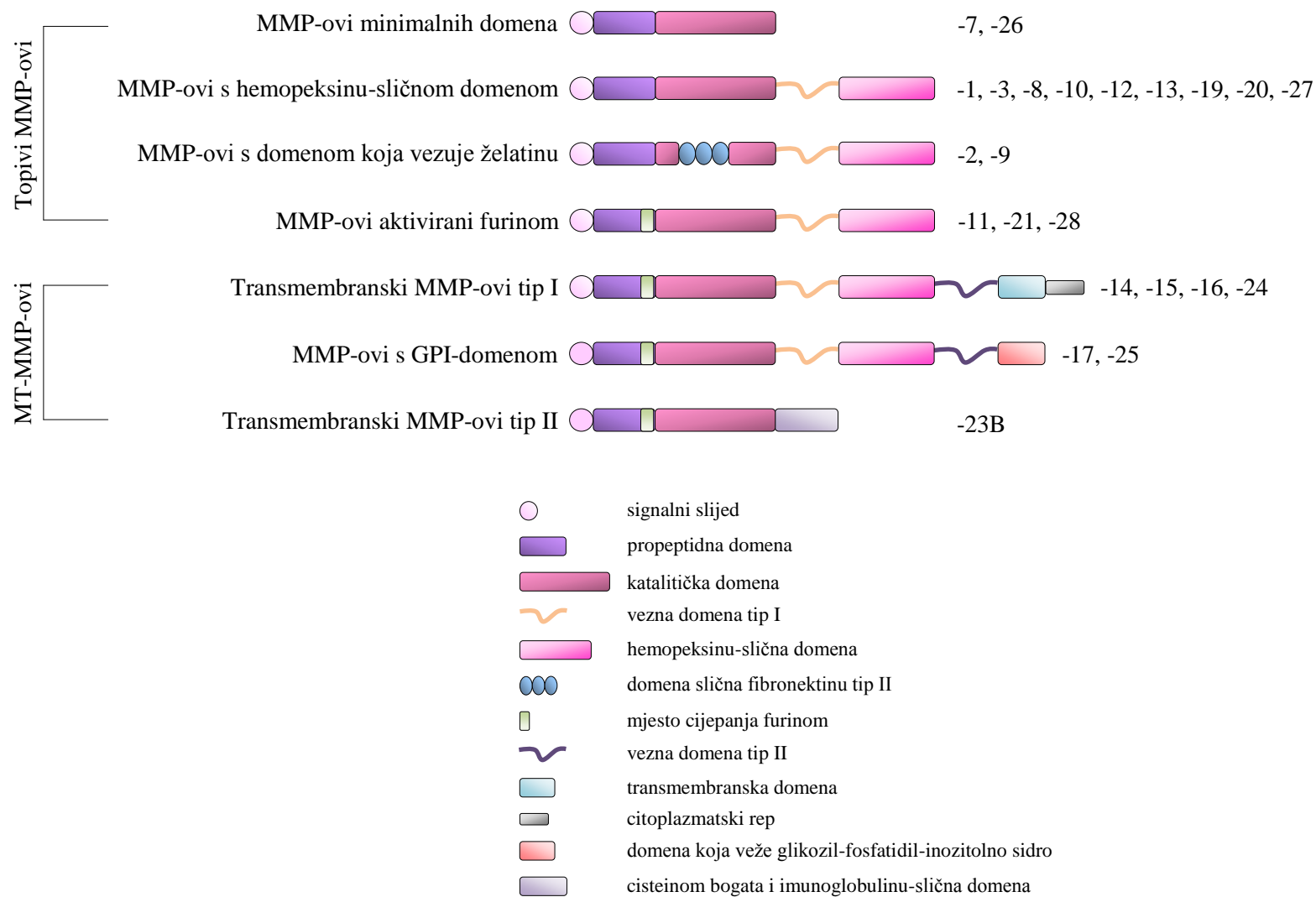
Dodatne domene MMP-ova određuju specifičnost prema supstratu, mehanizam aktivacije ili ciljno odredište djelovanja. Primjerice, vezna domena tip I i hemopeksinu-slična domena određuju specifičnost prema supstratu, a potonja i sposobnost vezanja TIMP-ova i molekula stanične površine, ciljno odredište djelovanja i endocitozu (144,147,148,153,155). Domena slična fibronektinu tipa II, umetnuta u katalitičku domenu MMP-2 i -9, omogućava cijepanje želatine, kolagena tipa IV i elastina (153,155). Nadalje, propeptidna domena MT-MMP-ova, kao i MMP-11, -21 i -28, sadrži mjesto cijepanja furinom (engl. *furin cleavage site*), koje usmjerava aktivaciju enzima unutar stanice.

Transmembranski MT-MMP-ovi tipa I, kojima je amino-kraj usmjeren prema unutrašnjosti stanice, posjeduju transmembransku domenu i kratki citoplazmatski rep (149). U MMP-23B, jedinog pripadnika transmembranskih MT-MMP-ova tipa II, amino-kraj je usmjeren izvan stanice, a transmembranska domena je smještena unutar propeptidne domene (149). Naposljetku, periferni MT-MMP-ovi sadrže domenu na koju se veže glikozil-fosfatidil-inozitolno sidro, smještajući protein na vanjsku stranu stanične membrane.

Tablica 3. Podjela enzima MMP obitelji prema supstratima, uz odabrane primjere (prema ref. 146,150,151)

Skupina	Naziv	Lokus gena	Sinonim	Kolagenski supstrati	Ostali supstrati ISM-a	pro-MMP supstrati
Kolagenaze	MMP-1	11q21-q22	Kolagenaza 1 (intersticijska)	I-III, VII, VIII, X, želatina	fibronektin, nidogen, perlekan	-1, -2
	MMP-8		Kolagenaza 2 (neutrofilna)	I-III, V, VII, VIII, X, želatina	laminin, nidogen	-8
	MMP-13	11q22.3	Kolagenaza 3	I-V, IX-XI, želatina	fibronektin, laminin	-2, -9, -13
Želatinaze	MMP-2	16q13-q21	Želatinaza A	I, IV, V, VII, X, XI, XIV, želatina	elastin, fibronektin, hondroitin-sulfat, laminin, nidogen, vitronektin	-1, -2, -9, -13
	MMP-9	20q12-q13	Želatinaza B	IV, V, VII, X, XIV, želatina	elastin, fibronektin, laminin, nidogen, vitronektin	-2, -9, -13
Stromelizini	MMP-3	11q22.3	Stromelizin 1	II, IV, IX, X, želatina	dekorin, elastin, fibronektin, laminin, nidogen, perlekan, vitronektin	-1, -3, -7, -8, -9, -13
	MMP-10		Stromelizin 2	III-V, želatina	fibronektin, laminin, nidogen	-1, -8, -10
	MMP-11	22q11.23	Stromelizin 3		fibronektin, laminin	
Matrilizini	MMP-7	11q21-q22	Matrilizin 1	I-V, X	elastin, fibronektin, laminin, vitronektin	-2, -7, -9
	MMP-26	11p15	Matrilizin 2	IV, želatina	fibronektin	-9
Membranski MMP-ovi	MMP-14	14q11-q12	MT1-MMP	I-III, želatina	fibronektin, laminin, nidogen	-2, -13
	MMP-15	16q13	MT2-MMP		fibronektin, laminin	
	MMP-16	8q21	MT3-MMP	želatina	hondroitin-sulfat, fibronektin	
	MMP-24	20q11.2	MT4-MMP		fibronektin	
	MMP-17	12q24.3	MT5-MMP	IV, želatina		
Ostali MMP-ovi	MMP-12	11q22.3	Makrofagna elastaza		elastin	
	MMP-20		Enamelizin		amelogenin	
	MMP-23B	1p36.3 ^a	CA-MMP ^b	želatina	fibronektin, kazein	
	MMP-28	17q21.1	Epilizin		kazein	
	MMP-19	12q14		I, IV, želatina	fibronektin, laminin, nidogen	
	MMP-21	10q26.3			agrekan, elastin	
	MMP-27	11q24				

^ana istom lokusu se nalazi i *MMP-23A* pseudogen; ^bMMP cisteinskog spektra (engl. *cysteine array-MMP*; CA-MMP)



Slika 2. Podjela enzima MMP obitelji prema strukturalnoj organizaciji (prerađeno prema ref. 149)

1.5.4. MEHANIZAM AKTIVACIJE

Inaktivne preteče MMP-ova nemaju sposobnost vezanja i cijepanja supstrata zbog međudjelovanja katalitičkog iona cinka u katalitičkoj domeni i tiolne skupine slobodnog cisteina u propeptidnoj domeni, koja djeluje kao njegov četvrti ligand umjesto molekule vode (144,148-150). Stoga je za aktivaciju MMP-ova nužan prekid veze između iona cinka i tiolne skupine cisteina, što potiče vezanje molekule vode nužne za hidrolizu supstrata (145,150,158). Navedena aktivacija naziva se mehanizmom cisteinskog prekidača (engl. *cysteine switch*), a postiže se na tri načina, uključujući proteolitičko uklanjanje propeptidne domene, alosteričku promjenu pro-enzima, te modifikaciju tiolne skupine pomoću oksidansa (npr. reaktivne čestice kisika), alkilirajućih agenasa, iona teških metala (npr. spojevi žive), disulfida, niskog pH i povišene tjelesne temperature (148,157,159,160). Aktivacija se najčešće postiže izravnim proteolitičkim uklanjanjem propeptidne domene unutar ili izvan stanice.

1.5.4.1. Aktivacija unutar stanice

Unutar stanice se aktiviraju MMP-ovi koji sadrže mjesto cijepanja furinom (slika 2). Takav oblik aktivacije odvija se u trans-Golgijskoj mreži pomoću subtilizinu-slične serinske proteaze furin, nakon čega se MMP-ovi otpuštaju ili sidre u membranu u aktivnom obliku (148).

1.5.4.2. Aktivacija izvan stanice

Aktivacija topivih MMP-ova izvan stanice događa se uklanjanjem propeptidne domene pomoću aktiviranih serinskih proteaza ili MMP-ova (149,160). Iako se većina MMP-ova nakon aktivacije odmah izlučuje, pro-MMP-8 i -9 mogu se pohranjivati u granulama neutrofila (144,149).

1.5.4.2.1. Aktivacija pomoću serinskih proteaza

Serinske proteaze su endopeptidaze koje u aktivnom mjestu sadrže aminokiselinu serin. Sposobnost aktivacije pro-MMP-ova imaju plazmin, kimaza, kalikrein, triptaza, elastaza i katepsin G (155,161). Primjerice, plazmin koji nastaje cijepanjem plazminogena pomoću urokinazi-sličnog aktivatora plazminogena (engl. *urokinase-like plasminogen activator*), aktivira pro-MMP-1, -3, -9, -10 i -13, koji potom mogu aktivirati druge MMP-ove (155,160).

1.5.4.2.2. Aktivacija pomoću aktiviranih matriks metaloproteinaza

Pojedini aktivirani MMP-ovi mogu aktivirati inaktivne preteče drugih MMP-ova (tablica 3). Aktivacija pro-MMP-2, koji je otporan na aktivaciju serinskim proteazama, događa se na staničnoj površini pomoću MT-MMP-ova (158-160). Naime, MT1-MMP djeluje kao receptor za TIMP-2, za koji se veže pro-MMP-2. Zatim, susjedni slobodni MT1-MMP cijepa propeptidnu domenu pro-MMP-2, a daljnja aktivacija se događa autokatalizom ili pomoću aktiviranih MMP-ova. Visoke razine TIMP-2 proteina onemogućavaju aktivaciju MMP-2 zbog zauzimanja svih slobodnih MT1-MMP-ova (144). Aktivacija pro-MMP-2 pomoću drugih MT-MMP-ova ne zahtijeva prisutnost TIMP-2 (157).

1.5.5. ULOGE

Matriks metaloproteinaze i njihovi endogeni inhibitori, proteini TIMP obitelji, čine izvršne molekule (pre)oblikovanja tkiva, koje uređuju međustaničnu komunikaciju, oblik, migraciju, proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu stanica (146). Navedenim funkcijama posreduju brojne fiziološke procese, poput implantacije i placencije, dok poremećaj njihovog djelovanja dovodi do raznih patoloških stanja. Iako su otkriveni kao enzimi koji cijepaju strukturne proteine ISM-a (tablica 3), (pre)oblikovanje tkiva pomoću MMP-ova dodatno je posredovano sposobnošću pretvaranja strukturnih proteina ISM-a u signalne molekule, kao i uređivanja aktivnosti drugih, nestrukturnih proteina pohranjenih u ISM-u (146,147,150).

1.5.5.1. Cijepanje strukturnih proteina izvanstaničnog matriksa

Osnovna uloga MMP-ova uključuje cijepanje brojnih strukturnih proteina ISM-a, usmjeravajući ih na daljnju razgradnju (tablica 3). Primjerice, MMP-ovi cijepaju trostruku uzvojnici kolagena između glicina i leucina ili glicina i izoleucina, dovodeći do nestabilne konformacije i daljnje razgradnje pomoću nespecifičnih proteolitičkih enzima (162).

1.5.5.2. Pretvaranje strukturnih proteina izvanstaničnog matriksa u signalne molekule

Cijepanjem strukturnih proteina ISM-a na specifičnim mjestima pomoću MMP-ova nastaju matrikriptini i matrikini - fragmenti drugačije biološke aktivnosti od one njihovih preteča

(147,163,164). Matrikriptini i matrikini djeluju autokrino ili parakrino, utječući na angiogenezu i migraciju stanica. Primjerice, cijepanjem kolagena tipa IV pomoću MMP-2 i -9 izlaže se skriveni epitop (engl. *cryptic epitope*) koji promiče angiogenezu, dok cijepanjem $\alpha 1$, -2 i -3 lanaca istog kolagena nastaju aresten, kanstatin, odnosno tumstatin koji sprječavaju angiogenezu (163).

1.5.5.3. Uređivanje aktivnosti nestrukturnih proteina izvanstaničnog matriksa

Matriks metaloproteinaze cijepaju brojne nestrukturane proteine, od kojih su neki vezani za strukturne proteine ISM-a, a koji se oslobađaju njihovim cijepanjem. Primjerice, vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*; VEGF), jedan od glavnih čimbenika koji potiču angiogenezu, nakon stvaranja se izlučuje izvan stanice i pohranjuje u ISM-u čvrsto vezan za proteoglikane koji sadrže heparan-sulfat (147,163). Cijepanjem sastavnica ISM-a, MMP-9 potiče otpuštanje VEGF-a (163). Nadalje, MMP-ovi cijepaju brojne slobodne nestrukturane proteine, uključujući čimbenike rasta, receptore, citokine i kemokine (tablica 4) (147,165).

1.5.6. NADZOR AKTIVNOSTI

Osim razine nadzora genskog izražaja, kojom je određeno kvalitativno i kvantitativno stvaranje inaktivnih preteča, aktivnost MMP-ova nadzirana je na post-transkripcijskoj, kao i razini proteina (166). Potonja uključuje nadzor aktivacije inaktivnih preteča, ciljno odredište djelovanja, razgradnju, kao i endogene inhibitore (144,147,148,154,161,167). Razgradnja, endogeni inhibitori i razina nadzora izražaja gena *MMP* obitelji razrađeni su u narednim odlomcima, dok su aktivacija inaktivnih preteča i ciljno odredište djelovanja objašnjeni prethodno (str. 29).

1.5.6.1. Razgradnja

Iako mehanizmi razgradnje MMP-ova nisu posve poznati, endocitozu i unutarstaničnu razgradnju MMP-ova promiču $\alpha 2$ -makroglobulin te trombospondin-1 i -2 (161,168). Navedene molekule fizičkim dodirrom onemogućavaju vezanje supstrata, sprječavajući djelovanje enzima (161). Takvi spojevi se vežu na receptore čistače (engl. *scavenger receptors*) smještene na fagocitima, nepovratno se odstranjujući procesom endocitoze (146,161,168,169).

Tablica 4. Odabrani primjeri nestrukturnih proteinskih supstrata ISM-a enzima MMP obitelji, kao i signalnih molekula koje nastaju njihovim cijepanjem (165)

MMP	Supstrat	Proizvod cijepanja
MMP-1	α_1 -antikimotripsin	inaktivni serpin
	IGFBP ^a -2, -3	slobodni IGF-ovi
	pro-IL ^b -1 β	IL-1 β
	pro-TNF ^c - α	TNF- α
MMP-2	adrenomedulin	vazokonstriktorne molekule
	veliki endotelin	srednji endotelin
	IGFBP-3, -5	slobodni IGF-ovi
	plazminogen	angiostatin
	pro-IL-1 β	IL-1 β
	pro-TGF ^d - β	TGF- β
	pro-TNF- α	TNF- α
MMP-3	α_1 -antikimotripsin	inaktivni serpin
	fibrinogen	monomer sličan D-dimeru
	IGFBP-3	slobodni IGF-ovi
	plazminogen	angiostatin
	pro-IL-1 β	IL-1 β
MMP-7	IGFBP	slobodni IGF-ovi
	plazminogen	angiostatin
	pro-TNF- α	TNF- α
MMP-9	pro-IL-1 β	IL-1 β
	plazminogen	angiostatin
	pro-TNF- α	TNF- α
	pro-TGF- β	TGF- β
MMP-11	IGFBP-1	slobodni IGF-ovi
MMP-12	plazminogen	angiostatin
	pro-TNF- α	TNF- α
MMP-13	α_1 -antikimotripsin	inaktivni serpin
	pro-TGF- β	TGF- β
MMP-14	pro-TNF- α	TNF- α
	TGF- β	TGF- β

^aengl. *insulin-like growth factor binding protein*; ^bengl. *interleukin*;
^cengl. *tumor necrosis factor*; ^dengl. *transforming growth factor*

1.5.6.2. Endogeni inhibitori

Prirodni endogeni inhibitori MMP-ova su proteini TIMP obitelji, dok slabiju sposobnost sprječavanja njihova djelovanja imaju netrini, PCPE (engl. *procollagen C-terminal proteinase enhancer*), RECK (engl. *reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*) i TFPI-2 (engl. *tissue factor pathway inhibitor 2*) (146,150,168). Međutim, mehanizmi djelovanja navedenih inhibitora, uz iznimku TIMP-ova, nisu poznati.

1.5.7. GENI OBITELJI MATRIKS METALOPROTEINAZA

Genom jezgre čovjeka sadrži 24 gena za enzime MMP obitelji, od kojih je *MMP-23A* pseudogen (tablica 3) (149). Geni *MMP* obitelji prisutni su u gotovo svih organizama, uključujući viruse i bakterije (149,150,170).

1.5.7.1. Nadzor izražaja

Izražaj gena *MMP* obitelji ovisi o razdoblju razvoja, vrsti stanice i tkiva, a nadziran je na transkripcijskoj i post-transkripcijskoj razini (161,166,167). Iako o post-transkripcijskom nadzoru nema dovoljno spoznaja, transkripcijski je razmjerno dobro opisan (166,167).

1.5.7.1.1. Transkripcijska razina nadzora

S obzirom na to da se većina gena *MMP* obitelji prepisuje specifično tijekom procesa koji zahtijevaju preoblikovanje ISM-a, drži se kako je transkripcijska razina najvažnija razina nadzora njihove aktivnosti (166,171). Transkripciju uređuju različiti poticaji, uključujući proupalne citokine, čimbenike rasta, hormone, kao i međusobni dodir stanica ili stanica i ISM-a (146,167,172). Navedeni poticaji aktiviraju signalne puteve, poput MAPK (engl. *mitogen activated protein kinase*), koji promiču vezanje transkripcijskih čimbenika kodiranih genima neposredno ranog odgovora za promotorske regije gena *MMP* obitelji (146,166,167). Tako, primjerice, TGF- β , retinoidi i glukokortikoidi potiskuju, a TNF- α i VEGF promiču njihovu transkripciju (166,173). Ovisno o prisustvu veznih mjesta za transkripcijske čimbenike u promotorskoj regiji, geni *MMP* obitelji se dijele u tri skupine (tablica 5) (166).

Tablica 5. Podjela gena *MMP* obitelji prema građi promotorske regije (166,167)

Skupina	DNA slijed	MMP-ovi
1	TATA kutija ^a i AP-1 mjesto ^b	-1, -3, -7, -9, -10, -12, -13, -19, -20, -26
2	TATA kutija ^a	-8, -11, -15, -21, -27
3	Bez TATA kutije i AP-1 mjesta	-2, -14, -16, -17, -23B, -24, -25, -28

^asmještena 30 pb uzvodno od mjesta početka transkripcije

^bengl. *activator protein 1*; smješteno 70 pb uzvodno od mjesta početka transkripcije

Osim osnovnih veznih mjesta navedenih u tablici 5, pojedini geni posjeduju i druge slijedove, uključujući NF- κ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) i PEA3 vezno mjesto (engl. *polyomavirus enhancer activator 3*), kao i GC kutije (engl. *guanosine and cytosine box*) (166,171,173). Nadzor izražaja prve skupine gena najčešće ovisi o međudjelovanju AP-1 i PEA-3 veznog mjesta na koje se vežu transkripcijski čimbenici Fos i Jun obitelji, kao i Ets obitelji (engl. *E-twenty six*) (166,173). Nadalje, u trećoj skupini transkripcija može početi s više mjesta, ovisno o vezanju transkripcijskih čimbenika Sp-1 obitelji (engl. *specificity protein 1*) za GC kutiju (166).

Iako sličnosti u građi promotorskih regija gena *MMP* obitelji upućuju na zajednički nadzor, pojedini pripadnici pokazuju svojstvenosti u izražaju, što je moguće posljedica prisustva ostalih veznih mjesta za transkripcijske čimbenike, položaja i međusobne udaljenosti tih mjesta, kao i istovremenog vezanja istih transkripcijskih čimbenika za više veznih mjesta (166,167,173). Mehanizmi koji posreduju stanično i tkivno-specifični izražaj nisu razjašnjeni, iako su moguće ovisni o dostupnosti transkripcijskih čimbenika u različitim vrstama stanica, kao i epigenetičkom nadzoru (173).

1.5.7.1.2. Funkcionalne polimorfne varijante

U promotorskim regijama nekolicine gena *MMP* obitelji, uključujući *MMP-1*, -2, -3 i -9, otkrivene su polimorfne varijante, uglavnom SNP-ovi, koje utječu na razinu izražaja mijenjajući slijed baza veznih mjesta određenih transkripcijskih čimbenika (166,167,171,172,174). Učinak na transkripcijsku aktivnost promotorskih regija, odnosno stvaranje mRNA i proteina, razlikuje se ovisno o prisustvu pojedinih alela (166,167,171,172). Polimorfne varijante u navedenim genima povezane su s podložnošću za razne poremećaje, poput kardiovaskularnih bolesti, aneurizmi, novotvorina i poremećaja reprodukcije (146,171).

Polimorfna varijanta -1607 1G/2G u *MMP-1* genu nastaje umetanjem dodatnog gvanina na mjestu 1607 uzvodno (engl. *upstream*) od mjesta početka transkripcije (166,171,172,174,175). Navedena polimorfna varijanta ima dva moguća alela, uključujući jedan (1G) ili dva gvanina (2G) (171). Dva gvanina na mjestu -1607 i -1608 zajedno sa susjednim adenozinom stvaraju vezno mjesto za transkripcijske čimbenike Ets obitelji (171,175-177). Tako, 2G alel veže više rekombinantnog Ets-1

transkripcijskog čimbenika nego 1G alel, povećavajući aktivnost promotorske regije četiri puta (167,175,178).

Polimorfne varijante -735 C/T i -1306 C/T u *MMP-2* genu posljedica su zamjene citozina (C) timinom (T) u dva vezna mjesta za Sp-1 transkripcijski čimbenik na mjestu 735 i 1306 uzvodno od mjesta početka transkripcije (166,174,179-181). Alel T -735 C/T polimorfne varijante povezivan je s povećanom, ali i umanjenom aktivnošću promotorske regije, što upućuje na moguće različiti učinak na transkripciju ovisno o vrsti stanice (179,180,182,183). Alel T -1306 C/T polimorfne varijante dovodi do gubitka veznog mjesta za Sp-1 transkripcijski čimbenik umanjujući promotorsku aktivnost *MMP-2* gena (174,181,184,185).

U *MMP-3* genu, unutar elementa osjetljivog na IL-1 (engl. *interleukin-1 responsive element*) na mjestu 1612 uzvodno od mjesta početka transkripcije, nalazi se polimorfna varijanta koja nastaje kao posljedica različite duljine polimonomernog slijeda adenzina (167,171,172,174,186,187). Navedena polimorfna varijanta ima dva moguća alela, uključujući pet (5A) ili šest (6A) adenzina (171). Prisutnost 6A alela dvostruko umanjuje promotorsku aktivnost *MMP-3* gena u usporedbi s 5A alelom (166,186-188). Međutim, utjecaj polimorfne varijante ovisi o koncentraciji i aktivnosti NF-κB i ZBP-89 (engl. *zinc-binding protein 89*) transkripcijskih čimbenika (188). Tako, ZBP-89 potiče prepisivanje 5A alela, dok NF-κB sprječava transkripciju s oba alela neovisno o ZBP-89 (188).

Naposlijetku, polimorfna varijanta -1562 C/T u *MMP-9* genu uključuje zamjenu citozina (C) timinom (T) na mjestu 1562 uzvodno od mjesta početka transkripcije (166,167,171,174). Iako točan mehanizam kojim navedena polimorfna varijanta utječe na izražaj gena nije poznat, C alel veže transkripcijski represor umanjujući aktivnost promotorske regije (189-191).

1.6. PROTEINI OBITELJI TKIVNIH INHIBITORA METALOPROTEINAZA

Glavni endogeni inhibitori MMP-ova su proteini TIMP obitelji, koja u čovjeka obuhvaća četiri pripadnika, TIMP-1, -2, -3 i -4 (192-194). Osim što sprječavaju djelovanje MMP-ova u jednakovrijednom omjeru, TIMP-ovi djeluju kao signalne molekule vežući se za proteine stanične membrane (168,195). Nakon translacije, svi TIMP-ovi se izlučuju izvan stanice, gdje se TIMP-3 veže za proteoglikane bogate heparan-sulfatom, dok su preostali slobodni u ISM-u (168,195).

1.6.1. STRUKTURA

Tkivni inhibitori metaloproteinaza izgrađeni su od amino- i karboksi-terminalne domene, od kojih je svaka stabilizirana pomoću tri disulfidne veze između šest cisteinskih ostataka (194-196). Osnovna struktura i mehanizam djelovanja zajednički su svim TIMP-ovima, dok su specifičnosti prema MMP-ovima, kao i posredovanje drugih funkcija uvjetovani svojstvenim strukturnim i biokemijskim obilježjima pojedinih TIMP proteina (168). Amino-terminalna domena sadrži svojstveni slijed VIRAK (V–valin, I–izoleucin, R–arginin, A–alanin, K–lizin) i sprječava djelovanje MMP-ova, a karboksi-terminalna domena posreduje funkcije neovisne o inhibiciji MMP-ova (195,197).

1.6.2. MEHANIZAM INHIBICIJE MATRIKS METALOPROTEINAZA

Tkivni inhibitori metaloproteinaza su spori inhibitori koji se čvrsto vežu za MMP-ove, najprije stvarajući inaktivni, ali povratni međuprodukt, nakon čega slijedi strukturno preoblikovanje u stabilni, nepovratni spoj (193,195). Sprječavanje djelovanja MMP-ova posljedica je vezanja amino-terminalne domene TIMP-ova za aktivno mjesto katalitičke domene MMP-ova (192). U takvom spoju, karbonilne i α -amino skupine prvog amino-terminalnog cisteina amino-terminalne domene TIMP-ova djeluju kao kelatori katalitičkog iona cinka MMP-ova. Nadalje, hidroksilne skupine serina i drugog treonina amino-terminalne domene TIMP-ova djeluju zajedno s glutamatom katalitičke domene MMP-ova uklanjajući molekulu vode nužnu za hidrolitičku aktivnost enzima (192-194).

1.6.3. ULOGE

Tkivni inhibitori metaloproteinaza posreduju različite funkcije stanica sprječavanjem djelovanja MMP-ova ili drugim mehanizmima neovisnim o toj inhibiciji (196,198).

1.6.3.1. Sprječavanje djelovanja matriks metaloproteinaza

Sva četiri TIMP-a sprječavaju djelovanje svih MMP-ova prema različitom afinitetu uparivanja, upućujući na redundanciju (146,195). Matriks metaloproteinaze ne mogu cijepati TIMP-ove niti s njima stvarati kovalentne veze.

1.6.3.2. Djelovanje neovisno o inhibiciji matriks metaloproteinaza

1.6.3.2.1. Vezanje inaktivnih preteča matriks metaloproteinaza

Složenost međudjelovanja višedomenskih TIMP-ova i MMP-ova očituje se u stvaranju raznovrsnih spojeva uparivanjem domena u različitim kombinacijama, što određuje konačnu aktivnost spoja (195). Primjerice, karboksi-terminalne domene TIMP-ova vežu hemopeksinu-sličnu domenu pro-MMP-ova, iako uloge takvih spojeva, osim za TIMP-2 nisu poznate (str. 30) (146,194).

1.6.3.2.2. Posredovanje staničnih funkcija

Tkivni inhibitori metaloproteinaza posreduju brojne funkcije neovisne o inhibiciji i aktivaciji MMP-ova. Vežući se za razne receptore na površini stanice, djeluju kao signalne molekule koje uređuju funkcije stanica. Tako, svi TIMP-ovi sprječavaju angiogenezu, dok na proliferaciju i apoptozu imaju oprečni utjecaj ovisno o vrsti stanice (168,194,195,199). Primjerice, TIMP-1 sprječava apoptozu vežući se za CD63 molekulu, TIMP-2 sprječava proliferaciju endotelnih stanica i angiogenezu vežući se za $\alpha_3\beta_1$ integrin, a TIMP-3 sprječava angiogenezu vežući se za VEGF receptor 2 (192,196,199).

1.6.4. GENI OBITELJI TKIVNIH INHIBITORA METALOPROTEINAZA

Geni *TIMP* obitelji su sveprisutni u eukariota, a drži se da su se pojavili razvojem vezivnog tkiva u višestaničnih organizama (193,194). U čovjeka, za svaki TIMP protein postoji po jedan gen, koji su, osim *TIMP-2* gena, smješteni u intronima gena *sinapsina*, čitajući se u smjeru od 3' prema 5' kraju (192,193). *Sinapsini* su višegenska obitelj fosfoproteina svojstvenih za živčane stanice. Gen *TIMP-1* (lokus Xp11.23) nalazi se u intronu 5 gena *sinapsin-1*, *TIMP-3* (lokus 22q12.3) u intronu 6 gena *sinapsin-3*, a *TIMP-4* (lokus 3p25.2) u intronu 6 gena *sinapsin-2* (192). Značaj smještaja *TIMP* gena unutar introna *sinapsina*, kao i zajednički mehanizmi uređivanja izražaja nisu poznati. Gen *TIMP-2* (lokus 17q25.3) u prvom intronu sadrži *DDC8* gen (engl. *differential display clone 8*) (192).

1.6.4.1. Nadzor izražaja

Nadzor izražaja gena *TIMP* obitelji ovisi o razdoblju razvoja, vrsti stanice i tkiva, a najbolje je istražen na razini transkripcije (192,199). Promotorske regije gena *TIMP* obitelji sadrže vezna mjesta

za većinu transkripcijskih čimbenika kao i geni *MMP* obitelji, upućujući na mogući zajednički, uzajamno usklađen ili oprečan, nadzor izražaja (167,195). Tako, svi *TIMP* geni posjeduju Sp-1 vezno mjesto, a dodatno *TIMP-1* i -3 GC kutije, *TIMP-2* TATA kutiju, *TIMP-3* NF- κ B, c-MYC i p53 vezna mjesta, *TIMP-1*, -2 i -3 AP-1 i PEA3 vezna mjesta, a *TIMP-4* područje osjetljivo na estrogen (engl. *estrogen responsive element*) (167,192).

Iako je *TIMP-2* u većine stanica izražen konstitutivno, transkripciju gena *TIMP* obitelji potiču ili sprječavaju brojni citokini i čimbenici rasta preko raznih signalnih puteva (199). Primjerice, eritropoetin, IL-1 β , IL-6, EGF (engl. *epidermal growth factor*), FGF (engl. *fibroblast growth factor*), retinoidi i TGF- β potiču njihov izražaj (195).

1.6.4.1.1. Polimorfne varijante

Unutar gena *TIMP* obitelji su pronađene funkcionalne, kao i polimorfne varijante koje ne utječu na izražaj gena, a pridonose razvoju raznih bolesti (167,174).

Polimorfna varijanta -372 C/T u *TIMP-1* genu nalazi se u egzonu 5 i nastaje zamjenom citozina (C) timinom (T) na mjestu 372 nizvodno od mjesta početka transkripcije (200). Iako je *TIMP-1* -372 C/T istoznačni SNP, koji kodira aminokiselinu fenilalanin na 124. mjestu u proteinu, T alel se povezuje s nižim, kao i višim genskim izražajem, moguće ovisno o vrsti stanice (200-202). Za *TIMP-1* -372 C/T polimorfnu varijantu je dokazana povezanost s novotvorinama, bolestima pluća i ishodom sepse (202,203).

U *TIMP-2* genu se nalaze dvije značajne polimorfne varijante, -418 G/C i -303 C/T. Polimorfna varijanta *TIMP-2* -418 G/C nalazi se u promotorskoj regiji, a nastaje zamjenom gvanina (G) citozinom (C) na mjestu 418 nizvodno od mjesta početka transkripcije (174). Alel G dovodi do gubitka Sp-1 veznog mjesta i povećanog izražaja gena. Međutim, alel C *TIMP-2* -418 G/C polimorfne varijante nije prisutan u Europske populacije bijelaca, što ga čini nepogodnim za istraživanja genetičke povezanosti. Druga polimorfna varijanta, *TIMP-2* -303 C/T je smještena u egzonu 3 i istoznačna je promjena koja kodira aminokiselinu serin na 101. mjestu u proteinu (174). Nastaje zamjenom citozina (C) timinom (T) na mjestu 303 nizvodno od mjesta početka transkripcije. Za *TIMP-2* -303 C/T utvrđena je izrazita povezanost s komplikacijama u trudnoći (204,205).

U *TIMP-3* genu najbolje istražene polimorfne varijante su -915 A/G i -1296 C/T. Obje su smještene u promotorskoj regiji gena, međutim, utjecaj na razinu izražaja nije poznat (206,207). Polimorfna varijanta *TIMP-3* -915 A/G nastaje zamjenom adenina (A) gvaninom (G) na mjestu 915, a -1296 C/T zamjenom citozina (C) timinom (T) na mjestu 1296 uzvodno od mjesta početka transkripcije (206,207). Zbog udruženosti s nizom bolesti, uključujući aneurizme i bolesti pluća, pretpostavlja se neravnoteža povezanosti (engl. *linkage disequilibrium*) s drugim, za sada nepoznatim, funkcionalnim SNP-ovima (206-208).

Uloga varijabilnosti *TIMP-4* gena kao čimbenika podložnosti za različite poremećaje nije dovoljno istražena. Jedina istražena polimorfna varijanta, *TIMP-4* -3'-UTR C/T, je smještena u 3' neprevedenoj regiji (engl. *untranslated region*; 3'-UTR), a nastaje zamjenom citozina (C) timinom (T) (209). Općenito, -3'-UTR nadzire stabilnost mRNA, pomaže prijenos mRNA do ribosoma i moguće pridonosi nadzoru translacije (166). Tako, prisustvo *TIMP-4* -3'-UTR T alela mijenja strukturu peteljki i omči *TIMP-4* mRNA, utječući na stabilnost i prevođenje (209).

1.7. ULOGA MATRIKS METALOPROTEINAZA I TKIVNIH INHIBITORA METALOPROTEINAZA U REPRODUKCIJI ČOVJEKA

Izražaj gena i aktivnost MMP i TIMP proteina su neznatni ili odsutni u oblikovanim tkivima, uz iznimku reproduktivnog sustava žene i tkiva majčino-fetalnog spoja (146,173,210). Stoga, svrsishodno preoblikovanje ISM-a endometrija tijekom endometrijskog ciklusa i razdoblja trudnoće ovisi o pravilnoj ravnoteži između MMP-ova i TIMP-ova (146,211,212).

1.7.1. ENDOMETRIJSKI CIKLUS

Najbolje istraženi MMP-ovi u reproduktivnom sustavu žene i tkivima majčino-fetalnog spoja su MMP-1, -2, -3 i -9. Glasničke RNA (engl. *messenger RNA*; mRNA) i proteini MMP-1, -2, -3 i -9, kao i sva četiri TIMP-a, stvaraju se tijekom čitavog endometrijskog ciklusa (213). Međutim, stvaranje MMP-ova je vremenski, prostorno i količinski strogo nadzirano, te ovisno o posrednom učinku steroidnih hormona (135). Za razliku od toga, TIMP-ovi su široko raspostranjeni i prisutni u manje promjenjivim količinama tijekom čitavog ciklusa, omogućujući uređivanje MMP/TIMP omjera

nužnog za pravilnu pregradnju ISM-a (211,213). Strogi nadzor djelovanja MMP-ova tijekom proliferativne i sekretorne faze nužan je za precizno preoblikovanje endometrija i sprječavanje neželjene razgradnje tkiva koje se priprema za trudnoću (135). Ako ne dođe do oplodnje, MMP-ovi posreduju odbacivanje pre-decidualnog tkiva tijekom menstruacijske faze.

1.7.1.1. Izražaj

Iako ih stvaraju različite stanice endometrija, fibroblasti strome u proliferativnoj fazi te pre-decidualne stanice u sekretornoj fazi, uz endotel kapilara i arteriola zajednički su izvor MMP-1, -2, -3, -9, kao i sva četiri TIMP mRNA i proteina (213-217). Njihov izražaj raste u sekretornoj fazi, posebno tijekom razdoblja implantacijskog prozora.

1.7.1.1.1. Nadzor izražaja

Nadzor izražaja gena *MMP* i *TIMP* obitelji u endometriju je složen i nije potpuno razjašnjen. Iako se drži da je progesteron glavni uređivač izražaja gena *MMP* obitelji, zaključak je izveden većinom iz *in vitro* istraživanja. Također, promotorske regije tih gena ne sadrže vezna mjesta za progesteronske receptore, pa se drži da je njegov učinak posredovan lokalnim stvaranjem, otpuštanjem ili aktivacijom raznih molekula, poput IL-1 α i - β , TNF- α i TGF- β (128,210,211,218-221). Nadalje, premda progesteron općenito potiskuje izražaj gena *MMP* obitelji, činjenica da razine njihovih mRNA i proteina rastu tijekom sredine sekretorne faze upućuje da utjecaj progesterona preko njegovih posrednika ovisi o intenzitetu i trajanju djelovanja, dostupnosti receptora za progesteron, vrsti stanice i području endometrija (135,218-220). Osim progesterona, drugi hormoni nadziru njihov izražaj. Tako, relaksin koji stvaraju fetalne membrane potiče transkripciju *MMP* gena (219,221). Mehanizmi nadzora gena *TIMP* obitelji u endometriju, osim *TIMP-3* gena, moguće ne uključuju progesteron zbog visokog i nepromjenjivog izražaja tijekom čitavog endometrijskog ciklusa (222).

1.7.1.2. Uloge tijekom sekretorne faze

Iako se prvotno pretpostavljalo kako je jedina uloga MMP-ova cijepanje sastavnica ISM-a endometrija tijekom menstruacijske faze, a TIMP-ova sprječavanje njihovog prekomjernog djelovanja,

otkrivene su brojne druge uloge tijekom čitavog endometrijskog ciklusa. Primjerice, tijekom proliferativne faze MMP-ovi promiču razgradnju debrisa, angiogenezu i ponovnu epitelizaciju olakšavajući migraciju stanica (211,219). Međutim, uloge MMP-ova i TIMP-ova posebno su istaknute u sekretornoj fazi, kada nadziru sazrijevanje i pripremu endometrija za implantaciju.

Tijekom sekretorne faze, MMP-ovi i TIMP-ovi posreduju preoblikovanje ISM-a endometrija cijepajući sastavnice svojstvene za proliferativnu fazu te promiču oblikovanje ISM-a koji potiče implantaciju. Također, MMP-1, -2, -3 i -9 promiču angiogenezu, a njihov izražaj raste od sredine sekretorne faze u endotelu i pericitima novostvorenih kapilara te endotelu i glatkim mišićnim stanicama spiralnih arteriola (213,217,223). Isto tako, MMP-ovi potiču prodiranje imunskih stanica u pre-decidualno tkivo iz krvnih žila (213,224). Nadalje, fibroblasti strome pretvorbom u pre-decidualne stanice poprimaju sposobnost migracije i invazije, što je pod utjecajem složene mreže hormona, čimbenika rasta, kemokina i upalnih posrednika koji potiču stvaranje MMP-2 i -9, kao izvršnih molekula koje promiču inkapsulaciju blastociste (124,134,225). Naposljetku, ako dođe do oplodnje, MMP-2 i -9, kao i sva četiri TIMP-a posreduju cijepanje i/ili obradu raznih molekula sudjelujući u prepoznavanju i implantaciji blastociste (213,214,222-224,226-228).

1.7.2. RAZDOBLJE TRUDNOĆE

Pojednostavljeno gledište na MMP-ove kao enzime odgovorne isključivo za invazivnost trofoblasta, a TIMP-ove kao molekule koje decidui omogućavaju obranu od prevelike prodornosti, osporeno je otkrićem niza drugih uloga. Glasničke RNA i proteini MMP-1, -2, -3-, -4 i sva četiri TIMP-a su izraženi u decidui tijekom čitave trudnoće, kao i dijelu posteljice podrijetlom od zametka, sudjelujući u implantaciji, placentaciji i porodu (212,229).

1.7.2.1. Nadzor izražaja

Izražaj gena *MMP* i *TIMP* obitelji na majčino-fetalnom spoju ovisi o brojnim autokrinim i parakrinim čimbenicima koji nadziru njihovo stvaranje, aktivaciju i sekreciju, uključujući citokine, kemokine, čimbenike rasta, hormone i zasićenost kisikom (128). Humani korionski gonadotropin, interleukin -1, inzulinu-sličan čimbenik rasta 2, kao i fiziološka hipoksija tijekom rane trudnoće drže

se ključnim čimbenicima razvoja i funkcije posteljice, povećavajući stvaranje MMP-ova i sprječavajući stvaranje TIMP-ova, što dovodi do cijepanja kolagena tipa IV (128,162,230).

1.7.2.2. Decidua

Iako se prvotno pretpostavljalo da je decidua pasivna struktura koja služi obrani od prekomjerne invazivnosti trofoblasta, najnovije spoznaje upućuju kako je decidua tkivo koje aktivno nadzire i uređuje funkciju trofoblasta (225). Naime, osim što MMP-ovi i TIMP-ovi nadziru doseg invazije trofoblasta u decidui, oni posreduju preoblikovanje spiralnih arteriola i širenje decidualnog tkiva na čitav endometrij (213,229,231). Iako ih stvaraju različite stanice, decidualni fibroblasti i uNK stanice glavni su izvor MMP-1, -2, -3, -9 te TIMP-1, -2, -3 i -4 mRNA i proteina (229,231). Dodatni izvor MMP-1, -2, -9, TIMP-1, -2 i -3 su endotelne stanice kapilara i spiralnih arteriola, MMP-2, -9, TIMP-1 i -2 žljezdane epitelne stanice, a MMP-9, TIMP-1 i -2 periciti (81,229,231-238). Nadalje, stvaranjem MMP-2 i -9, endotel, uNK stanice i makrofagi započinju preoblikovanje spiralnih arteriola prije prodora eEVT-a (81,237).

1.7.2.3. Posteljica podrijetlom od zametka

U dijelu posteljice podrijetlom od zametka, kasnije ploda, MMP-ovi i TIMP-ovi određuju invazivni fenotip trofoblasta, omogućavajući prodiranje kroz ISM endometrija te preoblikovanje spiralnih arteriola i korionskih resica (212). Stanice citotrofoblasta, posebice EVT-a, konstitutivno stvaraju MMP-1, -2, -3, -9 te TIMP-1, -2, -3 i -4 mRNA i proteine, dok je izražaj MMP-2, -9 i TIMP-3 prisutan i u eEVT-u (128,212,223,229-238).

1.8. POREMEĆAJ IZRAŽAJA GENA MATRIKS METALOPROTEINAZA I TKIVNIH INHIBITORA METALOPROTEINAZA U PONAVLJAJUĆIM SPONTANIM POBAČAJIMA NEPOZNATE ETIOLOGIJE

Poremećen izražaj gena *MMP* i *TIMP* obitelji pridonosi patogenezi raznih poremećaja povezanih s promijenjenim preoblikovanjem ISM-a (161,171). Tako su promijenjene razine MMP i

TIMP mRNA i proteina pronađene u endometriju i trofoblastu u raznim poremećajima povezanim s poteškoćama u reprodukciji, uključujući IPSP (128,239).

Tijekom razdoblja implantacijskog prozora u žena s IPSP-om, u usporedbi s kontrolnom skupinom, pronađene su niže razine MMP-2 i -9 proteina u ispirku maternice (240,241), a u tkivu endometrija više razine MMP-2 mRNA (242) i MMP-9 proteina (243). Oprečno, u jednom su istraživanju pronađene niže razine MMP-9 proteina u tkivu endometrija žena s IPSP-om (244). Navedeno mijenja sastav ISM-a endometrija što dovodi do poremećene pre-decidualizacije, prijemljivosti endometrija i uspostave majčino-fetalnog spoja (242,243). Također, povišene razine MMP-3 proteina pronađene su u serumu trudnica sa sekundarnim IPSP-om između 6. i 8. tjedna naredne, uspješno iznesene trudnoće (245). Nadalje, niže razine MMP-2 mRNA pronađene su u korionskim resicama spontano pobačenih zametaka parova s IPSP-om u 6. i 8. tjednu trudnoće, upućujući na promijenjeni invazivni potencijal trofoblasta i poremećenu angiogenezu (239,246,247).

Tijekom navedenog razdoblja prijemljivosti, u tkivu endometrija žena s IPSP-om, u usporedbi s kontrolnom skupinom, prisutne su i značajno niže razine TIMP-1 proteina (243) i TIMP-3 mRNA (242), dok je omjer MMP-9 u odnosu na TIMP-1 protein 25 puta veći (243). Također, u ispirku maternice žena s IPSP-om utvrđene su niže razine TIMP-1 proteina (241). Naprotiv, povišene razine TIMP-2 proteina pronađene su u serumu trudnica sa sekundarnim IPSP-om tijekom čitavog trajanja naredne, uspješno iznesene trudnoće (245), a varijacije broja kopija *TIMP-2* gena majčinog podrijetla pronađene su u spontano pobačenih zametaka parova s IPSP-om (121). Slično, u serumu žena sa SSP-om, u usporedbi sa ženama koje su imale uspješan ishod trudnoće, pronađene su povišene razine MMP-2 i -9, kao i niže razine TIMP-1 i -2 proteina (248). Navedene promjene izražaja gena upućuju na važnost točno određenih razina MMP-ova i TIMP-ova u održanju trudnoće.

Unatoč promijenjenim razinama MMP i TIMP mRNA i proteina, uzrok poremećenog genskog izražaja kao niti posljedični patogenetski mehanizmi kojima pridonose IPSP-u, zasad nisu poznati. Jedan od mogućih mehanizama koji pridonose takvoj promijeni izražaja uključuju polimorfne varijante gena *MMP* i *TIMP* obitelji. Utjecaj varijabilnosti gena *MMP* obitelji na podložnost za IPSP ispitana je u samo jednom istraživanju, za -1562 C/T polimorfizam *MMP-9* gena u Indijskoj populaciji (249), dok povezanost varijabilnosti gena *TIMP* obitelji i IPSP-a dosad nije istraživana.

2. PRETPOSTAVKA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovna pretpostavka ovog istraživanja je da varijabilnost *MMP-1*, *-2*, *-3*, *-9* te *TIMP-1*, *-2*, *-3* i *-4* gena, samostalno ili u kombinaciji, jest čimbenik podložnosti za IPSP u reproduktivnih parova. Navedena pretpostavka temelji se na dvije prethodno iznesene spoznaje, uključujući dokazane uloge *MMP-1*, *-2*, *-3* i *-9* te *TIMP-1*, *-2*, *-3* i *-4* proteina u (pre)decidualizaciji, implantaciji i placentaciji, kao i promijenjen izražaj gena *MMP* i *TIMP* obitelji u endometriju žena s IPSP-om i korionskim resicama spontano pobačenih zametaka parova s IPSP-om.

Osnovni cilj istraživanja bio je utvrditi povezanost varijabilnosti gena *MMP* i *TIMP* obitelji i etiologije IPSP-a.

Specifični ciljevi istraživanja su bili:

1. odrediti učestalost pojedinačnih genotipova i alela funkcionalnih polimorfni varijanti u promotorskim regijama gena *MMP* obitelji, zasebno u muških i ženskih ispitanika u skupini parova s IPSP-om, podskupinama primarnih i sekundarnih IPSP-ova te skupini kontrolnih ispitanika:

- *MMP-1* (11q22.2): polimorfna varijanta -1607 1G/2G (rs1799750)
- *MMP-2* (16q12.2): polimorfna varijanta -735 C/T (rs2285053)
- *MMP-2* (16q12.2): polimorfna varijanta -1306 C/T (rs243865)
- *MMP-3* (11q22.2): polimorfna varijanta -1612 5A/6A (rs3025058)
- *MMP-9* (20q13.12): polimorfna varijanta -1562 C/T (rs3918242),

2. odrediti učestalost pojedinačnih genotipova i alela polimorfni varijanti gena *TIMP* obitelji, zasebno u muških i ženskih ispitanika u skupini parova s IPSP-om, podskupinama primarnih i sekundarnih IPSP-ova te skupini kontrolnih ispitanika:

- *TIMP-1* (Xp11.23): polimorfna varijanta -372 C/T u egzonu 5 (rs4898)
- *TIMP-2* (17q25.3): polimorfna varijanta -303 C/T u egzonu 3 (rs2277698)
- *TIMP-3* (22q12.3): polimorfna varijanta -915 A/G u promotorskoj regiji (rs2234921)
- *TIMP-3* (22q12.3): polimorfna varijanta -1296 C/T u promotorskoj regiji (rs5749511)
- *TIMP-4* (3p25.2): polimorfna varijanta -3'-UTR C/T u 3' neprevedenoj regiji (rs17035945),

3. odrediti učestalost *MMP-2* -735 C/T i -1306 C/T, *MMP-1* -1607 1G/2G i *MMP-3* -1612 5A/6A te *TIMP-3* -915 A/G i -1296 C/T haplotipova zasebno u muških i ženskih ispitanika u skupini parova s IPSP-om, podskupinama primarnih i sekundarnih IPSP-ova te skupini kontrolnih ispitanika,

4. usporediti učestalosti pojedinačnih genotipova, alela i haplotipova navedenih polimorfničkih varijanti gena *MMP* i *TIMP* obitelji zasebno u muških i ženskih ispitanika između skupine parova s IPSP-om i skupine kontrolnih ispitanika, kao i podskupinama primarnih i sekundarnih IPSP-ova,

5. odrediti i usporediti učestalosti kombinacija genotipova navedenih polimorfničkih varijanti gena *MMP* obitelji, *TIMP* obitelji, kao i međusobno *MMP* i *TIMP* obitelji zasebno u muških i ženskih ispitanika između skupine parova s IPSP-om i skupine kontrolnih ispitanika, kao i podskupinama primarnih i sekundarnih IPSP-ova,

6. utvrditi utjecaj genotipova i alela navedenih polimorfničkih varijanti gena *MMP* i *TIMP* obitelji na podložnost za IPSP prema dominantnim, recesivnim i kodominantnim genetičkim modelima.

3. ISPITANICI I METODE

Istraživanje je provedeno kao dio znanstveno-istraživačkog projekta “Genetski čimbenici u etiologiji učestalih spontanih pobačaja” (br. 062-0000000-3548, voditelj: izv.prof.dr.sc. Saša Ostojić, dr.med.). Navedeni projekt prihvaćen je i financiran od Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske od 2008. godine. Istraživanje je osmišljeno kao istraživanje parova (engl. *case-control study*) i u potpunosti je izrađeno u Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

3.1. ISPITANICI

U istraživanje su bile uključene dvije skupine ispitanika: parovi s IPSP-om i kontrolni ispitanici. Svi ispitanici su prikupljeni i obrađeni u Kliničnom inštitutu za medicinsku genetiku, Univerzitetnog kliničnog centra u Ljubljani (Ljubljana, Slovenija) između 2004. i 2012. godine.

Skupinu parova s IPSP-om činilo je 149 žena i njihovih 149 reproduktivnih partnera sa tri ili više uzastopnih spontanih pobačaja nepoznate etiologije prije 22. tjedna trudnoće. Za prikupljanje epidemioloških i kliničkih podataka parova korišten je „*Human Miscarriage Genetic Network*“ („HuMGeN“) upitnik. Detaljnom kliničkom obradom u tih su žena isključeni poznati uzroci PSP-a, uključujući endokrine, autoimune i druge sustavne poremećaje, venske tromboze kao i anomalije maternice. Kariotip na razini razlučivosti od 500 pruga bio je uredan u oba partnera. Ispitanici skupine parova s IPSP-om nisu u srodstvu.

Kontrolnu skupinu sačinjavalo je 149 zdravih žena i 149 zdravih muškaraca koji imaju barem dva živorođena djeteta, bez spontanih pobačaja i ostalih komplikacija u trudnoći. Ispitanici kontrolne skupine podjednaki su godina kao i skupina ispitanika s IPSP-om i nisu u srodstvu.

3.2. METODE

3.2.1. IZOLACIJA GENOMSKE DNA MOLEKULE

Za istraživanje su korišteni isključivo uzorci genomske DNA molekule koji su dio međunarodne „HuMGeN“ banke DNA uzoraka sa sjedištem u Kliničnom inštitutu za medicinsko genetiko, Univerzitetnog kliničnog centra u Ljubljani (Ljubljana, Slovenija), a koji su pohranjeni na -20 °C u DNA banci u Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Genomska DNA molekula svih ispitanika izolirana je u razdoblju između 2004. i 2012. godine u Kliničnom inštitutu za medicinsko genetiko, Univerzitetnog kliničnog centra u Ljubljani (Ljubljana, Slovenija) iz leukocita periferne krvi pomoću kitova, prema postupniku što ga navodi proizvođač (Qiagen FlexiGene DNA kit, Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka). Svim ispitanicima je venepunkcijom izvađeno tri do pet mililitara periferne krvi u epruvetu s EDTA antikoagulansom, koje su bile pohranjene na -20 °C do izolacije DNA molekule. Koncentracija i čistoća izolirane genomske DNA molekule određena je spektrofotometrom prema postupniku što ga navodi proizvođač (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, Sjedinjene Američke Države).

3.2.2. ANALIZA GENETIČKE VARIJABILNOSTI GENA MATRIKS

METALOPROTEINAZA I TKIVNIH INHIBITORA METALOPROTEINAZA

Za genotipizaciju *MMP-1* -1607 1G/2G, *MMP-2* -735 C/T, *MMP-2* -1306 C/T, *MMP-3* -1612 5A/6A, *MMP-9* -1562 C/T, kao i *TIMP-1* -372 C/T, *TIMP-2* -303 C/T, *TIMP-3* -915 A/G, *TIMP-3* -1296 C/T, *TIMP-4* -3'-UTR C/T polimorfni varijanti korištena je kombinacija metoda lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*; PCR) i polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (engl. *restriction fragment length polymorphism*; RFLP). Slijedovi nukleotida specifičnih početnica, uvjeti PCR reakcija te vrste restrikcijskih enzima preuzeti su iz postupnika prethodno opisanih u literaturi, koji su, po potrebi, bili preinačeni (206,209,250-254).

3.2.2.1. Lančana reakcija polimeraze

Slijedovi nukleotida specifičnih početnica, kao i veličine umnoženih ciljnih odsječaka gena *MMP* i *TIMP* obitelji (PCR produkt) prikazani su u tablicama 6 i 7, sadržaj PCR reakcijske smjese u

tablici 8, a uvjeti PCR reakcija u tablicama 9 i 10. Umnažanje ciljnih odsječaka DNA molekule provedeno je u ukupnom volumenu od 10 μ l u uređajima za PCR (engl. *thermocycler*) (Mastercycle personal, Eppendorf, Hamburg, Njemačka i 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, Sjedinjene Američke Države). Za provjeru moguće kontaminacije PCR reakcijske smjese korištene su negativne kontrole, odnosno uzroci u kojima nije bilo DNA molekule.

3.2.2.2. Polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata

Nakon PCR reakcije, dobiveni PCR produkti su bili podvrgnuti cijepanju odgovarajućim restrikcijskim endonukleazama uz pripadajuće puferne prema uputama što ih navodi proizvođač (New England Biolabs, Ipswich, MA, Sjedinjene Američke Države). Vrste restrikcijskih enzima i veličine dobivenih restrikcijskih fragmenata potrebnih za analizu polimorfni varijanti gena *MMP* i *TIMP* obitelji prikazani su u tablicama 11 i 12. U svim RFLP analizama korišteno je 0,2 μ l restrikcijskog enzima i 2 μ l pripadajućeg pufera, osim u slučaju analize *MMP-3* -1612 5A/6A polimorfne varijante, u kojoj je korišteno 0,3 μ l *XmnI* enzima i 1,5 μ l pripadajućeg pufera. Reakcijske smjese inkubirane su u trajanju od 18 do 22 sata (preko noći) u vodenoj kupelji na temperaturi od 37 °C, uz iznimku RFLP analize za *TIMP-2* -303 C/T polimorfnu varijantu, za koju je reakcijska smjesa inkubirana u vodenoj kupelji na temperaturi od 65 °C u trajanju od četiri sata.

3.2.2.3. Elektroforeza na agaroznom gelu

Uvjeti elektroforeze na agaroznom gelu bili su isti za sve polimorfne varijante gena *MMP* i *TIMP* obitelji. Naime, dobiveni PCR produkti i restrikcijski fragmenti, uz negativne kontrole, bili su odvojeni tehnikom elektroforeze na 1 %, odnosno 3 % agaroznim gelovima obojanim pomoću 2,5 μ l etidij bromida ili GelRedTM-a (Olerup SSP[®], Saltsjöbaden, Švedska), u trajanju od 45 minuta na 80 volti. Rezultati su bili predloženi pod ultraljubičastim svjetlom na uređaju za vizualizaciju gelova (engl. *transilluminator*). Utvrđivanje veličine PCR produkata, kao i prisutnosti pojedinih polimorfni varijanti temeljilo se na određivanju očekivane veličine umnoženih, odnosno restrikcijskih fragmenata uz pomoć standardnih odsječaka DNA molekule veličine od 100 pb.

Tablica 6. Slijedovi nukleotida specifičnih početnica i veličine PCR produkata korištenih za analizu polimorfnih varijanti gena *MMP* obitelji

Gen	Polimorfna varijanta	Početnice	PCR produkt (pb)	Referenca
<i>MMP-1</i>	-1607 1G/2G	F: 5'-TGACTTTTAAAACATAGTCTATGTTCA-3'	269	250
		R: 5'-TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTCATAGC-3' ^a		
<i>MMP-2</i>	-735 C/T	F: 5'-ATAGGGTAAACCTCCCCACATT-3'	300	251
		R: 5'-GGTAAAATGAGGCTGAGACCTG-3'		
<i>MMP-2</i>	-1306 C/T	F: 5'-CTTCCTAGGCTGGTCCTTACTGA-3'	188	
		R: 5'-CTGAGACCTGAAGAGCTAAAGAGCT-3'		
<i>MMP-3</i>	-1612 5A/6A	F: 5'-GATTACAGACATGGGTCACA-3'	120	252
<i>MMP-9</i>	-1562 C/T	F: 5'-GCCTGGCACATAGTAGGCC-3'	435	253
		R: 5'-CTTCCTAGCCAGCCGGCATC-3'		

F - engl. *forward primer*; R - engl. *reverse primer*; pb – parova baza

^aNa mjestu drugog nukleotida blizu 3' kraja uvedena je točkasta mutacija zamjenom timina u gvanin čime je stvoreno mjesto cijepanja za restriksijski enzim AluI (slijed nukleotida AGCT) u slučaju prisutnosti 1G alela (255)

Tablica 7. Slijedovi nukleotida specifičnih početnica i veličine PCR produkata korištenih za analizu polimorfnih varijanti gena *TIMP* obitelji

Gen	Polimorfna varijanta	Početnice	PCR produkt (pb)	Referenca
<i>TIMP-1</i>	-372 C/T	F: 5'- GCACATCACTACCTGCAGTC-3' R: 5'- GAAACAAGCCCACGATTTAG-3'	175	251
<i>TIMP-2</i>	-303 C/T	F: 5'-CCAGGAAATTGGCAGGTAGT-3' R: 5'-GAATTCACCAACTGTGTGGC-3'	365	209
<i>TIMP-3</i>	-915 A/G	F: 5'- CACAGAAAATCACCCCTGTGC-3' R: 5'- ATAGAAGACCTGTTTTCTGGGCTC-3' ^a	141	206
	-1296 C/T	F: 5'- CAAAGCAGAATCAAGATGTCAAT-3' R: 5'- CTGGGTAAAGCAACACAAAGC-3' ^b	488	
<i>TIMP-4</i>	-3'-UTR C/T	F: 5'- ATGATGCTGTCAAACCACCT -3' R: 5'- CTCCCAAACCCCATTAGTCT -3'	222	209

F - engl. *forward primer*; R - engl. *reverse primer*; pb – parova baza

^apočetnice za sparivanje krivih baza (engl. *mismatch primers*) koje dovode do stvaranja restrikcijskog mjesta za NlaIV enzim

^bpreinačene početnice koje dovode do gubitka restrikcijskog mjesta za AluI enzim

Tablica 8. Sadržaj PCR reakcijskih smjesa korištenih za analizu polimorfnih varijanti gena *MMP* i *TIMP* obitelji

	<i>MMP-1</i> -1607 1G/2G	<i>MMP-2</i> -735 C/T	<i>MMP-2</i> -1306 C/T	<i>MMP-3</i> -1612 5A/6A	<i>MMP-9</i> -1562 C/T	<i>TIMP-1-4</i>
Sadržaj PCR reakcijske smjese	Konačna koncentracija					
10x PCR pufer	1x	1x	1x	1x	1x	1x
50mM MgCl	1,5 mM	2 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	2 mM
2mM dNTP	0,06 mM	0,06 mM	0,04 mM	0,04 mM	0,04 mM	0,06 mM
Uzvodna ^a početnica	0,2 μM	0,2 μM	0,1 μM	0,1 μM	0,1 μM	0,2 μM
Nizvodna ^b početnica	0,2 μM	0,2 μM	0,1 μM	0,1 μM	0,1 μM	0,2 μM
Taq polimeraza	0,05 U	0,05 U	0,05 U	0,05 U	0,05 U	0,05 U
Bidestilirana voda						

mM – milimol; μM- mikromol; U (jedinica; engl. *unit*)

^aengl. *forward primer*; ^bengl. *reverse primer*

Tablica 9. Uvjeti PCR reakcija korištenih za analizu polimorfni varijanti gena *MMP* obitelji

	<i>MMP-1</i> -1607 1G/2G	<i>MMP-2</i> -735 C/T	<i>MMP-2</i> -1306 C/T	<i>MMP-3</i> -1612 5A/6A	<i>MMP-9</i> -1562 C/T
Korak PCR reakcije	Temperatura (°C) / Vrijeme trajanja				
1. Početna denaturacija	94/2 min	95/10 min	95/5 min	95/2 min	94/10 min
2. Denaturacija	94/30 s	95/45s	95/30s	95/30s	94/30s
3. Sparivanje početnica	58/30s	68/45s	60/30s	53/30s	59/30s
4. Produljivanje lanaca	72/30 s	72/45s	72/30s	72/30s	72/30s
Broj ponavljanja koraka 2-4	40	35	35	35	35
5. Završno produljivanje lanaca	72/5 min	72/7 min	72/10 min	70/2 min	72/10 min

Tablica 10. Uvjeti PCR reakcija korištenih za analizu polimorfni varijanti gena *TIMP* obitelji

	<i>TIMP-1</i> -372 C/T	<i>TIMP-2</i> -303 C/T	<i>TIMP-3</i> -915 A/G	<i>TIMP-3</i> -1296 C/T	<i>TIMP-4</i> -3'-UTR C/T
Korak PCR reakcije	Temperatura (°C) / Vrijeme trajanja				
1. Početna denaturacija	94/10 min	94/10 min	94/10 min	95/10 min	94/10 min
2. Denaturacija	94/45s	94/45s	94/45s	95/30s	94/45s
3. Sparivanje početnica	63/45s	62/45s	60/45s	58/30s	60/45s
4. Produljivanje lanaca	72/45s	72/45s	72/45s	72/30s	72/45s
Broj ponavljanja koraka 2-4	35	35	35	35	35
5. Završno produljivanje lanaca	72/10 min	72/10 min	72/10 min	72/8 min	72/10 min

Tablica 11. Vrste restrikcijskih enzima i veličine restrikcijskih fragmenata korištenih za analizu polimorfnih varijanti gena *MMP* obitelji

Gen	Polimorfna varijanta	Restrikcijski enzim	Restrikcijski fragmenti (pb)	Referenca
<i>MMP-1</i>	-1607 1G/2G	AluI	2G alel: 269 1G alel: 241 i 28	250
	-735 C/T	HinfI	C alel: 300 T alel: 254 i 46	
<i>MMP-2</i>	-1306 C/T	BfaI	C alel: 188 T alel: 162 i 26	251
	-1612 5A/6A	XmnI	6A alel: 120 5A alel: 97 i 23	
<i>MMP-3</i>	-1562 C/T	SphI	C alel: 435 T alel: 247 i 188	252
<i>MMP-9</i>				253

pb – parova baza

Tablica 12. Vrste restrikcijskih enzima i veličine restrikcijskih fragmenata korištenih za analizu polimorfnih varijanti gena *TIMP* obitelji

Gen	Polimorfna varijanta	Restrikcijski enzim	Restrikcijski fragmenti (pb)	Referenca
<i>TIMP-1</i>	-372 C/T	BssSI	T alel: 175 C alel: 152 i 23	254
<i>TIMP-2</i>	-303 C/T	BsrI	C alel: 365 T alel: 232 i 133	209
<i>TIMP-3</i>	-915 A/G	NlaIV	A alel: 141 G alel: 120 i 21	206
	-1296 C/T	AluI	C alel: 204, 160, 69 i 55 T alel: 204, 128, 69, 55 i 32	
<i>TIMP-4</i>	-3'-UTR C/T	HpyCH4III	T alel: 222 C alel: 194 i 28	209

pb – parova baza

3.2.3. ETIČKI ASPEKTI ISTRAŽIVANJA

U skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije, u ovom istraživanju poštivali su se temeljni etički i bioetički principi, uključujući osobni integritet - autonomnost, pravednost, dobročinstvo i neškodljivost.

U istraživanju su korišteni isključivo DNA uzorci koji su prikupljeni između 2004. i 2012. godine u sklopu međunarodne „HuMGeN“ baze sa sjedištem u Kliničnom inštitutu za medicinsko genetiko, Univerzitetnog kliničnog centra u Ljubljani (Ljubljana, Slovenija). Svi medicinski podaci i humani materijal prikupljeni su uz odobrenje Državne komisije za biomedicinsku etiku Republike Slovenije u skladu s etičkim i bioetičkim principima, pri čemu je svaki ispitanik bio upoznat sa svrhom i metodologijom istraživanja, a pristanak za sudjelovanje u istraživanju potvrđen je davanjem pismene informirane suglasnosti ispitanika.

Istraživanje je odobrilo Povjerenstvo za etička pitanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci 2007. godine prilikom prijave projekta “Genetski čimbenici u etiologiji učestalih spontanih pobačaja” (br. 062-0000000-3548, voditelj: izv.prof.dr.sc. Saša Ostojić, dr.med.). Također, u istraživanju je osigurana privatnost, odnosno medicinska tajna ispitanika, kao i zaštita tajnosti podataka.

3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za statističku obradu podataka korišteni su računalni programi Statistica for Windows, inačica 10 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, Sjedinjene Američke Države) i MedCalc for Windows, inačica 12.4.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija). Za izračun snage testa (engl. *power analysis*) i Hardy-Weinbergove ravnoteže korištene su slobodno dostupne mrežne aplikacije Statistical Power Calculator (DSS Research, Fort Worth, TX, Sjedinjene Američke Države) (256), odnosno Simple Hardy-Weinberg Calculator - Court Lab (Washington State University College of Veterinary Medicine, Pullman, WA, Sjedinjene Američke Države) (257). Analiza haplotipova provedena je uz pomoć računalnog programa SNP Analyzer Pro, inačica 1.8 (ISTECH Inc., Goyang, Gyeonggi-do, Južna Korea). Epidemiološke značajke parova s IPSP-om prikazane su deskriptivnom statistikom.

3.3.1. ANALIZA GENOTIPOVA I ALELA

Razlike u učestalosti genotipova i alela pojedinačnih i kombinacija navedenih polimorfnih varijanti gena *MMP* i *TIMP* obitelji između ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine te primarnih i sekundarnih IPSP-ova, kao i moguća odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže utvrđene su X^2 -testom. Nadalje, za procjenu učinka pojedinačnih i kombiniranih *MMP* i *TIMP* genotipova i alela na podložnost za IPSP prema različitim genetičkim modelima izračunati su omjeri izgleda (engl. *odds ratio*; OR) i 95 %-tni intervali pouzdanosti (engl. *confidence intervals*; CI). Statistička značajnost je utvrđena na razini P-vrijednosti manjoj od 0,05.

3.3.2. ANALIZA HAPLOTIPOVA

Analiza haplotipova je provedena za polimorfne varijante koje su smještene na istom kromosomu, odnosno za *MMP-1* -1607 1G/2G i *MMP-3* -1612 5A/6A, *MMP-2* -735 C/T i -1306 C/T, kao i *TIMP-3* -915 A/G i -1296 C/T polimorfne varijante (tablica 3), postupkom maksimizacije očekivanja (engl. *expectation maximization algorithm*). Navedeni postupak stvara procjene na razini populacije na osnovi najveće vjerojatnosti za određeni haplotip, a koju određuje na temelju podataka iz uzorka (258).

Razlike u učestalosti haplotipova *MMP-1* -1607 1G/2G i *MMP-3* -1612 5A/6A, *MMP-2* -735 C/T i -1306 C/T, kao i *TIMP-3* -915 A/G i -1296 C/T polimorfni varijanti između ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine te primarnih i sekundarnih IPSP-ova utvrđene su X^2 -testom. Za procjenu učinka navedenih haplotipova na podložnost za IPSP izračunati su omjeri izgleda i 95 %-tni intervali pouzdanosti, tako što je jedan haplotip uspoređen sa zbrojem svih ostalih haplotipova. Statistička značajnost je utvrđena na razini P-vrijednosti manjoj od 0,05.

Kako bi se smanjile lažno pozitivne povezanosti s podložnošću za IPSP, haplotipovi učestalosti manje od 1 % nisu prikazani, dok su oni s učestalošću manjom od 5 % prikazani, ali nisu bili uključeni u izračun razlika učestalosti haplotipova, kao niti omjera izgleda.

4. REZULTATI

U istraživanju su analizirane *MMP-1* -1607 1G/2G, *MMP-2* -735 C/T, *MMP-2* -1306 C/T, *MMP-3* -1612 5A/6A, *MMP-9* -1562 C/T, kao i *TIMP-1* -372 C/T, *TIMP-2* -303 C/T, *TIMP-3* -915 A/G, *TIMP-3* -1296 C/T i *TIMP-4* -3'-UTR C/T polimorfne varijante na uzorcima genomske DNA molekule od ukupno 149 žena s IPSP-om i njihovih 149 reproduktivnih partnera, kao i 149 zdravih žena i 149 zdravih muškaraca koji imaju barem dva živorođena djeteta, bez spontanih pobačaja i ostalih komplikacija u trudnoći.

Koncentracija DNA je iznosila 350-800 ng/μl, a čistoća $A_{260/280} = 1,8-2$ i $A_{260/230} > 1$. Odabrane epidemiološke značajke povezane s fenomenom spontanih gubitaka trudnoće u parova s IPSP-om prikazane su u tablici 13. Podaci o razdoblju spontanih pobačaja bili su dostupni za 100 parova. Ukupno 98 parova je imalo primarni IPSP, a 51 sekundarni IPSP.

Tablica 13. Odabrane epidemiološke značajke spontanih gubitaka trudnoće u reproduktivnih parova s IPSP-om

	Parovi s IPSP-om
Broj spontanih pobačaja [N (%)]	
3	138 (92,6)
4	6 (4,0)
5	4 (2,7)
10	1 (0,7)
<hr/>	
Razdoblje spontanih pobačaja [N (%)]	
≤12. tjedan	282 (91,8)
13.-22. tjedan	25 (8,1)
<hr/>	
Broj živorođene djece [N (%)]	
0	98 (65,8)
1	37 (24,8)
2	11 (7,4)
3	2 (1,3)
4	1 (0,7)

4.1. ANALIZA POLIMORFNIH VARIJANTI GENA MATRIKS

METALOPROTEINAZA

Analiza učestalosti i utjecaja genotipova, alela i haplotipova istraživanih polimorfnih varijanti gena *MMP* obitelji provedena je i prikazana zasebno u muških i ženskih ispitanika u skupini parova s IPSP-om i skupini kontrolnih ispitanika te podskupinama primarnih i sekundarnih IPSP-ova.

4.1.1. ISPITANICI SKUPINE PAROVA S IPSP-OM I KONTROLNE SKUPINE

4.1.1.1. Snaga testa

Istraživanje je imalo snagu od 80 % za otkrivanje 1,6 puta veće promjene učestalosti *MMP-1* -1607 1G alela, 1,7 puta veće promjene učestalosti *MMP-2* -735 T alela, 1,8 puta veće promjene učestalosti *MMP-2* -1306 T alela, 1,3 puta veće promjene učestalosti *MMP-3* -1612 6A alela, kao i 1,7 puta veće promjene učestalosti *MMP-9* -1562 T alela.

4.1.1.2. Hardy-Weinbergova ravnoteža

Raspodjele učestalosti genotipova svih istraživanih polimorfnih varijanti gena *MMP* obitelji podudarale su se s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi u muških i ženskih ispitanika u skupini parova s IPSP-om i skupini kontrolnih ispitanika (tablica 14).

Tablica 14. Hardy-Weinbergova ravnoteža za polimorfne varijante gena *MMP* obitelji u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine

Gen	Polimorfna varijanta	Žene				Muškarci			
		IPSP		Kontrole		IPSP		Kontrole	
		X ²	P	X ²	P	X ²	P	X ²	P
<i>MMP-1</i>	-1607 1G/2G	3,12	0,077	1,92	0,165	3,45	0,063	2,20	0,138
<i>MMP-2</i>	-735 C/T	3,53	0,060	0,01	0,909	1,08	0,299	0,04	0,833
	-1306 C/T	0,00	0,970	1,76	0,185	0,29	0,590	0,15	0,700
<i>MMP-3</i>	-1612 5A/6A	0,54	0,464	0,64	0,423	1,56	0,211	1,14	0,286
<i>MMP-9</i>	-1562 C/T	1,48	0,224	3,51	0,061	1,41	0,235	3,26	0,071

4.1.1.3. Analiza pojedinačnih genotipova i alela

Učestalost genotipova i alela *MMP-1* -1607 1G/2G polimorfne varijante u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine prikazane su u tablici 15, a njihov utjecaj na podložnost za IPSP prema genetičkim modelima u tablici 16. Nije pronađena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova i alela navedene polimorfne varijante između žena, kao niti muškaraca skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine. Također, nije utvrđen statistički značajan utjecaj genotipova i alela na podložnost za IPSP u žena i muškaraca niti prema jednom genetičkom modelu.

Tablica 15. Učestalost genotipova i alela *MMP-1* -1607 1G/2G polimorfne varijante u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine

<i>MMP-1</i> -1607	Žene				Muškarci			
	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P
Genotip								
2G/2G	97 (65,1)	97 (65,1)			87 (58,4)	84 (56,4)		
1G/2G	42 (28,2)	43 (28,9)	0,06	0,968	48 (32,2)	51 (34,2)	0,14	0,931
1G/1G	10 (6,7)	9 (6,0)			14 (9,4)	14 (9,4)		
Alel								
2G	236 (79,2)	237 (79,5)	0,01	0,920	222 (74,5)	219 (73,5)	0,08	0,780
1G	62 (20,8)	61 (20,5)			76 (25,5)	79 (26,5)		

Tablica 16. Utjecaj genotipova i alela *MMP-1* -1607 1G/2G polimorfne varijante na podložnost za IPSP

<i>MMP-1</i> -1607 genetički model		Žene		Muškarci	
		IPSP vs. kontrole		IPSP vs. kontrole	
		OR (95 % CI)	P	OR (95 % CI)	P
Dominantni	1G1G + 1G2G vs. 2G2G	1,00 (0,62-1,61)	1,000	0,92 (0,58-1,46)	0,725
Recesivni	1G1G vs. 1G2G + 2G2G	1,12 (0,44-2,84)	0,813	1,00 (0,46-2,18)	1,000
	1G1G vs. 2G2G	1,11 (0,43-2,85)	0,828	0,96 (0,43-2,15)	0,931
Kodominantni	1G1G vs. 1G2G	1,14 (0,42-3,08)	0,800	1,06 (0,46-2,46)	0,888
	2G2G vs. 1G2G	1,02 (0,61-1,70)	0,928	1,10 (0,67-1,80)	0,705
Aleli	1G vs. 2G	1,02 (0,69-1,52)	0,919	0,95 (0,66-1,37)	0,779

Učestalost genotipova i alela *MMP-2* -735 C/T polimorfne varijante u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine prikazane su u tablici 17, a utjecaj na podložnost za IPSP prema genetičkim modelima u tablici 18. Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova i alela između muškaraca skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine, kao niti utjecaj na podložnost za IPSP. Međutim, u žena s IPSP-om, u usporedbi s kontrolnom skupinom, pronađena je statistički značajno veća učestalost CT genotipa (P=0,006) i T alela (P=0,004). Nadalje, prema dominantnom genetičkom modelu, žene koje imaju CT i TT genotipove imaju 2,15 puta veći izgled za IPSP u usporedbi sa ženama koje imaju CC genotip (95 % CI=1,34-3,45; P=0,001).

Tablica 17. Učestalost genotipova i alela *MMP-2* -735 C/T polimorfne varijante u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine

<i>MMP-2</i> -735 Genotip	Žene				Muškarci			
	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P
CC	76 (51,0)	103 (69,1)			93 (62,4)	102 (68,5)		
CT	67 (45,0)	42 (28,2)	10,21	0,006	52 (34,9)	43 (28,8)	1,27	0,530
TT	6 (4,0)	4 (2,7)			4 (2,7)	4 (2,7)		
Alel								
C	219 (73,5)	248 (83,2)	8,32	0,004	238 (79,9)	247 (82,9)	0,90	0,343
T	79 (26,5)	50 (16,8)			60 (20,1)	51 (17,1)		

Tablica 18. Utjecaj genotipova i alela *MMP-2* -735 C/T polimorfne varijante na podložnost za IPSP

<i>MMP-2</i> -735 genetički model		Žene		Muškarci	
		IPSP vs. kontrole OR (95 % CI)	P	IPSP vs. kontrole OR (95 % CI)	P
Dominantni	CT + TT vs. CC	2,15 (1,34-3,45)	0,001	1,32 (0,81-2,11)	0,273
Recesivni	TT vs. CC + CT	1,52 (0,42-5,50)	0,523	1,00 (0,24-4,07)	1,000
Kodominantni	TT vs. CC	2,03 (0,55-7,45)	0,284	1,10 (0,27-4,51)	0,898
	TT vs. CT	0,94 (0,25-3,53)	0,928	0,83 (0,19-3,50)	0,797
	CT vs. CC	2,16 (1,33-3,52)	0,002	0,75 (0,46-1,23)	0,261
Aleli	T vs. C	1,79 (1,20-2,66)	0,004	1,22 (0,81-1,85)	0,344

Učestalost genotipova i alela *MMP-2* -1306 C/T polimorfne varijante u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine prikazane su u tablici 19, a njihov utjecaj na podložnost za IPSP prema genetičkim modelima u tablici 20. Između muškaraca skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova i alela, kao niti utjecaj na podložnost za IPSP prema genetičkim modelima. Naprotiv, u žena s IPSP-om, u usporedbi s kontrolnom skupinom, pronađena je statistički značajno veća učestalost CC genotipa (P=0,037) i C alela (P=0,019). Također, prema recesivnom genetičkom modelu, žene koje imaju CC genotip imaju 2,08 puta veći izgled za IPSP u usporedbi sa ženama koje imaju CT i TT genotipove (95 % CI=1,17-3,69; P=0,012).

Tablica 19. Učestalost genotipova i alela *MMP-2* -1306 C/T polimorfne varijante u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine

<i>MMP-2</i> -1306	Žene				Muškarci			
	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P
Genotip								
CC	126 (84,5)	108 (72,5)			119 (79,9)	108 (72,5)		
CT	22 (14,8)	40 (26,8)	6,61	0,037	29 (19,4)	37 (24,8)	3,30	0,192
TT	1 (0,7)	1 (0,7)			1 (0,7)	4 (2,7)		
Alel								
C	274 (92,0)	256 (85,9)	5,52	0,019	267 (89,6)	253 (84,9)	2,96	0,085
T	24 (8,0)	42 (14,1)			31(10,4)	45 (15,1)		

Tablica 20. Utjecaj genotipova i alela *MMP-2* -1306 C/T polimorfne varijante na podložnost za IPSP

<i>MMP-2</i> -1306 genetički model		Žene		Muškarci	
		IPSP vs. kontrole		IPSP vs. kontrole	
		OR (95 % CI)	P	OR (95 % CI)	P
Dominantni	CC + CT vs. TT	1,00 (0,06-16,14)	1,000	4,08 (0,45-36,97)	0,211
Recesivni	CC vs. CT + TT	2,08 (1,17-3,69)	0,012	1,51 (0,88-2,58)	0,137
	CC vs. TT	1,17 (0,08-18,88)	0,914	4,41 (0,48-40,05)	0,188
Kodominantni	CC vs. CT	2,12 (1,19-3,79)	0,011	1,40 (0,81-2,44)	0,227
	TT vs. CT	1,82 (0,11-30,51)	0,678	0,32 (0,03-3,01)	0,319
Aleli	C vs. T	1,87 (1,10-3,19)	0,020	1,53 (0,94-2,50)	0,087

Učestalost genotipova i alela *MMP-3* -1612 5A/6A polimorfne varijante u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine prikazane su u tablici 21, a njihov utjecaj na podložnost za IPSP prema genetičkim modelima u tablici 22. Učestalost genotipova i alela nisu se statistički značajno razlikovale između žena, kao niti muškaraca skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine. Nadalje, nije utvrđen statistički značajan utjecaj genotipova i alela na podložnost za IPSP niti prema jednom genetičkom modelu.

Tablica 21. Učestalost genotipova i alela *MMP-3* -1612 5A/6A polimorfne varijante u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine

<i>MMP-3</i> -1612	Žene				Muškarci			
	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P
Genotip								
5A5A	41 (27,5)	47 (31,6)			50 (33,6)	35 (23,5)		
5A6A	70 (47,0)	69 (46,3)	0,77	0,681	66 (44,3)	81 (54,4)	4,18	0,124
6A6A	38 (25,5)	33 (22,1)			33 (22,1)	33 (22,1)		
Alel								
5A	152 (51,0)	163 (54,7)	0,81	0,367	166 (55,7)	151 (50,7)	1,52	0,218
6A	146 (49,0)	135 (45,3)			132 (44,3)	147 (49,3)		

Tablica 22. Utjecaj genotipova i alela *MMP-3* -1612 5A/6A polimorfne varijante na podložnost za IPSP

<i>MMP-3</i> -1612 genetički model		Žene		Muškarci	
		IPSP vs. kontrole OR (95 % CI)	P	IPSP vs. kontrole OR (95 % CI)	P
Dominantni	5A/5A + 5A/6A vs. 6A/6A	0,83 (0,49-1,42)	0,497	1,00 (0,58-1,73)	1,000
Recesivni	5A5A vs. 5A/6A + 6A/6A	0,82 (0,50-1,35)	0,446	1,64 (0,99-2,74)	0,055
Kodominantni	5A5A vs. 6A6A	0,76 (0,40-1,42)	0,385	1,43 (0,75-2,73)	0,280
	5A5A vs. 5A6A	0,86 (0,50-1,47)	0,580	1,75 (1,02-3,01)	0,042
	6A6A vs. 5A6A	1,13 (0,64-2,01)	0,665	1,23 (0,69-2,20)	0,490
Aleli	5A vs. 6A	0,86 (0,62-1,19)	0,367	1,22 (0,89-1,69)	0,218

Učestalost genotipova i alela *MMP-9* -1562 C/T polimorfne varijante u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine prikazane su u tablici 23, a njihov utjecaj na podložnost za IPSP prema genetičkim modelima u tablici 24. Nije pronađena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova i alela između muškaraca skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine, kao niti utjecaj na podložnost za IPSP prema genetičkim modelima. Međutim, u žena s IPSP-om, u usporedbi s kontrolnom skupinom, utvrđena je statistički značajno veća učestalost CC genotipa (P=0,010) i C alela (P=0,005). Također, prema recesivnom genetičkom modelu, žene koje imaju CC genotip imaju 2,21 puta veći izgled za IPSP u usporedbi sa ženama koje imaju CT i TT genotipove (95 % CI=1,30-3,80; P=0,004).

Tablica 23. Učestalost genotipova i alela *MMP-9* -1562 C/T polimorfne varijante u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine

<i>MMP-9</i> -1562	Žene				Muškarci			
	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P
Genotip								
CC	122 (81,9)	100 (67,1)			110 (73,8)	101 (67,8)		
CT	27 (18,1)	48 (32,2)	9,06	0,010	38 (25,5)	47 (31,5)	1,34	0,512
TT	0 (0)	1 (0,7)			1 (0,7)	1 (0,7)		
Alel								
C	271 (90,9)	248 (83,2)	7,89	0,005	258 (86,6)	249 (83,6)	1,07	0,301
T	27 (9,1)	50 (16,8)			40 (13,4)	49 (16,4)		

Tablica 24. Utjecaj genotipova i alela *MMP-9* -1562 C/T polimorfne varijante na podložnost za IPSP

<i>MMP-9</i> -1562 genetički model		Žene		Muškarci	
		IPSP vs. kontrole		IPSP vs. kontrole	
		OR (95 % CI)	P	OR (95 % CI)	P
Dominantni	CC + CT vs. TT	3,02 (0,12-74,74)	0,500	1,00 (0,06-16,14)	1,000
Recesivni	CC vs. CT + TT	2,21 (1,30-3,80)	0,004	1,34 (0,81-2,21)	0,252
	CC vs. TT	3,66 (0,15-90,75)	0,429	1,09 (0,07-17,64)	0,952
Kodominantni	CC vs. CT	2,17 (1,26-3,72)	0,005	1,35 (0,81-2,23)	0,249
	TT vs. CT	0,59 (0,02-14,93)	0,748	1,24 (0,07-20,43)	0,882
Aleli	C vs. T	2,02 (1,23-3,33)	0,006	1,27 (0,81-2,00)	0,302

4.1.1.4. Analiza kombinacija genotipova

Između žena skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine je pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli učestalosti 39 kombinacija (podaci nisu prikazani). Sve kombinacije uključuju jedan, dva ili sva tri rizična *MMP-2 -735 CT*, *MMP-2 -1306 CC* i *MMP-9 -1562 CC* genotipa utvrđena u analizi pojedinačnih polimorfničkih varijanti. Međutim, značajno je da niti jedna od navedenih kombinacija ne povećava izgled za IPSP u usporedbi s navedenim pojedinačnim rizičnim genotipovima. Primjerice, žene koje imaju kombinaciju *MMP-2 -735 CT* i *-1306 CC* genotipova imaju 2,45 puta veći izgled za IPSP (95 % CI=1,46-4,13; $P<0,001$), dok žene koje imaju kombinaciju *MMP-2 -735 CT*, *MMP-2 -1306 CC* i *MMP-9 -1562 CC* genotipova imaju 2,54 puta veći izgled za IPSP (95 % CI=1,43-4,56; $P=0,002$), u usporedbi sa ženama koje imaju ostale kombinacije genotipova.

Između muškaraca skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine nisu utvrđene statistički značajne razlike u raspodjeli učestalosti kombinacije genotipova dvije ili više polimorfničkih varijanti gena *MMP* obitelji, kao niti utjecaj na podložnost za IPSP prema genetičkim modelima (podaci nisu prikazani).

4.1.1.5. Analiza haplotipova

Učestalost haplotipova *MMP-1 -1607 1G/2G* i *MMP-3 -1612 5A/6A* te *MMP-2 -735 C/T* i *-1306 C/T* polimorfničkih varijanti u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine, kao i utjecaj na podložnost za IPSP prikazani su u tablicama 25 i 26. U žena skupine parova s IPSP-om, u usporedbi s kontrolnom skupinom, utvrđena je statistički značajno veća učestalost haplotipa koji sadrži *MMP-2 -735 T* i *-1306 C* alele ($P=0,002$). Žene koje imaju navedeni haplotip imaju 1,89 puta veći izgled za IPSP u usporedbi sa ženama koje imaju ostale haplotipove (95 % CI=1,26-2,84; $P=0,002$). Učestalosti haplotipova *MMP-1 -1607 1G/2G* i *MMP-3 -1612 5A/6A* polimorfničkih varijanti nisu se statistički značajno razlikovale između žena, kao niti muškaraca skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine.

Tablica 25. Učestalost haplotipova *MMP-1* -1607 1G/2G i *MMP-3* -1612 5A/6A polimorfnih varijanti i njihov utjecaj na podložnost za IPSP u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine

Haplotip		Žene						Muškarci					
<i>MMP-1</i> -1607	<i>MMP-3</i> -1612	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	χ^2	P	OR (95 % CI)	P	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	χ^2	P	OR (95 % CI)	P
2G	6A	135 (45,4)	122 (40,9)			1,19 (0,85-1,65)	0,309	114 (38,4)	122 (41,1)			0,89 (0,64-1,24)	0,503
2G	5A	101 (33,8)	115 (38,6)	1,65	0,438	0,80 (0,57-1,13)	0,203	108 (36,1)	97 (32,4)	0,95	0,814	1,18 (0,84-1,65)	0,343
1G	5A	51 (17,2)	48 (16,1)			1,07 (0,69-1,64)	0,769	52 (17,3)	55 (18,6)			0,93 (0,61-1,42)	0,749
1G	6A	11 (3,6)	13 (4,4)					24 (8,2)	24 (7,9)			1,00 (0,55-1,80)	1,000

Tablica 26. Učestalost haplotipova *MMP-2* -735 C/T i -1306 C/T polimorfnih varijanti i njihov utjecaj na podložnost za IPSP u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine

Haplotip		Žene						Muškarci					
<i>MMP-2</i> -735	<i>MMP-2</i> -1306	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	χ^2	P	OR (95 % CI)	P	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	χ^2	P	OR (95 % CI)	P
C	C	198 (66,4)	213 (71,4)			0,79 (0,56-1,12)	0,184	208 (69,8)	204 (68,3)			1,02 (0,72-1,45)	0,913
T	C	78 (26,1)	47 (15,7)	12,50	0,002	1,89 (1,26-2,84)	0,002	60 (20,0)	47 (15,9)	3,91	0,142	1,32 (0,87-2,02)	0,191
C	T	22 (7,5)	38 (12,9)			0,54 (0,31-0,95)	0,031	30 (10,2)	43 (14,6)			0,65 (0,40-1,07)	0,093
T	T							0 (0)	4 (1,2)				

4.1.2. ISPITANICI PODSKUPINA PRIMARNIH I SEKUNDARNIH IPSP-OVA

4.1.2.1. Hardy-Weinbergova ravnoteža

Raspodjele učestalosti genotipova svih istraživanih polimorfnih varijanti gena *MMP* obitelji podudarale su se s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi u muških i ženskih ispitanika u podskupinama parova s primarnim i sekundarnim IPSP-om, osim za *MMP-1* - 1607 1G/2G polimorfnu varijantu u žena sa sekundarnim IPSP-om ($P=0,001$) (tablica 27). Stoga je navedena polimorfna varijanta u žena isključena iz daljnje analize.

Tablica 27. Hardy-Weinbergova ravnoteža za polimorfne varijante gena *MMP* obitelji u ispitanika s primarnim i sekundarnim IPSP-om

Gen	Polimorfna varijanta	Žene				Muškarci			
		Primarni		Sekundarni		Primarni		Sekundarni	
		X ²	P	X ²	P	X ²	P	X ²	P
<i>MMP-1</i>	-1607 1G/2G	0,19	0,658	10,56	0,001	3,12	0,077	0,50	0,478
<i>MMP-2</i>	-735 C/T	1,52	0,217	2,44	0,118	0,44	0,505	1,52	0,218
	-1306 C/T	0,11	0,737	0,28	0,599	0,00	0,982	0,74	0,388
<i>MMP-3</i>	-1612 5A/6A	0,17	0,679	3,31	0,069	0,53	0,465	1,24	0,266
<i>MMP-9</i>	-1562 C/T	1,26	0,261	0,28	0,599	1,88	0,170	0,20	0,655

4.1.2.2. Analiza pojedinačnih genotipova i alela

Učestalost genotipova i alela *MMP-1 -1607 1G/2G*, *MMP-2 -735 C/T*, *MMP-2 -1306 C/T* i *MMP-3 -1612 5A/6A* polimorfnih varijanti u ispitanika podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova prikazane su u tablicama 28, 30, 32 i 34, a njihov utjecaj na podložnost za primarni i sekundarni IPSP prema genetičkim modelima u tablicama 29, 31, 33 i 35. Nije pronađena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova i alela niti jedne od navedenih polimorfnih varijanti između žena, kao niti muškaraca dviju podskupina. Nadalje, nije utvrđen statistički značajan utjecaj genotipova i alela istraživanih polimorfnih varijanti gena *MMP* obitelji na podložnost za primarni i sekundarni IPSP.

Tablica 28. Učestalost genotipova i alela *MMP-1 -1607 1G/2G* polimorfne varijante u muškaraca podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova

<i>MMP-1 -1607</i>	Muškarci		X ²	P
	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)		
Genotip				
2G/2G	57 (58,2)	30 (58,8)	0,23	0,891
1G/2G	31 (31,6)	17 (33,3)		
1G/1G	10 (10,2)	4 (7,9)		
Alel			0,08	0,776
2G	145 (74,0)	77 (75,5)		
1G	51 (26,0)	25 (24,5)		

Tablica 29. Utjecaj genotipova i alela *MMP-1 -1607 1G/2G* polimorfne varijante na podložnost za primarni i sekundarni IPSP

<i>MMP-1 -1607</i> genetički model		Muškarci	
		Primarni vs. sekundarni OR (95 % CI)	P
Dominantni	1G1G + 1G2G vs. 2G2G	1,03 (0,52-2,04)	0,938
Recesivni	1G1G vs. 1G2G + 2G2G	1,33 (0,40-4,49)	0,640
Kodominantni	1G1G vs. 2G2G	1,31 (0,38-4,55)	0,665
	1G1G vs. 1G2G	1,37 (0,37-5,04)	0,635
	2G2G vs. 1G2G	1,04 (0,50-2,18)	0,913
Aleli	1G vs. 2G	1,08 (0,62-1,88)	0,776

Tablica 30. Učestalost genotipova i alela *MMP-2* -735 C/T polimorfne varijante u ispitanika podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova

<i>MMP-2</i> -735	Žene				Muškarci			
	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)	X ²	P	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)	X ²	P
Genotip								
CC	49 (50,0)	27 (52,9)	0,88	0,644	57 (58,2)	36 (70,6)	3,58	0,167
CT	44 (44,9)	23 (45,1)			37 (37,7)	15 (29,4)		
TT	5 (5,1)	1 (2,0)			4 (4,1)	0		
Alel								
C	142 (72,4)	77 (75,5)	0,32	0,572	151 (77,0)	87 (85,3)	2,84	0,092
T	54 (27,6)	25 (24,5)			45 (23,0)	15 (14,7)		

Tablica 31. Utjecaj genotipova i alela *MMP-2* -735 C/T polimorfne varijante na podložnost za primarni i sekundarni IPSP

<i>MMP-2</i> -735 genetički model		Žene		Muškarci	
		Primarni vs. sekundarni OR (95 % CI)	P	Primarni vs. sekundarni OR (95 % CI)	P
Dominantni	CT + TT vs. CC	1,12 (0,57-2,21)	0,733	1,73 (0,84-3,56)	0,139
Recesivni	TT vs. CC + CT	2,69 (0,30-23,65)	0,373	4,90 (0,26-92,91)	0,289
	TT vs. CC	2,75 (0,30-24,81)	0,366	5,71 (0,30-109,27)	0,247
Kodominantni	CT vs. CC	1,05 (0,53-2,10)	0,881	1,56 (0,75-3,23)	0,234
	CT vs. TT	0,38 (0,04-3,47)	0,393	0,27 (0,01-5,30)	0,388
Aleli	T vs. C	1,17 (0,68-2,03)	0,573	1,73 (0,91-3,23)	0,094

Tablica 32. Učestalost genotipova i alela *MMP-2* -1306 C/T polimorfne varijante u ispitanika podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova

<i>MMP-2</i> -1306	Žene				Muškarci			
	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)	X ²	P	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)	X ²	P
Genotip								
CC	82 (83,7)	44 (86,3)	0,60	0,739	79 (80,6)	40 (78,4)	0,72	0,699
CT	15 (15,3)	7 (13,7)			18 (18,4)	11 (21,6)		
TT	1 (1,0)	0			1 (1,0)	0		
Alel								
C	179 (91,3)	95 (93,1)	0,30	0,586	176 (89,8)	91 (89,2)	0,02	0,876
T	17 (8,7)	7 (6,9)			20 (10,2)	11 (10,8)		

Tablica 33. Utjecaj genotipova i alela *MMP-2* -1306 C/T polimorfne varijante na podložnost za primarni i sekundarni IPSP

<i>MMP-2</i> -1306 genetički model		Žene		Muškarci	
		Primarni vs. sekundarni		Primarni vs. sekundarni	
		OR (95 % CI)	P	OR (95 % CI)	P
Dominantni	CC + CT vs. TT	0,63 (0,02-15,77)	0,779	0,63 (0,02-15,77)	0,779
Recesivni	CC vs. CT + TT	0,81 (0,31-2,13)	0,677	1,14 (0,50-2,63)	0,753
	CC vs. TT	0,62 (0,02-15,49)	0,770	0,65 (0,03-16,42)	0,796
Kodominantni	CC vs. CT	0,87 (0,33-2,29)	0,777	1,21 (0,52-2,80)	0,661
	TT vs. CT	1,45 (0,05-40,04)	0,826	1,86 (0,07-49,77)	0,710
Aleli	C vs. T	0,77 (0,31-1,94)	0,587	1,06 (0,49-2,32)	0,876

Tablica 34. Učestalost genotipova i alela *MMP-3* -1612 5A/6A polimorfne varijante u ispitanika podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova

<i>MMP-3</i> -1612	Žene				Muškarci			
	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)	X ²	P	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)	X ²	P
Genotip								
5A/5A	25 (25,5)	16 (31,4)	3,03	0,220	31 (31,6)	19 (37,2)	0,50	0,780
5A6A	51 (52,0)	19 (37,2)			45 (45,9)	21 (41,2)		
6A6A	22 (22,5)	16 (31,4)			22 (22,5)	11 (21,6)		
Alel								
5A	101 (51,5)	51 (50,0)	0,06	0,802	107 (54,6)	59 (57,8)	0,29	0,592
6A	95 (48,5)	51 (50,0)			89 (45,4)	43 (42,2)		

Tablica 35. Utjecaj genotipova i alela *MMP-3* -1612 5A/6A polimorfne varijante na podložnost za primarni i sekundarni IPSP

<i>MMP-3</i> -1612 genetički model		Žene		Muškarci	
		Primarni vs. sekundarni		Primarni vs. sekundarni	
		OR (95 % CI)	P	OR (95 % CI)	P
Dominantni	5A/5A + 5A/6A vs. 6A/6A	1,58 (0,74-3,37)	0,238	0,95 (0,42-2,15)	0,902
Recesivni	5A5A vs. 5A/6A + 6A/6A	0,75 (0,35-1,58)	0,448	0,78 (0,38-1,58)	0,491
	5A5A vs. 6A6A	1,14 (0,46-2,79)	0,780	0,81 (0,32-2,05)	0,665
Kodominantni	5A5A vs. 5A6A	0,58 (0,26-1,32)	0,195	0,76 (0,35-1,65)	0,488
	6A6A vs. 5A6A	0,51 (0,22-1,18)	0,115	0,93 (0,38-2,28)	0,879
Aleli	5A vs. 6A	1,06 (0,66-1,71)	0,802	0,88 (0,54-1,42)	0,592

Učestalost genotipova i alela *MMP-9* -1562 C/T polimorfne varijante u ispitanika podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova prikazane su u tablici 36, a utjecaj na podložnost za primarni i sekundarni IPSP prema genetičkim modelima u tablici 37. Nije pronađena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova i alela između žena dviju podskupina, kao niti utjecaj na podložnost za primarni i sekundarni IPSP. Međutim, u muških partnera žena sa sekundarnim IPSP-om, u usporedbi s primarnim IPSP-om, utvrđena je statistički značajno veća učestalost CC genotipa ($P=0,015$) i C alela ($P=0,006$). Prema recesivnom genetičkom modelu, muškarci koji imaju CC genotip imaju 3,81 puta veći izgled za sekundarni nego primarni IPSP u usporedbi s muškarcima koji imaju CT i TT genotipove (95 % CI=1,47-9,84; $P=0,006$).

Tablica 36. Učestalost genotipova i alela *MMP-9* -1562 C/T polimorfne varijante u ispitanika podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova

<i>MMP-9</i> -1562	Žene				Muškarci			
	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)	X ²	P	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)	X ²	P
Genotip								
CC	78 (79,6)	44 (86,3)			65 (66,3)	45 (88,2)		
CT	20 (20,4)	7 (13,7)	1,01	0,315	32 (32,7)	6 (11,8)	8,44	0,015
TT	0	0			1 (1,0)	0		
Alel								
C	176 (89,8)	95 (93,1)	0,91	0,340	162 (82,7)	96 (94,1)	7,59	0,006
T	20 (10,2)	7 (6,9)			34 (17,3)	6 (5,9)		

Tablica 37. Utjecaj genotipova i alela *MMP-9* -1562 C/T polimorfne varijante na podložnost za primarni i sekundarni IPSP

<i>MMP-9</i> -1562 genetički model		Žene		Muškarci	
		Primarni vs. sekundarni		Primarni vs. sekundarni	
		OR (95 % CI)	P	OR (95 % CI)	P
Dominantni	CC + CT vs. TT	1,91 (0,04-97,80)	0,747	0,63 (0,02-15,77)	0,779
Recesivni	CC vs. CT + TT	0,62 (0,24-1,58)	0,318	0,26 (0,10-0,68)	0,006
	CC vs. TT	1,76 (0,03-90,45)	0,777	0,48 (0,02-12,04)	0,655
Kodominantni	CC vs. CT	0,62 (0,24-1,58)	0,318	0,27 (0,10-0,70)	0,007
	TT vs. CT	0,36 (0,01-20,14)	0,623	0,60 (0,02-16,42)	0,762
Aleli	C vs. T	0,65 (0,26-1,59)	0,343	0,30 (0,12-0,73)	0,009

4.1.2.3. Analiza kombinacija genotipova

U žena s IPSP-om nisu utvrđene statistički značajne razlike u raspodjeli učestalosti kombinacija genotipova dvije ili više polimorfničkih varijanti gena *MMP* obitelji između skupine primarnih i sekundarnih IPSP-ova, kao niti utjecaj na podložnost za primarni i sekundarni IPSP (podaci nisu prikazani). Između muškaraca podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova su pronađene statistički značajne razlike u raspodjeli učestalosti kombinacija genotipova *MMP-9* -1562 C/T i *MMP-1* -1612 5A/6A, kao i *MMP-9* -1562 C/T i *MMP-2* -735 C/T polimorfničkih varijanti (podaci nisu prikazani). Međutim, značajno je da navedene kombinacije ne povećavaju izgled za primarni i sekundarni IPSP u usporedbi s pojedinačnim *MMP-9* -1562 CC genotipom. Primjerice, muškarci koji imaju kombinaciju *MMP-9* -1562 CC i *MMP-2* -735 CC genotipova imaju 2,78 puta veći izgled za sekundarni nego primarni IPSP (95 % CI=1,38-5,59; P=0,004) u usporedbi s muškarcima koji imaju ostale kombinacije genotipova.

4.1.2.4. Analiza haplotipova

Učestalost haplotipova *MMP-1* -1607 1G/2G i *MMP-3* -1612 5A/6A te *MMP-2* -735 C/T i -1306 C/T polimorfničkih varijanti u ispitanika podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova, kao i utjecaj na podložnost za primarni i sekundarni IPSP prikazane su u tablicama 38 i 39. Između žena, kao i muškaraca dvije podskupine nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti haplotipova navedenih polimorfničkih varijanti.

Tablica 38. Učestalost haplotipova *MMP-1* -1607 1G/2G i *MMP-3* -1612 5A/6A polimorfničkih varijanti i njihov utjecaj na podložnost za primarni i sekundarni IPSP u muškaraca

Haplotip		Muškarci					
<i>MMP-1</i> -1607	<i>MMP-3</i> -1612	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)	χ^2	P	OR (95 % CI)	P
2G	6A	76 (38,7)	33 (31,9)	4,54	0,209	1,32 (0,80-2,19)	0,275
2G	5A	69 (35,2)	44 (43,6)			0,72 (0,44-1,17)	0,181
1G	5A	38 (19,4)	14 (14,2)			1,51 (0,78-2,94)	0,224
1G	6A	13 (6,7)	11 (10,3)			0,59 (0,25-1,36)	0,216

Tablica 39. Učestalost haplotipova *MMP-2* -735 C/T i -1306 C/T polimorfnih varijanti i njihov utjecaj na podložnost za primarni i sekundarni IPSP u ispitanika podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova

Haplotip		Žene						Muškarci					
<i>MMP-2</i> -735	<i>MMP-2</i> -1306	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)	χ^2	P	OR (95 % CI)	P	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)	χ^2	P	OR (95 % CI)	P
C	C	131 (66,6)	70 (68,7)			0,92 (0,55-1,54)	0,754	132 (67,4)	76 (74,7)			0,70 (0,41-1,21)	0,202
T	C	52 (26,3)	25 (24,5)	0,14	0,931	1,11 (0,64-1,93)	0,705	44 (22,4)	15 (14,6)	2,60	0,273	1,68 (0,88-3,19)	0,114
C	T	13 (6,6)	7 (6,8)			0,96 (0,37-2,50)	0,940	19 (9,6)	11 (10,7)			0,89 (0,40-1,94)	0,767

4.2. ANALIZA POLIMORFNIH VARIJANTI GENA TKIVNIH INHIBITORA METALOPROTEINAZA

Analiza učestalosti i utjecaja genotipova, alela i haplotipova istraživanih polimorfnih varijanti gena *TIMP* obitelji provedena je i prikazana zasebno u muških i ženskih ispitanika u skupini parova s IPSP-om i skupini kontrolnih ispitanika te podskupinama primarnih i sekundarnih IPSP-ova.

4.2.1. ISPITANICI SKUPINE PAROVA S IPSP-OM I KONTROLNE SKUPINE

4.2.1.1. Snaga testa

Istraživanje je imalo snagu od 80 % za otkrivanje 1,4 puta veće promjene učestalosti *TIMP-1* -372 T alela, 2,1 puta veće promjene učestalosti *TIMP-2* -303 T alela, 1,6 puta veće promjene učestalosti *TIMP-3* -915 G alela, 1,4 puta veće promjene učestalosti *TIMP-3* -1296 C alela, kao i 1,7 puta veće promjene učestalosti *TIMP-4* -3'-UTR T alela.

4.2.1.2. Hardy-Weinbergova ravnoteža

Raspodjele učestalosti genotipova svih istraživanih polimorfnih varijanti gena *TIMP* obitelji podudarale su se s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi u muških i ženskih ispitanika u skupini parova s IPSP-om i skupini kontrolnih ispitanika (tablica 40).

Tablica 40. Hardy-Weinbergova ravnoteža za polimorfne varijante gena *TIMP* obitelji u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine

Gen	Polimorfna varijanta	Žene				Muškarci			
		IPSP		Kontrole		IPSP		Kontrole	
		X ²	P	X ²	P	X ²	P	X ²	P
<i>TIMP-1</i> ^a	-372 C/T	3,76	0,052	3,70	0,054				
<i>TIMP-2</i>	-303 C/T	0,00	0,965	0,29	0,590	0,09	0,761	1,36	0,243
<i>TIMP-3</i>	-915 A/G	0,03	0,852	0,07	0,784	1,12	0,289	0,00	0,984
	-1296 C/T	0,33	0,566	0,00	0,966	3,29	0,070	1,92	0,166
<i>TIMP-4</i>	-3'-UTR C/T	0,01	0,901	0,19	0,663	0,53	0,464	0,52	0,471

^aPodaci o raspodjeli učestalosti genotipova *TIMP-1* -372 C/T polimorfne varijante su izostavljeni u muškaraca, s obzirom na to da je gen smješten na kromosomu X

4.2.1.3. Analiza pojedinačnih polimorfnih varijanti

Učestalost genotipova i alela *TIMP-1* -372 C/T, *TIMP-2* -303 C/T, *TIMP-3* -915 A/G, *TIMP-3* -1296 C/T i *TIMP-4* -3'-UTR C/T polimorfnih varijanti u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine prikazane su u tablicama 41, 43, 45, 47 i 49, a njihov utjecaj na podložnost za IPSP prema genetičkim modelima u tablicama 42, 44, 46, 48 i 50. Nije pronađena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova i alela niti jedne od navedenih polimorfnih varijanti između žena, kao niti muškaraca skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine. Nadalje, nije utvrđen statistički značajan utjecaj genotipova i alela istraživanih polimorfnih varijanti gena *TIMP* obitelji na podložnost za IPSP u žena i muškaraca prema genetičkim modelima.

Tablica 41. Učestalost genotipova i alela *TIMP-1* -372 C/T polimorfne varijante u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine

<i>TIMP-1</i> -372	Žene				Muškarci ^a			
	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P
Genotip								
CC	63 (42,3)	66 (44,3)	0,15	0,925	83 (55,7)	84 (56,4)	0,01	0,907
CT	59 (39,6)	58 (38,9)						
TT	27 (18,1)	25 (16,8)						
Alel								
C	185 (62,1)	190 (63,8)	0,18	0,671	83 (55,7)	84 (56,4)	0,01	0,907
T	113 (37,9)	108 (36,2)						

^aPodaci o raspodjeli učestalosti genotipova *TIMP-1* -372 C/T polimorfne varijante su izostavljeni u muškaraca, s obzirom na to da je gen smješten na kromosomu X

Tablica 42. Utjecaj genotipova i alela *TIMP-1* -372 C/T polimorfne varijante na podložnost za IPSP

<i>TIMP-1</i> -372 genetički model		Žene		Muškarci ^a	
		IPSP vs. kontrole		IPSP vs. kontrole	
		OR (95 % CI)	P	OR (95 % CI)	P
Dominantni	CC + CT vs. TT	0,91 (0,50-1,66)	0,760		
Recesivni	CC vs. CT + TT	0,92 (0,58-1,46)	0,726		
	CC vs. TT	0,88 (0,46-1,68)	0,707		
Kodominantni	CC vs. CT	0,94 (0,57-1,55)	0,803		
	TT vs. CT	1,06 (0,55-2,04)	0,857		
Aleli	C vs. T	0,93 (0,67-1,30)	0,671	0,97 (0,61-1,54)	0,907

^aPodaci o raspodjeli učestalosti genotipova *TIMP-1* -372 C/T polimorfne varijante su izostavljeni u muškaraca, s obzirom na to da je gen smješten na kromosomu X

Tablica 43. Učestalost genotipova i alela *TIMP-2* -303 C/T polimorfne varijante u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine

<i>TIMP-2</i> -303	Žene				Muškarci			
	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P
Genotip								
CC	116 (77,9)	119 (79,9)			122 (81,9)	123 (82,5)		
CT	31 (20,8)	29 (19,4)	0,44	0,803	26 (17,4)	26 (17,5)	1,00	0,605
TT	2 (1,3)	1 (0,7)			1 (0,7)	0 (0)		
Alel								
C	263 (88,3)	267 (89,6)			270 (90,6)	272 (91,3)		
T	35 (11,7)	31 (10,4)	0,27	0,601	28 (9,4)	26 (8,7)	0,08	0,776

Tablica 44. Utjecaj genotipova i alela *TIMP-2* -303 C/T polimorfne varijante na podložnost za IPSP

<i>TIMP-2</i> -303 genetički model		Žene		Muškarci	
		IPSP vs. kontrole		IPSP vs. kontrole	
		OR (95 % CI)	P	OR (95 % CI)	P
Dominantni	CC + CT vs. TT	0,50 (0,04-5,54)	0,569	0,33 (0,01-8,20)	0,500
Recesivni	CC vs. CT + TT	0,89 (0,51-1,55)	0,670	0,95 (0,53-1,73)	0,880
	CC vs. TT	0,49 (0,04-5,45)	0,560	0,33 (0,01-8,20)	0,499
Kodominantni	CC vs. CT	0,91 (0,52-1,61)	0,750	0,99 (0,54-1,80)	0,979
	TT vs. CT	1,87 (0,16-21,75)	0,617	3,00 (0,12-77,03)	0,507
Aleli	C vs. T	0,87 (0,52-1,46)	0,601	0,92 (0,53-1,61)	0,775

Tablica 45. Učestalost genotipova i alela *TIMP-3* -915 A/G polimorfne varijante u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine

<i>TIMP-3</i> -915	Žene				Muškarci			
	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P
Genotip								
AA	97 (65,1)	94 (63,1)			105 (70,5)	95 (63,8)		
AG	46 (30,9)	48 (32,2)	0,17	0,920	38 (25,5)	48 (32,2)	1,66	0,435
GG	6 (4,0)	7 (4,7)			6 (4,0)	6 (4,0)		
Alel								
A	240 (80,5)	236 (79,2)	0,17	0,683	248 (83,2)	238 (79,9)	1,11	0,291
G	58 (19,5)	62 (20,8)			50 (16,8)	60 (20,1)		

Tablica 46. Utjecaj genotipova i alela *TIMP-3* -915 A/G polimorfne varijante na podložnost za IPSP

<i>TIMP-3</i> -915 genetički model		Žene		Muškarci	
		IPSP vs. kontrole		IPSP vs. kontrole	
		OR (95 % CI)	P	OR (95 % CI)	P
Dominantni	AA + AG vs. GG	1,17 (0,38-3,58)	0,777	1,00 (0,31-3,17)	1,000
Recesivni	AA vs. AG + GG	1,09 (0,68-1,75)	0,717	1,36 (0,83-2,20)	0,218
	AA vs. GG	1,20 (0,39-3,71)	0,747	1,10 (0,34-3,54)	0,866
Kodominantni	AA vs. AG	1,08 (0,66-1,76)	0,769	1,40 (0,84-2,32)	0,198
	GG vs. AG	0,89 (0,28-2,86)	0,851	1,26 (0,38-4,23)	0,705
Aleli	A vs. G	1,09 (0,73-1,62)	0,683	1,25 (0,82-1,89)	0,291

Tablica 47. Učestalost genotipova i alela *TIMP-3* -1296 C/T polimorfne varijante u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine

<i>TIMP-3</i> -1296	Žene				Muškarci			
	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P
Genotip								
TT	68 (45,6)	67 (45,0)			72 (48,3)	59 (39,6)		
CT	63 (42,3)	66 (44,3)	0,19	0,907	56 (37,6)	63 (42,3)	2,45	0,293
CC	18 (12,1)	16 (10,7)			21 (14,1)	27 (18,1)		
Alel								
T	199 (66,8)	200 (67,1)	0,01	0,929	200 (67,1)	181 (60,7)	2,63	0,105
C	99 (33,2)	98 (32,9)			98 (32,9)	117 (39,3)		

Tablica 48. Utjecaj genotipova i alela *TIMP-3* -1296 C/T polimorfne varijante na podložnost za IPSP

<i>TIMP-3</i> -1296 genetički model		Žene		Muškarci	
		IPSP vs. kontrole OR (95 % CI)	P	IPSP vs. kontrole OR (95 % CI)	P
Dominantni	TT + CT vs. CC	0,87 (0,43-1,79)	0,716	1,35 (0,72-2,51)	0,345
Recesivni	TT vs. CT + CC	1,03 (0,65-1,62)	0,907	1,43 (0,90-2,26)	0,130
	TT vs. CC	0,90 (0,42-1,92)	0,789	1,57 (0,81-3,05)	0,185
Kodominantni	TT vs. CT	1,06 (0,66-1,72)	0,803	1,37 (0,83-2,26)	0,212
	CC vs. CT	1,18 (0,55-2,51)	0,670	0,87 (0,44-1,72)	0,698
Aleli	T vs. C	0,98 (0,70-1,38)	0,930	1,32 (0,94-1,84)	0,105

Tablica 49. Učestalost genotipova i alela *TIMP-4* -3'-UTR C/T polimorfne varijante u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine

<i>TIMP-4</i> -3'-UTR	Žene				Muškarci			
	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	X ²	P
Genotip								
CC	111 (74,5)	105 (70,5)			108 (72,5)	102 (68,5)		
CT	35 (23,5)	41 (27,5)	0,64	0,726	39 (26,2)	41 (27,5)	2,22	0,329
TT	3 (2,0)	3 (2,0)			2 (1,3)	6 (4,0)		
Alel								
C	257 (86,2)	251 (84,2)	0,48	0,488	255 (85,6)	245 (82,2)	1,24	0,265
T	41 (13,8)	47 (15,8)			43 (14,4)	53 (17,8)		

Tablica 50. Utjecaj genotipova i alela *TIMP-4* -3'-UTR C/T polimorfne varijante na podložnost za IPSP

<i>TIMP-4</i> -3'-UTR genetički model		Žene		Muškarci	
		IPSP vs. kontrole		IPSP vs. kontrole	
		OR (95 % CI)	P	OR (95 % CI)	P
Dominantni	CC + CT vs. TT	1,00 (0,20-5,04)	1,000	3,08 (0,61-15,53)	0,172
Recesivni	CC vs. CT + TT	1,22 (0,73-2,04)	0,437	1,21 (0,74-2,00)	0,446
	CC vs. TT	1,06 (0,21-5,35)	0,946	3,18 (0,63-16,10)	0,163
Kodominantni	CC vs. CT	1,24 (0,73-2,09)	0,424	1,11 (0,66-1,86)	0,683
	TT vs. CT	1,17 (0,22-6,18)	0,852	0,35 (0,07-1,84)	0,215
Aleli	C vs. T	1,17 (0,74-1,85)	0,488	1,28 (0,83-1,99)	0,265

4.2.1.4. Analiza kombinacija genotipova

U ženskih i muških ispitanika nisu utvrđene statistički značajne razlike u raspodjeli učestalosti kombinacije genotipova polimorfnih varijanti dvije ili više polimorfni varijanti gena *TIMP* obitelji između skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine, kao niti utjecaj na podložnost za IPSP prema genetičkim modelima (podaci nisu prikazani).

4.2.1.4.1. Analiza kombinacija genotipova polimorfni varijanti gena *MMP* i *TIMP* obitelji

Između žena podskupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine je utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli učestalosti kombinacija genotipova gena *MMP* i *TIMP* obitelji, koje uključuju jedan, dva ili sva tri rizična *MMP-2* -735 CT, *MMP-2* -1306 CC i *MMP-9* -1562 CC genotipa (podaci nisu prikazani). Kao i kod kombinacija genotipova polimorfni varijanti gena *MMP* obitelji, niti jedna od navedenih kombinacija s genima *TIMP* obitelji ne povećava izgleda za IPSP u usporedbi s pojedinačnim rizičnim genotipovima *MMP-2* i *-9* gena.

Između muškaraca skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine nisu utvrđene statistički značajne razlike u raspodjeli učestalosti kombinacije genotipova dvije ili više polimorfni varijanti gena *MMP* i *TIMP* obitelji, kao niti utjecaj na podložnost za IPSP (podaci nisu prikazani).

4.2.1.5. Analiza haplotipova

Učestalost haplotipova *TIMP-3* -915 A/G i -1296 C/T polimorfni varijanti u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine, kao i utjecaj na podložnost za IPSP prikazani su u tablici 51. Učestalosti haplotipova nisu se statistički značajno razlikovale između žena, kao niti muškaraca skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine.

Tablica 51. Učestalost haplotipova *TIMP-3* -915 A/G i -1296 C/T polimorfnih varijanti i njihov utjecaj na podložnost za IPSP u ispitanika skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine

Haplotip		Žene						Muškarci					
<i>TIMP-3</i> -915	<i>TIMP-3</i> -1296	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	χ^2	P	OR (95 % CI)	P	IPSP N (%)	Kontrole N (%)	χ^2	P	OR (95 % CI)	P
A	T	192 (64,4)	195 (65,5)			0,97 (0,69-1,37)	0,883	187 (62,6)	176 (59,0)	3,75	0,153	1,27 (0,90-1,78)	0,168
G	C	51 (17,0)	59 (19,9)	1,53	0,465	0,84 (0,56-1,28)	0,420	37 (12,3)	55 (18,4)			0,65 (0,41-1,01)	0,058
A	C	48 (16,2)	39 (13,0)			1,29 (0,81-2,03)	0,281	61 (20,6)	62 (20,9)			1,01 (0,68-1,51)	0,943
G	T	7 (2,4)	5 (1,6)					13 (4,5)	5 (1,7)				

4.2.2. ISPITANICI PODSKUPINA PRIMARNIH I SEKUNDARNIH IPSP-OVA

4.2.2.1. Hardy-Weinbergova ravnoteža

Raspodjele učestalosti genotipova svih istraživanih polimorfnih varijanti gena *TIMP* obitelji podudarale su se s očekivanim vrijednostima prema Hardy-Weinbergovoj jednadžbi u muških i ženskih ispitanika u podskupinama parova s primarnim i sekundarnim IPSP-om, osim za polimorfnu varijantu *TIMP-1* -372 C/T u žena s primarnim IPSP-om ($P=0,012$), kao i *TIMP-3* -1296 C/T u muških partnera žena s primarnim IPSP-om ($P=0,027$) (tablica 52). Stoga su navedene polimorfne varijante isključene iz daljnje analize u žena, odnosno muškaraca.

Tablica 52. Hardy-Weinbergova ravnoteža za polimorfne varijante gena *TIMP* obitelji u ispitanika podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova

Gen	Polimorfna varijanta	Žene				Muškarci			
		Primarni		Sekundarni		Primarni		Sekundarni	
		X ²	P	X ²	P	X ²	P	X ²	P
<i>TIMP-1^a</i>	-372 C/T	6,30	0,012	0,02	0,889				
<i>TIMP-2</i>	-303 C/T	0,06	0,809	0,48	0,489	0,06	0,812	0,20	0,655
<i>TIMP-3</i>	-915 A/G	0,18	0,672	1,00	0,317	3,12	0,077	0,32	0,571
	-1296 C/T	0,96	0,326	0,22	0,638	4,89	0,027	0,00	0,990
<i>TIMP-4</i>	-3'-UTR C/T	1,63	0,202	1,76	0,184	0,01	0,907	1,29	0,256

^aPodaci o raspodjeli učestalosti genotipova *TIMP-1* -372 C/T polimorfne varijante su izostavljeni u muškaraca, s obzirom na to da je gen smješten na kromosomu X

4.2.2.2. Analiza pojedinačnih genotipova i alela

Učestalost genotipova i alela *TIMP-1* -372 C/T, *TIMP-2* -303 C/T, *TIMP-3* -915 A/G, *TIMP-3* -1296 C/T i *TIMP-4* -3'-UTR C/T polimorfni varijanti u muškaraca podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova prikazane su u tablicama 53, 54, 56, 58 i 60, a njihov utjecaj na podložnost za primarni i sekundarni IPSP prema genetičkim modelima u tablicama 53, 55, 57, 59 i 61. Nije pronađena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova i alela niti jedne od navedenih polimorfni varijanti između žena, kao i muškaraca dviju podskupina. Nadalje, nije utvrđen statistički značajan utjecaj genotipova i alela istraživanih polimorfni varijanti gena *TIMP* obitelji na podložnost za primarni i sekundarni IPSP.

Tablica 53. Učestalost i utjecaj alela *TIMP-1* -372 C/T polimorfne varijante na podložnost za primarni i sekundarni IPSP u muškaraca

<i>TIMP-1</i> -372	Muškarci ^a					
	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)	X ²	P	OR (95 % CI)	P
Alel						
C	51 (52,0)	32 (62,7)	1,56	0,212	0,64 (0,32-1,29)	0,213
T	47 (48,0)	19 (37,3)				

^aPodaci o raspodjeli učestalosti genotipova *TIMP-1* -372 C/T polimorfne varijante su izostavljeni, s obzirom na to da je gen smješten na kromosomu X

Tablica 54. Učestalost genotipova i alela *TIMP-2* -303 C/T polimorfne varijante u ispitanika podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova

<i>TIMP-2</i> -303	Žene				Muškarci			
	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)	X ²	P	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)	X ²	P
Genotip								
CC	74 (75,5)	42 (82,4)			77 (78,6)	45 (88,2)		
CT	22 (22,5)	9 (17,6)	1,61	0,446	20 (20,4)	6 (11,8)	2,34	0,310
TT	2 (2,0)	0			1 (1,0)	0		
Alel								
C	170 (86,7)	93 (91,2)	1,28	0,258	174 (88,8)	96 (94,1)	2,25	0,134
T	26 (13,3)	9 (8,8)			22 (11,2)	6 (5,9)		

Tablica 55. Utjecaj genotipova i alela *TIMP-2* -303 C/T polimorfne varijante na podložnost za primarni i sekundarni IPSP

<i>TIMP-2</i> -303 genetički model		Žene		Muškarci	
		Primarni vs. sekundarni		Primarni vs. sekundarni	
		OR (95 % CI)	P	OR (95 % CI)	P
Dominantni	CC + CT vs. TT	0,37 (0,02-7,95)	0,529	0,63 (0,02-15,77)	0,779
Recesivni	CC vs. CT + TT	0,66 (0,28-1,55)	0,342	0,49 (0,18-1,30)	0,152
	CC vs. TT	0,35 (0,02-7,47)	0,502	0,57 (0,02-14,23)	0,731
Kodominantni	CC vs. CT	0,72 (0,30-1,71)	0,457	0,51 (0,19-1,37)	0,184
	TT vs. CT	2,11 (0,09-48,27)	0,640	0,95 (0,03-26,31)	0,976
Aleli	C vs. T	0,63 (0,28-1,41)	0,262	0,49 (0,19-1,26)	0,140

Tablica 56. Učestalost genotipova i alela *TIMP-3* -915 A/G polimorfne varijante u ispitanika podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova

<i>TIMP-3</i> -915	Žene				Muškarci			
	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)	X ²	P	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)	X ²	P
Genotip								
AA	59 (60,2)	38 (74,5)	3,23	0,199	71 (72,5)	34 (66,6)	2,03	0,363
AG	35 (35,7)	11 (21,6)			22 (22,4)	16 (31,4)		
GG	4 (4,1)	2 (3,9)			5 (5,1)	1 (2,0)		
Alel								
A	153 (78,1)	87 (85,3)	2,24	0,135	164 (83,7)	84 (82,4)	0,08	0,772
G	43 (21,9)	15 (14,7)			32 (16,3)	18 (17,6)		

Tablica 57. Utjecaj genotipova i alela *TIMP-3* -915 A/G polimorfne varijante na podložnost za primarni i sekundarni IPSP

<i>TIMP-3</i> -915 genetički model		Žene		Muškarci	
		Primarni vs. sekundarni OR (95 % CI)	P	Primarni vs. sekundarni OR (95 % CI)	P
Dominantni	AA + AG vs. GG	0,96 (0,17-5,42)	0,962	0,38 (0,04-3,31)	0,378
Recesivni	AA vs. AG + GG	0,52 (0,24-1,09)	0,085	1,31 (0,63-2,73)	0,463
	AA vs. GG	0,78 (0,13-4,45)	0,776	0,42 (0,05-3,71)	0,434
Kodominantni	AA vs. AG	0,49 (0,22-1,07)	0,075	1,52 (0,71-3,26)	0,283
	GG vs. AG	0,63 (0,10-3,91)	0,618	3,64 (0,39-34,21)	0,259
Aleli	A vs. G	0,61 (0,32-1,17)	0,137	1,10 (0,58-2,07)	0,772

Tablica 58. Učestalost genotipova i alela *TIMP-3* -1296 C/T polimorfne varijante u žena podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova

<i>TIMP-3</i> -1296	Žene		X ²	P
	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)		
Genotip				
TT	44 (44,9)	24 (47,1)		
CT	40 (40,8)	23 (45,1)	1,33	0,514
CC	14 (14,3)	4 (7,8)		
Alel				
T	128 (65,3)	71 (69,6)	0,56	0,454
C	68 (34,7)	31 (30,4)		

Tablica 59. Utjecaj genotipova i alela *TIMP-3* -1296 C/T polimorfne varijante na podložnost za primarni i sekundarni IPSP

<i>TIMP-3</i> -1296 genetički model		Žene	
		Primarni vs. sekundarni OR (95 % CI)	P
Dominantni	TT + CT vs. CC	0,51 (0,16-1,64)	0,259
Recesivni	TT vs. CT + CC	0,92 (0,46-1,81)	0,802
	TT vs. CC	0,52 (0,15-1,77)	0,298
Kodominantni	TT vs. CT	1,05 (0,52-2,15)	0,885
	CC vs. CT	2,01 (0,59-6,84)	0,263
Aleli	T vs. C	0,82 (0,49-1,37)	0,455

Tablica 60. Učestalost genotipova i alela *TIMP-4* -3'-UTR C/T polimorfne varijante u ispitanika podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova

<i>TIMP-4</i> -3'-UTR	Žene				Muškarci			
	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)	X ²	P	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)	X ²	P
Genotip								
CC	76 (77,5)	35 (68,6)			71 (72,5)	37 (72,5)		
CT	19 (19,4)	16 (31,4)	3,97	0,137	25 (25,5)	14 (27,5)	1,09	0,580
TT	3 (3,1)	0			2 (2,0)	0		
Alel								
C	171 (87,2)	86 (84,3)	0,49	0,486	167 (85,2)	88 (86,3)	0,06	0,803
T	25 (12,8)	16 (15,7)			29 (14,8)	14 (13,7)		

Tablica 61. Utjecaj genotipova i alela *TIMP-4* -3'-UTR C/T polimorfne varijante na podložnost za primarni i sekundarni IPSP

<i>TIMP-4</i> -3'-UTR genetički model		Žene		Muškarci	
		Primarni vs. sekundarni		Primarni vs. sekundarni	
		OR (95 % CI)	P	OR (95 % CI)	P
Dominantni	CC + CT vs. TT	0,26 (0,01-5,23)	0,383	0,37 (0,02-7,95)	0,529
Recesivni	CC vs. CT + TT	1,58 (0,74-3,37)	0,238	0,99 (0,47-2,12)	0,990
	CC vs. TT	0,31 (0,01-6,12)	0,440	0,38 (0,02-8,15)	0,537
Kodominantni	CC vs. CT	1,83 (0,84-3,97)	0,127	1,07 (0,50-2,31)	0,854
	TT vs. CT	5,92 (0,28-123,19)	0,251	2,84 (0,13-63,37)	0,509
Aleli	C vs. T	1,27 (0,64-2,51)	0,486	0,92 (0,46-1,82)	0,803

4.2.2.3. Analiza kombinacija genotipova

Nisu pronađene statistički značajne razlike u raspodjeli učestalosti kombinacije genotipova dvije ili više polimorfnih varijanti gena *TIMP* obitelji u muškaraca i žena između podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova, kao niti utjecaj na podložnost za primarni i sekundarni IPSP (podaci nisu prikazani).

4.2.2.3.1. Analiza kombinacija genotipova polimorfnih varijanti gena MMP i TIMP obitelji

U žena s IPSP-om nisu utvrđene statistički značajne razlike u raspodjeli učestalosti kombinacija genotipova dvije ili više polimorfnih varijanti gena *MMP* i *TIMP* obitelji između skupine primarnih i sekundarnih IPSP-ova, kao niti utjecaj na podložnost za primarni i sekundarni IPSP (podaci nisu prikazani). Između muškaraca podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova su pronađene statistički značajne razlike u raspodjeli učestalosti kombinacija genotipova polimorfnih varijanti *MMP-9* -1562 C/T i sva četiri gena *TIMP* obitelji (podaci nisu prikazani). Međutim, kao i u slučaju raspodjele kombinacije genotipova polimorfnih varijanti gena *MMP* obitelji, navedene kombinacije ne povećavaju izgleda za primarni i sekundarni IPSP u usporedbi s pojedinačnim *MMP-9* genotipovima.

4.2.2.4. Analiza haplotipova

Učestalost haplotipova *TIMP-3* -915 A/G i -1296 C/T polimorfnih varijanti u žena podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova, kao i utjecaj na podložnost za primarni i sekundarni IPSP prikazane su u tablici 62. Učestalosti haplotipova nisu se statistički značajno razlikovale između žena dviju podskupina.

Tablica 62. Učestalost haplotipova *TIMP-3* -915 A/G i -1296 C/T polimorfnih varijanti i njihov utjecaj na podložnost za primarni i sekundarni IPSP u žena

Haplotip		Žene					
<i>TIMP-3</i> -915	<i>TIMP-3</i> -1296	Primarni N (%)	Sekundarni N (%)	χ^2	P	OR (95 % CI)	P
A	T	120 (61,1)	71 (69,6)			0,69 (0,41-1,15)	0,153
G	C	36 (18,2)	15 (14,7)	4,91	0,178	1,30 (0,68-2,52)	0,427
A	C	32 (16,4)	16 (15,7)			1,05 (0,54-2,02)	0,887
G	T	7 (3,7)	0 (0)				

5. RASPRAVA

Osnovni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi povezanost varijabilnosti *MMP-1*, -2, -3, -9 te *TIMP-1*, -2, -3 i -4 gena i podložnosti za IPSP. Dodatno je istražena povezanost varijabilnosti navedenih gena i podložnosti za primarni i sekundarni IPSP. Istraživanje je provedeno na dvije skupine ispitanika, uključujući skupinu reproduktivnih parova sa tri ili više spontanih pobačaja nepoznate etiologije, te skupinu kontrolnih ispitanika sastavljenu od žena i muškaraca normalne plodnosti, koji imaju barem dva živorođena djeteta, bez spontanih pobačaja i ostalih komplikacija u trudnoći. Prema dostupnoj literaturi, razvidno je da povezanost pojedinačnih, kao i kombinacije polimorfnih varijanti *MMP-1*, -2, -3 i -9 te *TIMP-1*, -2, -3 i -4 gena i etiologije IPSP-a u reproduktivnih parova dosad nije istraživana, što upućuje na izvornost ovog istraživanja.

Polimorfne varijante gena *MMP* obitelji uključene u ovo istraživanje, *MMP-1* -1607 1G/2G, *MMP-2* -735 C/T, *MMP-2* -1306 C/T, *MMP-3* -1612 5A/6A i *MMP-9* -1562 C/T, smještene su u promotorskim regijama gena, a odabrane su na temelju njihove funkcionalnosti, odnosno dokazanog utjecaja na izražaj gena na razini transkripcije (166,171). Dodatni razlog odabira navedenih polimorfnih varijanti bila je njihova povezanost s razvojem različitih poremećaja koji nastaju kao posljedica promijenjenog preoblikovanja ISM-a, uključujući komplikacije u trudnoći. Iz istog su razloga odabrane polimorfne varijante gena *TIMP* obitelji, *TIMP-1* -372 C/T, *TIMP-2* -303 C/T, *TIMP-3* -915 A/G, *TIMP-3* -1296 C/T, *TIMP-4* -3'-UTR C/T, čiji utjecaj na izražaj gena, osim za *TIMP-4* -3'-UTR C/T, nije precizno utvrđen (174,202,206,207,209). Istraživanje je provedeno na uzorcima genomske DNA molekule izolirane iz limfocita periferne krvi, a za utvrđivanje genotipova i alela polimorfnih varijanti korištena je kombinacija PCR i RFLP metoda. Prilikom analize dobivenih rezultata ženski i muški ispitanici razmatrani su kao zasebne populacije, s obzirom na to da ne postoje dokazi da je IPSP poremećaj vezan uz istog partnera (108).

Dobiveni rezultati pridonose razumijevanju nove paradigme patogeneze IPSP-a, kao poremećaja koji nastaje posljedično promijenjenom preoblikovanju ISM-a endometrija. Također, nadopunjuju prethodne spoznaje o promijenjenom izražaju gena *MMP* i *TIMP* obitelji u endometriju žena s IPSP-om i korionskim resicama spontano pobačenih zametaka parova s IPSP-om, kao i

ulogama njihovih proteina u (pre)decidualizaciji, implantaciji i placenciji tijekom normalne trudnoće i raznih komplikacija u trudnoći.

5.1. VARIJABILNOST GENA *MMP* OBITELJI U PAROVA S IPSP-OM

U ovom istraživanju je u žena s IPSP-om, u usporedbi s kontrolnom skupinom, utvrđena statistički značajno veća učestalost pojedinačnih *MMP-2* -735 CT (P=0,006), *MMP-2* -1306 CC (P=0,037) i *MMP-9* -1562 CC (P=0,010) genotipova. Tako, žene koje imaju *MMP-2* -735 CT ili TT genotip imaju dva puta veći izgled za IPSP u usporedbi sa ženama koje imaju *MMP-2* -735 CC genotip (OR=2,15; 95 % CI=1,34-3,45; P=0,001). Stoga bi prisustvo samo jednog *MMP-2* -735 T alela moglo biti čimbenik podložnosti za IPSP u žena. Nadalje, utvrđeno je da *MMP-2* -1306 CC genotip u žena povećava izgled za IPSP dva puta u usporedbi s *MMP-2* -1306 CT i TT genotipovima (OR=2,08; 95 % CI=1,17-3,69; P=0,012). Konačno, žene koje imaju *MMP-9* -1562 CC genotip imaju, također, dva puta veći izgled za IPSP u usporedbi sa ženama koje imaju *MMP-9* -1562 CT i TT genotipove (OR=2,21; 95 % CI=1,30-3,80; P=0,004). Zanimljivo je da, iako je između žena skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine pronađena statistički značajna razlika u raspodjeli učestalosti kombinacija genotipova dvije ili više istraživanih polimorfni varijanti gena *MMP* obitelji, kao i *MMP* i *TIMP* obitelji koje uključuju jedan, dva ili sva tri navedena rizična genotipa *MMP-2* i -9 gena, nije utvrđen porast izgleda za IPSP u usporedbi s pojedinačnim rizičnim genotipovima. Navedeno upućuje da su pojedinačni *MMP-2* -735 CT, *MMP-2* -1306 CC ili *MMP-9* -1562 CC genotipovi mogući čimbenik podložnosti za IPSP u žena, dok njihove međusobne kombinacije, kao i kombinacije s genotipovima drugih polimorfni varijanti gena *MMP*, kao i *TIMP* obitelji ne povećavaju dodatno izgled za IPSP.

Uzroci poremećenog izražaja gena *MMP* obitelji u endometriju žena s IPSP-om, kao i korionskim resicama spontano pobačenih plodova parova s IPSP-om nisu poznati. Također, iako nije razjašnjeno je li spontani pobačaj potaknut signalima iz decidue ili trofoblasta (259), poremećaj izražaja gena *MMP* obitelji uzrokovan genskom podložnošću mogao bi biti zajednički čimbenik rizika za IPSP. Naime, s obzirom na to da su u ovo istraživanje bile uključene samo funkcionalne polimorfne varijante gena *MMP* obitelji, moguće je da prisutnost rizičnih *MMP-2* -735 CT, *MMP-2* -1306 CC,

kao i *MMP-9* -1562 CC genotipova u žena ili zametka utječe na transkripcijski nadzor izražaja *MMP-2* i *-9* gena, mijenjajući stvaranje njihovih mRNA i/ili proteina, utječući na (pre)decidualizaciju u žene, a u zametka ili ploda (neposredne uloge i genoma muškarca) na invazivnost trofoblasta.

Prethodna istraživanja pokazuju da *MMP-2* -735 CT, kao i *MMP-2* -1306 CC genotipovi povećavaju, a *MMP-9* -1562 CC genotip umanjuje aktivnost promotorskih regija tih gena (174,180,181,183-185,189-191). Iako su potrebna dodatna istraživanja sa ciljem utvrđivanja međusobne povezanosti genotipova i izražaja gena u endometriju žena s IPSP-om, ovo istraživanje potvrđuje rezultate istraživanja izražaja gena *MMP* obitelji, u kojima su tijekom sredine sekretorne faze pronađene niže razine *MMP-9* proteina u ispirku maternice i tkivu endometrija, kao i više razine *MMP-2* mRNA u tkivu endometrija žena s IPSP-om u usporedbi s kontrolnom skupinom (240-242,244). Poremećena (pre)decidualizacija uzrokovana promjenama izražaja *MMP-2* i *-9* mRNA i proteina tijekom sredine sekretorne faze u žena s IPSP-om moguće utječe na ključne procese prilikom pripreme endometrija za implantaciju, uključujući sazrijevanje i preoblikovanje ISM-a endometrija, angiogenezu, funkciju pre-decidualnih stanica, prodiranje imunskih stanica i oslobađanje ključnih molekula u razvoju trudnoće (239-244).

Prvo, važnost pravovremenog sazrijevanja i preoblikovanja endometrija tijekom sekretorne faze očituje se u činjenici da ishod rane trudnoće djelomično ovisi o tome u kojem se vremenskom razdoblju nakon ovulacije blastocista usadi u endometrij (125,260). Uobičajeno, implantacijski prozor počinje šest dana nakon ovulacije i traje dva do četiri dana, a rizik za spontani pobačaj se povećava ako se implantacija dogodi nakon 10. dana nakon ovulacije (260). U žena s IPSP-om sazrijevanje endometrija tijekom sekretorne faze je usporeno i očituje se produženim trajanjem implantacijskog prozora i povećanom prijemljivosti endometrija (125). Iako je u endometriju žena s IPSP-om utvrđen niz morfoloških promjena, poput smanjenog udjela žlijezda, kao i volumena epitelnih stanica lumena žlijezda, nisu utvrđene patognomonične promjene (259,261). Stoga se drži kako je usporeno sazrijevanje endometrija posljedica suptilnijih promjena, ponajprije u izražaju enzima koji nadziru preoblikovanje ISM-a endometrija (125,259,262,263). Oblikovanje pre-decidualnog tkiva jedna je od glavnih uloga *MMP*-ova, s obzirom na sposobnost cijepanja strukturnih proteina ISM-a, kao i činjenice da su fibroblasti strome, kasnije pre-decidualne stanice, njihov glavni izvor (213,223). Osim

toga, normalne razine MMP-2 i -9 u epitelnim stanicama endometrija određuju njegovu prijemljivost (264). Također, stvaranje MMP-9 proteina u epitelnim stanicama posebno raste tijekom razdoblja implantacijskog prozora te se otpušta u žljezdani sekret gdje moguće nadzire cijepanje molekula važnih za prepoznavanje i implantaciju blastociste (213,224). Stoga je proces pre-decidualizacije izravno ovisan o enzimima MMP obitelji (265), dok zbog promijenjenih razina MMP-2 i -9 proteina u tkivu endometrija žena s IPSP-om dolazi tijekom sekretorne faze do odlaganja povećanih količina kolagena tipa I i III, te poremećene prijemljivosti, što upućuje na promijenjenu morfologiju i funkciju endometrija (242,244).

Drugo, prokrvljenost endometrija jedan je od glavnih čimbenika koji određuje njegovu prijemljivost i uvjetuje normalan razvoj majčino-fetalnog spoja (126,213). Iako promjene krvnih žila maternice u žena s IPSP-om nisu dovoljno istražene, rezultati provedenih istraživanja upućuju na postojanje povećanog otpora spiralnih arterija u sredini sekretorne faze (266,267). Također, u usporedbi sa ženama normalne plodnosti, žene s IPSP-om imaju smanjen indeks vaskularizacije, protoka i perfuzije u endometriju (268). S obzirom na to da svrsishodna angiogeneza u endometriju, koja se odvija tijekom čitavog menstruacijskog ciklusa i trudnoće, izravno ovisi o stvaranju dostatnih razina MMP-2 i -9 proteina u krvnim žilama (213), nepravilan obrazac razvoja i funkcije krvnih žila u endometriju žena s IPSP-om mogao bi biti posljedica promijenjenog izražaja tih MMP-ova. Osim što cijepanjem strukturnih proteinskih sastavnica ISM-a stvaraju prostor za migraciju endotelnih stanica, MMP-9 novači preteče endotelnih stanica i hematopoetskih matičnih stanica iz koštane srži (269). Konačno, MMP-2 i -9 stvaraju matrikine i oslobađaju molekule koje potiču angiogenezu (269). Istovremeni izražaj MMP-2, -9 i VEGF-a u novooblikovanim krvnim žilama dodatno upućuje na izravno međudjelovanje MMP-ova s molekulama koje potiču angiogenezu (81,140,213). Zanimljivo je da je u endometriju žena s IPSP-om utvrđen promijenjen izražaj nekolicine čimbenika koji potiču angiogenezu, uključujući VEGF koji se oslobađa cijepanjem pomoću MMP-2 i -9 (270).

Treće, pre-decidualne stanice imaju ključne uloge u uspostavljanju majčino-fetalnog spoja, nadzirući prijemljivost, probir zametaka prema njihovoj kvaliteti, imunosni odgovor, nadzor invazije trofoblasta, hemostazu, kao i obranu od oksidativnog stresa (3). Stoga, pre-decidualne stanice aktivno sudjeluju u procesu implantacije (271). Štoviše, rast i razvoj trofoblasta ovisi o sposobnosti migracije

pre-decidualnih stanica, dok inhibicija signalnih puteva koji nadziru pokretljivost, reorganizaciju citoskeleta i adheziju decidualnih stanica onemogućava proliferaciju i diferencijaciju blastociste (271,272). Pokretljivost i invazivna sposobnost pre-decidualnih stanica posredovana je MMP-2 i -9 enzimima, čije se stvaranje dodatno povećava u nazočnosti stanica trofoblasta, čime pre-decidualne stanice promiču inkapsulaciju blastociste i njeno usađivanje u endometriju (225,273). Tijekom trudnoće, decidualne stanice odgovaraju na signale koje odašilje trofoblast te kao odgovor na njih stvaraju brojne molekule koje pospješuju placentaciju (225,271). Pre-decidualne stanice žena normalne plodnosti imaju sposobnost sprječavanja migracije i prestanka stvaranja tih molekula u prisustvu zametaka lošije kvalitete (124,134,141). Naprotiv, u žena s IPSP-om pre-decidualne stanice nemaju sposobnost probira zametaka prema njihovoj kvaliteti, već migriraju i inkapsuliraju sve blastociste (134,141). U žena koje imaju rizične *MMP-2 -735 CT*, *MMP-2 -1306 CC*, kao i *MMP-9 -1562 CC* genotipove mogla bi biti narušena sposobnost migracije pre-decidualnih stanica, probir zametaka i razvoj posteljice, što je u skladu s najnovijim spoznajama o poremećenoj funkciji (pre)decidualnog tkiva u žena s IPSP-om. Stoga bi upravo poremećaji funkcije pre-decidualnih stanica mogli biti jedinstveni patogenetski mehanizam odgovoran za spontani pobačaj zametaka i plodova euploidnog i aneuploidnog kariotipa (271).

Četvrto, tijekom procesa (pre)decidualizacije dolazi do nakupljanja neutrofila, makrofaga, eozinofila i uNK stanica, koji u endometriju migriraju iz krvnih žila, prodirući kroz bazalnu membranu stvaranjem MMP-9 (213,224). Stoga bi promjene u razinama i aktivnosti dostupnih enzima mogle poremetiti broj i funkciju imunskih stanica na majčino-fetalnom spoju.

Peto, mehanizmi koji bi također mogli narušiti proces (pre)decidualizacije zbog poremećenog izražaja gena *MMP* obitelji posljedično genskoj podložnosti, uključuju promjene u djelovanju MMP-ova koje nije povezano s cijepanjem sastavnica ISM-a, već brojnih drugih proteina. Primjerice, razgradnjom spojeva između stanica i ISM-a, MMP-9 promiče anoikis, posebnu vrstu apoptoze, koja nastaje gubitkom povezanosti ISM-a i stanice (274). Apoptoza je važan mehanizam koji nadzire sazrijevanje endometrija tijekom sekretorne faze, kao i rast i invazivnost trofoblasta (275). U endometriju žena s IPSP-om pronađena je povećana apoptoza, kao i smanjena proliferacija stanica (275). Osim toga, cijepanjem raznih proteina, MMP-ovi oslobađaju molekule ključne u trudnoći,

poput IL-1 β , TGF- β i IGFBP-3, povećavajući njihovu dostupnost (165). Nadalje, MMP-2 i -9 uređuju djelovanje trombocita, potičući odnosno sprječavajući njihovo sljepljivanje, s posljedičnim učinkom na hemostazu (276). Naposljetku, iznenađujuće, rezultati najnovijih istraživanja upućuju na unutarstanično djelovanje brojnih MMP-ova, ključno u mehanizmima nadzora raznih procesa, poput urođene imunosti i apoptoze (159,277). Matriks metaloproteinaze su pronađene u jezgri, mitohondriju, vezikularnim i citoplazmatskim odjeljcima, uključujući citoskelet (159). Utvrđeno je da cijepaju uređivače apoptoze, druge glasnike, šaperone, proteine citoskeleta, autoantigene, enzime u metabolizmu šećera i sinteze proteina, uređivače transkripcije i translacije i mnoge druge (277). Također, enzim MMP-2 djeluje kao signalna molekula aktivirana oksidativnim stresom u jezgri, sarkomerama i kaveolama (159).

Osim važnih uloga u endometriju tijekom pripreme endometrija za implantaciju, MMP-ovi uređuju različite funkcije jajnika, gdje ih većinom stvaraju leukociti (278,279). Naime, MMP-2 i -9 nadziru rast i razvoj folikula, cijepanje kolagena stijenke folikula tijekom ovulacije, kao i oblikovanje, održavanje i propadanje žutog tijela (211,221,278,280). Sastav i cjelovitost ISM-a jajnika uređuje oblik stanice, međustaničnu komunikaciju, steroidogenezu i preživljavanje, a promjene u izražaju gena *MMP* i *TIMP* obitelji povezuju se s poremećenim stvaranjem hormona u žena sa sindromom policističnih jajnika (281). Također, u hipofizi, MMP-2 i -9 sudjeluju u neuroendokrinom nadzoru aktivnosti gonadotropin oslobađajućih hormona (282). Stoga bi poremećaj izražaja *MMP-2* i -9 gena mogao biti uzrokom poremećene funkcije i nemogućnosti održanja žutog tijela, te posljedično spontanog pobačaja (281).

Zanimljivo je da gotovo svi mehanizmi predloženi kao mogući uzročni čimbenici IPSP-a, uključujući antifosfolipidni sindrom, sindrom policističnih jajnika, insuficijenciju žutog tijela i druge, utječu na izražaj gena *MMP* obitelji. Primjerice, antifosfolipidna protutijela smanjuju stvaranje MMP-ova u endotelnim stanicama spiralnih arteriola, sprječavajući angiogenezu (29). Stoga bi, unatoč raznim mogućim uzročnim čimbenicima, patogenetski mehanizam IPSP-a mogao biti isti, a uključuje poremećaj aktivnosti izvršnih enzima preoblikovanja ISM-a endometrija. Stoga, proteini obitelji MMP-ova i TIMP-ova čine moguće vezno mjesto koje ujedinjuje opisane etiologije i daje znanstvenu opravdanost za daljnja istraživanja u tom području.

Međutim, rezultati manjeg broja istraživanja upućuju da ne postoji povezanost poremećenog izražaja gena *MMP* i *TIMP* obitelji. Tako, u tri istraživanja nije pronađena statistički značajna razlika u razini *MMP-2* i *-9*, kao i *TIMP-1* i *-2* mRNA i proteina u tkivu endometrija u sredini sekretorne faze između žena s IPSP-om i kontrolne skupine (242,243,283). Također, u jednom istraživanju nije utvrđena povezanost između razine izražaja *MMP-2* gena i stvaranja pinopoda, koji se drže mogućim biljezima prijemljivosti endometrija (284). Rezultati jedinog istraživanja razlike razina MMP-ova u serumu normalnih trudnica i onih s IPSP-om, pokazali su razlike za *MMP-3*, ali ne i za *MMP-1* i *-9* protein. Međutim, navodi se da serumske razine moguće ne odražavaju lokalne promjene u endometriju (245).

Povezanost polimorfnih varijanti gena *MMP* obitelji i IPSP-a prethodno je ispitana u samo jednom istraživanju, za *MMP-9* -1562 C/T u žena Indijske populacije, bez njihovih reproduktivnih partnera (249). U tom istraživanju nisu pronađene statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova i alela između žena s IPSP-om i kontrolne skupine, što je oprečno rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. Mogući razlog razilaženja u rezultatima su genetičke razlike svojstvene za populacije.

Jedan od specifičnih ciljeva ovog istraživanja bio je utvrditi učestalosti haplotipova za polimorfne varijante gena *MMP* obitelji koje su smještene na istom kromosomu, izričito za *MMP-1* -1607 1G/2G i *MMP-3* -1612 5A/6A, kao i *MMP-2* -735 C/T i -1306 C/T. Haplotip je skup alela smještenih na različitim lokusima duž istog kromosoma unutar homolognog para, koji se zajedno nasljeđuju (285). Analizom haplotipova određuje se položaj alela više istraživanih polimorfnih varijanti zasebno za oba kromosoma u homolognom paru, što analizom pojedinačnih i kombinacija genotipova nije moguće. U ovom istraživanju, analiza je provedena postupkom maksimizacije očekivanja, koja određuje vjerojatnost učestalosti haplotipova dodjeljujući alele haplotipovima s visokom razinom preciznosti (285). U žena s IPSP-om, u usporedbi s kontrolnom skupinom je utvrđena statistički značajno veća učestalost haplotipa koji sadrži *MMP-2* -735 T i -1306 C alele ($P=0,002$). Štoviše, žene koje imaju *MMP-2* -735 T i -1306 C haplotip imaju dva puta veći izgled za IPSP u usporedbi sa ženama koje imaju ostale haplotipove *MMP-2* gena ($OR=1,89$; 95 % $CI=1,26-2,84$; $P=0,002$).

Važnost određivanja haplotipova proizlazi iz mogućnosti procjene utjecaja alela više polimorfničkih varijanti smještenih na istom kromosomu, na podložnost za određeni poremećaj (285). Određivanje položaja alela više polimorfničkih varijanti po kromosomima unutar homolognih parova u obliku haplotipova može pružiti podatak o izmjeni genetičkog materijala ili rekombinaciji između lokusa tih alela tijekom ukriženog povezivanja (engl. *crossing-over*) u prvoj mejotičkoj diobi. Vjerojatnost izmjene genetičkog materijala djelomično ovisi o udaljenosti između istraživanih polimorfničkih varijanti. Što su one bliže smještene, vjerojatnost njihove neravnoteže povezanosti je veća. Stoga, određivanje haplotipova može uputiti na zajednički učinak nekoliko alela različitih lokusa na istom kromosomu (engl. *cis-acting loci*), koji često ne dolazi do izražaja kada se ti lokusi istražuju zasebno (285). Međutim, u ovom istraživanju je utvrđen zaseban utjecaj genotipova i alela *MMP-2 -735 C/T* i *MMP-2 -1306 C/T* polimorfničkih varijanti na podložnost za IPSP, dok haplotip koji uključuje rizične *MMP-2 -735 T* i *-1306 C* alele ne povećava dodatno izgled za IPSP u žena.

Uvid u patogenezu IPSP-a uvjetovanog genetičkom podložnošću trudnice mogu pružiti drugi poremećaji preoblikovanja endometrija povezani s poteškoćama u reprodukciji, u kojih su u tkivu endometrija i serumu žena utvrđene promijenjene razine izražaja *MMP* i *TIMP* mRNA i proteina (128). Navedeni poremećaji uključuju preeklampsiju, hipertenzije u trudnoći, prijevremeni porod, ponavljane neuspjehe implantacije nakon metoda potpomognute oplodnje, odnosno endometrioze i kronični endometritis. Iako polimorfne varijante gena *MMP* i *TIMP* obitelji nisu prethodno istraživane kao čimbenici podložnosti za IPSP, brojna istraživanja genetičke povezanosti za te gene provedena su u žena s navedenim poteškoćama u reprodukciji. Štoviše, za određene polimorfne varijante gena *MMP* obitelji pokazana je uzročna veza s promijenjenim izražajem, što upućuje da poremećena aktivnost *MMP*-ova i *TIMP*-ova negativno utječe na sazrijevanje endometrija tijekom sekretorne faze, kao i implantaciju i razvoj trudnoće (286). Tako su, primjerice, u endometriozi, poremećaju povezanom sa smanjenom plodnošću u žena, kao i povećanom učestalosti spontanih pobačaja, pronađene povišene razine *MMP-2* i *-9* proteina u serumu, peritonealnoj tekućini i tkivu endometrija, što promiče invazivnost tkiva endometrija, kao i poremećenu angiogenezu u implantantima izvan endometrija (287,288). Nadalje, u žena s neplodnošću nepoznate etiologije pronađene su niže razine *MMP-2* i *-9*,

TIMP-1 i -3 mRNA u tkivu endometrija tijekom sredine sekretorne faze (289). Suprotno, u žena s ponavljanim neuspjehom implantacije nakon metoda potpomognute oplodnje razine MMP-2 i -9 su povišene u ispirku maternice u odnosu na žene normalne plodnosti, dok dvotjedno liječenje kinolonskim antibioticima i kortikosteroidima smanjuje razine MMP-ova, a time i učestalost spontanih pobačaja (286).

Naposlijetku, enzimi MMP obitelji najbolje su istraženi u preeklampsiji. Preeklampsija nastaje zbog nedovoljne invazivne sposobnosti trofoblasta, dovodeći do nepotpunog preoblikovanja spiralnih arteriola i smanjene prokrvljenosti posteljice (290). Navedene promjene povezuju se s niskim razinama MMP-2 i -9 proteina u posteljici i amnijskoj tekućini (290,291). Istovremeno, ishemična posteljica otpušta brojne upalne posrednike koji, već i prije kliničkih znakova preeklampsije, povisuju razine MMP-2 i -9 proteina u perifernoj cirkulaciji trudnice, gdje MMP-ovi oslobađaju vazokonstriktore cijepanjem raznih proteina, uzrokujući hipertenziju (291,292). Provedena su i brojna istraživanja utjecaja polimorfnih varijanti *MMP-2* i -9 gena na patogenezu preeklampsije, te je pronađena moguća uzročna povezanost *MMP-2* -735 C/T, *MMP-2* -1306 C/T i *MMP-9* -1562 C/T genotipova i njihovog poremećenog izražaja. Tako su *MMP-2* -735 T i *MMP-2* -1306 C aleli u žena mogući čimbenici podložnosti za preeklampsiju, koji dovode do povišenih razina MMP-2 proteina u plazmi trudnica (292). Također, u žena s preeklampsijom je pronađena veća učestalost *MMP-9* -1562 C alela, koji dovodi do sniženih razina MMP-9 proteina i nedovoljnog preoblikovanja spiralnih arteriola (293). U drugim je istraživanjima utvrđeno da razine MMP-2 i -9 proteina, kao i njihove polimorfne varijante utječu na odgovor na liječenje antihipertenzivima (292,294). Stoga se predlažu klinička ispitivanja u kojima bi se trudnicama s povišenim rizikom za preeklampsiju određivala razina MMP-2 i -9 proteina iz krvi, te provodila genotipizacija sa ciljem procjene odgovora na antihipertenzivno liječenje (290).

Polimorfne varijante *MMP-2* -735 C/T, *MMP-2* -1306 C/T i *MMP-9* -1562 C/T ispitane su i u ovom istraživanju, a rizični genotipovi i aleli za IPSP u žena identični su onima u žena s preeklampsijom. Usporedivost rezultata ovog istraživanja s onima provedenim u žena s preeklampsijom navodi na mogućnost zajedničke patogeneze tih dvaju poremećaja. Zanimljivo je da žene s dva ili više spontanih pobačaja imaju oko tri puta povećan izgled za razvoj preeklampsije

(142,295-297). Štoviše, pretpostavlja se da su uzročni čimbenici IPSP-a i preeklampsije isti, odnosno da čine različite stupnjeve istog uzročnog poremećaja implantacije i placentacije, s razlikom što IPSP ne napreduje do faze arterijske hipertenzije u trudnice (298). Oba su poremećaja obilježena poremećenom funkcijom endotelnih stanica spiralnih arteriola, koji se očituju nemogućnošću dilatacije već od sredine sekretorne faze, a u trudnoći nesposobnosti prilagodbe endotela na invaziju EVT-a, uz razvoj nedostatne cirkulacije u posteljici (298). Navodi se da je genetička podložnost trudnice ili zametka za nedostatnu invazivnost trofoblasta, koja neizbježno dovodi do nepravilnog preoblikovanja spiralnih arteriola, uzrokom poremećaja implantacije i placentacije u IPSP-u i preeklampsiji (108,142). Ako je IPSP dio takvog poremećaja, moguće je da su tu mehanizmi probira zametaka puno strožiji nego u slučajevima preeklampsije.

Unatoč podudarnosti s rezultatima prethodnih istraživanja izražaja gena *MMP* obitelji u žena s IPSP-om, nekoliko je otežavajućih čimbenika u tumačenju rezultata ovog rada. Naime, iako bi prisustvo rizičnog *MMP-9* -1562 CC genotipa moglo biti uzrokom niskih razina *MMP-9* proteina u ispirku maternice, a prisustvo *MMP-2* -735 CT i TT, kao i *MMP-2* -1306 CC genotipova u podlozi visokih razina *MMP-2* mRNA u tkivu endometrija žena s IPSP-om, navedeni genotipovi ne objašnjavaju preostale rezultate istraživanja genskog izražaja, uključujući niske razine *MMP-2* proteina u ispirku maternice, kao i visoke razine *MMP-9* mRNA u tkivu endometrija žena s IPSP-om u usporedbi sa ženama normalne plodnosti (240,243). Međutim, moguće je da, premda određeni aleli i genotipovi polimorfni varijanti gena *MMP* obitelji mijenjaju razinu izražaja, nadzor transkripcije najvjerojatnije ovisi o vrsti stanice i razdoblju razvoja, odnosno dostupnosti transkripcijskih čimbenika, što otežava interpretaciju i procjenu učinka polimorfni varijanti u *in vivo* uvjetima, posebice stoga što *MMP*-ove izražavaju razne stanice u endometriju. Primjerice, za polimorfnu varijantu *MMP-2* -735 C/T je dokazan suprotan učinak na izražaj gena ovisno o vrsti tkiva (179,180,182,183). Također, o nadzoru izražaja gena *MMP* obitelji poznato je većinom na temelju istraživanja provedenih na staničnim kulturama, te je upitno djeluju li isti mehanizmi u organizmu kao cjelini (166). Precizni mehanizmi stanične signalizacije koji potiču izražaj gena *MMP* i *TIMP* obitelji u stanicama endometrija nisu potpuno poznati, iako, kao i u brojnim drugim stanicama, izražaj ovisi o

ravnoteži citokina, hormona, čimbenika rasta i drugih molekula u određenom mikrookolišu (212). Navedeno potkrijepljuje činjenica da se izražaj gena *MMP* obitelji u stanicama eEVT-a i iEVT-a ne podudara vremenski i količinski, iako se one nalaze u neposrednoj blizini (265). Također, s obzirom na redundanciju i činjenicu da MMP-ovi cijepaju brojne strukturne i nestrukturne proteinske sastavnice ISM-a, često se preklapajući, teško je precizno predvidjeti posljedice njihovog pomijenjenog izražaja (136,299).

Sažeto, *MMP-2 -735 CT*, *MMP-2 -1306 CC* ili *MMP-9 -1562 CC* genotipovi su mogući čimbenici podložnosti za IPSP u žena, što bi moglo dovesti do poremećenog izražaja gena *MMP* obitelji tijekom sekretorne faze i trudnoće, te kao krajnju posljedicu spontani pobačaj.

S druge strane, MMP-ovi imaju važne uloge u trofoblastu, posebice stanicama EVT-a. S obzirom na pretpostavku da je IPSP, kao i preeklampsija, uzrokovan nedostatnom invazivnošću trofoblasta, moguće je da reproduktivni partneri prenose rizične alele i haplotipove polimorfnih varijanti gena *MMP* obitelji na zametak, što dovodi do njihovog poremećenog izražaja u stanicama trofoblasta (265). Većina istraživanja genetičke etiologije IPSP-a temelji se na ispitivanju pojedinačnih gena kandidata isključivo u žena, dok u zametka ili ploda gotovo ništa nije poznato o genetičkim čimbenicima koji bi mogli potaći spontani pobačaj (92). S obzirom na ravnopravni doprinos ženskog i muškog genoma stvaranju zigote, nužno je istaknuti važnost uključivanja muških partnera u istraživanja genetičke podložnosti za IPSP.

Pretpostavku o dodatnom mehanizmu spontanog gubitka trudnoće u parova s IPSP-om, potaknutog od strane zametka, potkrijepljuju rezultati istraživanja genskog izražaja u kojima su utvrđene niže razine MMP-2 mRNA u korionskim resica spontano pobačenih zametaka u 6. i 8. tjednu trudnoće (246). Niske razine MMP-2 proteina mogu umanjiti sposobnost invazivnosti trofoblasta te onemogućiti odgovarajuće preoblikovanje spiralnih arteriola. Pretpostavlja se da razgradnja trofoblastnih čepova unutar spiralnih arteriola počinje oko 10. tjedna trudnoće, što omogućava početak protoka krvi kroz intervilozne prostore (2), dok se smanjeno stvaranje MMP-2 u trofoblastnim čepovima povezuje s prestankom invazije eEVT-a (265).

Procjena učinka rizičnih alela i haplotipova u reproduktivnih parova s IPSP-om na razvoj zametka moguća je ako su partneri homozigoti za rizične genotipove, pa žene i muškarci heterozigoti za rizični genotip čine navedenu procjenu problematičnom. Stoga je utjecaj rizičnog *MMP-2* -735 CT genotipa u žene na razvoj zametka teže tumačiti, s obzirom na njegov heterozigotni oblik. Analizu nasljeđivanja rizičnih alela moguće je provesti testom neravnoteže prijenosa alela (engl. *transmission disequilibrium test*), kojim se analiziraju roditelji heterozigoti za alel povezan s podložnošću za određeni poremećaj, procjenjujući učestalost prenošenja tog ili drugog alela na potomke (300). Nažalost, s obzirom na to da u ovom istraživanju nije analiziran genotip spontano pobačenih zametaka i plodova, test neravnoteže prijenosa alela nije bilo moguće provesti. No, istovremeno, potrebno je spomenuti nekoliko mogućih mehanizama koji dovode do IPSP-a, a koji su moguće posljedica genske podložnosti zametka.

Prije svega, prodiranje stanica EVT-a u deciduu uključuje stvaranje spojeva između stanica EVT-a i ISM-a decidue, polariziranu razgradnju ISM-a, kao i migraciju kroz ISM do gornje trećine miometrija. Iako su brojni MMP-ovi izraženi u stanicama EVT-a, upravo se MMP-2 i -9 enzimi drže ključnim uređivačima invazivne sposobnosti trofoblasta (135,212,233). Invazivna sposobnost stanica EVT-a ovisna o MMP-ovima uspoređuje se s onom stanica zloćudnih novotvorina (301). Međutim, ključna razlika je u prostorno i vremenski strogo nadziranom izražaju gena *MMP* obitelji, koji stanicama EVT-a daje samo prolaznu sposobnost invazivnosti. Dodatna razlika prema tumorskom tkivu je prisutnost stanica decidue, koje autokrinim i parakrinim oblikom signalizacije, kao i fizičkim dodirima, uređuju opseg i doseg invazije trofoblasta, prilagođavajući izražaj gena *MMP* obitelji u stanicama trofoblasta (265).

Očito je da žene s rizičnim *MMP-2* -1306 CC i *MMP-9* -1562 CC genotipovima, utvrđenim u ovom istraživanju, u zigotu uvijek prenose C alel, koji je povezivan s višim izražajem *MMP-2*, odnosno nižim izražajem *MMP-9* gena (174,181,184,185,189-191). Snižene razine MMP-9 enzima priječe rast i invazivnu sposobnost trofoblasta (140,302-304). Nadalje, stanice EVT-a stvaraju MMP-9 i potiču apoptozu endotelnih stanica spiralnih arteriola decidue (303). Također, sprječavanje prevođenja MMP-9 mRNA pomoću malih interferirajućih RNA molekula (engl. *small interfering RNA*) u stanicama EVT-a, kao i djelovanja aktivnog MMP-9 enzima, onemogućava preoblikovanje

spiralnih arteriola zbog kočenja apoptoze endotelnih stanica, preobrazbe glatkih mišićnih stanica i infiltracije leukocita (140,303,304). Konačno, stanice EVT-a prestaju stvarati MMP-9 kao odgovor na stres, poput prekomjerne hipoksije u preeklampsiji, što umanjuje invazivnost EVT-a i dovodi do plitke implantacije (305). Sve navedeno može biti uzrokom poremećenog razvoja posteljice i spontanog pobačaja.

Istraživanje uloge genetičkih čimbenika u spontano pobačenih plodova reproduktivnih parova s IPSP-om otežava činjenica da se pobačaj u više od 90 % slučajeva dogodi u vrlo ranom razdoblju trudnoće, prije 12. tjedna gestacije (111). Posljedično, u većine istraživanja se ne analizira genetički materijal zametaka i plodova, kao niti živorođene djece parova sa sekundarnim IPSP-om kao ispitanika kontrolne skupine (92). Također, nisu otkrivene patohistološke promjene niti imunohistokemijski biljezi patognomonični za IPSP (263).

Nadalje, s obzirom na to da su mjesta implantacije blastociste čovjeka zbog etičkih razloga nedostupna za znanstveno istraživanje, razumijevanje molekularnih mehanizama trudnoće većinom se temelji na istraživanjima provedenim na životinjama, posebice miševima (124,271). Međutim, iako je za pretpostaviti da su osnovni molekularni mehanizmi trudnoće slični u svih sisavaca, važno je naglasiti da postoje vrlo jasne razlike između vrsta (124,260). Prvo, za razliku od čovjeka, u većine sisavaca, uključujući miša, ne dolazi do spontane pre-decidualizacije prije trudnoće, već proces počinje tek nakon implantacije blastociste (271). Drugo, endometrijski miša ima sposobnost odgađanja daljnjeg napredovanja implantacije zaustavljanjem razvoja blastociste procesom dijapauze, što u čovjeka nije slučaj (124,271). Treće, kromosomske aberacije, prisutne u barem 50 % spontano pobačenih zametaka i plodova čovjeka, iznimno su rijetke u drugih vrsta, upućujući da o ishodu takvih trudnoća u životinja nije poznato gotovo ništa (38,124,271). Konačno, postojanje razlika u djelovanju molekula, uključujući MMP-ove i TIMP-ove, nije zanemariv čimbenik prilikom tumačenja rezultata. Tako, iako postoji homologija između gena pripadnika *Mmp* obitelji, *Mmp-1* gen u čovjeka ima dva ortologa u miša, MMP-1a i -1b, dok *Mmp-26*, važan u reprodukciji čovjeka, nema ortologa u miša (149). Također je važno napomenuti postojanje specifičnih razlika u nadzoru i djelovanju promotorskih regija ovisno o vrsti, što se očituje posebnostima u izražaju u istim tkivima (166). Primjerice, MMP-9 je glavni MMP u implantaciji blastociste u miša, dok su u čovjeka MMP-2 i -9

podjednako važni (265). Stoga, sve više istraživača upućuje na problem nekritičnog sagledavanja rezultata i poistovjećivanja molekularnih mehanizama rane trudnoće u različitim vrsta bez znanstvene potvrde (124,271).

Dosad su stvoreni miševi s izbačenim genima (engl. *knock-out*) za 23 člana *Mmp* obitelji (306). Miševi s pojedinačno izbačenim *Mmp* genima nemaju povećanu učestalost spontanih pobačaja i preživljavaju do rođenja, osim onih s izbačenim *Mmp-14* genom, koji ugibaju netom nakon rođenja (136,147,306). No, pomnijom su analizom u istih modela otkrivene suptilne promjene koje uključuju usporen proces decidualizacije i poremećenu angiogenezu u endometriju. Slično, sprječavanje djelovanja MMP-ova pomoću različitih inhibitora usporava proces decidualizacije u raznih vrsta, onemogućavajući širenje decidualnog područja na ostatak endometrija (307). Navedene spoznaje upućuju na važnost MMP-ova u procesu decidualizacije te se može pretpostaviti da bi se slični poremećaji (pre)decidualizacije u čovjeka mogli djelomično objasniti promijenjenim izražajem gena *Mmp* obitelji (136).

Iako miševi s pojedinačno izbačenim genima *MMP* obitelji ne pokazuju poremećaje plodnosti, kao niti komplikacije u trudnoći, moguće je da je odsustvo fenotipskog izražaja posljedica redundancije i nadoknade djelovanjem preostalih MMP-ova (147). Navedena redundancija između pripadnika obitelji MMP enzima dokazana je stvaranjem miševa s istovremeno izbačenom dva *MMP* gena, koji pokazuju poremećaje u prenatalnom razvoju. Tako, miševi s izbačenim *Mmp-2* i *-14* genima ugibaju odmah nakon rođenja (147).

Na redundanciju i nadoknadu drugim MMP-ovima upućuju i miševi kojima su izbačeni pojedinačni geni čiji proizvodi djeluju u uzvodnim signalnim putevima koji istovremeno nadziru izražaj više MMP-ova (136). Primjerice, miševi u kojih je izbrisana DNA vezna domena *Ets2* transkripcijskog čimbenika ugibaju vrlo rano tijekom prenatalnog razvoja zbog nemogućnosti preoblikovanja ISM-a endometrija i poremećene angiogeneze (308). Navedeni poremećaji posljedica su smanjenog izražaja *Mmp-3*, *-9* i *-13* gena. Slično, miševi s izbačenim *JunB* genom, pripadnikom AP-1 obitelji transkripcijskih čimbenika, imaju niske razine MMP-9 proteina što uzrokuje poremećenu angiogenezu i spontani pobačaj (309). Nadalje, sprječavanje djelovanja MMP-ova inhibitorom širokog spektra u miševa kojima nedostaje *plazminogen* dovodi do spontanih pobačaja, a patohistološka

analiza mjesta implantacije pokazuju odgođenu decidualizaciju, poremećenu angiogenezu i razvoj posteljice (310).

Za razliku od značajnih rezultata za ispitane polimorfne varijante *MMP-2* i *-9* gena u ovom istraživanju, za genotipove, alele i haplotipove *MMP-1* -1607 1G/2G i *MMP-3* -1612 5A/6A polimorfni varijanti nije pronađena razlika u učestalosti između žena skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine, kao niti utjecaj na IPSP. Također, između muškaraca skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine nije bilo statistički značajnih razlika u raspodjeli učestalosti pojedinačnih i kombinacije genotipova i alela niti jedne od istraživanih polimorfni varijanti gena *MMP* obitelji ili njihovog utjecaja na podložnost za IPSP. Unatoč tome, ne treba isključiti mogućnost uloge drugih polimorfni varijanti navedeni gena, kao i drugih gena *MMP* obitelji. Također, genetička varijabilnost samo je jedan od mogućih čimbenika koji dovodi do poremećenog nadzora izražaja gena *MMP* obitelji, s obzirom na to da je njihova aktivnost nadzirana na nekoliko razina (mehanizmi opisani na str. 33). Ostali *MMP*-ovi čiji je poremećen izražaj u IPSP-u dokazan u pojedinačnim istraživanjima su *MMP-7*, *10*, *-12*, *-19* i *-26*, što ostavlja prostor za daljnja istraživanja (311-313).

5.2. VARIJABILNOST GENA *TIMP* OBITELJI U PAROVA S IPSP-OM

S obzirom na to da je ravnoteža između *MMP*-ova i *TIMP*-ova na majčino-fetalnom spoja ključna za normalan razvoj trudnoće, u ovom su istraživanju ispitane i polimorfne varijante gena *TIMP* obitelji (299). Utjecaj odabranih *TIMP-1* -372 C/T, *TIMP-2* -303 C/T, *TIMP-3* -915 A/G, *TIMP-3* -1296 C/T i *TIMP-4* -3'-UTR C/T polimorfni varijanti na izražaj gena nije poznat, osim za *TIMP-4* -3'-UTR C/T, koja utječe na stabilnost i prevođenje *TIMP-4* mRNA (209). Većina polimorfni varijanti u genomu čovjeka smještena je izvan kodirajućih područja gena, a svega manji dio onih u kodirajućim područjima dovodi do zamjene aminokiselina unutar proteina (285). Iako učinak takvih istoznačnih i tih polimorfizama na izražaj gena nije posve razjašnjen, sve veći broj rezultata genetičkih istraživanja upućuje na njihovu povezanost s podložnošću za složene bolesti, ali i nepotpuno razumijevanje uloge polimorfizama u zdravlju i bolesti čovjeka (285).

U ovom istraživanju, učestalosti pojedinačnih, kao i kombinacije genotipova i alela *TIMP-1* -372 C/T, *TIMP-2* -303 C/T, *TIMP-3* -915 A/G, *TIMP-3* -1296 C/T i *TIMP-4* -3'-UTR C/T polimorfni

varijanti nisu se statistički značajno razlikovale u žena i muškaraca između skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine. Također, nije utvrđen utjecaj genotipova i alela navedenih polimorfničkih varijanti gena *TIMP* obitelji na podložnost za IPSP u žena i muškaraca. Nadalje, nije pronađena razlika u raspodjeli učestalosti *TIMP-3* -915 A/G i -1296 C/T haplotipova u muškaraca i žena između skupine parova s IPSP-om i kontrolne skupine. Međutim, iako dobiveni rezultati upućuju da pojedinačne i kombinacije polimorfničkih varijanti gena *TIMP* obitelji ne utječu na podložnost za IPSP u žena i muškaraca, nekoliko je razloga zašto su upravo ti geni dobri kandidati za daljnja istraživanja genetičke povezanosti s IPSP-om.

Prije svega, na važnu ulogu proteina TIMP obitelji tijekom trudnoće upućuje poremećaj izražaja njihovih gena u tkivu endometrija i serumu žena s IPSP-om (241-243,245). Općenito, u žena s IPSP-om su pronađene niže razine TIMP-ova u endometriju i serumu, što upućuje na poremećaj ravnoteže između MMP-ova i TIMP-ova (243). Nadalje, TIMP-ovi nadziru čitav niz procesa važnih u trudnoći, no dvosmislene uloge u raznim biološkim procesima posljedica su djelovanja ovisnog ili neovisnog o sprječavanju aktivnosti MMP-ova (196,198). Naime, TIMP-ovi poništavaju djelovanje MMP-ova sprječavajući proliferaciju, apoptozu i migraciju stanica. Primjerice, istovremeni izražaj TIMP-ova u endotelu i glatkim mišićnim stanicama štiti cjelovitost krvnih žila endometrija tijekom (pre)decidualizacije i implantacije (213,216,217). S druge strane, neovisno o inhibiciji MMP-ova, TIMP-1 i -2 potiču proliferaciju, a TIMP-2 i -3 sprječavaju angiogenezu izravnim potiskivanjem migracije i proliferacije endotelnih stanica (199). Naposljetku, potrebno je istaknuti svojstvene uloge pojedinačnih TIMP-ova u pripremi endometrija za implantaciju i placentaciju, kao i djelovanju na majčino-fetalnom spoju.

Posebno je zanimljiv *TIMP-1* gen, koji je smješten na kromosomu X. Iako se u tjelesnim stanicama žena sisavaca jedan od dva kromosoma X nasumično transkripcijski stišava (str. 17), otprilike 15 % gena na inaktivnom kromosomu X ostaje uvijek izraženo, a dodatnih 10 % gena, uključujući *TIMP-1* gen, pokazuje promjenjivu inaktivaciju na inaktivnom kromosomu X (314-316). Štoviše, *TIMP-1* gen pokazuje promjenjivi obrazac inaktivacije između žena, pa čak i tkiva u iste žene (315,316). S obzirom na to da su rezultati pojedinih istraživanja uputili na veću učestalost nenasmisleno inaktivacije kromosoma X u žena s IPSP-om, moguće je da određene (epi)genetičke

promjene *TIMP-1* gena pridonose takvom obrascu inaktivacije i, posljedično, povećanoj učestalosti spontano pobačenih zametaka i plodova muškog spola. Dodatni mehanizam kojim bi *TIMP-1* gen mogao pridonijeti podložnosti za IPSP uključuje promjene u razini izražaja ovisno o aktivnosti *TIMP-1* gena na inaktivnom kromosomu X. Naime, žene u kojih je *TIMP-1* gen izražen s oba alela imaju povećane razine *TIMP-1* proteina, što može biti čimbenik podložnosti za različite bolesti, uključujući IPSP (316). Protein *TIMP-1* iznimno je važan u spolnim žlijezdama, gdje stvarajući spoj s prokatepsinom L potiče steroidogenezu u Leydigovim i granulosa stanicama, a time razvoj ženskih i muških spolnih stanica (195,317). Također, zajedno s *TIMP-2* proteinom, *TIMP-1* je izražen u miometriju, gdje moguće nadzire doseg implantacije (318).

Od mogućeg značaja za IPSP je i *TIMP-2* gen, čiji su CNV-ovi pronađeni u žena s IPSP-om i njihovih spontano pobačenih zametaka (121). No, s obzirom na to da je *TIMP-2* CNV u zametaka bio nasljeđena promjena, u istraživanju je istaknuto kako je utjecaj na razvoj IPSP-a upitan. Međutim, treba pretpostaviti da *TIMP-2* CNV u žena s IPSP-om moguće utječe na proces (pre)decidualizacije i time pridonosi neuspješnom ishodu trudnoće. Osim toga, polimorfna varijanta *TIMP-2* -303 C/T u majke i djeteta povezana je s podložnošću za prijevremeni porod koji nastaje spontano ili zbog prijevremenog puknuća fetalnih ovojnica, što upućuje na moguću ulogu genetičke varijabilnosti *TIMP-2* gena u određivanju ishoda trudnoće (204,205).

Na važne uloge *TIMP-3* proteina u reprodukciji čovjeka upućuje posebna građa promotorske regije gena, koja sadrži područja osjetljiva na progesteron, zbog čega su u ovom istraživanju odabrane dvije polimorfne varijante smještene upravo u tom području (220). Pod utjecajem progesterona tijekom sekretorne faze, razine izražaja *TIMP-3* gena se povećavaju, zbog čega se *TIMP-3* protein drži jednim od glavnih biljega (pre)decidualizacije (319). Poznato je da *TIMP-3* potiče preživljavanje predecidualnih stanica, dok njegove snižene razine mogu potaknuti njihovu apoptozu (319).

Konačno, za razliku od ostalih *TIMP*-ova, uloge *TIMP-4* proteina u reprodukciji čovjeka tek se istražuju, iako je poznato da sudjeluje u implantaciji i nadzoru dosega invazivnosti trofoblasta, vjerojatno uređujući aktivnost MMP-2 i -9 (214,226,238).

Na važnost poremećenog izražaja *TIMP*-ova u određivanju ishoda trudnoće dodatno upućuju različiti umjetno stvoreni miševi (147). Iako miševi s pojedinačno izbačenim genima *Timp* obitelji

nemaju povećanu učestalost spontanih pobačaja, pokazuju znatne poteškoće u reprodukciji (303,147). Primjerice, miševi s izbačenim *Timp-1* genom imaju skraćen vijek razmnožavanja, smanjeno stvaranje progesterona u jajniku, ubrzan razvoj žlijezda u endometriju i otežano začeće (320,321). Slično, miševi u kojih je djelovanje *Timp-1* gena sprječeno pomoću mikroRNA molekula su neplodni zbog poremećene angiogeneze žutog tijela jajnika (322). Nadalje, u CBA/J ženki i DBA/2 mužjaka, kombinaciji križanja miševa podložnima spontanim pobačajima (engl. *abortion-prone*), nemogućnost preoblikovanja spiralnih arteriola posljedica je povećanog izražaja *Timp-2* gena (323). Potonji rezultati oprečni su onima dobivenim u žena s IPSP-om, u kojih su povišene razine TIMP-2 proteina povezane s uspješnim ishodom trudnoće (245).

5.3. VARIJABILNOST GENA *MMP* I *TIMP* OBITELJI U PAROVA S PRIMARNIM I SEKUNDARNIM IPSP-OM

Jedna od posebnosti ovog istraživanja je analiza polimorfnih varijanti zasebno u ispitanika podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova. Naime, pretpostavlja se da se patogenetski mehanizmi spontanih pobačaja razlikuju između dviju podskupina, iako rezultati prethodno provedenih istraživanja nisu jednoznačno potvrdili navedenu pretpostavku (17). Primjerice, žene s primarnim IPSP-om imaju veći rizik za razvoj hipertenzije u trudnoći i prijevremenog poroda u usporedbi sa ženama sa sekundarnim IPSP-om (324,325). Također, u žena s primarnim IPSP-om predlagani su neimunosni uzroci spontanog pobačaja, s obzirom na povećanu učestalost trombofilija, dok se u žena sa sekundarnim IPSP-om pretpostavljaju imunosni mehanizmi spontanog gubitka trudnoće, posebice ako je prvorodeno dijete muškog spola (326-328). Međutim, druga istraživanja nisu potvrdila takve rezultate, upućujući na nepostojanje razlika u uzročnim mehanizmima spontanog pobačaja između žena s primarnim i sekundarnim IPSP-om (18,329). Štoviše, učestalost antifosfolipidnog sindroma, kao i kromosomskih aberacija u reproduktivnih partnera s primarnim i sekundarnim IPSP-om je podjednaka (45).

Dosad su u svega malom broju istraživanja genetičke povezanosti ispitanici razvrstani u podskupine primarnih i sekundarnih IPSP-ova, zbog čega genetička podložnost za podvrste IPSP-a nije dovoljno istražena. Stoga, sa ciljem utvrđivanja razlika u genetičkoj podložnosti između

primarnog i sekundarnog IPSP-a, u ovom je istraživanju provedena zasebna analiza raspodjele učestalosti genotipova, alela i haplotipova gena *MMP* i *TIMP* obitelji, kao i njihovog utjecaja na podložnost za primarni i sekundarni IPSP. Međutim, između žena podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova nisu utvrđene statistički značajne razlike u učestalosti pojedinačnih i kombinacije genotipova, alela i haplotipova niti jedne od ispitivanih varijanti gena *MMP* i *TIMP* obitelji. Također, u žena nije utvrđen utjecaj polimorfni varijanti navedenih gena na podložnost za IPSP.

Suprotno, između muškaraca dviju podskupina, od istraživanih polimorfni varijanti gena *MMP* i *TIMP* obitelji statističku značajnost je dosegla jedino razlika u raspodjeli učestalosti genotipova i alela *MMP-9 -1562 C/T* polimorfne varijante. Tako je u muških partnera žena sa sekundarnim IPSP-om, u usporedbi s primarnim IPSP-om, utvrđena statistički značajno veća učestalost *MMP-9 -1562 CC* genotipa ($P=0,015$), čije prisustvo povećava izgleda za sekundarni IPSP gotovo četiri puta u usporedbi s muškarcima koji imaju *MMP-9 -1562 CT* i *TT* genotipove ($OR=3,81$; $95\% CI=1,47-9,84$; $P=0,006$). Također, iako dosežu razinu statističke značajnosti, kombinacije *MMP-9 -1562 CC* genotipa s genotipovima drugih polimorfni varijanti gena *MMP* i *TIMP* obitelji ne povećavaju izgleda za primarni ili sekundarni IPSP u usporedbi s pojedinačnim *MMP-9 -1562 CC* genotipom. Stoga je *MMP-9 -1562 CC* genotip u muškaraca mogući samostalan čimbenik podložnosti za sekundarni IPSP, dok njegova kombinacija s drugim genotipovima ne povećava dodatno izgleda za IPSP. Isti genotip u žena je u ovom istraživanju utvrđen kao mogući čimbenik rizika za IPSP.

S obzirom na to da muški partneri žena sa sekundarnim IPSP-om imaju barem jedno živorođeno dijete, odnosno barem jednu uspješno iznesenu trudnoću, bilo bi za očekivati veću učestalost rizičnog *MMP-9 -1562 CC* genotipa u muških partnera žena s primarnim IPSP-om, što je suprotno od dobivenog. Zbog homozigotnog oblika rizičnog genotipa, očito je da genom spermija u zigotu uvijek donosi *MMP-9 -1562 C* alel, ali učinak na izražaj u posteljici i ishod trudnoće ostaje otvorenim pitanjem za buduća istraživanja. No, postoji moguće obrazloženje povećane učestalosti *MMP-9 -1562 CC* genotipa u muških partnera žena sa sekundarnim IPSP-om. Naime, trudnoća koja je završila živorođenjem prije IPSP-a predstavlja čimbenik rizika za preeklampsiju, odnosno žene sa sekundarnim IPSP-om imaju veću učestalost preeklampsije nego žene kontrolne skupine (296). Stoga se drži da trudnoća u žene stvara oblik „(epi)genetičkog pamćenja“ zbog prisustva određenog

čimbenika rizika, koji povećava rizik od komplikacija u narednim trudnoćama (330). Tako je moguće da prisustvo rizičnog *MMP-9* -1562 C alela u zametka, nakon prve uspješne trudnoće, ostavlja „(epi)genetičko pamćenje“ koje će u narednim trudnoćama potaći spontani pobačaj.

5.4. NEDOSTACI I PREDNOSTI ISTRAŽIVANJA

Istraživanja genetičke podložnosti za IPSP obilježena su nedosljednošću u kriterijima odabira skupina ispitanika, određenja IPSP-a, kao i metodologije samog pokusa (92), što se u ovom istraživanju pokušalo zaobići.

Ipak, treba navesti nedostatke provedenog istraživanja. Prvo, uzorci DNA molekule spontano pobačenih zametaka i plodova reproduktivnih parova s IPSP-om nisu prikupljeni zbog čega procjena učinka rizičnih heterozigotnih genotipova na rast i razvoj zametka nije bila moguća. No, važno je napomenuti kako bi u istraživanje bilo potrebno uključiti sve spontano pobačene zametke i plodove reproduktivnih parova s IPSP-om, ne samo posljednje u nizu, što dosad nije provedeno niti u jednom istraživanju (92). Naime, svaki zametak ima jedinstvenu genetičku kombinaciju s jedinstvenim epigenetičkim modifikacijama i uvjetima okoliša (92). Drugo, prilikom analize učestalosti kombinacija genotipova dvije ili više polimorfničkih varijanti broj ispitanika se po pojedinim skupinama smanjuje, što otežava donošenje valjanih zaključaka zbog umanjene snage testa. Treće, u ovom je istraživanju ispitan utjecaj genetičke varijabilnosti gena *MMP* i *TIMP* obitelji na podložnost za IPSP, što je samo jedan od mogućih uzroka koji dovodi do poremećenog izražaja tih gena.

Unatoč navedenim nedostacima, ovo istraživanje ima nekoliko prednosti, poput navedene dostatne snage testa i broja ispitanika. Također, u istraživanje su bili uključeni reproduktivni partneri žena s IPSP-om. Naime, većina istraživanja provedena je samo na ženama, a samo iznimno i njihovim reproduktivnim partnerima, što upućuje na nepostojanje općeprihvaćenog poimanja trudnoće kao fenomena u kojem na majčino-fetalnom spoju dolazi do međudjelovanja genoma žene, muškarca i zametka (92,101,119). Nadalje, reproduktivni partneri uključeni u istraživanje odabrani su prema strogim kriterijima nakon detaljne kliničke obrade u kojoj su isključeni svi poznati uzroci IPSP-a (9). Štoviše, u skladu s ESHRE smjernicama, izabrani su reproduktivni parovi s tri ili više uzastopnih spontanih pobačaja, što je pridonijelo vjerodostojnosti rezultata. Značajno je da je većina

reproduktivnih parova (91,8 %) imala spontane pobačaje u prvih 12 tjedana, čineći istovrsnu skupinu ispitanika pogodnu za ispitivanje hipoteze o genetičkoj podložnosti za poremećeno preoblikovanje ISM-a endometrija u IPSP-u prije i tijekom najranije trudnoće. Za razliku od većine istraživanja genetičke povezanosti s podložnošću za IPSP, poseban doprinos ovog istraživanja uključuje dio genetičke analize proveden na ispitanicima podskupina primarnih i sekundarnih IPSP-ova. Naposljetku, istraživanje je provedeno kao istraživanje genetičke povezanosti u kojem su korišteni uzorci genomske DNA izolirane iz periferne krvi ispitanika. Drži se da istraživanja genetičke povezanosti imaju veću snagu u traženju gena podložnosti za složene bolesti u usporedbi s obiteljskim istraživanjima (285).

5.5. BUDUĆE SMJERNICE

Rezultati ovog istraživanja pridonose boljem razumijevanju genetičke podložnosti za IPSP, kao i uloge varijabilnosti gena *MMP* i *TIMP* obitelji u etiologiji IPSP-a. Također, istraživanje pridonosi stjecanju temeljnih znanja o genetičkim mehanizmima normalne i patološke trudnoće, uključujući spontani pobačaj.

Buduća istraživanja uloge gena *MMP* i *TIMP* obitelji trebala bi se temeljiti na istraživanjima genskog izražaja sa ciljem otkrivanja utjecaja genotipova i alela polimorfničkih varijanti na izražaj gena *MMP* i *TIMP* obitelji i njihovih proizvoda u pre-decidualnim stanicama žena s IPSP-om, ali i trofoblastu spontano pobačenih zametaka i plodova. Štoviše, potrebna su istraživanja genetičke povezanosti koja uključuju oba reproduktivna partnera i spontano pobačene zametke i plodove. Nadalje, moguća su dodatna istraživanja genetičke povezanosti na većem broju uzoraka i drugim populacijama kako bi se upotpunilo razumijevanje uloge genetičke varijabilnosti gena *MMP* i *TIMP* obitelji u etiologiji IPSP-a.

Iako se poznati uzroci IPSP-a dijele na genetičke i negenetičke, liječenje je zasad moguće samo u potonje skupine, uključujući kirurško ispravljanje anomalija maternice, antikoagulantno liječenje antifosfolipidnog sindroma, kao i izbjegavanje rizičnih okolišnih čimbenika (9). Stoga će savladavanje temeljnih znanja o molekularnim mehanizmima normalne trudnoće, kao i patoloških stanja u trudnoći, pridonijeti učinkovitijem pristupu problemu ponavljajućih spontanih pobačaja u kliničkoj praksi.

6. ZAKLJUČCI

Dobiveni rezultati odgovaraju na pretpostavku ovog istraživanja, iz čega proizlaze sljedeći zaključci:

A) uloga varijabilnosti *MMP-1*, -2, -3, -9 te *TIMP-1*, -2, -3 i -4 gena kao čimbenika podložnosti za IPSP u reproduktivnih parova:

1. statistički značajno veća učestalost pojedinačnih *MMP-2* -735 CT, *MMP-2* -1306 CC ili *MMP-9* -1562 CC genotipova u žena s IPSP-om u usporedbi s kontrolnom skupinom upućuje da bi mogli biti čimbenici podložnosti za IPSP
2. pojedinačne i kombinacije polimorfni varijanti *MMP-1* -1607 1G/2G, *MMP-3* -1612 5A/6A, te *TIMP-1* -372 C/T, *TIMP-2* -303 C/T, *TIMP-3* -915 A/G, *TIMP-3* -1296 C/T i *TIMP-4* -3'-UTR C/T u žena, kao niti muškaraca ne pridonose podložnosti za IPSP

B) uloga varijabilnosti *MMP-1*, -2, -3, -9 te *TIMP-1*, -2, -3 i -4 gena kao čimbenika podložnosti za primarni i sekundarni IPSP u reproduktivnih parova:

1. statistički značajno veća učestalost *MMP-9* -1562 CC genotipa u muških partnera žena sa sekundarnim IPSP-om u usporedbi s primarnim IPSP-om upućuje da bi mogao biti čimbenik podložnosti za sekundarni IPSP
2. pojedinačne i kombinacije polimorfni varijanti *MMP-1* -1607 1G/2G, *MMP-2* -735 C/T, *MMP-2* -1306 C/T, *MMP-3* -1612 5A/6A, te *TIMP-1* -372 C/T, *TIMP-2* -303 C/T, *TIMP-3* -915 A/G, *TIMP-3* -1296 C/T i *TIMP-4* -3'-UTR C/T u žena, kao niti muškaraca ne pridonose podložnosti za primarni i sekundarni IPSP

7. LITERATURA

1. Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM, Macklon N. New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Med* 2013;11:154.
2. Porter TF, Scott JR. Evidence-based care of recurrent miscarriage. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2005;19:85-101.
3. Teklenburg G, Salker M, Heijnen C, Macklon NS, Brosens JJ. The molecular basis of recurrent pregnancy loss: impaired natural embryo selection. *Mol Hum Reprod* 2010;16:886-95.
4. Skakkebaek NE, Jørgensen N, Main KM i sur. Is human fecundity declining? *Int J Androl* 2006;29:2-11.
5. WHO: recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1977;56:247-53.
6. Macklon NS, Geraedts JP, Fauser BC. Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update* 2002;8:333-43.
7. 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.
8. Quenby S, Vince G, Farquharson R, Aplin J. Recurrent miscarriage: a defect in nature's quality control? *Hum Reprod* 2002;17:1959-63.
9. 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.
10. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG practice bulletin. Management of recurrent pregnancy loss. Number 24, February 2001. (Replaces Technical Bulletin Number 212, September 1995). American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* 2002;78:179-90.
11. Berry CW, Brambati B, Eskes TK i sur. The Euro-Team Early Pregnancy (ETEP) protocol for recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 1995;10:1516-20.

12. Christiansen OB, Nybo Andersen AM, Bosch E i sur. Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2005;83:821-39.
13. 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.
14. Daya S. Evaluation and management of recurrent spontaneous abortion. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1996;8:188-92.
15. Franssen MT, Korevaar JC, van der Veen F, Boer K, Leschot NJ, Goddijn M. Management of recurrent miscarriage: evaluating the impact of a guideline. *Hum Reprod* 2007;22:1298-303.
16. Stirrat GM. Recurrent miscarriage. II: Clinical associations, causes, and management. *Lancet* 1990;336:728-33.
17. Stirrat GM. Recurrent miscarriage. *Lancet* 1990;336:673-5.
18. Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman E, Laird S. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Hum Reprod Update* 2002;8:463-81.
19. Rackow BW, Arici A. Reproductive performance of women with müllerian anomalies. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007;19:229-37.
20. Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, Suzumori N, Mizutani E. Uterine anomaly and recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2011;29:514-21.
21. Dendrinou S, Grigoriou O, Sakkas EG, Makrakis E, Creatsas G. Hysteroscopy in the evaluation of habitual abortions. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2008;13:198-200.
22. Salim R, Regan L, Woelfer B, Backos M, Jurkovic D. A comparative study of the morphology of congenital uterine anomalies in women with and without a history of recurrent first trimester miscarriage. *Hum Reprod* 2003;18:162-6.
23. Devi Wold AS, Pham N, Arici A. Anatomic factors in recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2006;24:25-32.
24. Bohlmann MK, von Wolff M, Luedders DW i sur. Hysteroscopic findings in women with two and with more than two first-trimester miscarriages are not significantly different. *Reprod Biomed Online* 2010;21:230-6.

25. Ortel TL. Antiphospholipid syndrome: laboratory testing and diagnostic strategies. *Am J Hematol* 2012;87 Suppl 1:S75-81.
26. Lim W. Antiphospholipid antibody syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:233-9.
27. Branch DW, Gibson M, Silver RM. Clinical practice. Recurrent miscarriage. *N Engl J Med* 2010;363:1740-7.
28. van den Boogaard E, Cohn DM, Korevaar JC i sur. 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.
29. Di Simone N, Di Nicuolo F, D'Ippolito S i sur. Antiphospholipid antibodies affect human endometrial angiogenesis. *Biol Reprod* 2010;83:212-9.
30. Coulam CB, Acacio B. Does immunotherapy for treatment of reproductive failure enhance live births? *Am J Reprod Immunol* 2012;67:296-304.
31. McIntyre JA. Antiphospholipid antibodies in implantation failures. *Am J Reprod Immunol* 2003;49:221-9.
32. Empson M, Lassere M, Craig J, Scott J. Prevention of recurrent miscarriage for women with antiphospholipid antibody or lupus anticoagulant. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;2:CD002859.
33. Mak A, Cheung MW, Cheak AA, Ho RC. Combination of heparin and aspirin is superior to aspirin alone in enhancing live births in patients with recurrent pregnancy loss and positive anti-phospholipid antibodies: a meta-analysis of randomized controlled trials and meta-regression. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:281-8.
34. Gardella JR, Hill JA 3rd. Environmental toxins associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2000;18:407-24.
35. Laurino MY, Bennett RL, Saraiya DS i sur. Genetic evaluation and counseling of couples with recurrent miscarriage: recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns* 2005;14:165-81.

36. Lanasa MC, Hogge WA, Hoffman EP. Sex Chromosome Genetics '99. The X chromosome and recurrent spontaneous abortion: the significance of transmanifesting carriers. *Am J Hum Genet* 1999;64:934-8.
37. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM[®] [Internet]. Baltimore, MD: McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University; c1966-2013 [updated 30 September 2013; cited 2013 Oct 02]. Available from: <http://www.omim.org/>.
38. Voet T, Vanneste E, Vermeesch JR. The human cleavage stage embryo is a cradle of chromosomal rearrangements. *Cytogenet Genome Res* 2011;133:160-8.
39. Vanneste E, Voet T, Le Caignec C i sur. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009;15:577-83.
40. van den Berg MM, van Maarle MC, van Wely M, Goddijn M. Genetics of early miscarriage. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:1951-9.
41. Wellesley D, Dolk H, Boyd PA i sur. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. *Eur J Hum Genet* 2012;20:521-6.
42. Rubio C, Pehlivan T, Rodrigo L, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview. *Am J Reprod Immunol* 2005;53:159-65.
43. ESHRE Capri Workshop Group. Genetic aspects of female reproduction. *Hum Reprod Update* 2008;14:293-307.
44. Warren JE, Silver RM. Genetics of pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol* 2008;51:84-95.
45. Franssen MT, Korevaar JC, Leschot NJ i sur. Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *BMJ* 2005;331:137-41.
46. 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.
47. Hodes-Wertz B, Grifo J, Ghadir S i sur. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. *Fertil Steril* 2012;98:675-80.

48. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod* 2002;17:446-51.
49. Franssen MT, Musters AM, van der Veen F i sur. Reproductive outcome after PGD in couples with recurrent miscarriage carrying a structural chromosome abnormality: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011;17:467-75.
50. Forabosco A, Percesepe A, Santucci S. Incidence of non-age-dependent chromosomal abnormalities: a population-based study on 88965 amniocenteses. *Eur J Hum Genet* 2009;17:897-903.
51. 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.
52. Foyouzi N, Cedars MI, Huddleston HG. Cost-effectiveness of cytogenetic evaluation of products of conception in the patient with a second pregnancy loss. *Fertil Steril* 2012;98:151-5.
53. 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.
54. van den Boogaard E, Kaandorp SP, Franssen MT i sur. Consecutive or non-consecutive recurrent miscarriage: is there any difference in carrier status? *Hum Reprod* 2010;25:1411-4.
55. Carp H, Feldman B, Oelsner G, Schiff E. Parental karyotype and subsequent live births in recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2004;81:1296-301.
56. Carp H, Guetta E, Dorf H, Soriano D, Barkai G, Schiff E. Embryonic karyotype in recurrent miscarriage with parental karyotypic aberrations. *Fertil Steril* 2006;85:446-50.
57. Vissenberg R, Goddijn M. Is there a role for assisted reproductive technology in recurrent miscarriage? *Semin Reprod Med* 2011;29:548-56.
58. Stephenson MD, Sierra S. Reproductive outcomes in recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a structural chromosome rearrangement. *Hum Reprod* 2006;21:1076-82.

59. Zeesman S, Carson N, Whelan DT. Paternal transmission of the congenital form of myotonic dystrophy type 1: a new case and review of the literature. *Am J Med Genet* 2002;107:222-6.
60. Castori M. Diabetic embryopathy: a developmental perspective from fertilization to adulthood. *Mol Syndromol* 2013;4:74-86.
61. Castorino K, Jovanović L. Pregnancy and diabetes management: advances and controversies. *Clin Chem* 2011;57:221-30.
62. Krassas GE, Poppe K, Glinoer D. Thyroid function and human reproductive health. *Endocr Rev* 2010;31:702-55.
63. van den Boogaard E, Vissenberg R, Land JA i sur. 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.
64. Dal Lago A, Vaquero E, Pasqualetti P i sur. Prediction of early pregnancy maternal thyroid impairment in women affected with unexplained recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2011;26:1324-30.
65. Thangaratinam S, Tan A, Knox E, Kilby MD, Franklyn J, Coomarasamy A. Association between thyroid autoantibodies and miscarriage and preterm birth: meta-analysis of evidence. *BMJ* 2011;342:d2616.
66. Stagnaro-Green A. Thyroid antibodies and miscarriage: where are we at a generation later? *J Thyroid Res* 2011;2011:841949.
67. Kallen CB, Arici A. Immune testing in fertility practice: truth or deception? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003;15:225-31.
68. Twig G, Shina A, Amital H, Shoenfeld Y. Pathogenesis of infertility and recurrent pregnancy loss in thyroid autoimmunity. *J Autoimmun* 2012;38:J275-81.
69. Fauser BC, Tarlatzis BC, Rebar RW i sur. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil Steril* 2012;97:28-38.e25.

70. Bukulmez O, Arici A. Luteal phase defect: myth or reality. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2004;31:727-44, ix.
71. 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.
72. Egli M, Leeners B, Kruger TH. Prolactin secretion patterns: basic mechanisms and clinical implications for reproduction. *Reproduction* 2010;140:643-54.
73. Li W, Ma N, Laird SM, Ledger WL, Li TC. The relationship between serum prolactin concentration and pregnancy outcome in women with unexplained recurrent miscarriage. *J Obstet Gynaecol* 2013;33:285-8.
74. Chaouat G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol* 2007;29:95-113.
75. Chaouat G, Petitbarat M, Dubanchet S, Rahmati M, Ledée N. Tolerance to the foetal allograft? *Am J Reprod Immunol* 2010;63:624-36.
76. 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.
77. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1221:80-7.
78. Tang AW, Alfirevic Z, Quenby S. Natural killer cells and pregnancy outcomes in women with recurrent miscarriage and infertility: a systematic review. *Hum Reprod* 2011;26:1971-80.
79. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y i sur. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 2006;12:1065-74.
80. Yagel S. The developmental role of natural killer cells at the fetal-maternal interface. *Am J Obstet Gynecol* 2009;201:344-50.
81. Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, Harris LK, Jones RL. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *Am J Pathol* 2009;174:1959-71.

82. Saini V, Arora S, Yadav A, Bhattacharjee J. Cytokines in recurrent pregnancy loss. *Clin Chim Acta* 2011;412:702-8.
83. Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ* 2000;321:424.
84. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:601-10.
85. Porter TF, LaCoursiere Y, Scott JR. Immunotherapy for recurrent miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;2:CD000112.
86. Stephenson MD, Kutteh WH, Purkiss S i sur. Intravenous immunoglobulin and idiopathic secondary recurrent miscarriage: a multicentered randomized placebo-controlled trial. *Hum Reprod* 2010;25:2203-9.
87. Ata B, Tan SL, Shehata F, Holzer H, Buckett W. A systematic review of intravenous immunoglobulin for treatment of unexplained recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2011;95:1080-5.e1-2.
88. Ober C, Karrison T, Odem RR i sur. Mononuclear-cell immunisation in prevention of recurrent miscarriages: a randomised trial. *Lancet* 1999;354:365-9.
89. de Jong PG, Goddijn M, Middeldorp S. Testing for inherited thrombophilia in recurrent miscarriage. *Semin Reprod Med* 2011;29:540-7.
90. Robertson L, Wu O, Langhorne P i sur. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol* 2006;132:171-96.
91. 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.
92. Rull K, Nagirnaja L, Laan M. Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions. *Front Genet* 2012;3:34.
93. McNamee K, Dawood F, Farquharson R. Recurrent miscarriage and thrombophilia: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2012;24:229-34.

94. Kaandorp S, Di Nisio M, Goddijn M, Middeldorp S. Aspirin or anticoagulants for treating recurrent miscarriage in women without antiphospholipid syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;1:CD004734.
95. Kujovich JL. Thrombophilia and pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:412-24.
96. Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2000;74:1196-9.
97. Hague WM. Homocysteine and pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003;17:459-69.
98. Boots C, Stephenson MD. Does obesity increase the risk of miscarriage in spontaneous conception: a systematic review. *Semin Reprod Med* 2011;29:507-13.
99. Craig M. Stress and recurrent miscarriage. *Stress* 2001;4:205-13.
100. Brent RL, Christian MS, Diener RM. Evaluation of the reproductive and developmental risks of caffeine. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2011;92:152-87.
101. Pereza N, Ostojić S. Funkcionalna nejednakost roditeljskih genoma u etiologiji gestacijskih trofoblastičnih bolesti. *Medicina* 2008;44:22-37.
102. Puscheck EE, Jeyendran RS. The impact of male factor on recurrent pregnancy loss. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007;19:222-8.
103. Hanna CW, McFadden DE, Robinson WP. DNA methylation profiling of placental villi from karyotypically normal miscarriage and recurrent miscarriage. *Am J Pathol* 2013;182:2276-84.
104. Ankolkar M, Patil A, Warke H i sur. Methylation analysis of idiopathic recurrent spontaneous miscarriage cases reveals aberrant imprinting at H19 ICR in normozoospermic individuals. *Fertil Steril* 2012;98:1186-92.
105. Minks J, Robinson WP, Brown CJ. A skewed view of X chromosome inactivation. *J Clin Invest* 2008;118:20-3.

106. Pasquier E, Bohec C, De Saint Martin L i sur. Strong evidence that skewed X-chromosome inactivation is not associated with recurrent pregnancy loss: an incident paired case control study. *Hum Reprod* 2007;22:2829-33.
107. Brigham SA, Conlon C, Farquharson RG. A longitudinal study of pregnancy outcome following idiopathic recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 1999;14:2868-71.
108. 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.
109. Christiansen OB, Pedersen B, Mathiesen O, Husth 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.
110. Kolte AM, Nielsen HS, Moltke I i sur. A genome-wide scan in affected sibling pairs with idiopathic recurrent miscarriage suggests genetic linkage. *Mol Hum Reprod* 2011;17:379-85.
111. 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.
112. Ostojić S, Peterlin B. Genetski čimbenici u etiologiji učestalih spontanih pobačaja. *Medicina* 2004;4:256-64.
113. Buretić-Tomljanović A, Šverko A. Heteromorfizmi kromosoma čovjeka u poremećajima reprodukcije. *Medicina fluminensis* 2013;49:62-70.
114. Sahin FI, Yilmaz Z, Yuregir OO, Bulakbasi T, Ozer O, Zeyneloglu HB. Chromosome heteromorphisms: an impact on infertility. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:191-5.
115. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ i sur. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2012;27:2908-17.
116. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* 2009;10:241-51.
117. Rodriguez-Revena L, Mila M, Rosenberg C, Lamb A, Lee C. Structural variation in the human genome: the impact of copy number variants on clinical diagnosis. *Genet Med* 2007;9:600-6.

118. Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, von Wolff M. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update* 2006;12:617-30.
119. 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.
120. 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.
121. Rajcan-Separovic E, Diego-Alvarez D, Robinson WP i sur. Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2010;25:2913-22.
122. Pereza N, Črnjar K, Buretić-Tomljanović A i sur. 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.
123. Li Wang, Zeng Chan Wang, Cui Xie, Xiao Feng Liu, Mao Sheng Yang. Genome-wide screening for risk loci of idiopathic recurrent miscarriage in a Han Chinese population: a pilot study. *Reprod Sci* 2010;17:578-84.
124. Teklenburg G, Salker M, Molokhia M i sur. Natural selection of human embryos: decidualizing endometrial stromal cells serve as sensors of embryo quality upon implantation. *PLoS One* 2010;5:e10258.
125. Salker M, Teklenburg G, Molokhia M i sur. Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PLoS One* 2010;5:e10287.
126. Cartwright JE, Fraser R, Leslie K, Wallace AE, James JL. Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction* 2010;140:803-13.
127. Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 2003;200:423-8.

128. Zhu JY, Pang ZJ, Yu YH. Regulation of trophoblast invasion: the role of matrix metalloproteinases. *Rev Obstet Gynecol* 2012;5:e137-43.
129. Vu TH. Don't mess with the matrix. *Nat Genet* 2001;28:202-3.
130. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 2010;123:4195-200.
131. Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol* 2011;209:139-51.
132. Diedrich K, Fauser BC, Devroey P, Griesinger G; Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update* 2007;13:365-77.
133. Emera D, Romero R, Wagner G. The evolution of menstruation: a new model for genetic assimilation: explaining molecular origins of maternal responses to fetal invasiveness. *Bioessays* 2012;34:26-35.
134. Weimar CH, Macklon NS, Post Uiterweer ED, Brosens JJ, Gellersen B. The motile and invasive capacity of human endometrial stromal cells: implications for normal and impaired reproductive function. *Hum Reprod Update* 2013;19:542-57.
135. Gaide Chevronnay HP, Selvais C, Emonard H, Galant C, Marbaix E, Henriët P. Regulation of matrix metalloproteinases activity studied in human endometrium as a paradigm of cyclic tissue breakdown and regeneration. *Biochim Biophys Acta* 2012;1824:146-56.
136. Salamonsen LA, Zhang J, Brasted M. Leukocyte networks and human endometrial remodelling. *J Reprod Immunol* 2002;57:95-108.
137. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O i sur. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* 2004;114:744-54.
138. Aplin JD, Lacey H, Haigh T, Jones CJ, Chen CP, Westwood M. Growth factor-extracellular matrix synergy in the control of trophoblast invasion. *Biochem Soc Trans* 2000;28:199-202.
139. Wallace AE, Fraser R, Cartwright JE. Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership. *Hum Reprod Update* 2012;18:458-71.

140. Hazan AD, Smith SD, Jones RL, Whittle W, Lye SJ, Dunk CE. Vascular-leukocyte interactions: mechanisms of human decidual spiral artery remodeling in vitro. *Am J Pathol* 2010;177:1017-30.
141. Weimar CH, Kavelaars A, Brosens JJ i sur. Endometrial stromal cells of women with recurrent miscarriage fail to discriminate between high- and low-quality human embryos. *PLoS One* 2012;7:e41424.
142. Trogestad L, Magnus P, Moffett A, Stoltenberg C. The effect of recurrent miscarriage and infertility on the risk of pre-eclampsia. *BJOG* 2009;116:108-13.
143. Quesada V, Ordóñez GR, Sánchez LM, Puente XS, López-Otín C. The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis. *Nucleic Acids Res* 2009;37(Database issue):D239-43.
144. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
145. Gomis-Rüth FX. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J Biol Chem* 2009;284:15353-7.
146. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006;69:562-73.
147. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:221-33.
148. Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* 2007;26:587-96.
149. Jackson BC, Nebert DW, Vasiliou V. Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. *Hum Genomics* 2010;4:194-201.
150. Somerville RP, Oblander SA, Apte SS. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol* 2003;4:216.
151. Murphy G, Nagase H. Localizing matrix metalloproteinase activities in the pericellular environment. *FEBS J* 2011;278:2-15.

152. Maskos K, Bode W. Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Mol Biotechnol* 2003;25:241-66.
153. Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:639-52.
154. Das S, Mandal M, Chakraborti T, Mandal A, Chakraborti S. Structure and evolutionary aspects of matrix metalloproteinases: a brief overview. *Mol Cell Biochem* 2003;253:31-40.
155. Murphy G, Knäuper V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol* 1997;15:511-8.
156. Tallant C, Marrero A, Gomis-Rüth FX. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:20-8.
157. Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* 2011;41:271-90.
158. Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U i sur. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science* 1999;284:1667-70.
159. Mannello F, Medda V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Prog Histochem Cytochem* 2012;47:27-58.
160. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-39.
161. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 2003;253:269-85.
162. Tong W, Zhang L. Fetal hypoxia and programming of matrix metalloproteinases. *Drug Discov Today* 2012;17:124-34.
163. Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:558-64.
164. Schenk S, Quaranta V. Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix. *Trends Cell Biol* 2003;13:366-75.
165. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:534-40.

166. Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol* 2007;211:19-26.
167. Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1362-78.
168. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002;115:3719-27.
169. Herz J, Strickland DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* 2001;108:779-84.
170. Huxley-Jones J, Clarke TK, Beck C, Toubaris G, Robertson DL, Boot-Handford RP. The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC Evol Biol* 2007;7:63.
171. Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol* 2000;19:623-9.
172. Chaudhary AK, Singh M, Bharti AC, Asotra K, Sundaram S, Mehrotra R. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant and malignant lesions of the head and neck. *J Biomed Sci* 2010;17:10.
173. Benbow U, Brinckerhoff CE. The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix Biol* 1997;15:519-26.
174. Langers AM, Verspaget HW, Hommes DW, Sier CF. Single-nucleotide polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastrointestinal cancer. *World J Gastrointest Oncol* 2011;3:79-98.
175. Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G i sur. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res* 1998;58:5321-5.
176. Tower GB, Coon CI, Brinckerhoff CE. The 2G single nucleotide polymorphism (SNP) in the MMP-1 promoter contributes to high levels of MMP-1 transcription in MCF-7/ADR breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2003;82:75-82.

177. Tower GB, Coon CI, Belguise K, Chalbos D, Brinckerhoff CE. Fra-1 targets the AP-1 site/2G single nucleotide polymorphism (ETS site) in the MMP-1 promoter. *Eur J Biochem* 2003;270:4216-25.
178. Wyatt CA, Coon CI, Gibson JJ, Brinckerhoff CE. Potential for the 2G single nucleotide polymorphism in the promoter of matrix metalloproteinase to enhance gene expression in normal stromal cells. *Cancer Res* 2002;62:7200-2.
179. Yu C, Zhou Y, Miao X, Xiong P, Tan W, Lin D. Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer. *Cancer Res* 2004;64:7622-8.
180. Rollin J, Régina S, Vourc'h P i sur. Influence of MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms on gene expression and clinical outcome of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007;56:273-80.
181. Price SJ, Greaves DR, Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2001;276:7549-58.
182. Gonçalves FM, Martins-Oliveira A, Lacchini R i sur. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 gene polymorphisms affect circulating MMP-2 levels in patients with migraine with aura. *Gene* 2013;512:35-40.
183. Marson BP, Lacchini R, Belo V i sur. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 genetic variants modify the circulating MMP-2 levels in end-stage kidney disease. *Am J Nephrol* 2012;35:209-15.
184. Belo VA, Luizon MR, Carneiro PC i sur. Effect of metabolic syndrome risk factors and MMP-2 genetic variations on circulating MMP-2 levels in childhood obesity. *Mol Biol Rep* 2013;40:2697-704.
185. Beránek M, Kolar P, Tschoplova S, Kankova K, Vasku A. Genetic variations and plasma levels of gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) and gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) in proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2008;14:1114-21.

186. Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem* 1996;271:13055-60.
187. Ye S, Whatling C, Watkins H, Henney A. Human stromelysin gene promoter activity is modulated by transcription factor ZBP-89. *FEBS Lett* 1999;450:268-72.
188. Borghaei RC, Gorski G, Javadi M; Mariah Chambers. NF-kappaB and ZBP-89 regulate MMP-3 expression via a polymorphic site in the promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;382:269-73.
189. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O i sur. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003;107:1579-85.
190. Ghaderian SM, Akbarzadeh Najar R, Tabatabaei Panah AS. Genetic polymorphisms and plasma levels of matrix metalloproteinases and their relationships with developing acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis* 2010;21:330-5.
191. Fernandes KS, Brum DG, Palei AC i sur. Functional MMP-9 polymorphisms modulate plasma MMP-9 levels in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2012;249:56-9.
192. Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol* 2011;12:233.
193. Brew K, Dinakarpanian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477:267-83.
194. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:55-71.
195. Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49:187-98.
196. Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HR. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:99-113.

197. Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 1996;271:30375-80.
198. Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* 2008;1:re6.
199. Stetler-Stevenson WG, Seo DW. TIMP-2: an endogenous inhibitor of angiogenesis. *Trends Mol Med* 2005;11:97-103.
200. Meijer MJ, Mieremet-Ooms MA, van Hogezaand RA, Lamers CB, Hommes DW, Verspaget HW. Role of matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of metalloproteinase and tumor necrosis factor-alpha single nucleotide gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007;13:2960-6.
201. Hinterseher I, Krex D, Kuhlisch E i sur. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) polymorphisms in a Caucasian population with abdominal aortic aneurysm. *World J Surg* 2007;31:2248-54.
202. Lorente L, Martín M, Plasencia F i sur. The 372 T/C genetic polymorphism of TIMP-1 is associated with serum levels of TIMP-1 and survival in patients with severe sepsis. *Crit Care* 2013;17:R94.
203. Kumar M, Bhadoria DP, Dutta K i sur. The $\alpha(1)$ AT and TIMP-1 Gene Polymorphism in the Development of Asthma. *Comp Funct Genomics* 2012;2012:968267.
204. Romero R, Friel LA, Velez Edwards DR i sur. A genetic association study of maternal and fetal candidate genes that predispose to preterm prelabor rupture of membranes (PROM). *Am J Obstet Gynecol* 2010;203:361.e1-30.
205. Romero R, Velez Edwards DR, Kusanovic JP i sur. Identification of fetal and maternal single nucleotide polymorphisms in candidate genes that predispose to spontaneous preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:431.e1-34.
206. Beránek M, Kanková K, Muzík J. Identification of novel common polymorphisms in the promoter region of the TIMP-3 gene in Czech population. *Mol Cell Probes* 2000;14:265-8.

207. Armstrong C, Abilleira S, Sitzer M, Markus HS, Bevan S. Polymorphisms in MMP family and TIMP genes and carotid artery intima-media thickness. *Stroke* 2007;38:2895-9.
208. Ogata T, Shibamura H, Tromp G i sur. Genetic analysis of polymorphisms in biologically relevant candidate genes in patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2005;41:1036-42.
209. Lee HJ, Lee GH, Nah S i sur. Association of TIMP-4 gene polymorphism with the risk of osteoarthritis in the Korean population. *Rheumatol Int* 2008;28:845-50.
210. Salamonsen LA, Zhang J, Hampton A, Lathbury L. Regulation of matrix metalloproteinases in human endometrium. *Hum Reprod* 2000;15 Suppl 3:112-9.
211. Goldman S, Shalev E. The role of the matrix metalloproteinases in human endometrial and ovarian cycles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;111:109-21.
212. Cohen M, Meisser A, Bischof P. Metalloproteinases and human placental invasiveness. *Placenta* 2006;27:783-93.
213. Freitas S, Meduri G, Le Nestour E, Bausero P, Perrot-Applanat M. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in blood vessels in human endometrium. *Biol Reprod* 1999;61:1070-82.
214. Pilka R, Noskova V, Domanski H, Andersson C, Hansson S, Casslén B. Endometrial TIMP-4 mRNA is expressed in the stroma, while TIMP-4 protein accumulates in the epithelium and is released to the uterine fluid. *Mol Hum Reprod* 2006;12:497-503.
215. Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC i sur. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* 1994;94:946-53.
216. Määttä M, Soini Y, Liakka A, Autio-Harmanen H. Localization of MT1-MMP, TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3 messenger RNA in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. Enhanced expression by endometrial adenocarcinomas is associated with low differentiation. *Am J Clin Pathol* 2000;114:402-11.
217. Zhang J, Salamonsen LA. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1, -2 and -3 in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 1997;3:735-41.

218. Henriot P, Cornet PB, Lemoine P i sur. Circulating ovarian steroids and endometrial matrix metalloproteinases (MMPs). *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:119-38; discussion 157-8, 396-406.
219. Dong JC, Dong H, Campana A, Bischof P. Matrix metalloproteinases and their specific tissue inhibitors in menstruation. *Reproduction* 2002;123:621-31.
220. Vassilev V, Pretto CM, Cornet PB i sur. Response of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases messenger ribonucleic acids to ovarian steroids in human endometrial explants mimics their gene- and phase-specific differential control in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:5848-57.
221. Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod* 1997;3:27-45.
222. Pilka R, Oborna I, Lichnovsky V i sur. Endometrial expression of the estrogen-sensitive genes MMP-26 and TIMP-4 is altered by a substitution protocol without down-regulation in IVF patients. *Hum Reprod* 2006;21:3146-56.
223. Skinner JL, Riley SC, Gebbie AE, Glasier AF, Critchley HO. Regulation of matrix metalloproteinase-9 in endometrium during the menstrual cycle and following administration of intrauterine levonorgestrel. *Hum Reprod* 1999;14:793-9.
224. Jeziorska M, Nagase H, Salamonsen LA, Woolley DE. Immunolocalization of the matrix metalloproteinases gelatinase B and stromelysin 1 in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Reprod Fertil* 1996;107:43-51.
225. Gellersen B, Reimann K, Samalecos A, Aupers S, Bamberger AM. Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals. *Hum Reprod* 2010;25:862-73.
226. Pilka R, Domanski H, Hansson S, Eriksson P, Casslén B. Endometrial TIMP-4 mRNA is high at midcycle and in hyperplasia, but down-regulated in malignant tumours. Coordinated expression with MMP-26. *Mol Hum Reprod* 2004;10:641-50.
227. Chegini N, Rhoton-Vlasak A, Williams RS. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 and -4 in endometrium throughout the normal

- menstrual cycle and alteration in users of levonorgestrel implants who experience irregular uterine bleeding. *Fertil Steril* 2003;80:564-70.
228. Tunuguntla R, Ripley D, Sang QX, Chegini N. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-3 and -4 in benign endometrium and endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2003;89:453-9.
229. Anacker J, Segerer SE, Hagemann C i sur. Human decidua and invasive trophoblasts are rich sources of nearly all human matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod* 2011;17:637-52.
230. Bischof P, Meisser A, Campana A. Biochemistry and molecular biology of trophoblast invasion. *Ann N Y Acad Sci* 2001;943:157-62.
231. Naruse K, Lash GE, Innes BA i sur. Localization of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitors for MMPs (TIMPs) in uterine natural killer cells in early human pregnancy. *Hum Reprod* 2009;24:553-61.
232. Bjørn SF, Hastrup N, Lund LR, Danø K, Larsen JF, Pyke C. Co-ordinated expression of MMP-2 and its putative activator, MT1-MMP, in human placentation. *Mol Hum Reprod* 1997;3:713-23.
233. Seval Y, Akkoyunlu G, Demir R, Asar M. Distribution patterns of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in the human decidua during early pregnancy. *Acta Histochem* 2004;106:353-62.
234. Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res* 1998;291:133-48.
235. Husslein H, Haider S, Meinhardt G, Prast J, Sonderegger S, Knöfler M. Expression, regulation and functional characterization of matrix metalloproteinase-3 of human trophoblast. *Placenta* 2009;30:284-91.
236. Huisman MA, Timmer A, Zeinstra M i sur. Matrix-metalloproteinase activity in first trimester placental bed biopsies in further complicated and uncomplicated pregnancies. *Placenta* 2004;25:253-8.

237. Hurskainen T, Höyhty M, Tuuttila A, Oikarinen A, Autio-Harminen H. mRNA expressions of TIMP-1, -2, and -3 and 92-KD type IV collagenase in early human placenta and decidual membrane as studied by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1996;44:1379-88.
238. Zhang J, Cao YJ, Zhao YG, Sang QX, Duan EK. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitor of metalloproteinase-4 in human normal cytotrophoblast cells and a choriocarcinoma cell line, JEG-3. *Mol Hum Reprod* 2002;8:659-66.
239. Baek KH. Aberrant gene expression associated with recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 2004;10:291-7.
240. Inagaki N, Stern C, McBain J, Lopata A, Kornman L, Wilkinson D. Analysis of intra-uterine cytokine concentration and matrix-metalloproteinase activity in women with recurrent failed embryo transfer. *Hum Reprod* 2003;18:608-15.
241. Skrzypczak J, Wirstlein P, Mikolajczyk M. Could the defects in the endometrial extracellular matrix during the implantation be a cause for impaired fertility? *Am J Reprod Immunol* 2007;57:40-8.
242. Jokimaa V, Oksjoki S, Kujari H, Vuorio E, Anttila L. Altered expression of genes involved in the production and degradation of endometrial extracellular matrix in patients with unexplained infertility and recurrent miscarriages. *Mol Hum Reprod* 2002;8:1111-6.
243. Banerjee P, Jana SK, Pasricha P, Ghosh S, Chakravarty B, Chaudhury K. Proinflammatory cytokines induced altered expression of cyclooxygenase-2 gene results in unreceptive endometrium in women with idiopathic recurrent spontaneous miscarriage. *Fertil Steril* 2013;99:179-87.
244. Kuznetsova AV, Paukov VS, Voloshchuk IN, Demidova EM. Changes in the components of the extracellular matrix and its regulators in the endometrium of women with habitual abortion. *Arkh Patol* 2002;64:18-22.
245. Anumba DO, El Gelany S, Elliott SL, Li TC. Circulating levels of matrix proteases and their inhibitors in pregnant women with and without a history of recurrent pregnancy loss. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8:62.

246. Choi HK, Choi BC, Lee SH, Kim JW, Cha KY, Baek KH. Expression of angiogenesis- and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy loss patients. *Mol Reprod Dev* 2003;66:24-31.
247. Baek KH, Choi BC, Lee JH i sur. Comparison of gene expression at the feto-maternal interface between normal and recurrent pregnancy loss patients. *Reprod Fertil Dev* 2002;14:235-40.
248. Nissi R, Talvensaari-Mattila A, Kotila V, Niinimäki M, Järvelä I, Turpeenniemi-Hujanen T. Circulating matrix metalloproteinase MMP-9 and MMP-2/TIMP-2 complex are associated with spontaneous early pregnancy failure. *Reprod Biol Endocrinol* 2013;11:2.
249. Singh K, Nair RR, Khanna A. Functional SNP -1562C/T in the promoter region of MMP9 and recurrent early pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 2012;24:61-5.
250. Zhu Y, Spitz MR, Lei L, Mills GB, Wu X. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances lung cancer susceptibility. *Cancer Res* 2001;61:7825-9.
251. Vasků A, Goldbergová M, Izakovicová Hollá L i sur. A haplotype constituted of four MMP-2 promoter polymorphisms (-1575G/A, -1306C/T, -790T/G and -735C/T) is associated with coronary triple-vessel disease. *Matrix Biol* 2004;22:585-91.
252. Dunleavey L, Beyzade S, Ye S. Rapid genotype analysis of the stromelysin gene 5A/6A polymorphism. *Atherosclerosis* 2000;151:587-9.
253. Matsumura S, Oue N, Nakayama H i sur. A single nucleotide polymorphism in the MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131:19-25.
254. Kubben FJ, Sier CF, Meijer MJ i sur. Clinical impact of MMP and TIMP gene polymorphisms in gastric cancer. *Br J Cancer* 2006;95:744-51.
255. Fang S, Jin X, Wang R i sur. Polymorphisms in the MMP1 and MMP3 promoter and non-small cell lung carcinoma in North China. *Carcinogenesis* 2005;26:481-6.
256. DSS Research [Internet]. Fort Worth, TX, USA: DSS Research; c1982-2013 [cited 2013 Oct 02]. Researcher's Toolkit, Statistical Power Calculator; [about 3 screens]. Available from:

<http://www.dssresearch.com/KnowledgeCenter/toolkitcalculators/statisticalpowercalculators.aspx>.

257. Comparative and Molecular Pharmacogenomics [Internet]. Pullman, WA, USA: Washington State University College of Veterinary Medicine; c2005-2008 [cited 2013 Oct 02]. Laboratory Protocols, Simple Hardy-Weinberg Calculator – Court Lab; [about 2 screens]. Available from: http://www.tufts.edu/~mcourt01/lab_protocols.htm.
258. Do CB, Batzoglou S. What is the expectation maximization algorithm? *Nature Biotechnology* 2008;26:897-9.
259. Li TC, Tuckerman EM, Laird SM. Endometrial factors in recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 2002;8:43-52.
260. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340:1796-9.
261. Serle E, Aplin JD, Li TC i sur. Endometrial differentiation in the peri-implantation phase of women with recurrent miscarriage: a morphological and immunohistochemical study. *Fertil Steril* 1994;62:989-96.
262. Tuckerman E, Laird SM, Stewart R, Wells M, Li TC. Markers of endometrial function in women with unexplained recurrent pregnancy loss: a comparison between morphologically normal and retarded endometrium. *Hum Reprod* 2004;19:196-205.
263. Jindal P, Regan L, Fourkala EO i sur. Placental pathology of recurrent spontaneous abortion: the role of histopathological examination of products of conception in routine clinical practice: a mini review. *Hum Reprod* 2007;22:313-6.
264. Evron A, Goldman S, Shalev E. Effect of primary human endometrial stromal cells on epithelial cell receptivity and protein expression is dependent on menstrual cycle stage. *Hum Reprod* 2011;26:176-90.
265. Jones RL, Findlay JK, Farnworth PG, Robertson DM, Wallace E, Salamonsen LA. Activin A and inhibin A differentially regulate human uterine matrix metalloproteinases: potential interactions during decidualization and trophoblast invasion. *Endocrinology* 2006;147:724-32.

266. Habara T, Nakatsuka M, Konishi H, Asagiri K, Noguchi S, Kudo T. Elevated blood flow resistance in uterine arteries of women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2002;17:190-4.
267. Nakatsuka M, Habara T, Noguchi S, Konishi H, Kudo T. Impaired uterine arterial blood flow in pregnant women with recurrent pregnancy loss. *J Ultrasound Med* 2003;22:27-31.
268. Chen L, Quan S, Li H, Chen C, Xing F, Yu Y. A comparison of endometrial and subendometrial vascularity assessed by three-dimensional ultrasonography and power Doppler angiography between healthy fertile women and women with unexplained primary recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2011;95:1127-9.
269. Heissig B, Hattori K, Friedrich M, Rafii S, Werb Z. Angiogenesis: vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases. *Curr Opin Hematol* 2003;10:136-41.
270. Lash GE, Innes BA, Drury JA, Robson SC, Quenby S, Bulmer JN. Localization of angiogenic growth factors and their receptors in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2012;27:183-95.
271. Brosens JJ, Gellersen B. Something new about early pregnancy: decidual biosensing and natural embryo selection. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010;36:1-5.
272. Grewal S, Carver JG, Ridley AJ, Mardon HJ. Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16189-94.
273. Cohen M, Wuillemain C, Irion O, Bischof P. Role of decidua in trophoblastic invasion. *Neuro Endocrinol Lett* 2010;31:193-7.
274. Ingber DE. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circ Res* 2002;91:877-87.
275. Meresman GF, Olivares C, Vighi S, Alfie M, Irigoyen M, Etchepareborda JJ. Apoptosis is increased and cell proliferation is decreased in out-of-phase endometria from infertile and recurrent abortion patients. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8:126.
276. Fernandez-Patron C, Martinez-Cuesta MA, Salas E i sur. Differential regulation of platelet aggregation by matrix metalloproteinases-9 and -2. *Thromb Haemost* 1999;82:1730-5.

277. Cauwe B, Opdenakker G. Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2010;45:351-423.
278. Lind AK, Dahm-Kähler P, Weijdegård B, Sundfeldt And K, Brännström M. Gelatinases and their tissue inhibitors during human ovulation: increased expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1. *Mol Hum Reprod* 2006;12:725-36.
279. Fedorcsák P, Polec A, Ráki M, Holm R, Jepsen P, Abyholm T. Differential release of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases by human granulosa-lutein cells and ovarian leukocytes. *Endocrinology* 2010;151:1290-8.
280. Fata JE, Ho AT, Leco KJ, Moorehead RA, Khokha R. Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:77-95.
281. Shalev E, Goldman S, Ben-Shlomo I. The balance between MMP-9 and MMP-2 and their tissue inhibitor (TIMP)-1 in luteinized granulosa cells: comparison between women with PCOS and normal ovulatory women. *Mol Hum Reprod* 2001;7:325-31.
282. Shah BH, Catt KJ. Matrix metalloproteinases in reproductive endocrinology. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15:47-9.
283. Skrzypczak J, Wirstlein P, Mikołajczyk M, Ludwikowski G, Zak T. TGF superfamily and MMP2, MMP9, TIMP1 genes expression in the endometrium of women with impaired reproduction. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;45 Suppl 1:S143-8.
284. Mikołajczyk M, Skrzypczak J, Wirstlein P. No correlation between pinopode formation and LIF and MMP2 expression in endometrium during implantation window. *Folia Histochem Cytobiol* 2011;49:615-21.
285. Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med* 2005;56:303-20.
286. Yoshii N, Hamatani T, Inagaki N i sur. Successful implantation after reducing matrix metalloproteinase activity in the uterine cavity. *Reprod Biol Endocrinol* 2013;11:37.

287. Malvezzi H, Aguiar VG, Paz CC, Tanus-Santos JE, Penna IA, Navarro PA. Increased circulating MMP-2 levels in infertile patients with moderate and severe pelvic endometriosis. *Reprod Sci* 2013;20:557-62.
288. Li T, Li YG, Pu DM. Matrix metalloproteinase-2 and -9 expression correlated with angiogenesis in human adenomyosis. *Gynecol Obstet Invest* 2006;62:229-35.
289. Konac E, Alp E, Onen HI, Korucuoglu U, Biri AA, Menevse S. Endometrial mRNA expression of matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and cell adhesion molecules in unexplained infertility and implantation failure patients. *Reprod Biomed Online* 2009;19:391-7.
290. Palei AC, Granger JP, Tanus-Santos JE. Matrix metalloproteinases as drug targets in preeclampsia. *Curr Drug Targets* 2013;14:325-34.
291. Shokry M, Omran OM, Hassan HI, Elsedfy GO, Hussein MR. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human trophoblasts of normal and preeclamptic placentas: preliminary findings. *Exp Mol Pathol* 2009;87:219-25.
292. Palei AC, Sandrim VC, Amaral LM i sur. Association between matrix metalloproteinase (MMP)-2 polymorphisms and MMP-2 levels in hypertensive disorders of pregnancy. *Exp Mol Pathol* 2012;92:217-21.
293. Coolman M, de Maat M, Van Heerde WL i sur. Matrix metalloproteinase-9 gene -1562C/T polymorphism mitigates preeclampsia. *Placenta* 2007;28:709-13.
294. Palei AC, Sandrim VC, Amaral LM i sur. Matrix metalloproteinase-9 polymorphisms affect plasma MMP-9 levels and antihypertensive therapy responsiveness in hypertensive disorders of pregnancy. *Pharmacogenomics J* 2012;12:489-98.
295. Xiong X, Fraser WD, Demianczuk NN. History of abortion, preterm and term birth, and risk of gestational hypertension: a population-based study. *J Reprod Med* 2004;49:899-907.
296. Weintraub AY, Sheiner E, Bashiri A, Shoham-Vardi I, Mazor M. Is there a higher prevalence of pregnancy complications in a live-birth preceding the appearance of recurrent abortions? *Arch Gynecol Obstet* 2005;271:350-4.
297. Sheiner E, Levy A, Katz M, Mazor M. Pregnancy outcome following recurrent spontaneous abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;118:61-5.

298. Germain AM, Romanik MC, Guerra I i sur. Endothelial dysfunction: a link among preeclampsia, recurrent pregnancy loss, and future cardiovascular events? *Hypertension* 2007;49:90-5.
299. Salamonsen LA. Role of proteases in implantation. *Rev Reprod* 1999;4:11-22.
300. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 1993;52:506-16.
301. Soundararajan R, Rao AJ. Trophoblast 'pseudo-tumorigenesis': significance and contributory factors. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:15.
302. Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML i sur. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol* 1991;113:437-49.
303. Xu J, Liu H, Wu Y, Gong X, Zhou Q, Qiao F. Proapoptotic effect of metalloproteinase 9 secreted by trophoblasts on endothelial cells. *J Obstet Gynaecol Res* 2011;37:187-94.
304. Luo J, Qiao F, Yin X. Impact of silencing MMP9 gene on the biological behaviors of trophoblasts. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2011;31:241-5.
305. Luo J, Qiao F, Yin X. Hypoxia induces FGF2 production by vascular endothelial cells and alters MMP9 and TIMP1 expression in extravillous trophoblasts and their invasiveness in a cocultured model. *J Reprod Dev* 2011;57:84-91.
306. International Knockout Mouse Consortium [Internet]. KOMP, EUCOMM, NorCOMM, TIGM. [cited 2013 Oct 2]. Available from: <http://www.knockoutmouse.org/>
307. Strakova Z, Szmidi M, Srisuparp S, Fazleabas AT. Inhibition of matrix metalloproteinases prevents the synthesis of insulin-like growth factor binding protein-1 during decidualization in the baboon. *Endocrinology* 2003;144:5339-46.
308. Yamamoto H, Flannery ML, Kupriyanov S i sur. Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of *Ets2*. *Genes Dev* 1998;12:1315-26.
309. Schorpp M, Mattei MG, Herr I, Gack S, Schaper J, Angel P. Structural organization and chromosomal localization of the mouse collagenase type I gene. *Biochem J* 1995;308:211-7.

310. Solberg H, Rinkenberger J, Danø K, Werb Z, Lund LR. A functional overlap of plasminogen and MMPs regulates vascularization during placental development. *Development* 2003;130:4439-50.
311. Krieg SA, Fan X, Hong Y i sur. Global alteration in gene expression profiles of deciduas from women with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 2012;18:442-50.
312. Othman R, Omar MH, Shan LP, Shafiee MN, Jamal R, Mokhtar NM. Microarray profiling of secretory-phase endometrium from patients with recurrent miscarriage. *Reprod Biol* 2012;12:183-99.
313. Lee J, Oh J, Choi E, Park I i sur. Differentially expressed genes implicated in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:2265-77.
314. Berletch JB, Yang F, Xu J, Carrel L, Disteche CM. Genes that escape from X inactivation. *Hum Genet* 2011;130:237-45.
315. Anderson CL, Brown CJ. Polymorphic X-chromosome inactivation of the human TIMP1 gene. *Am J Hum Genet* 1999;65:699-708.
316. Anderson CL, Brown CJ. Variability of X chromosome inactivation: effect on levels of TIMP1 RNA and role of DNA methylation. *Hum Genet* 2002;110:271-8.
317. Duncan WC, McNeilly AS, Illingworth PJ. The effect of luteal "rescue" on the expression and localization of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the human corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2470-8.
318. Ma C, Chegini N. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors in human myometrial smooth muscle cells by TGF-beta1. *Mol Hum Reprod* 1999;5:950-4.
319. Higuchi T, Kanzaki H, Nakayama H i sur. Induction of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 gene expression during in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 1995;136:4973-81.
320. Nothnick WB. Disruption of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene results in altered reproductive cyclicity and uterine morphology in reproductive-age female mice. *Biol Reprod* 2000;63:905-12.

321. Nothnick WB. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) deficient mice display reduced serum progesterone levels during corpus luteum development. *Endocrinology* 2003;144:5-8.
322. Otsuka M, Zheng M, Hayashi M i sur. Impaired microRNA processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice. *J Clin Invest* 2008;118:1944-54.
323. Dixon ME, Chien EK, Osol G, Callas PW, Bonney EA. Failure of decidual arteriolar remodeling in the CBA/J x DBA/2 murine model of recurrent pregnancy loss is linked to increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2). *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:113-9.
324. Shapira E, Ratzon R, Shoham-Vardi I, Serjienko R, Mazor M, Bashiri A. Primary vs. secondary recurrent pregnancy loss--epidemiological characteristics, etiology, and next pregnancy outcome. *J Perinat Med* 2012;40:389-96.
325. Jivraj S, Anstie B, Cheong YC, Fairlie FM, Laird SM, Li TC. Obstetric and neonatal outcome in women with a history of recurrent miscarriage: a cohort study. *Hum Reprod* 2001;16:102-6.
326. Wramsby ML, Sten-Linder M, Bremme K. Primary habitual abortions are associated with high frequency of factor V Leiden mutation. *Fertil Steril* 2000;74:987-91.
327. Christiansen OB, Pedersen B, Nielsen HS, Nybo Andersen AM. Impact of the sex of first child on the prognosis in secondary recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2004;19:2946-51.
328. Nielsen HS, Steffensen R, Lund M i sur. Frequency and impact of obstetric complications prior and subsequent to unexplained secondary recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2010;25:1543-52.
329. Diejomaoh MF, Al-Azemi MM, Bandar A i sur. A favorable outcome of pregnancies in women with primary and secondary recurrent pregnancy loss associated with antiphospholipid syndrome. *Arch Gynecol Obstet* 2002;266:61-6.
330. Trogstad L, Magnus P, Skjaerven R, Stoltenberg C. Previous abortions and risk of pre-eclampsia. *Int J Epidemiol* 2008;37:1333-40.

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime	Nina Pereza
Datum rođenja	18. kolovoz 1984.
Adresa	D. Šćitara 15, 51000 Rijeka, Hrvatska
Telefon	00385 (0)51 651 234
E-mail	nina.pereza@medri.uniri.hr
Državljanstvo	Hrvatsko
Matični broj iz Upisnika znanstvenika	322474

ZANIMANJE	Doktor medicine
------------------	-----------------

RADNO ISKUSTVO

Datumi (od – do)	Studeni 2009. -
Ustanova zaposlenja	Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, Hrvatska
Naziv radnog mjesta	Znanstveni novak – asistent
Područja rada	Molekularna genetika, nastava iz citologije, molekularne biologije i medicinske genetike

ŠKOLOVANJE

Datumi	Studeni 2009. -
Mjesto	Rijeka, Hrvatska
Ustanova	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Zvanje	Doktorski studij Biomedicina
Datumi	2012.
Mjesto	Rijeka, Hrvatska
Ustanova	University of Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo
Zvanje	Certificate of Proficiency in English (C2 level)
Datumi	2003. – 2009.
Mjesto	Rijeka, Hrvatska
Ustanova	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Zvanje	Doktor medicine
Datum	1999. - 2003.
Mjesto	Rijeka, Hrvatska
Ustanova	Prva sušačka hrvatska gimnazija
Datum	1991. – 1999.
Mjesto	Rijeka, Hrvatska
Ustanova	Osnovna škola “Vladimir Gortan”

USAVRŠAVANJE

Datum	2012.
Mjesto	Ljubljana, Slovenija
Ustanova	Klinični inštitut za medicinsko genetiko, Univerzitetni klinični center Ljubljana
Područje	Reproduktivna i molekularna genetika
Datum	Studen 2011.
Mjesto	Rim, Italija
Ustanova	Istituto di Genetica medica dell'Università Cattolica del Sacro Cuore
Naziv tečaja	4th European Course in Clinical Dysmorphology
Datum	Listopad 2010.
Mjesto	Zagreb, Hrvatska
Ustanova	Hrvatsko Antropološko Društvo i Institut za Antropologiju
Naziv tečaja	37. škola biološke antropologije
Datum	Lipanj 2010.
Mjesto	Zagreb, Hrvatska
Ustanova	Hrvatsko Antropološko Društvo i Institut za Antropologiju
Naziv tečaja	36. škola biološke antropologije
Datum	23.-28. svibanj 2010.
Mjesto	Bologna, Italija
Ustanova	European Genetics Foundation i University of Bologna
Naziv tečaja	23rd Course in Medical Genetics
Datum	Studen 2009.
Mjesto	Rim, Italija
Ustanova	Istituto di Genetica medica dell'Università Cattolica del Sacro Cuore
Naziv tečaja	3rd European Course in Clinical Dysmorphology
Datum	Rujan 2009.
Mjesto	Ljubljana, Slovenija
Ustanova	Klinični inštitut za medicinsko genetiko, Univerzitetni klinični center Ljubljana
Područje	Reproduktivna genetika, osnovne molekularne laboratorijske vještine
Datum	Rujan 2006.
Mjesto	Ljubljana, Slovenija
Ustanova	Klinični inštitut za medicinsko genetiko, Univerzitetni klinični center Ljubljana
Područje	Reproduktivna genetika, osnovne molekularne laboratorijske vještine

**OSOBNJE VJEŠTINE I
KOMPETENCIJE**

Materinji jezik	Hrvatski
Strani jezik	Engleski
Govori, piše, čita	C2 razine (CPE diploma)
Strani jezik	Talijanski
Govori, piše, čita	Vrlo dobro

**SOCIJALNE VJEŠTINE I
KOMPETENCIJE**

Positivan stav prema radnim zadacima; kolegijalnost; kontinuirano učenje; sposobnost oblikovanja ideja u pisanom i usmenom obliku; sposobnost prezentiranja informacija grupi; sposobnost rada u grupi

**ORGANIZACIJSKE
VJEŠTINE I
KOMPETENCIJE**

Organizacija nastave, rada sa studentima i laboratorijskog rada

**TEHNIČKE VJEŠTINE I
KOMPETENCIJE**

Istraživački rad u molekularno-genetičkom laboratoriju
Odlično snalaženje u Microsoft Office™ paketu (Word™, Excel™, PowerPoint™) i internetu

VOZAČKA DOZVOLA

B kategorija

DODATNE INFORMACIJE

PROJEKTI

2009. - znanstveni novak na projektu „Genetičke i biomedicinske značajke populacije otoka Cresa” (MZOŠ RH; br. 062-1962766-0309; voditelj: prof.dr.sc. Miljenko Kapović, dr.med.)

2009. – istraživač u sklopu projekta “Genetski čimbenici u etiologiji učestalih spontanih pobačaja” (MZOŠ RH; br. 062-0000000-3548; voditelj: izv.prof.dr.sc. Saša Ostojić, dr.med.)

UREDNIČKI ODBORI ZNANSTVENIH ČASOPISA

2008. - članica Uredničkog odbora znanstveno-stručnog časopisa *Medicina fluminensis*

2008. - izvršna urednica za internet izdanje znanstveno-stručnog časopisa *Medicina fluminensis*

ZNANSTVENI ČLANCI CITIRANI U CC/SCIE BAZI PODATAKA

1. **Pereza N**, Ostojić S, Kapović M, Buretić-Tomljanović A. Insulin-like growth factor 2 and insulin-like growth factor 2 receptor gene polymorphisms in idiopathic male infertility. *Journal of Reproductive Medicine* 2013;58:132-6.
2. **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. *Fertility and Sterility* 2013;99:1923-9.
3. **Pereza N**, Črnjar K, Buretić-Tomljanović A, Volk M, Kapović M, Peterlin B, Ostojić S. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions are not associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion in a Slovenian population: association study and literature review. *Fertility and Sterility* 2013;99:1663-7.
4. **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. *Reproductive Biomedicine Online* 2012;24:567-75.
5. **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. *Journal of Maternal, Fetal and Neonatal Medicine* 2012;25:429-31.
6. **Pereza N**, Severinski S, Ostojić S, Volk M, Maver A, Dekanić KB, Kapović M, Peterlin B. Third case of 8q23.3-q24.13 deletion in a patient with Langer-Giedion syndrome phenotype without TRPS1 gene deletion. *American Journal of Medical Genetics A* 2012;158A:659-63.
7. Kabalin M, Kolarić B, Marchesi VV, **Pereza N**, Ostojić S, Rukavina T, Kapović M. Body mass index, waist circumference and waist-to-hip ratio: which anthropometric indicator is better predictor for the hypertension development in women population of the island Cres. *Collegium Antropologicum* 2012;36:363-8.
8. **Pereza N**, Barbarić I, Ostojić S, Cace N, Kapović M. Recurrent achalasia in a child with Williams-Beuren syndrome. *Collegium Antropologicum* 2011;35:941-4.
9. Medica I, Ostojic S, **Pereza N**, Kastrin A, Peterlin B. Association between genetic polymorphisms in cytokine genes and recurrent miscarriage—a meta-analysis. *Reproductive Biomedicine Online* 2009;19:406-14.
10. Ostojić S, **Pereza N**, Kapović M. A current genetic and epigenetic view on human aging mechanisms. *Collegium Antropologicum* 2009;33:687-99.
11. 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. *American Journal of Reproductive Immunology* 2008;60:111-7.

ZNANSTVENI ČLANCI CITIRANI U SCOPUS BAZI PODATAKA

1. **Pereza N**, Buretić-Tomljanović A, Ostojić S, Vraneković J, Bićanić N, Kapović M. Izodicentrični X kromosom i složeni mozaicizam 45, X/46, X, idic(X)(q28)/46, XX u bolesnice sa sekundarnom amenorejom, visokim rastom i pretilošću. *Medicina fluminensis* 2011;47:107-14.
2. **Pereza N**, Buretić-Tomljanović A, Vraneković J, Ostojić S, Kapović M. Sindrom prstenastog kromosoma 18. *Medicina fluminensis* 2010;46:208-13.
3. **Pereza N**, Ostojić S, Kapović M, Zergollern-Čupak Lj, Peterlin B. Klinička dismorfologija i razvojne anomalije. *Medicina* 2010;46:5-18.
4. Ostojić S, **Pereza N**, Pedri L. Current view on Ethics and Genetics: The importance of progressive evolution of Medical genetics and Genetic counselling. *Formosan Journal of Medical Humanities* 2009;10:46-72.
5. **Pereza N**, Čače N, Nikolić H. Ekstrofija mokraćnog mjehura – epispadija kompleks s atrijskim septalnim defektom: prikaz rijetkog slučaja i pregled literature. *Medicina* 2009;45:180-6.
6. **Pereza N**, Zergollern-Čupak Lj, Ostojić S. Elektroničke baze podataka humanih genetičkih poremećaja: osnove diferencijalne dijagnostike u kliničkoj genetici. *Medicina* 2009;45:22-37.
7. **Pereza N**, Ostojić S. Funkcionalna nejednakost roditeljskih genoma u etiologiji gestacijskih trofoblastičnih bolesti. *Medicina* 2008;44:22-37.
8. Ostojić S, **Pereza N**. Genetički pogled na teorije starenja. *Medicina* 2006;42:4-14.

KONGRESNA PRIOPĆENJA

1. **Pereza N**, Peterlin B, Kapovic M, Ostojic S. Direct and potential (epi)genetic causes of recurrent spontaneous abortion: advances and controversies. 10th Balkan congress of human genetics and 2nd Alpe Adria meeting of human genetics. Bled, Slovenia 10.-12. October 2013. Usmena prezentacija.
2. **Pereza N**, Volk M, Kapovic M, Peterlin B, Ostojic S. Single nucleotide polymorphisms of tissue inhibitors of metalloproteinases genes in couples with idiopathic recurrent spontaneous abortion. 10th Balkan congress of human genetics and 2nd Alpe Adria meeting of human genetics. Bled, Slovenia 10.-12. October 2013. Poster prezentacija.
3. Ostojić S, **Pereza N**, Kapović M, Peterlin B. Current view on genetics and epigenetics of recurrent spontaneous abortion. Final program and abstracts - The seventh ISABS conference in forensic, anthropologic and medical genetics and Mayo Clinic lectures in translational medicine. Zagreb, 2011;262. Usmena prezentacija.
4. **Pereza N**, Ostojić S, Volk M, Kapović M, Peterlin B. Functional single nucleotide polymorphisms in promoter region of matrix metalloproteinase -1, -2, -3 and -9 as risk factors for recurrent spontaneous abortion. Final program and abstracts - The seventh ISABS conference in forensic, anthropologic and medical genetics and Mayo Clinic lectures in translational medicine. Zagreb, 2011;263. Usmena prezentacija.
5. **Pereza N**, Severinski S, Ostojić S, Volk M, Maver A, Baraba K, Kapović M, Peterlin B. A rare case of 8q23.3-q24.13 microdeletion in a patient with Langer-Giedion syndrome without TRPS1 gene deletion. Final program and abstracts - The seventh ISABS conference in forensic, anthropologic and medical genetics and Mayo Clinic lectures in translational medicine. Zagreb, 2011;297. Poster prezentacija.
6. **Pereza N**, Ostojić S, Volk M, Maver A, Kapović M, Peterlin B. Insulin-like growth factor 2 receptor gene Gly1619Arg polymorphism in couples with idiopathic recurrent spontaneous abortion. 10th Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology. „The Secret Life of Biomolecules“, Opatija, 2010. Poster prezentacija.
7. Blatnik A, Volk M, Ostojić S, **Pereza N**, Kapovic M, Peterlin B. Genetics of recurrent miscarriage. The Second International Scientific Symposium - Molecular genetics research today and it's application possibilities. Tuzla, BiH, 22 October 2010. Usmena prezentacija.

8. **Pereza N**, Ostojić S, Volk M, Kapović M, Peterlin B. Igf2 and H19 gene polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortion. Xth International Congress Of Reproductive Immunology, Opatija, 2007. American Journal of Reproductive Immunology 2007;57:470. Poster prezentacija.
9. Ostojić S, Volk M, Medica I, Meden-Vrtovec H, **Pereza N**, Kapović M, Peterlin B. Polymorphisms in the Interleukin-12 and IL-18 Genes and Recurrent Spontaneous Abortion. Xth International Congress Of Reproductive Immunology, Opatija, 2007. American Journal of Reproductive Immunology 2007;57:475. Poster prezentacija.
10. Peterlin B, Ostojić S, Medica I, Volk M, **Pereza N**, Kapović M. Genetic polymorphisms in RSA susceptibility – a systematic review of immunity-related genes. Xth International Congress Of Reproductive Immunology, Opatija, 2007. American Journal of Reproductive Immunology 2007;57:475. Poster prezentacija.
11. Ostojić S, **Pereza N**, Volk M, Kapović M, Peterlin B. Genetic predisposition to idiopathic recurrent spontaneous abortion: Igf2 and H19 gene polymorphisms. IV. Kongres Humane Genetike, Malinska, otok Krk, 2007. Paediatrica Croatica 2007;51:136-7. Poster prezentacija.

OSTALE PUBLIKACIJE

1. **Pereza N**, Ostojić S. Priča o iksu i ipsilonu. Narodni zdravstveni list. 2011.
2. **Pereza N**, Ostojić S. U zatvorenom svijetu nevidljivih bolesti. Narodni zdravstveni list. 2010.

ORGANIZACIJA KONGRESA

1. Članica Organizacijskog odbora za Peti hrvatski kongres iz humane genetike, Bol, Brač, 2011.

SUVODITELJSTVO TEČAJEVA

1. Članica Organizacijskog odbora domaćeg tečaja prve kategorije: EKG učilica – od početnika do profesionalca; termin održavanja: 29.11.-13.12.2011.; organizatori: HLZ Podružnica Rijeka, KBC Rijeka, Klinika za internu medicinu i Thalassoterapije Opatija
2. Članica Organizacijskog odbora domaćeg tečaja prve kategorije: Test opterećenja u ordinaciji medicine rada i sporta; termin održavanja: svibanj 2012.; organizatori: HLZ Podružnica Rijeka i Thalassoterapija Opatija

SUDJELOVANJE U IZVOĐENJU NASTAVE IZ KOLEGIJA

1. Medicinska biologija – sveučilišni studij Medicina
2. Medicinska genetika – sveučilišni studij Medicina
3. Stanična i molekularna biologija – sveučilišni studij Biotehnologija i istraživanje lijekova
4. Stanična biologija s genetikom – sveučilišni studij Dentalna medicina
5. Biologija – stručni studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika
6. Biologija – izvanredni stručni studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika
7. Klinička genetika - sveučilišni studij Medicina
8. Medicinska citogenetika u praksi - sveučilišni studij Medicina

STIPENDIJE, NAGRADE I PRIZNANJA

2013. Nagrada za najbolju mladu znanstvenicu Medicinskog fakulteta u Rijeci za temeljne medicinske znanosti
2011. Zahvalnica Hrvatskog liječničkog zbora – Podružnica Rijeka
2010. Stipendija Europskog društva za humanu genetiku za 23rd Course in Medical Genetics
2009. Nacionalova Top stipendija za top studente

ČLANSTVA

Hrvatski liječnički zbor, Hrvatsko društvo za rijetke bolesti, Hrvatsko društvo za humanu genetiku

OSTALO

2004.-2009. - Demonstratorica na Katedri za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

2008.-2009. - Članica Znanstvenog Odbora Svih Studenata Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci (ZOSS MedRi)