



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ
ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA**



Lidia BĂRU (BOLDEANU)

**IMPLICAREA POLIMORFISMELOR GENELOR
KDR, iNOS ȘI p53
ÎN AVORTUL RECURENT**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător științific:

Prof. univ. dr. Liliana NOVAC

Craiova

2015

INTRODUCERE

Avortul recurent, considerat pierderea spontană recurentă a sarcinii este definit drept pierderea a trei sau mai multe sarcini consecutive. Studiile epidemiologice au arătat că această patologie a sarcinii afectează aproximativ 1% dintre toate femeile, riscul de a pierde o altă sarcină după trei avorturi consecutive fiind de 55%. Au fost propuse mai multe ipoteze și s-au analizat diverse etiologii pentru avortul recurent dar numeroși autori consideră încă aproximativ 50% din avorturile recurente ca fiind de cauză necunoscută.

Cercetările actuale au avut ca obiectiv principal înțelegerea la nivel molecular a procesului complex al implantării, înainte de a ameliora diagnosticul și tratamentul infertilității. Embrio-implantarea umană este un proces unic și niciun alt mamifer nu poate fi considerat ca un model adevărat.

Deși există progrese importante în ceea ce privește reproducerea umană asistată, absența controlului implantării rămâne un obstacol major în evoluția cu succes a unei sarcini. Deoarece perioadele de preimplantare și implantare sunt la originea diverselor probleme apărute în sarcină, s-a încercat înțelegerea mecanismelor implantării, pentru a facilita descoperirea de noi tratamente aplicabile în momentele cele mai potrivite atât pentru embrion cât și pentru endometru.

Observațiile științifice acumulate pe parcursul ultimelor două decenii au permis cunoașterea fiziologiei preimplantării și a implantării. Procesul de implantare variază de la specie la specie, iar considerațiile etice și dificultățile experimentale nu au permis analizarea directă a acestui proces la specia umană. Cu toate studiile care au fost efectuate, mai sunt necesare date complementare care să clarifice procesele de interacțiune moleculară prin noi tehnologii care să aducă noi informații.

Avortul spontan reprezintă una dintre cele mai complexe probleme ale medicinei moderne și constă în întreruperea spontană a sarcinii în cazul în care embrionul sau fetusul este incapabil de a supraviețui independent, în general înainte de săptămâna 20 de gestație. Avortul spontan este cea mai frecventă complicație a sarcinii, fiind o experiență negativă atât pentru pacient cât și pentru medic.

S-a remarcat că cea mai frecventă complicație a gestației umane este pierderea sarcinii. Majoritatea avorturilor spontane sunt nerecunoscute și pot să apară înaintea sau odată cu menstruația următoare. 15-20% din sarcinile recunoscute pot evolua către avort spontan sau sarcini extrauterine. De asemenea studiile populaționale au arătat că aproximativ 5% din cuplurile care încearcă obținerea unei sarcini, au două avorturi spontane consecutive și aproximativ 1% din cupluri au 3 sau mai multe pierderi consecutive ale sarcinii.

Avortul spontan recurent constituie și o problemă clinică delicată, întrucât cercetările avansate în domeniul imunologiei și geneticii nu au elucidat cauzele producerii lui. Problema importantă care se

pune este de a face cuplul respectiv, care așteaptă răspunsuri și soluții, să înțeleagă că această patologie poate fi frustrantă chiar și pentru medic.

Întrucât fenomenele care se produc la nivelul situsului de implantare pe parcursul evoluției unei sarcini normale sau patologice sunt extrem de complexe, am considerat oportun ca acest studiu să se refere la studiul situsului de implantare. Dacă am putea contribui la dezvoltarea abordărilor și cunoștințelor existente în domeniu, iar prin rezultatele cercetării efectuate am putea să clarificăm o parte a proceselor celulare și moleculare ce contribuie la această patologie a sarcinii, patologie cu implicații majore psiho-sociale asupra cuplurilor, ne-am gândi pe viitor și la un algoritm de investigații tip screening precum și la o terapie adecvată preconcepțională pentru a preveni această complicație a sarcinii.

Cuvinte cheie : Polimorfisme, VEGFR2/KDR, iNOS, p53,

I. STADIUL CUNOAȘTERII

Capitolul I - “Epidemiologia și etiopatogeneza avortului recurent” prezintă date recente referitoare la incidența și prevalența acestei patologii, precum și studiul factorilor etiologici implicați în avortul recurent.

Capitolul II - “Angiogeneza implantării” trece în revistă principalii factori de mediere ai angiogenezei în implantare, precum și rolul factorului de creștere a endoteliului vascular în reglarea vasculogenezei și a angiogenezei. Înțelegerea în profunzime a dezvoltării embrionare în perioada preimplantării și a procesului de implantare va ajuta la identificarea mecanismelor aberante ce conduc la pierderea sarcinii, precum și oferirea de noi strategii de îmbunătățire a infertilității și prevenirea complicațiilor sarcinii.

Partea generală se continuă cu “**Susceptibilitatea genetică în avortul recurent**”, **Capitolul III**, unde sunt prezentate cele mai recente date referitoare la mecanismele moleculare și principalele gene de susceptibilitate studiate în avortului recurent. Mai multe studii sugerează că polimorfisme ale genelor ce codifică diferiți mediatori pot reprezenta un factor de susceptibilitate pentru avorturile spontane recurente inexplicabile.

Capitolul IV - “Consilierea genetică și sfatul genetic în avortul recurent”, încheie partea generală. Consilierea genetică și sfatul genetic, alături de asistența psihologică sunt etape esențiale ce trebuie să fie oferite tuturor cuplurilor care se confruntă cu avort spontan recurent, pentru ca o sarcină să ajungă la termen și să nu aibă ca rezultat o anomalie.

II. CONTRIBUȚII PROPRII

Capitolul V - SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI

Scopul acestui studiu este de a optimiza metodele de prevenire ale avortului spontan și dezvoltarea pe viitor de terapii medicale, de a înțelege, la nivel molecular și genetic, procesul complex al implantării, înainte de a ameliora diagnosticul și tratamentul infertilității.

Obiectivele studiului nostru au pornit de la evaluarea principalelor polimorfisme localizate în gene ce codifică citokine și receptori, în loturile de paciente cu și fără avort recurent și corelarea variantelor genetice depistate cu susceptibilitatea la avortul recurent în zona județului Dolj, o regiune unde aceste variante genetice nu au fost investigate până în prezent.

Îndeplinirea scopului propus în acest proiect de cercetare științifică s-a realizat prin atingerea următoarelor obiective specifice :

- determinarea frecvenței genotipurilor principalelor gene ce codifică citokine ;
- determinarea frecvenței genotipurilor pentru gene care codifică receptori pentru *VEGFR-2* (*KDR*), *iNOS* și *p53* ;
- stabilirea unor posibile asocieri între genele implicate și susceptibilitatea la avortul recurent.
- stabilirea unor posibile asocieri între genele implicate.

Capitolul VI – MATERIAL ȘI METODĂ

VI.1. Stabilirea loturilor și includerea pacienților în studiu

În acest studiu au fost incluse 139 de paciente diagnosticate cu avort recurent pe baza istoricului, examenului clinic, a examenului ultrasonografic sau histologic. Pacientele cuprinse în acest studiu au fost diagnosticate în Clinicile de Obstetrică-Ginecologie ale Spitalului Clinic Municipal Filantropia Craiova, în intervalul octombrie 2009 - decembrie 2014.

Pentru analiza comparată a fost constituit un *lot control* (paciente fără avort recurent în antecedente și care au avut cel puțin o naștere normală, finalizată la termen) format din 145 de paciente internate și investigate pentru avort spontan sau avort la cerere, în Clinicile de Obstetrică-Ginecologie ale aceluiași spital.

Ambele loturi mari au fost stabilite pe baza criteriilor de includere și excludere.

Atât pacientele cu avort recurent cât și pacientele din lotul control au semnat un consimțământ informat de includere în studiu, precum și un chestionar detaliat pentru a obține date demografice importante.

VI.2. Recoltarea probelor și materialul biologic

În ceea ce privește pacientele din lotul cu avort recurent, materialul biologic a fost reprezentat de sânge (aproximativ 2.5 - 5 ml de sânge venos) recoltat pe EDTA și menținut la + 4°C până în momentul izolării ADN-ului și din țesut placentar recoltat în soluție de RNA later și menținut la - 20°C. În cazul pacientelor din lotul control, materialul biologic a fost reprezentat de sânge venos recoltat pe EDTA. Probele au fost codificate cu litere și numere acordate în ordinea recoltării.

VI.3. Identificarea polimorfismelor genetice

Identificarea polimorfismelor genelor VEGFR-2/KDR, iNOS și p53 a fost efectuată în Laboratorul de Biologie Celulară și Moleculară din cadrul Universității de Medicină și Farmacie din Craiova.

Protocolul de identificare a polimorfismelor genetice a inclus următoarele etape : izolarea ADN-ului genomic din sânge și din țesut, evaluarea spectrofotometrică, identificarea variantelor alelice prin tehnica *Real Time PCR* cu *sonde TaqMan*, interpretarea rezultatelor.

VI.4. Analiza biostatistică a loturilor de studiu

Analiza biostatistică a urmărit prelucrarea datelor experimentale prin statistici descriptive, reprezentări grafice, teste de interferență statistică, studii de corelație a parametrilor în avortul spontan și cel indus la cerere, care reprezintă sarcina normală. De asemenea s-a evaluat echilibrul Hardy-Weinberg – testul X^2 , corelarea și stabilirea asocierii între parametrii studiați și rezultatele investigațiilor genetice – odds ratio (OR), intervale de încredere (95% CI) și p.

Capitolul VII – REZULTATE

VII.1. CARACTERISTICILE LOTURILOR STUDIAȚE

Lotul cu avort spontan recurent (ASR) a fost clasificat și luat în studiu, în funcție de antecedentele obstetricale ale pacientei în :

- ◆ ASR primar - 76 cazuri, când pacienta nu a avut nici o naștere în antecedente;
- ◆ ASR secundar - 50 cazuri, la paciente la care a existat o naștere inițială urmată de avorturi spontane;
- ◆ ASR terțiar - 13 cazuri, când pacienta a avut trei avorturi recurente non-consecutive, iar acestea ar trebui să fie considerate ca entități separate, reprezentând probabil mecanisme diferite fiziopatologice care au dus la pierderea sarcinii.

VII.2. ANALIZA BIOSTATISTICĂ A LOTURILOR DE STUDIU

Analiza cazurilor studiate, urmărind anamneza și examenul clinic al pacientelor selectate ne-a permis evidențierea datelor căutate în studiu. Prelucrarea datelor s-a realizat prin analiza statistică realizată prin utilizarea unor indicatori statistici aplicați la cazuistica studiată.

➤ Am introdus ca parametru de urmărire și investigare, o serie de *indici demografici*.

- În funcție de *tipul de ASR* am întâlnit ASR primar în 54.68% din cazuri, ASR secundar la 35.97% din cazuri și ASR terțiar la 9.35% din cazuri, dintr-un total de 139 de cazuri.
- Caracteristica demografică a lotului studiat ne-a arătat o diferență ne semnificativă în *distribuția demografică* a cazurilor studiate, având o proporție de 58.27% a cazurilor în mediul urban și o proporție de 41.73% a cazurilor în mediul rural la cazurile cu ASR.
- Am corelat mediul de rezidență cu tipul de ASR, pentru a vedea dacă există un algoritm de distribuție a tipului de ASR, în funcție de mediul de rezidență. Rezultatul testului a fost $p=0.935$, $p>0.05$, deci nu există o legătură semnificativă statistic între mediul de rezidență și tipul ASR actual.
- Distribuția pacientelor pe grupe de vârstă la momentul luării în studiu, a arătat în ambele loturi faptul că majoritatea pacientelor cu avort recurent au avut vârsta cuprinsă între 25 și 34 de ani (62.59%), iar la lotul control procentul fiind de 59.31% în aceleași grupe de vârstă. Acest interval corespunde de altfel intervalului de vârstă în care femeile prezintă cea mai crescută rată de fertilitate.
- Am încercat să vedem dacă *vârsta maternă* are influență și se corelează cu tipul de ASR. Am constatat că în cazul ASR primar, vârsta medie \pm SDV a fost de 28.66 ani. În cazul ASR secundar vârsta medie \pm SDV a fost de 31.02 ani, iar la ASR terțiar a fost de 31.08 ani, deci aceeași vârstă ca la ASR secundar.
- Referitor la *antecedentele obstetricale*, am luat în considerare la lotul cu ASR numărul de avorturi și numărul de nașteri, tipul lor, complicațiile apărute. Am remarcat că doar un procent de 14.39 din cazurile cu ASR au prezentat antecedente obstetricale, referindu-ne la cazurile cu nașteri în antecedente și complicații legate de acestea.
- Am *corelat statistic tipul de ASR și antecedentele obstetricale* – am obținut o diferență semnificativă între tipurile ASR actual în ceea ce privește ponderea complicațiilor obstetricale din antecedente, $p\text{Chi pătrat} < 0.001$ ceea ce arată un rezultat înalt semnificativ statistic.

- Am căutat să combinăm 2 factori de risc pentru producerea avortului spontan și pentru a vedea care este viitorul obstetrical al acestor cazuri.
- Am corelat vârsta maternă și numărul de avorturi din antecedente → Rezultatul testului ANOVA a fost $p=0.000106 < 0.001$, deci există o diferență înalt semnificativă între cele trei categorii de paciente, cele cu 3 avorturi având vârsta medie semnificativ mai mică decât cele cu 4 avorturi, care, la rândul lor, au vârsta medie semnificativ mai mică decât cele cu 5 avorturi.
- Am analizat posibile corelații între numărului de avorturi în antecedente cu mediul de rezidență, gândindu-ne că în mediul rural probabil că accesul la serviciile specializate se face mai dificil → Rezultatul testului a fost $p=0.099 > 0.05$, prin urmare, în pofida diferențelor procentuale observate (în mediul urban sunt mai multe cazuri cu 3 avorturi decât în rural), nu există o legătură semnificativă statistic între mediul de rezidență și numărul de avorturi spontane din antecedente.
- Am analizat implicarea antecedentelor obstetricale în producerea avortului recurent și am comparat numărul total de avorturi recurente cu nașterile cu feți vii din antecedente la ASR secundare și terțiare → Am constatat că majoritatea cazurilor cu ASR au avut 3 avorturi în antecedente (77.92%), iar 77.08% din aceste cazuri au prezentat 1 sarcină cu făt viu ;
- Am investigat și vârsta gestațională a avortului în momentul producerii care a coincis cu momentul intrării în loturile de studiu → Majoritatea pacientelor din lotul cu ASR au avut actualul avort spontan la o vârstă gestațională cuprinsă între 6-9 săptămâni de gestație (103 cazuri, 74.10%).
- Am constatat că nu există o diferență semnificativă ($p=0.257 > 0.05$) între cele trei tipuri de ASR în ceea ce privește vârsta gestațională la care s-au produs.
- La lotul de studiu cu ASR, am găsit o serie de afecțiuni asociate, în această categorie intrând și avorturile spontane non recurente (mai puțin de 3 avorturi spontane în antecedente).
- Tipul de afecțiune asociată a fost reprezentată de boli hematologice, aici referindu-ne la cazurile cu trombofilie confirmată, patologia uterină reprezentată de tumori și malformații uterine, iar patologia frecvent întâlnită în rândul acestor paciente a fost reprezentată de infecții locale sau generale → ASR terțiar prezintă o asociere mult mai mare cu infecțiile și cu patologia uterină decât ASR primar și secundar (testul Chi pătrat, $p=0.003 < 0.0$).
- Trombofilia a fost diagnosticată la 25.97% dintre cazurile cu ASR primar, care nu au prezentat nașteri în antecedente, la 10.42% din cazurile cu 1 naștere în antecedente și la doar 7.14% din cazurile cu 2 nașteri în antecedente → ASR primar a prezentat o asociere mult mai pronunțată cu trombofilia.

- Analizând acțiunea factorului de risc, trombofilia, asupra producerii avortului spontan recurent, am analizat relația care există între prezența/absența trombofiliei și tipul de avort recurent → luând în considerare că numărul de cazuri cu ASR terțiar este foarte mic și că acele 3 cazuri au prezentat trombofilie în asociere cu patologie urinară sau infecții, există posibilitatea ca trombofilia să fie asociată în măsură semnificativ mai mare cu ASR primar decât cu ASR secundar sau terțiar.
- Având în vedere implicarea statistică a trombofiliei la cazurile studiate, am analizat implicarea a doi factori la cazurile luate în studiu, *vârsta maternă și prezența trombofiliei* → există o diferență înalt semnificativă între vârstele pacientelor cu, respectiv fără trombofilie, cele cu trombofilie având vârsta medie mai mare decât celelalte (32.35 ani față de 29.13 ani, $p=0.004 < 0.01$) → Am emis supoziția că prezența a 2 factori: *vârsta și trombofilia, pot prezenta factori de risc pentru producerea avortului spontan recurent.*

VII.3. FRECVENȚA POLIMORFISMELOR GENELOR *KDR*, *iNOS* ȘI *p53* ÎN POPULAȚIA STUDIATĂ

- Am investigat polimorfismele *VEGFR-2/KDR 604T → C (rs 2071559)*, *iNOS 2087A → G (rs 2297518)* și *p53 360 C → G (rs 35993958)*, în cele doua grupuri (grupul pacientelor la care am recoltat ca produs patologic țesut placentar și respectiv pacientele la care am recoltat sânge venos) ;
- În ceea ce privește polimorfismele investigate în lotul martor, nu au existat devieri de la echilibrul Hardy-Weinberg corespunzător ($p > 0.05$, $\chi^2 > 3,84$) ;
- Am determinat frecvența genotipurilor acestor gene și am stabilit existența unor posibile asocieri între genele implicate și susceptibilitatea la avortul recurent ;
- Din analiza comparativă a genotipurilor (consultând bazele de date internaționale am luat ca referință genotipul - TT) și a datelor statistice obținute, s-a constatat că *polimorfismul VEGFR2 (KDR) -604T → C nu este asociat cu un risc crescut de avort spontan recurent ;*
- De asemenea analiza comparativă a genotipurilor (consultând bazele de date internaționale a fost luat ca referință genotipul - GG) și a datelor statistice obținute, a evidențiat că *polimorfismul iNOS 2087A → G nu este asociat cu un risc crescut de avort spontan recurent ;*
- Și pentru polimorfismul, *p53 -360 T → C (rs35993958)* nu am observat *asocierea cu un risc crescut de avort spontan recurent.*

CONCLUZII

- ❖ Studiul de față, constituit ca un studiu de avangardă în încercarea de a elucida cauzele avortului recurent, realizează o analiză complexă din punct de vedere epidemiologic, fenotipic și genotipic a pacientelor diagnosticate cu avort recurent în zona județului Dolj, o regiune unde o astfel de analiză nu s-a mai realizat până în prezent.
- ❖ Originalitatea studiului constă în determinarea profilului fenotipic al pacientelor, asocierea anumitor caracteristici fenotipice cu diferiți factori etiologici implicați în avortul recurent, prin evaluarea principalelor polimorfisme localizate în gene ce codifică citokine și receptori, în loturile de paciente cu și fără avort recurent și corelarea variantelor genetice depistate cu susceptibilitatea la avortul recurent.
- ❖ Am constatat diferențe ne semnificative în ceea ce privește distribuția demografică a cazurilor în funcție de mediul de rezidență, vârsta cuprinsă între 25 și 34 de ani (62.59%), vârste semnificativ mai scăzute la pacientele cu ASR primar decât cele cu ASR secundar sau terțiar, vârsta medie gestațională la care s-a produs avortul a fost aproximativ aceeași, cu diferențe minime, între 8 săptămâni și 8.53 săptămâni.
- ❖ De asemenea am evidențiat anumite corelații între vârsta mamei și numărul de avorturi din antecedente, între numărul de avorturi din antecedente și mediul de rezidență, corelarea antecedentelor obstetricale sarcini cu feți vii și numărul de avorturi spontan recurente, prezența afecțiunilor asociate și corelarea acestora cu tipul de avort spontan recurent și cu numărul de sarcini anterioare cu feți vii, ASR terțiar a prezentat o asociere mult mai mare cu infecțiile și cu patologia uterină decât ASR primar și secundar, ASR primar a prezentat o asociere mult mai pronunțată cu trombofilia.
- ❖ Polimorfismele genelor *VEGFR2 (KDR) -604T→C (rs 2071559)*, *iNOS 2087A→G (rs 2297518)* și *p53 -360C→G (rs35993958)* nu influențează pierderea sarcinii recurente într-o populație românească, județul Dolj.
- ❖ Sunt necesare studii suplimentare pentru a reproduce constatarea noastră în diferite grupuri etnice cu o dimensiune mai mare a eșantionului.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Abulata NN, AbdalWahab DF, Osman OM. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in a cohort of Egyptian women with recurrent spontaneous miscarriage. *Comparative Clinical Pathology*, 2015; 24(3):629-634.
2. Aggarwal S, Parveen F, Faridi RM, Phadke S, Borkar M, Agrawal S. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in North Indian patients with recurrent miscarriages. *Reprod BioMed Online*, 2011; 22:59–64.
3. Coulam CB, Jeyendran RS. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*, 2008; 59(4): 301–305.
4. Christiansen OB, Steffensen R, Nielsen HS, Varming K. Multifactorial etiology of recurrent miscarriage and its scientific and clinical implications. *Gynecol Obstet Invest*, 2008; 66(4):257–267.
5. Eller AG, Branch DW, Nelson L, Porter TF, Silver RM. Vascular endothelial growth factor-A gene polymorphisms in women with recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol*, 2011; 88(1):48–52.
6. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18(1):4–25.
7. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 2004; 25(4):581–611.
8. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol*, 2009; 2(2):76-83.
9. Galazios G, Papazoglou D, Tsikouras P, Kolios G. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2009; 22(5):371–378.
10. Goddijn M, Leschot NJ. Genetic aspects of miscarriage. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2000; 14(5):855-65.
11. Kaare M, Butzow R, Ulander VM, Kaaja R, Aittomaki K, Painter JN. Study of p53 gene mutations and placental expression in recurrent miscarriage cases. *Reprod Biomed Online*, 2009; 18(3):430–435.
12. Kristiina Rull, Liina Nagirnaja and Maris Laan. Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions. *Front Genet*, 2012; 3: 1-13.
13. Lee HH, Hong SH, Shin SJ, Ko JJ, Oh D, Kim NK. Association study of vascular endothelial growth factor polymorphisms with the risk of recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril*, 2010; 93(4):1244–1247.
14. Lidia Boldeanu, Ioana Streață, MV Boldeanu, Cristina Mălin, Liliana Novac. Influence of angiogenesis- and apoptosis-related genes polymorphisms in recurrent miscarriages, *Current Health Sciences Journal*, 2014; Volume 40, Supplement 7: 5-8.
15. Lidia Boldeanu, Lorena Dijmarescu, Maria-Magdalena Manolea, MV Boldeanu, F Burada, Ioana Streață, M Cucu, Daniela Maria Cîrju, Liliana Novac. Association of KDR gene polymorphism with recurrent pregnancy loss in a romanian population, *Current Health Sciences Journal*, 2014; Volume 40, Supplement 11: 5-8.

16. McNamee K, Dawood F, Farquharson R. Recurrent miscarriage and thrombophilia: An update. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2012;24(4):229-34.
17. Papazoglou D, Galazios G, Papatheodorou K, Liberis V, Papanas N, Maltezos E, Maroulis GB. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*, 2005; 83(4):959–963.
18. Pietrowski D, Bettendorf H, Riener EK, Keck C, Hefler LA, Huber JC, Tempfer C. Recurrent pregnancy failure is associated with a polymorphism in the p53 tumour suppressor gene. *Hum Reprod*, 2005; 20(4):848–851.
19. Rah H, Jeon YJ, Lee BE, Choi DH, Yoon TK, Lee WS, Kim NK. Association of kinase insert domain-containing receptor (KDR) gene polymorphisms with idiopathic recurrent spontaneous abortion in Korean women. *Fertil Steril*, 2013; 99(3):753-760.
20. Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet*, 2006; 368(9535): 601-611.
21. Samli H, Demir BÇ, Özgöz A, Atalay MA, Uncu G. Vascular endothelial growth factor gene 1154 G/A, 2578 C/A, 460 C/T, 936 C/T polymorphisms and association with recurrent pregnancy losses. *Genet Mol Res*, 2012; 11(4):4739-45.
22. Shin SJ, Lee HH, Cha SH, Kim JH, Shim SH, Choi DH, Kim NK. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) and haplotypes in Korean patients with recurrent spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;152(1):64-7.
23. Su MT, Lin SH, Lee IW, Chen YC, Kuo PL. Association of polymorphisms/haplotypes of the genes encoding vascular endothelial growth factor and its KDR receptor with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod*, 2011; 26(4):758–764.
24. Tang W, Zhou X, Chan Y, Wu X, Luo Y. p53 codon 72 polymorphism and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2011 Sep;28(10):965-9.
25. Traina E, Daher S, Moron AF, Sun SY, Franchim CS, Mattar R. Polymorphisms in VEGF, progesterone receptor and IL-1 receptor genes in women with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol*, 2011; 88(1):53–57.
26. Xing XY, Yan JH, Zhao YR, You L, Bian Y, Chen ZJ. Association of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms with recurrent spontaneous abortion in Chinese Han women. *Am J Reprod Immunol*, 2011; 65(5):521–525.
27. You X, Tan H, Hu S, Wu J, Jiang H, Peng A, Dai Y, Wang L, Guo S, Qian X. Effects of preconception counseling on maternal health care of migrant women in China: a community-based, cross-sectional survey. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2015; 15:55.