

Universita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Plzni
Gynekologicko-porodnická klinika

**Význam trombofilních a imunologických faktorů
v lidské reprodukci**

Doktorská disertační práce

Vědní obor: Gynekologie a porodnictví

MUDr. Ivan Šubrt

Školitel: Prof. MUDr. Zdenka Ulčová-Gallová, DrSc.

Plzeň 2013



Souhrn

Cílem studie bylo stanovit frekvence osmi antifosfolipidových protilátek (aPL) a vybraných genetických trombofilních faktorů a jejich vzájemný vztah u pacientek s opakovanými těhotenskými ztrátami (recurrent pregnancy loss, RPL) a u kontrolního souboru zdravých žen.

K detekci protilátek proti fosfatidyl-L-serinu, fosfatidylethanolaminu, fosfatidylinositolu, fosfatidyl-DL-glycerolu, kyselině fosfatidové, annexinu V, kardiolipinu a beta2-GPI jsme využili metodu ELISA. Trombofilní mutace faktor V Leiden (F5 G1691A), F II G20210A a varianty MTHFR C677T a MTHFR A1298C jsme stanovili metodou analýzy křivky tání PCR produktu na podkladě rezonančního přenosu fluorescenční energie (FRET). K detekci variant PAI1 (-675)4G/5G, PROZ intron F G79A, PROZ A(-13)G a PROZ R255H byla zvolena standardní metoda PCR-RFLP. Ze získaných dat jsme vykalkulovali distribuce genotypů a alelické frekvence jednotlivých variant. Shodu sledovaného souboru a kontrol a vztah mezi přítomností aPL a potenciálních trombofilních faktorů jsme testovali chí-kvadrát testem a Fisherovým exaktním testem.

Výsledky studie ukazují signifikantně zvýšenou frekvenci aPL proti fosfatidylinositolu ve sledovaném souboru (17 – 19,6 % v závislosti na počtu RPL) a fosfatidyl-L-serinu (18 – 25 %). Převažovaly protilátky ve třídě IgG. V 96 % byl přítomen alespoň jeden rizikový faktor (aPL pozitivita nebo trombofilní faktor). aPL a trombofilní faktory byly současně přítomny u 43 % žen ve sledovaném souboru. Ve skupině žen se 3 a více RPL jsme pozorovali statisticky významnou korelaci mezi aPL pozitivitou a trombofilním stavem. V další části studie jsme prokázali statisticky vysoce významnou korelaci mezi RPL a PAI1 (-675)4G/4G genotypem. Korelace mezi PAI1 (-675)4G alelou a přítomností aPL u pacientek s RPL nebyla pozorována. Také asociaci mezi sledovanými variantami genu PROZ a RPL nebo mezi mutací PROZ R255H a přítomností aPL se nám nepodařilo prokázat.

Antifosfolipidové protilátky a genetické trombofilní faktory jsou předmětem výzkumu pro svoji potenciální roli důležitého rizikového faktoru v patogenezi RPL. Další studie přítomnosti autoprottilátek proti různým fosfolipidům a genetických trombofilních faktorů mohou vést k odhalení nových biomarkerů, využitelných v managementu RPL.

Summary

The aim of presented study was to compare frequencies of eight antiphospholipid antibodies (aPL) in serum and assorted genetic thrombophilic factors and their mutual relation in patients with recurrent pregnancy loss (RPL) and controls.

Enzyme-linked immunosorbent assay was used for detection of aPL against phosphatidyl-L-serine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidyl-DL-glycerol, phosphatidic acid, annexin V, cardiolipin, and beta2-GPI. Thrombophilic mutations factor V Leiden (F5 G1691A), F II G20210A, and MTHFR C677T and A1298C variants were determined using a melting curve analysis of the PCR amplification product detected by the fluorescence resonance energy transfer (FRET). PAI1 (-675)4G/5G, PROZ intron F G79A, PROZ A(-13)G and PROZ R255H variants were determined using standard PCR-RFLP method. Genotypes distribution and allelic frequencies were calculated. Correlation between aPL and thrombophilic factors was tested by chi-square and Fisher exact test.

Our results showed significantly increased prevalence of aPL against phosphatidylinositol (17 - 19.6 % dependent on number of spontaneous miscarriages) and against phosphatidyl-L-serine (18-25 %). aPL in IgG prevailed. In 96 % of studied group we found at least one risk factor (either aPL positivity or thrombophilic factor). Both aPL and thrombophilic factors were present in 43 % of women with RPL. In the group of women with 3 or more RPLs, strong positive correlation of aPL positivity and thrombophilic status was observed. Statistically highly significant correlation between RPL and PAI1 (-675)4G/4G genotype was found. We observed no relation between PAI1 (-675)4G/5G polymorphism and the presence of antiphospholipid antibodies in RPL patients. Finally, no statistically significant association between either RPL and PROZ gene variants or PROZ R255H mutation and aPL were proven.

Antiphospholipid antibodies and genetic thrombophilic factors are subjected to research as possible important risk factors in the pathogenesis of RPL. More studies for the presence of autoantibodies against various kinds of phospholipids and genetic thrombophilic factors are recommended in order to establish new biomarkers usable for appropriate management in RPL cases.

Předmluva

Čestné prohlášení

Předkládaná práce byla vypracována samostatně, všechny použité prameny a literatura byly řádně citovány a práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Výzkumná data, jejich interpretace a komentáře uvedené v této práci byly získány vlastní klinickou a výzkumnou činností a studiem uvedených literárních zdrojů. Při této činnosti autor respektoval etické zásady vědecké práce a práva pacientů.

Užité online zdroje byly držiteli autorských práv uvolněny do veřejné domény (National Center for Biotechnology Information, U. S. National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA), respektive uvolněny pro vědecké využití (Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA) a v této práci byly využity podle zásad „Fair Use“ v souladu s Title 17 U.S. Code (Copyright Law of the United States).

Poděkování

Autor si dovoluje na tomto místě poděkovat všem svým kolegyním a kolegům, bez jejichž pomoci by tato práce nemohla vzniknout. Je jich příliš mnoho, než aby bylo možné jmenovat všechny.

Jedno jméno však nelze neuvést - zvláštní dík patří prof. MUDr. Zdence Ulčové-Gallové, DrSc. za inspiraci, odborné vedení i nezbytnou motivaci nejen v době postgraduálního studia.

A konečně dík patří i autorově rodině – za trpělivost.

Grantová podpora

Práce byla podpořena granty VZ MSM 002 162 0812 „Chronické onemocnění vznikající na podkladě nepřiměřené reaktivity imunitního systému“ a IGA MZ ČR NR/8917-3 „Potrácení - příčina u matky imunologická, genetická a hemokoagulační“.

Seznam používaných symbolů a zkratek

°C	stupeň Celsia
a	aktivovaný
aCGH	srovnávací genomová hybridizace na nosiči (array Comparative Genomic Hybridisation)
APC	aktivovaný protein C
aPL	antifosfolipidové protilátky
APS	antifosfolipidový syndrom
ASRM	American Society for Reproductive Medicine
AT III	antitrombin III
beta2-GPI	beta-2-glykoprotein I
BMI	body mass index
bp	páry bází (base pairs)
CNV	varianta počtu kopií úseku DNA (copy-number variation)
CNS	centrální nervový systém
cca	přibližně (circa)
dbSNP	Database of Single Nucleotide Polymorphisms NCBI
DES	diethylstilbestrol
dF/dt	změna fluorescence závislá na změně teploty
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	kyselina deoxyribonukleová
dNTP	deoxynukleosidtrifosfát
EDTA	kyselina ethylen-diamino-tetraoctová
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESC	stromální buňky endometria (endometrial stromal cells)
F II	koagulační faktor II
F V	koagulační faktor V
F2	gen pro koagulační faktor II
F5	gen pro koagulační faktor V
F7	gen pro koagulační faktor VII
F8	gen pro koagulační faktor VIII
F9	gen pro koagulační faktor IX

F10	gen pro koagulační faktor X
F13A1	gen pro koagulační faktor XIII
FRET	rezonanční přenos fluorescenční energie (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
GRCh37	sestavení lidského genomu verze 37 (Genome Reference Consortium Human Build 37)
hCG	lidský choriový gonadotropin
HELLP	hemolysis-elevated liver enzymes-low platelet count syndrome
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HGVS	Human Genome Variation Society
HLA	histokompatibilní leukocytární antigen
IFN	interferon
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IL	interleukin
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kb	kilobáze
kD	kilodalton
LA	lupus antikoagulans
LDA	low-dose aspirin
LH	luteinizační hormon
LMWH	low molecular-weight heparin
M	mutovaná alela
MgCl ₂	chlorid hořečnatý
MIM	Mendelian Inheritance in Man
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
MTHFR	methyilentetrahydrofolát reduktáza
n	počet (number)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next Generation Sequencing
NTC	kontrolní reakce bez vzorku DNA (no template control)
OD	jednotka změny optické denzity

OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OR	poměr šancí (odds ratio)
p	hladina významnosti
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu 1
PCOS	syndrom polycystických ovarií
PCR	polymerázová řetězová reakce
PLAT	gen pro aktivátor plazminogenu, tkáňový typ
PLAU	gen pro aktivátor plazminogenu, urokinázový typ
PROC	gen pro protein C
PROS	gen pro protein S
PROZ	gen pro protein Z
PZ	protein Z
RefSeq	Reference Sequence NCBI
RFLP	Restriction Fragments Length Polymorphism
RNA	kyselina ribonukleová
RPL	opakovaná těhotenská ztráta (recurrent pregnancy loss)
SD	směrodatná odchylka (standard deviation)
SERPINA10	gen pro inhibitor protein Z-dependentní proteázy (dříve ZPI)
SERPINE1	gen pro inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 (dříve PAI1, PLANH1)
SLE	systemový lupus erythematoses
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris-buffered saline
TGFB	gen pro transforming growth factor β
TNFA	gen pro tumor necrosis factor α
U	jednotka DNA polymerázy (unit)
TF	trombofilní faktor
TS	trombofilní stav
UV	ultrafialový
W	nemutovaná alela (wild-type)
WHO	World Health Organization
ZPI	gen pro inhibitor protein Z-dependentní proteázy

Mezinárodní kódy nukleotidů a aminokyselin dle IUPAC viz příloha 9.1

Obsah

1	Úvod	10
2	Cíl práce.....	11
3	Současný stav poznání.....	12
3.1	Sterilita (neplodnost) a infertilita.....	12
3.1.1	Těhotenské ztráty	13
3.1.2	Izolovaný spontánní potrat.....	14
3.2	Habituální potrácení a opakované těhotenské ztráty	14
3.2.1	Chromosomální příčiny RPL	16
3.2.2	Anatomické příčiny RPL	17
3.2.3	Endokrinnologické příčiny RPL	17
3.2.4	Imunologické a imunogenetické příčiny RPL	18
3.2.5	Porucha výběru embrya jako příčina RPL	19
3.2.6	Infekční příčiny RPL.....	20
3.2.7	Faktory životního stylu jako příčina RPL	20
3.2.8	Idiopatické RPL	21
3.3	Antifosfolipidový syndrom.....	21
3.4	Dědičné trombofilie jako příčina RPL.....	23
3.4.1	Leidenská mutace genu pro koagulační faktor V	25
3.4.2	Mutace G20210A genu pro koagulační faktor II.....	28
3.4.3	Mutace C677T a A1298C genu pro methylenetetrahydrofolát reduktázu	30
3.4.4	Mutace (-675)4G/5G genu pro inhibitor aktivátoru plazminogenu 1	33
3.4.5	Mutace intron F G79A, A(-13)G a R255H genu pro protein Z. 35	
3.5	Genetické příčiny RPL - budoucí směry	38
4	Vlastní řešení a výsledky.....	41
4.1	Studovaný soubor a metody	41
4.1.1	Soubor	41
4.1.2	Imunologické analýzy	41
4.1.3	Genetické analýzy	43
4.1.4	Statistická analýza.....	51
4.2	Výsledky	51

4.2.1	Antifosfolipidové protilátky a trombofilní mutace	51
4.2.2	Antifosfolipidové protilátky a PAI1 (-675)4G	55
4.2.3	Mutace v genu PROZ.....	56
5	Diskuze	57
5.1	aPL, klasické trombofilní mutace a RPL.....	57
5.2	Polymorfismus PAI1 (-675)4G/5G a RPL	60
5.3	Mutace PROZ a RPL	61
5.4	Přínosy a omezení práce, budoucí směry výzkumu	62
6	Závěry.....	64
7	Literatura	66
8	Publikační činnost autora	76
8.1	Publikace související s tématem práce	76
8.2	Přednášková činnost související s tématem práce	76
8.3	Jiné publikace	77
8.4	Jiná přednášková činnost	78
9	Přílohy	80
9.1	Mezinárodní kódy nukleotidů a aminokyselin podle IUPAC	80
9.2	Graf distribuce sledovaných aPL v souboru 206 žen s 2 – 8 RPL	81
9.3	Publikované práce.....	81

1 Úvod

Poruchy lidské reprodukce patří k významným medicínským problémům. Pro svůj význam jsou i předmětem zvláštního programu výzkumu lidské reprodukce (The Special Programme of Research in Human Reproduction) Světové zdravotnické organizace, který mimo jiné oblasti zahrnuje i výzkum sexuálního a reprodukčního zdraví žen, mužů a mladistvých a výzkum neplodnosti a opakovaných těhotenských ztrát.

Opakované těhotenské ztráty jsou komplexním dějem, který je výsledkem interakce mnoha etiologických faktorů vnitřních a vnějších, dědičných i získaných. Kromě prokázaných příčin opakovaných těhotenských ztrát, jako jsou chromosomální aberace, anatomické anomálie vnitřního genitálu, endokrinologická onemocnění a klasická forma antifosfolipidového syndromu, patří k intenzivně zkoumaným oblastem i problematika dalších pravděpodobných a možných příčin opakovaných těhotenských ztrát (hematologických příčin, infekčních příčin, alloimunitních i autoimunitních a imunogenetických faktorů, poruch výběru embrya i faktorů životního stylu). Mezi těmito zvažovanými příčinami hrají významnou roli pozitivita antifosfolipidových protilátek (porodnický antifosfolipidový syndrom) a přítomnost geneticky podmíněných trombofilních faktorů.

Dosud publikované studie, zabývající se rolí antifosfolipidových protilátek a genetických trombofilii u pacientek s opakovanými těhotenskými ztrátami, zkoumaly každý z uvedených rizikových faktorů odděleně. Na rozdíl od nich se předkládaná práce kromě studia prevalence antifosfolipidových protilátek a některých geneticky podmíněných trombofilních faktorů zabývá i otázkou jejich vzájemného vztahu.

Poznání etiologie opakovaných těhotenských ztrát může v konečném důsledku vést k nalezení nových efektivních biomarkerů, a tím umožnit zavádění účinných postupů k léčbě tohoto frekventního onemocnění, vysoce stresujícího těhotné, jejich partnery i ošetřující lékaře. Přispět k tomu svými závěry si klade za cíl i předkládaná práce.

2 Cíl práce

Předkládaná práce byla v souladu s dlouhodobým výzkumným zaměřením zúčastněných pracovišť navržena jako retrospektivní studie případů a kontrol (case-control study) a zaměřena na stanovení vybraných imunologických a genetických trombofilních faktorů u žen s diagnózou opakovaných idiopatických těhotenských ztrát v péči ambulance reprodukční imunologie Gynekologicko-porodnické kliniky nebo ambulance Ústavu lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň.

Studie byla rozčleněna do tří částí.

V první části byly v rámci imunologické analýzy stanoveny hladiny osmi antifosfolipidových protilátek. Genetická analýza v první části zahrnovala stanovení klasických mutací genů pro proteiny hemokoagulačního systému - mutace G1691A v genu pro koagulační faktor V (faktor V Leiden), mutace v genu pro faktor II (protrombin) G20210A a doplněna byla stanovením dvou potenciálně trombogenních variant v genu pro methylenetetrahydrofolát reduktázu MTHFR C677T a MTHFR A1298C.

Ve druhé části genetická analýza zahrnovala stanovení dalšího z protrombotických faktorů působícího v oblasti fibrinolytického systému - inzerčního/delečního polymorfismu 4G/5G v genu pro inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 (PAI1 (-675)4G/5G).

Ve třetí části byla studie doplněna stanovením dosud málo studovaných variant v genu pro protein Z - PROZ intron F G79A, PROZ A(-13)G a PROZ R255H.

Jako cíle práce bylo stanoveno:

1. porovnání výskytu antifosfolipidových protilátek a sledovaných trombofilních mutací u sledovaného souboru a zdravých kontrol
2. zhodnocení korelace současného výskytu antifosfolipidových protilátek a trombofilních mutací u sledovaného souboru
3. publikace výsledků v impaktovaném periodiku

3 Současný stav poznání

3.1 Sterilita (neplodnost) a infertilita

Poruchy lidské reprodukce patří v současné době k významným medicínským problémům. Vzhledem ke svému významu se staly předmětem zvláštního programu výzkumu lidské reprodukce (The Special Programme of Research in Human Reproduction) Světové zdravotnické organizace, zahájeného již v roce 1972. V současné době program zahrnuje výzkum v následujících oblastech: sexuální a reprodukční zdraví žen, mužů a mladistvých; zdraví matky a novorozence; infekce reprodukčního ústrojí a sexuálně přenosné infekce (včetně HIV/AIDS); plánování rodičovství; neplodnost; kriminální potraty; sexuální zdraví; screening karcinomu děložního hrdla v rozvojových zemích a problematiku genderových a reprodukčních práv. Další aktivity programu směřují k rozvoji mezinárodní spolupráce na podpoře lidské reprodukce včetně prvního Globálního strategického plánu reprodukčního zdraví WHO a akčního programu „Reprodukční zdraví pro všechny do roku 2015“ Mezinárodní konference o populaci a rozvoji Populačního fondu OSN [Benagiano, 2012].

Terminologie užívaná v anglickojazyčné a české odborné literatuře se odlišuje. V České republice se pro stav, kdy se páru nedaří spontánně otěhotnět do jednoho roku pravidelných nechráněných styků, používá termín sterilita (neplodnost). Termín infertilita je používán pro stav, kdy je pár schopen spontánní koncepce, ale žena není opakovaně schopna donosit živý plod. V anglosaské literatuře je oproti tomu termín infertility používán pro onemocnění, které postihuje reprodukční systém a zabraňuje úspěšnému otěhotnění (a v podstatě tedy odpovídá výše uvedenému termínu sterilita). Pro stav, kdy žena není opakovaně schopna donosit živý plod, jsou využívány termíny opakované těhotenské ztráty (recurrent pregnancy loss, RPL), případně opakované fetální ztráty (recurrent fetal loss).

Světová zdravotnická organizace definuje neplodnost jako „onemocnění reprodukčního systému definované neschopností dosáhnout klinické gravidity po 12 nebo více měsících pravidelných nechráněných pohlavních styků“ [Zegers, 2009].

American Society for Reproductive Medicine v roce 2013 stanovila následující definice:

Neplodnost je onemocnění, definované neschopností úspěšného otěhotnění po 12 nebo více měsících vhodně časovaných, nechráněných pohlavních styků nebo po

terapeutické inseminaci semenem dárce. Časnější zhodnocení stavu a léčba mohou být oprávněné na základě anamnestických údajů a klinického vyšetření, u žen nad 35 let věku je vhodné k nim přistoupit již po 6 měsících.

Opakované těhotenské ztráty jsou onemocnění odlišné od neplodnosti a definované dvěma a více neúspěšnými graviditami. Pečlivé přezkoumání a zhodnocení potřeby specifické péče však vyžaduje každá těhotenská ztráta, u které není známa její příčina.

Pro účely hodnocení a léčby neplodnosti nebo opakovaných těhotenských ztrát je těhotenství definováno jako klinické těhotenství dokumentované ultrazvukovým nálezem nebo výsledkem histopatologického vyšetření [ASRM, 2013].

3.1.1 Těhotenské ztráty

Ztráta těhotenství je pro pacientku i lékaře vysoce stresující událost, která může nastat v časném i pozdním období. Časná těhotenská ztráta je definována jako ztráta těhotenství do 20. týdne gravidity nebo o hmotnosti plodu menší než 500 g. Těhotenská ztráta, která nastala po průkazu zvýšené hladiny lidského choriového gonadotropinu, ale nebylo možné ji ověřit ultrasonografickým vyšetřením nebo histopatologickým nálezem, je označována jako ztráta biochemické gravidity. Klinická ztráta gravidity (spontánní potrat) vyžaduje ultrasonografické či histopatologické ověření existence gravidity a dělí se na časný spontánní potrat (před 12. t. gravidity) a pozdní spontánní potrat (12 – 20. t. gravidity). Většina autorů se shoduje v tom, že ektopické a molární gravidity nejsou mezi časně těhotenské ztráty zahrnovány. Od 20. t. gravidity je užíván termín fetální ztráta [Farquharson, 2005].

Vzhledem k tomu, že lidská reprodukce je vysoce neefektivní proces, je časná těhotenská ztráta nejčastější poruchou lidské gravidity, která postihuje až 75 % těhotných. Skutečná frekvence časných těhotenských ztrát dosahuje asi 50 %. Více než 30 % fertilizovaných oocytů je však ztraceno do doby implantace a většina těchto ztrát není rozpoznána a žena je vnímá jako opožděnou, někdy silnější menstruaci. Z rozpoznaných gravidit potom asi 15 % končí spontánním potratem nebo ektopickou graviditou [Wilcox, 1988].

3.1.2 Izolovaný spontánní potrat

Etiologie spontánního potratu je multifaktoriální, příčinami jsou faktory maternální, fetální i paternální (andrologické).

Nejčastější příčinou spontánního potratu jsou vrozené chromosomální aberace, které způsobují asi 50 – 70 % všech spontánních potratů. Jedná se zejména o chromosomální aneuploidie [Jacobs, 1987; Hodes-Wertz, 2012]. Vyskytují se převážně u starších těhotných, protože s věkem roste pravděpodobnost *de novo* chromosomálních aberací, a to nejen numerických, ale i strukturních. Karyotypizace produktů koncepce představuje důležitý prognostický faktor, protože průkaz *de novo* chromosomální aberace jako příčiny ztráty gravidity znamená pravděpodobnost úspěchu v dalším těhotenství vyšší než 75 % [Hogge, 2003].

Z dalších maternálních příčin spontánních abortů lze jmenovat anatomické změny reprodukčních orgánů (dělohy a děložního hrdla), endokrinologické poruchy (např. insuficience žlutého tělíska), onemocnění imunitního systému, chronická či těžká akutní infekční onemocnění, onkologická onemocnění, mechanická traumata, intoxikace, psychické faktory a další [Allison, 2009].

3.2 Habituální potracení a opakované těhotenské ztráty

Striktní definice habituálního potracení předpokládá tři následné těhotenské ztráty stejného partnerského páru s 80% rizikem dalšího spontánního potratu [Stephenson, 1996]. Dnes víme, že riziko spontánního abortu se sice zvyšuje s počtem těhotenských ztrát, ale nárůst se postupně zpomaluje a zřídka převýší 40 – 50 %. U dosud nerodivších žen je riziko neúspěšné gravidity po jedné ztrátě přibližně 15 %, po dvou následujících ztrátách již asi 30 % a po třech ztrátách roste již pouze nevýznamně na asi 33 %. Také žena, která porodila živé dítě, má riziko spontánního potratu v budoucích těhotenstvích asi 30 % i v případě, že dříve prodělala několik spontánních abortů. Podle současných poznatků je proto doporučeno zvážit diagnostiku a intervenci již u pacientek se dvěma následujícími těhotenskými ztrátami, zejména pokud žena dosud nikdy neprodila živé dítě nebo je starší 35 let [Ford, 2009]. Tento přístup se odráží také v redefinici pojmu opakovaných těhotenských ztrát, jak bylo uvedeno výše [ASRM, 2013].

Klinicky rozpoznatelné opakované těhotenské ztráty postihují asi 1 – 2 % žen, po přičtení biochemických ztrát však jejich frekvence stoupá až na 2 – 3 %. Jejich frekvence je tedy vyšší než náhodná, a proto lze předpokládat, že se jedná

o definované onemocnění s řadou prokázaných i možných příčin. Tyto příčiny se liší od příčin izolovaných těhotenských ztrát a zůstávají vzhledem k vysoké základní frekvenci těchto těhotenských ztrát a nekonsistenci definice RPL v různých studiích kontroverzním tématem. Mezi obecně uznávané příčiny časných RPL patří chromosomální aberace [Hogge, 2003; Stephenson, 2006], anatomické abnormality dělohy [Saravolos, 2008], antifosfolipidový syndrom (APS) [Ruiz-Irastorza, 2010], některé další trombofilní stavy [Rey, 2003], endokrinologické poruchy, zejména neléčené thyreopatie a neléčený diabetes [Arredondo, 2006]. Malý počet obecně uznávaných příčin RPL, pro které lze stanovit postupy vyšetření a terapie založené podle pravidel medicíny založené na důkazech (evidence based medicine, EBM), pokrývá pouze asi 50 % případů [Jauniaux, 2006], v současnosti je však předmětem výzkumu celá řada dalších pravděpodobných či možných příčin RPL [ASRM, 2012; Larsen, 2013]. Přehled příčin opakovaných těhotenských ztrát podává tabulka 3-1.

**Tab. 3-1 Možné příčiny opakovaných časných těhotenských ztrát (RPL) -
- upraveno podle Kwak-Kim [2009], ASRM [2012]**

Příčiny	Onemocnění
anatomické	leiomyomy uterinní anomálie: uterus septus, uterus didelphys, uterus bicornis expozice diethylstilbestrolu <i>in utero</i> primární defekt endometria Ashermanův syndrom
endokrinologické	hyperthyreóza a hypothyreóza diabetes mellitus a inzulínová rezistence hypersekrece LH, androgenů, hyperprolaktinémie syndrom polycystických ovarií
hematologické	trombofilie (dědičné/získané) srpkovitá anémie
imunologické - autoimunní	antifosfolipidový syndrom autoimunní thyreoiditis revmatoidní arthritida systémový lupus erythematosus Sjögrenova choroba, psoriáza, celiakie, Behçetova choroba

- alloimunní	autoimunní trombocytopenická purpura autoimunní hemolytická anémie myasthenia gravis IgM gamapatie Rhesus, AB0 inkompatibilita HLA
genetické	vyvážené translokace chromosomální inverze polymorfismy genů pro HLA-G nepravidelná inaktivace X polymorfismy genů pro cytokiny (např. TNFA, IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TGFB)
výživa	hyperhomocysteinémie, deficit folátů, deficit vitamínu B12
životní styl	obezita alkohol, kouření
infekční	<i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Cytomegalovirus</i> , <i>parvovirus B19</i> <i>Toxoplasma gondii</i>

3.2.1 Chromosomální příčiny RPL

Na rozdíl od sporadických těhotenských ztrát jsou asi 2 – 4 % RPL asociována s nosičstvím vyvážených strukturních chromosomálních aberací u rodičů. Nejčastěji se jedná o vyvážené translokace autosomů a Robertsonské translokace, zachycovány jsou i další typy přestaveb jako inverze, inzerce a také případy mozaicismu. Při průkazu parentální aberace je indikováno genetické poradenství a obvykle doporučována prenatální diagnostika vzhledem k riziku nevyváženého karyotypu u plodu v další graviditě. Velké studie párů s RPL a vyváženými translokacemi však uvádějí riziko nevyvážené translokace u potomků nižší než 1 %, tedy riziko srovnatelné s rizikem invazivního prenatálního vyšetření [Franssen, 2006]. Pravděpodobnost další úspěšné gravidity u párů s vyváženými translokacemi přesahuje 80 %. V některých případech obav ženy z komplikací invazivního

vyšetření proto také zůstává otevřena možnost konzervativního postupu, zaměřeného na vyšetření dalších možných příčin RPL a podpůrnou péči. V některých případech s vysokým rizikem viabilního plodu s nevyváženou translokací může být invazivní prenatální diagnostika nahrazena *in vitro* fertilizací s následnou preimplantační genetickou diagnostikou. Využití dárcovských gamet je indikováno v případě genetických anomálií vedoucích vždy k aneuploidii, tj. např. u Robertsonských translokací homologních chromosomů [Franssen 2011].

3.2.2 Anatomické příčiny RPL

Anatomické příčiny způsobují asi 10 – 15 % RPL. Předpokládá se, že k těhotenské ztrátě dochází na podkladě poruchy vaskularizace endometria, což vede k abnormální placentaci. Potenciální příčinou RPL proto může být jakákoli anomálie dělohy, která narušuje cévní zásobení endometria. Mezi ně patří vrožené anomálie dělohy, intrauterinní adheze a děložní leiomyomy.

Ačkoli jsou vrožené anomálie dělohy spojovány spíše s pozdními těhotenskými ztrátami a předčasným porodem, hrají svoji roli i v časných RPL. Nejtěsnější vztah s RPL byl zjištěn u uterus septus, s rizikem spontánní těhotenské ztráty nad 70 % [Lin, 2004]. Další anomálie Müllerských vývodů jako uterus bicornis a uterus didelphys jsou spojovány pouze s malým nárůstem rizika RPL [Raga, 1997]. Intrauterinní adheze, někdy asociované s Ashermanovým syndromem, mohou významně ovlivňovat implantaci a vést k časným těhotenským ztrátám. Také intramurální leiomyomy větší než 5 cm a submukózní leiomyomy jakékoli velikosti zvyšují riziko RPL [Bajekal, 2000].

3.2.3 Endokrinologické příčiny RPL

Syndrom polycystických ovarií (PCOS), diabetes mellitus, thyreopatie, hyperprolaktinémie a defekty luteální fáze jsou spojovány s asi 17 – 20 % případů RPL [Ford 2009].

Existuje obecný konsensus k vyšetření maternálních thyreopatií a diabetes mellitus, protože neléčená tato onemocnění prokazatelně zvyšují frekvenci nejen těhotenských ztrát, ale i vývojových postižení plodu. V případě dobrého řízení léčby však k rizikovým faktorům RPL nepatří [ASRM, 2012].

PCOS je frekventním onemocněním žen v reprodukčním věku. Při využití striktních diagnostických kritérií se jeho prevalence u žen s RPL odhaduje na

8 – 10 % [Cocksedge, 2009]. S RPL je spojován mechanismy hyperandrogenismu, obezity a inzulínové resistance. Vhodnou a nenákladnou metodou počáteční intervence u žen s PCOS je snížení hmotnosti [Larsen, 2013].

Vysoké hladiny prolaktinu mohou inhibovat sekreci progesteronu a vést k poškození endometria. Udržení normální hladiny prolaktinu v graviditě proto může být důležité. Role hyperprolaktinémie v RPL však zůstává nejasná [Arredondo, 2006].

Jako mechanismus defektů luteální fáze byla tradičně navrhována nedostatečná produkce progesteronu žlutým tělískem vedoucí k poruše vyzrání endometria, neumožňující placentaci. Dnes je skutečná role insuficience žlutého tělíska předmětem diskuze a biopsie endometria z této indikace jsou indikovány pouze vzácně [Ford, 2009].

3.2.4 Imunologické a imunogenetické příčiny RPL

Protože reprodukce má zásadní význam pro zachování druhu a fétus není geneticky identický s matkou, je pravděpodobné, že vývojem vznikla řada redundantních imunotolerančních procesů, které v graviditě brání odmítnutí plodu. Dosud bylo navrženo více než deset takovýchto mechanismů a předpokládá se, že teprve porucha více mechanismů současně vede ke sporadickým i opakovaným těhotenským ztrátám [Thellin, 2000].

Kromě antifosfolipidových protilátek, jejichž problematika bude rozebrána později, je vztah jiných autoproti látek a RPL zřejmě slabý. Některé studie prokazují asociaci antithyreoidálních protilátek s vyšší frekvencí těhotenských ztrát. Zda má toto zjištění dopad na osud budoucí gravidity a může vést ke vzniku RPL, však není prokázáno [Arredondo, 2006; Stagnaro-Green, 2004].

Jednou ze zvažovaných příčin RPL jsou maternální alloimunní protilátky proti antigenům embrya či fétu, kódovaných paternálními alelami. Předpokládá se jejich účinek proti trofoblastu nebo přímo proti tkáním fétu. Byla také vyslovena hypotéza, že tvorba těchto protilátek s počtem těhotenských ztrát roste navzdory rostoucímu titru protilátek ochranných. Tvorbu blokujících protilátek může dále omezovat shoda mezi těhotnou a otcem plodu v HLA znacích a dalším diskutovaným faktorem, snižujícím pravděpodobnost úspěšné gravidity, je přítomnost protilátek primárně zaměřených proti spermii [Ulčová-Gallová, 2006].

Nejpřesvědčivějším důkazem významu funkcí imunitního systému u sporadických těhotenských ztrát i RPL jsou studie maternálních

imunogenetických biomarkerů spojovaných s dysregulací imunitní odpovědi v graviditě. Příkladem může být maternální homozygotie pro 14 bp inzerci v genu pro HLA-G, přenašečství alel HLA systému predisponujících k imunitní odpovědi proti histokompatibilním antigenům přítomným na embryích s mužským genotypem, specifická kombinace maternálních receptorů natural killer (NK) buněk a HLA-C genotypu embrya, která vede k imunitní reakce proti trofoblastu, nebo přítomnost určitých alel genu pro manózu vázající lektin, ovlivňující produkci cytokinů určených k odklizení apoptotických buněk trofoblastu [Beaman, 2012; Larsen, 2013].

Jiným faktorem studovaným v souvislosti s RPL jsou funkce a souhra imunokompetentních buněk periferní krve a endometria v místě implantace - NK buněk, makrofágů a Th1, Th2 a Th17 lymfocytů. Děložní NK buňky jsou převládající populací leukocytů v endometriu v době implantace a na počátku gravidity a v koordinaci s dalšími imunokompetentními buňkami jsou považovány za regulátory invaze trofoblastu a angiogeneze. Také jejich přesná funkce je však stále diskutována a prognostický význam jejich počtu či funkce je nejistý [Kwak-Kim, 2009]. Z toho důvodu by také s výjimkou klinických studií neměla být ženám na podkladě výsledků testů NK buněk nabízena imunosupresivní léčba [Larsen, 2013].

Další studie popisují zvýšené hladiny markerů zánětu a cytokinů jako interleukin 1, tumor necrosis factor α nebo interferon γ nejen u sporadických těhotenských ztrát, ale i u žen s RPL. Také význam toho zjištění zůstává předmětem diskuze [Calleja-Agius, 2012].

3.2.5 Porucha výběru embrya jako příčina RPL

Recentní *in vitro* studie zaměřené na interakci embrya s deciduou demonstrují, že decidualizované endometriální stromální buňky (endometrial stromal cells, ESC) fungují jako senzory přijímající směs embryonálních signálních molekul a jsou schopny výběru embrya pro implantaci na základě jeho kvality [Teklenburg, 2010]. ESC u žen s RPL také exprimují nižší hladiny endometriálního mucinu 1 a vykazují abnormální reakci při decidualizaci, charakterizovanou sníženou produkcí prolaktinu a zvýšenou expresí prokineticinu 1. Dalším důkazem může být zachovaná migrace ESC pacientek s RPL v přítomnosti chromozomálně abnormálního embrya, tedy v situaci, kdy jsou ESC fertilních žen zcela inhibovány [Larsen, 2013]. Význam těchto pozorování musí být dále objasněn, ale mohl by

představovat první experimentální důkazy hypotézy formulované původně Quenbym [2002], že ženy s RPL umožňují implantaci nekvalitních embryí, která přežívají až do doby klinického těhotenství, místo aby byla ztracena ve stádiu biochemické gravidity.

3.2.6 Infekční příčiny RPL

Ureaplasma urealyticum, *Mycoplasma hominis*, chlamydia, *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*, virus rubeoly, lidský virus herpes simplex (HSV) i některá další vzácnější agens jsou zachycována ve vaginálních a cervikálních stěrech a séru žen se sporadickými těhotenskými ztrátami [Stephenson, 1996]. Neexistují však přesvědčivá data, že tyto infekce způsobují RPL. Rutinní vyšetření těchto infekcí u žen s RPL není indikováno [ASRM, 2012].

3.2.7 Faktory životního stylu jako příčina RPL

Ve středu pozornosti žen s RPL jsou také faktory životního stylu jako např. výživa, kontrola hmotnosti, fyzická aktivita, užívání léčiv, alkoholu, kofeinu, rekreačních drog, kouření, expozice chemikáliím z pracovního a životního prostředí [Homan, 2007].

Ačkoli se těhotným ženám alkohol nedoporučuje, prokazuje Andersen [2012], že 45 % z dotazovaných 100 000 žen požívalo alkohol v graviditě a že množství nad 3 standardní jednotky alkoholického nápoje týdně v prvním trimestru gravidity zvyšuje riziko těhotenské ztráty. Oproti tomu příjem kofeinu zvyšuje riziko těhotenských ztrát teprve nad hranicí 7 šálků denně [Bech, 2005].

Nežádoucí účinky kouření v pozdějších stádiích gravidity jsou považovány za prokázané [Larsen, 2013]. Nikotin funguje jako mohutný vasokonstriktor a také další složky pevné fáze (cigaretový dehet) i plynné fáze (cigaretový kouř) obsahují velké množství toxinů a volných radikálů, které mohou vést k oxidačnímu stresu fétu [Agarwal, 2012]. Kouření je považováno za rizikový faktor izolovaných těhotenských ztrát i RPL [Saravolos, 2011]. V rozporu s tím dřívější prospektivní studie zahrnující více než 28 000 gravidit asociaci kouření se spontánním potratem neprokázala [Wisborg, 2003].

Obezita je významným faktorem, závislým na životním stylu a spojovaným s mnoha komplikacemi těhotenství, včetně sporadických těhotenských ztrát i RPL. Zatímco riziko sporadické ztráty těhotenství je prokazatelně zvýšeno u těhotných

s BMI $\geq 25 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$, v případě RPL bylo signifikantní zvýšení rizika demonstrováno pouze u těhotných s BMI $\geq 30 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ [Metwally, 2010]

3.2.8 Idiopatické RPL

Opakované těhotenské ztráty z neznámé příčiny bezpochyby představují obrovskou psychologickou zátěž pro postižené páry a při následných vyšetřeních a péči o další těhotenství je nutný velmi citlivý přístup [Brier, 2004]. Nejefektivnější terapeutickou metodou u idiopatického RPL se proto stává podrobné prekoncepční poradenství a psychologická podpora na specializovaném pracovišti. U párů s RPL vede prokazatelně k nárůstu úspěšných gravidit [Brigham, 1999], přestože úspěchy připisované aplikaci metody „něžné péče“ („tender loving care“) publikované Stray-Pedersen [1984] zatím zůstávají nereprodukovány.

3.3 Antifosfolipidový syndrom

Antifosfolipidový syndrom (APS) je autoimunitní onemocnění vedoucí ke vzniku získaného trombofilního stavu. Je charakterizován arteriální a venózní trombózou [Hirmerova, 2010], komplikacemi gravidity (časné i pozdní těhotenské ztráty, intrauterinní růstová retardace plodu, prematurita, hypertenze, preeklampsie, HELLP, uteroplacentární insuficience, abrupce placenty) a přítomností antifosfolipidových protilátek [McIntyre, 2003; Kwak, 1994; Ulčová-Gallová, 2005b; Shoenfeld, 2006]. APS se může vyskytovat jako sekundární při jiných onemocněních (např. cerebrovaskulárních, kardiálních, renálních, infekčních, onkologických, dermatologických, revmatických a psychiatrických) nebo se objevuje jako primární onemocnění [Cervera, 2002]. Antifosfolipidové protilátky jsou autoprotiilátky namířené proti negativně nabitým fosfolipidovým molekulám, tvořícím vnitřní vrstvu biologických membrán, plazmatickým proteinům a komplexům protein-fosfolipid. [Mackworth-Young, 2004]. Nejčastější epitopy, proti kterým jsou antifosfolipidové protilátky namířeny, jsou kardiolipin, kyselina fosfatidová, fosfatidylethanolamin, fosfatidyl-DL-glycerol, fosfatidylinositol, fosfatidyl-L-serin, beta-2-glykoprotein I a annexin V. Frekvence výskytu sérových aPL ve fyziologických těhotenstvích se odhaduje na 2 % [Shapiro, 1994; Ruiz-Irastorza, 2010].

Prevalence APS v obecné populaci je asi 3 – 5 % [Cervera, 2002]. Je prokazatelně asociován s RPL a odhaduje se, že je přítomen asi u 15 % žen

s časnými RPL. Revidovaná diagnostická kritéria APS přijatá v Sydney v roce 2006 shrnuje tabulka 3-2.

**Tab. 3-2 - Diagnostická kritéria antifosfolipidového syndromu -
- podle Miyakis [2006]**

K potvrzení diagnózy APS musí být splněno alespoň jedno klinické a jedno laboratorní kritérium.

Klinická kritéria

1. Nejméně jedna potvrzená vaskulární trombóza (venózní, arteriální nebo kapilární)
2. Komplikace gravidity
 - Nejméně 1 těhotenská ztráta po 10. týdnu gravidity bez morfologické poruchy plodu (vyloučeno ultrasonografickým vyšetřením nebo vyšetřením plodu)
 - Nejméně 1 předčasný porod (< 34. t. gravidity) následkem preeklampsie nebo placentární insuficience
 - Nejméně 3 následné těhotenské ztráty před 10. t. gravidity (po vyloučení maternálních anatomických malformací, hormonálních poruch a maternálních i paternálních chromosomálních aberací)

Laboratorní kritéria

(alespoň 2x pozitivní výsledek s odstupem nejméně 12 týdnů)

1. Pozitivní plazmatický lupus antikoagulans, stanovený dle doporučení Mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu
2. Pozitivní plazmatické hladiny antikardiolipinových protilátek ve třídě IgG nebo IgM (nad 99. percentilem, stanoveno standardním ELISA testem)
3. Pozitivní plazmatické hladiny protilátek proti beta-2-glykoproteinu I ve třídě IgG nebo IgM (nad 40 GPL/MPL* nebo nad 99. percentilem, stanoveno standardním ELISA testem)

Pozn.: * 1 GPL/MPL = 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Mechanismy, kterými APS vede k RPL, nejsou dosud kompletně vysvětleny. Patogeneze APS zahrnuje aktivaci buněk endotelu, monocytů, trombocytů, inhibici přirozených antikoagulačních drah proteinu S a annexinu V, aktivaci komplementu

a inhibici fibrinolytického systému cestou aktivace inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1, protilátek proti annexinu V a protilátek proti beta-2-glykoproteinu I [Krone, 2010].

Kompletní laboratorní vyšetřovací schéma RPL by mělo zahrnovat nejméně vyšetření lupus antikoagulans a antikardiolipinových protilátek. V případě splnění diagnostických kritérií APS se u jinak zdravých žen (nepřítomnost systémového autoimunitního onemocnění jako systémový lupus erythematoses, nepřítomnost trombózy v osobní anamnéze) v graviditě doporučuje léčba nízkými dávkami kyseliny acetylsalicylové (low dose aspirin; LDA) a profylaktické podávání nízkomolekulárního heparinu (low-molecular-weight heparin; LMWH). Podávání LDA by mělo být zahájeno před koncepcí nebo alespoň po průkazu gravidity, podávání LMWH po průkazu gravidity [Derksen, 2008; ASRM 2012].

Stanovení dalších antifosfolipidových protilátek relevantních ke vzniku RPL je velmi diskutovanou oblastí. S výjimkou stanovení lupus antikoagulans, antikardiolipinových protilátek a protilátek proti beta-2-glykoproteinu I, fosfatidyl-L-serinu a annexinu V jsou vyšetřovací metody slabě standardizovány a hodnocení jejich podílu na etiologii RPL proto vyžaduje další studie [ASRM, 2012].

Antifosfolipidové protilátky jsou však jednoznačně spojeny s RPL a dalšími komplikacemi gravidity. Laboratorní nálezy u APS v graviditě se významně liší od jeho klasické formy. Mnoho žen s RPL a pozitivními aPL tedy nesplňuje současná diagnostická kritéria APS. Důvodem může být aktivace jiných, spíše imunopatogenetických než tromboembolických mechanismů (např. aPL indukovaná aktivace komplementu, vedoucí k přímému poškození fétu, porucha angiogeneze ve smyslu abnormální endovaskulární invaze trofoblastu do deciduálních cév [Girardi, 2004; Sebire, 2002]. To následně také ovlivňuje účinnost léčby LMWH v prevenci RPL. Kwak-Kim [2013] zdůrazňuje urgentní potřebu nových diagnostických kritérií porodnického APS a výzkum nových terapeutických přístupů k tomuto komplexnímu problému.

3.4 Dědičné trombofilie jako příčina RPL

Dědičné trombofilní faktory, stejně jako kombinace dědičných a získaných trombofilních faktorů jsou časté, více než 15 % indoevropské populace nese alespoň jeden dědičný trombofilní faktor. Dědičné trombofilní faktory mohou predisponovat k mikrotrombózám zejména trofoblastu a placenty, a vést tak k závažným komplikacím průběhu gravidity včetně RPL.

Autosomálně dominantně dědičné deficity antitrombinu, proteinu C a proteinu S jsou velmi vzácné a vzhledem k nízké prevalenci jsou nalézány jen ojediněle, spíše jako příčina závažných pozdních komplikací gravidity [Greer, 2003].

Nejčastěji vyšetřované dědičné trombofilní faktory, označované také jako klasické trombofilní mutace, jsou Leidenská mutace genu pro koagulační faktor V, mutace genu pro koagulační faktor II (protrombin) G20210A a polymorfismy genu pro methyilentetrahydrofolát reduktázu MTHFR C677T a A1298C. Práce studující asociaci dědičných trombofilních faktorů s RPL docházejí k rozporným výsledkům. Někteří autoři asociaci s RPL neprokazují [Abbate, 2002; Makino, 2004], jiní docházejí k závěru, že přítomnost rizikových trombofilních faktorů vedoucích k sekundárnímu hyperkoagulačnímu stavu vykazuje silnou asociaci s komplikacemi gravidity včetně RPL [Kutteh, 2006; Goodman, 2006].

Tab. 3-3 – Experimentální panel trombofilních mutací pro identifikaci rizika RPL podle Goodman [2006], Coulam [2009]

1.	Faktor V Leiden (G1691A)
2.	Faktor V R2 (H1299R)
3.	Faktor II (protrombin) G20210A
4.	Faktor XIII V34L
5.	Beta-fibrinogen G(-455)A
6.	PAI1 (-675)4G/5G
7.	HPA1 a/b (L33P)
8.	MTHFR C677T
9.	MTHFR A1298C

Kromě uvedených faktorů je předmětem výzkumu řada dalších genových mutací a polymorfismů a jejich kombinací, které ovlivňují funkce hemokoagulačního systému a/nebo fibrinolytického systému a vedou tak k hyperkoagulačnímu stavu [Wolf, 2003; Yenicesu, 2010; Jeddi-Tehrani, 2010, 2011; Bennett, 2012]. Nejčastěji je potenciální asociace dědičných trombofilii a RPL založena na teorii poruchy vývoje placenty způsobené mikrotrombózami. Vzhledem ke studiím prokazujícím, že krev matky začíná proudit intervillózními prostory placenty asi od 10. týdne gravidity, je lépe přijímána spojitost mezi

dědičnými trombofiliemi a RPL po 10. týdnu gravidity než u obdobných událostí před 10. týdnem. Skutečnost, že přenos živin z krve matky do fetálních tkání závisí na průtoku krve děložními cévním řečištěm a může být ovlivněn zde probíhajícími trombotickými událostmi, však připouští roli dědičných trombofilií jako příčiny těhotenských ztrát v každém období gestace [Ford, 2009].

Velké prospektivní studie však dosud asociaci dědičných trombofilií a RPL neprokázaly [Dizon-Townson, 2005; Silver, 2010].

Přehled základních informací o trombofilních mutacích testovaných v rámci předkládané práce shrnují následující oddíly [OMIM, 2013].

3.4.1 Leidská mutace genu pro koagulační faktor V

Koagulační faktor V

MIM 612309

Alternativní názvy; symboly:

Kofaktor proteinu C

Kofaktor aktivovaného proteinu C

APC kofaktor

Labilní faktor

Symbol genu schválený HGNC: F5

Cytogenetický lokus: 1q24.2

Genomické souřadnice (GRCh37): 1:169,481,191 - 169,555,768

Gen F5 kóduje koagulační faktor V, plazmatický glykoprotein o velikosti 330 kD, který se vyskytuje v krevním oběhu s malou nebo nulovou aktivitou. Faktor V je trombinem (F2, MIM 176930), který z neaktivní formy vytváří těžký a lehký řetězec vzájemně spojený vápenatými ionty, konvertován na aktivní formu - faktor Va. Faktor V je základním proteinem koagulačního systému a působí jako kofaktor pro konverzi protrombinu na trombin pomocí faktoru Xa (F10, MIM 613872). Cripe v roce 1992 zjistil, že gen F5 obsahuje 25 exonů.

Alelická varianta 612309.0001: trombofilie na podkladě faktoru V Leiden

F5 G1691A; ARG506GLN; R506Q; dbSNP:rs6025

HGVS schválený název: F5: c.1691G>A

Tato mutace je v publikacích tradičně označována jako faktor V Leiden (FV Leiden) a tento název je užíván i v textu práce.

Trombofilie

Faktor Va je inaktivován aktivovaným proteinem C (PROC, MIM 612283). Za určitých okolností však může být vůči této inaktivaci rezistentní a tento stav se označuje jako APC rezistence. V rodině s trombofilií způsobenou APC rezistencí Bertina [1994] identifikoval heterozygotní mutaci R506Q genu F5, způsobenou substitucí z G na A v pozici 1691 genu.

Varianta byla označena názvem faktor V Leiden podle města v Nizozemsku, kde v té době působil. Dalším vyšetřením většího souboru pacientů identifikoval stejnou mutaci u 56 z 64 pacientů s APC rezistencí. Mutace byla u šesti pacientů homozygotní.

```
>gnl|dbSNP|rs6025 rs=6025|pos=501|len=1001|taxid=9606|mol="genomic"
CGGGGCCTGT CGGGGGGGGG GGGTGGGGGG CGGGGGGAGG GATAGCATTG GGAGATATAC CTAATGTAA TGACAAGTTA
ATGGGTGCAG CACACCAACA TGACACATGT ATACATATGT AACAAACCTG CACGTTGTGC ACATGTACCC TAGAACTTAA
AGTATAATTT AAAAAAATA AAAATAAAAG AATTCCTTTT GCAATATTAA TTGGTTCCAG CGAAAGCTTA TTTATTTATT
TATTATCATG AAATAACTTT GCAAATGAAA ACAATTTTGA ATATATTTTC TTTCAGGCAG GAACAACACC ATGATCAGAG
CAGTTC AACAGG GAAACC TATACTTATA AGTGAACAT CTTAGAGTTT GATGAACCCA CAGAAAATGA TGCCCAGTGC
TTAACAAGAC CATACTACAG TGACGTGGAC ATCATGAGAG ACATCGCCTC TGGGCTAATA GGACTACTTC TAATCTGTAA
GAGCAGATCC CTGGACAGGC
R
AGGAATACAG GTATTTTGTG CTTGAAGTAA CCTTTCAGAA ATTCTGAGAA TTTCTTCTGG CTAGAACATG TTAGGTCTCC
TGGCTAAATA ATGGGGCATT TCCTTCAAGA GAACAGTAAT TGCAAGTAG TCCTTTTTAG CACCAGTGTG ATAACATTTA
TTCTTTTTTT TTTTTGTCT TGTCTATTTT TATCAGTACC ATCACTGCCG AAGGCAAGTC TAGAGTGTGA TAACATATTT
TGTCTTAGTT TCAAATCCA GGTCTGTTGG TATGGATGT GTTGTGCAAG TTGATTAGCC TTTCTTAATT TCTTCTTTT
ATCAAATGGG TAATAACCCT CCTAAAAATG TTACAGGTCT GTTGTGGGGT TCAGTGAGAT ACCATCTGGT AAAAGTATAA
AGCTCTTTAC CAGTCTTGC TATTTTTAGA GACCTGCAAT AGGAGACAG AGGAGAGATT CTCTGAAAGC AACCAAATTT
AGAGACATAG TTCCTAGTGA
```

Obr. 3-1 – Mutace faktor V Leiden v sekvenci genu F5 -

- podle NCBI [dbSNP, 2013]

Brenner v roce 1996 publikoval pozorování dvou pacientek se závažnou komplikací preeklampsie, syndromem HELLP (hemolýza, zvýšené jaterní enzymy a nízký počet krevních destiček), které nesly heterozygotní genotyp faktoru

V Leiden. Nález této mutace naznačoval, že patogeneze HELLP syndromu může být spojena s trombotickým procesem.

Opakované ztráty těhotenství

Ve studii 67 žen s první epizodou nevysvětlitelné pozdní fetální ztráty (úmrť plodu po 20. týdnu těhotenství) a u 232 žen, které měly jedno nebo více normálních těhotenství, Martinelli v roce 2000 zjistil, že faktor V Leiden i mutace protrombinového genu G20210A byly spojeny s přibližným ztrojnásobením rizika pozdní ztráty plodu.

Zivelin v roce 2006 prokázal founder effect faktoru V Leiden (tj. skutečnost, že vznikl jedinou mutační událostí v minulosti) a odhadl jeho stáří na 21340 let. Vyslovil také hypotézu, že k jejímu rozšíření v době poslední doby ledové v Evropě došlo proto, že podobně jako protrombinová mutace G20120A svému nosiči poskytovala selektivní výhodu snížením úmrtnosti z poporodního a poúrazového krvácení.

Frekvence výskytu faktoru V Leiden v kavkazoidní populaci kolísá - je uváděna v rozmezí mezi 4 – 8 %. Raušová [2005] stanovila frekvenci faktoru V Leiden v české populaci na 5 %. V nekavkazoidních populacích je faktor V extrémně vzácný.

Účinek faktoru V Leiden může být potencován přítomností dalších trombofilních mutací. Například Kemkes-Matthes [2005] publikovala pozorování, že přítomnost heterozygotní nebo homozygotní mutace R225H v exonu 8 genu pro protein Z je spojena s vyšší frekvencí tromboembolických komplikací u pacientů nesoucích faktor V Leiden. Ve studii 134 nosičů faktoru V Leiden byla mutace R225H nalezena v 11 (14,4 %) ze 76 pacientů s tromboembolií a pouze u 3 (5,1 %) z 58 pacientů, kteří tromboembolické příhody neměli.

3.4.2 Mutace G20210A genu pro koagulační faktor II

MIM 176930

Koagulační faktor II

Alternativní názvy; symboly:

Trombin

Protrombin

Faktor II

Symbol genu schválený HGNC: F2

Cytogenetický lokus: 11p11.2

Genomické souřadnice (GRCh37): 11:46,740,742 - 46,761,055

Gen F2 kóduje koagulační faktor II (EC 3.4.21.5), protrombin, vitamin K-dependentní glykoprotein syntetizovaný v játrech v neaktivní formě. Protrombin je aktivován na trombin serinovou proteázou - faktorem Xa (F10; MIM 613872) za přítomnosti fosfolipidů, vápníku a faktoru Va (F5, MIM 612309). Aktivovaný enzym hraje důležitou roli v hemostáze a patogenezi trombózy: v procesu tvorby krevních sraženin mění fibrinogen (MIM 134820) na fibrin, stimuluje agregaci krevních destiček a aktivuje koagulační faktory V, VIII (F8, MIM 300841) a XIII (F13A1, MIM 134570). Trombin také zpětně inhibuje koagulaci aktivací proteinu C (PROC, MIM 612283).

Gen pro protrombin obsahuje 14 exonů a má asi 21 kb. Gen obsahuje 30 repetitivních Alu sekvencí a 2 Kpn sekvence, které tvoří asi 40 % genu.

Alelická varianta 176930.0009: trombofilie následkem poruchy produkce protrombinu

HGVS schválený název: F2: g.20210G>A

Tato mutace je v publikacích tradičně označována F II G20210A (protrombin G20210A) a tento název je užíván v textu práce.

Trombofilie

Poort v roce 1996 publikoval, že mutace v 3' nepřekládané oblasti protrombinového genu G20210A je spojena se zvýšenou plazmatickou hladinou protrombinu a vede ke zvýšenému riziku žilní trombózy. Záměna byla nalezena u 18 % probandů rodin s trombózou, u 6 % náhodně vybraných pacientů s hlubokou žilní trombózou a ve 2 % u zdravých kontrol. Mutace je dle jiných autorů také

spojena se čtyřnásobným zvýšením rizika infarktu myokardu u žen, zatímco u mužů se riziko se zvyšuje 1,5krát. Kromě trombózy je mutace G20210A spojována i s rizikem cévních mozkových příhod a Budd-Chiariho syndromu.

Rosendaal v roce 1998 uvádí prevalenci v jižní Evropě 3 %, téměř dvakrát vyšší než v severní Evropě (1,7 %). Zivelin v roce 1998 stanovil founder effect také u polymorfismu G20210A a vyslovil hypotézu, že vzhledem k absenci či velmi nízké frekvenci polymorfismu v nekavkazoidních populacích došlo k mutační události až po divergenci kavkazoidní subpopulace od ostatních.

Opakované těhotenské ztráty

Pihusch [2001] studoval koagulační faktory u 102 pacientů s RPL a zjistil, že heterozygotní mutace G20210A byla asociována s časnými RPL ($p = 0,027$, OR 8,5).

```
Homo sapiens coagulation factor II (thrombin) (F2), NCBI RefSeq NG_008953.1
25021 ctgatgtgac cttgaacttg actctattgg aaacctcatc tttcttcttc agagcccctt
25081 taacaaccgc tggatcaaaa tgggcatcgt ctcatggggg gaaggctgtg accgggatgg
25141 gaaatatggc ttctacacac atgtgttccg cctgaagaag tggatacaga aggtcattga
25201 tcagtttggg gagtaggggg cactcatat tctgggctcc tggaaaccaat cccgtgaaag
25261 aattatTTTT gtgtttctaa aactatgggt cccaataaaa gtgactctca gcga
    R
    cctca
25321 atgctcccag tgctattcat gggcagctct ctgggctcag gaagagccag taatactact
25381 ggataaagaa gacttaagaa tccaccacct ggtgcacgct gtagtccga gactcggga
25441 ggctgaggtg ggagatcgc ttgagcccag gaggtggagg ctgcagtgag cactgcacc
25501 ccagcctggg tgacagagtg agaccctgtc caaaagaat cactatcta tcttcagagc
25561 agggccaggt gagaggaaag atggcaggtt gaatttacag gcattaaaga tgttccacc
```

Obr. 3-2 – Mutace G20210A v sekvenci genu F2 – podle NCBI [RefSeq, 2013]

3.4.3 Mutace C677T a A1298C genu pro methylenetetrahydrofolát reduktázu

MIM 607093

5,10-methylenetetrahydrofolát reduktáza

Symbol genu schválený HGNC: MTHFR

Cytogenetický lokus: 1p36.22

Genomické souřadnice (GRCh37): 1:11,845,786 - 11,866,159

Methylenetetrahydrofolát reduktáza katalyzuje přeměnu 5,10-methylenetetrahydrofolátu na 5-methyltetrahydrofolátu, který tvoří kosubstrát pro remethylaci homocysteinu na methionin.

Alelická varianta 607093.0003: MTHFR termolabilní polymorfismus

MTHFR C677T, ALA222VAL; dbSNP:rs1801133

HGVS schválený název: MTHFR: c.677C>T

Tato mutace je v publikacích tradičně označována MTHFR C677T a tento název je užíván v textu práce.

```
>gnl|dbSNP|rs1801133
rs=1801133|pos=501|len=1001|taxid=9606|mol="genomic"|class=snp|alleles="C/T"|build=138|suspect=?|GMAF=A:707:0.3246|clinsig=non-pathogenic

TGGGAGTTTG GAGCAATCCA CCCCCACTCT TGGAAGTGGG CTCTGAGCCA CCTCCCCTGA GAGTCATCTC TGGGGTCAGA
AGCATATCAG TCATGAGCCC AGCCACTCAC TGTTTTAGTT CAGGCTGTGC TGTGCTGTTG GAAGGTGCAA GATCAGAGCC
CCCAAAGCAG AGGACTCTCT CTGCCAGTC CCTGTGGTCT CTTCATCCCT CGCCTTGAAC AGGTGGAGGC CAGCCTCTCC
TGACTGTCAT CCCTATTGGC AGGTTACCCC AAAGGCCACC CCGAAGCAGG GAGCTTTGAG GCTGACCTGA AGCACTTGAA
GGAGAAGGTG TCTGCGGGAG

y

CGATTTTCATC ATCACGCAGC TTTTCTTTGA GGCTGACACA TTCTTCCGCT TTGTGAAGGC ATGCACCGAC ATGGGCATCA
CTTGCCCCAT CGTCCCCGGG ATCTTTCCCA TCCAGGTGAG GGGCCAGGA GAGCCCATAA GCTCCCTCCA CCCCCTCTC
ACCGCACCGT CCTCGCACAG GCTGGGGGCT CTGGGTGGAG TGCTGAGTTC GCTGAGTTCT TCCCAGATCT CCTCTCAGGT
CCAGAACTTG CACAGCGTTG CTTGGCCACC CCATTTTGGT TACCTCTAAT TTTCCCCCA AAACCCAGCA ACAGTGTCTG
TTGAGGGGTT TGTTGTAATT TGGCCAACAA GCATCACCAA AAGGGATTCT AATTCTCATT ACAAATCCTG CTAAATCAG
```

Obr. 3-3 – Mutace C677T v sekvenci genu MTHFR – podle NCBI [dbSNP, 2013]

Frosst v roce 1995 jako první identifikoval mutaci genu MTHFR C677T, která vede k záměně Ala222Val (A222V). Frekvence mutované alely v obecné populaci činí kolem 0,38. Mutace v heterozygotním nebo homozygotním stavu koreluje se zvýšenou termolabilitou a sníženou aktivitou enzymu. Jedinci homozygotní pro mutaci C677T mají významně zvýšené plazmatické hladiny homocysteinu, a to zejména v podmínkách deficitu folátu. Mutace MTHFR C677T proto může představovat významný genetický rizikový faktor cévního onemocnění.

Klerk v roce 2002 provedl metaanalýzu rizika vzniku ischemické choroby srdeční související s přítomností polymorfismu C677T a dospěl k závěru, že jedinci s genotypem 677TT mají významně vyšší riziko vzniku ischemické choroby srdeční zejména v podmínkách nedostatečného přísunu folátu.

V komplexní metaanalýze 22 case-control studií zahrnujících 3387 dospělých pacientů Casas v roce 2004 zjistil statisticky významnou souvislost mezi ischemickými cévními mozkovými příhodami a polymorfismem C677T (OR 1,24).

Defekty neurální trubice

Christensen již v roce 1999 uvedl polymorfismus genu MTHFR C677T jako první genetický rizikový faktor pro defekty neurální trubice stanovený na molekulární úrovni, tento objev později vedl k rozšíření suplementace folátu na populační úrovni (fortifikace potravin) nebo formou cílené prekoncepční péče.

Keijzer v roce 2002 uvádí hyperhomocysteinémií způsobenou mutací MTHFR C677T a faktor V Leiden jako nezávislé rizikové faktory pro recidivující žilní trombózy.

Asociace polymorfismu MTHFR C677T s mnoha dalšími onemocněními, jako jsou hypertenze, okluze retinální arterie, Downův syndrom, kancerogeneze, deprese, schizofrenie, migrény, glaukom a v gynekologicko-porodnické péči riziko preeklampsie a RPL je předmětem mnoha studií.

Hradecký [2009] neprokázal na souboru 55 žen s preeklampsií asociaci s variantami MTHFR C677T ani A1298C.

Alelická varianta 607093.0004: MTHFR termolabilní polymorfismus

MTHFR A1298C, GLU429ALA; dbSNP:rs1801131

HGVS schválený název: MTHFR: c.1298A>C

Tato mutace je v publikacích tradičně označována MTHFR C1298T a tento název je užíván v textu práce.

Van der Put v roce 1998 identifikoval další polymorfismus genu MTHFR A1298C, vedoucí k záměně Glu429Ala (E429A) v předpokládané regulační oblasti genu MTHFR.

Homozygotní ani heterozygotní záměna A1298C není spojena s vyššími plazmatickými koncentracemi homocysteinu ani folátu. Genotyp složených heterozygotů C677T/A1298C má však za následek funkční změny podobné těm, které byly pozorovány u homozygotů 677TT.

```
>gnl|dbSNP|rs1801131
rs=1801131|pos=501|len=1001|taxid=9606|mol="genomic"|class=snp|alleles="A/C"|build=138|sus
pect=?|GMAF=G:496:0.2277|clinsig=other
TCCGGCTCCC TCTAGCCAAT CCCTTGCTC AATCTCTGT CCCCATCCTC ACCCAGGCGT CCCCTACCT GGGCTCTCAG
CGCCACCCC AAGCGCCGAG AGGAAGATGT ACGTCCATC TTCTGGGCT CCAGACCAA GAGTTACATC TACCGTACCC
AGGAGTGGGA CGAGTTCCT AACGGCCGCT GGTGAGGGCC TGCAGACCTT CCTTGCAAAT ACATCTTGT TCTTGGGAGC
GGGAGGGCAG AAGAAGTTG CATGCTTGTG GTTACCTGG GAGGAGTCAG GGCAGAAAT TACAGGAATG GCCTCCTGGG
CATGTGGTGG CACTGCCCTC TGTCAGGAGT GTGCCCTGAC CTCTGGGCAC CCCTCTGCCA GGGGCAATTC CTCTCCCTC
GCCTTTGGGG AGCTGAAGGA CTACTACCTC TTCTACCTGA AGAGCAAGTC CCCCAAGGAG GAGCTGTCTGA AGATGTGGGG
GGAGGAGCTG ACCAGTGAAG
M
AAGTGTCTTT GAAGTCTTCG TTCTTTACCT CTCGGGAGAA CCAAACCGGA ATGGTCACAA AGTGAGTGAT GCTGGAGTGG
GGACCCTGGT TCATCCCCTG CCCCTGGCCT GACCCAGCT GCAGGCCAGG CTGCGGGGCT GTGACTTCCC CATCCTGTGC
CCTCCCCTCC ATGCTGTGGA CATGGCAAAG GGAGAAGGCT AAGTTGGGAG ACCTCCACCT GGAAGGGCTT AGGGAGGCAA
AGACAGGCTG GGTCTTTGTT GGGGGCCGTG AGAGGGACTC AGGGTGCCAA ACCTGATGGT CGCCCCAGCC AGCTCACCGT
CTCTCCCAGG TGA CTGCTTGCCT GCCCTGGAAC GATGAGCCCC TGGCGGCTGA GACCAGCCTG CTGAAGGAGG AGCTGTCTGC
GGTGAACCGC CAGGGCATCC TCACCATCAA CTCACAGCCC AACATCAACG GGAAGCCGTC CTCCGACCCC ATCGTGGGCT
GGGGCCCCAG CGGGGGCTAT
```

Obr. 3-4 – Mutace A1298C v sekvenci genu MTHFR – podle NCBI [dbSNP, 2013]

Zetterberg v roce 2002 vyslovil hypotézu, že i polymorfismus MTHFR A1298C může být rizikovým faktorem v průběhu embryogeneze, kdy jsou vysoké požadavky na hladinu kyseliny listové.

Žádná z autorovi známých studií dosud jednoznačně neprokázala asociaci polymorfismu MTHFR A1298C s komplikacemi gravidity, ale vzhledem

k hypotetickým rizikům složených heterozygotů C677T/A1298C a propojení vyšetřovací metodiky bylo jeho stanovení zařazeno do předkládané práce.

3.4.4 Mutace (-675)4G/5G genu pro inhibitor aktivátoru plazminogenu 1

MIM 173360

Serpin E1 (nexin)

Alternativní názvy; symboly:

Inhibitor aktivátoru plazminogenu 1; PAI1

Inhibitor endoteliálního aktivátoru plazminogenu

Symbol genu schválený HGNC: SERPINE1

Cytogenetický lokus: 7q22.1

Genomické souřadnice (GRCh37): 7:100,770,369 - 100,782,546 (NCBI)

Gen SERPINE1 kóduje endoteliální PAI-1 (PAI1), protein ze skupiny inhibitorů serinových proteáz, který inhibuje tkáňový aktivátor plazminogenu (PLAT, MIM 173370) a aktivátor plazminogenu urokinázového typu (PLAU, MIM 191840). Protein má velikost 47,2 kD a nápadnou strukturní podobnost s angiotenzinogenem, alfa-1-antitrypsinem a antitrombinem III. PLAT a PLAU proteolyticky aktivují plazminogen na plazmin, který odbourává fibrinové sraženiny. SERPINE1 tak negativně reguluje fibrinolýzu a zpomaluje rozpouštění krevních sraženin.

Loskutoff v roce 1987 zjistil, že gen SERPINE1 je velký přibližně 12,2 kb a obsahuje 9 exonů. Vzácné deletorní mutace genu významně snižují hladiny PAI-1 a vedou ke ztrátě regulace fibrinolýzy a hemoragické diatéze.

Alelická varianta 173360.0002: Modulátor transkripce inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1

Serpine 1bp DEL/INS, PAI1 4G/5G

Tato mutace je v publikacích tradičně označována PAI1 (-675)4G/5G a tento název je užíván v textu práce.

Dawson v roce 1993 ukázal, že zvýšená plazmatická hladina PAI-1 asociuje s 1bp inzerčním/delečním polymorfismem guaninu (4G/5G) v promotoru genu PAI1. 4G alela je spojena s vyšší transkripcí PAI1. Alela 5G kromě aktivátoru transkripce váže na překrývajícím se vazebném místě také represorový protein.

V případě alely 4G je nemožnost vazby represoru spojena se zvýšenou bazální úrovní transkripce.

```
Homo sapiens chromosome 7, complete sequence.  
Region: 100769000..100782000  
  
361 accactgctc cacagaatct atcggctcaact cttcctcccc tcaccccctt gccctaaaag  
421 cacaccctgc aaacctgcca tgaattgaca ctctgtttct atcccttttc cccttggtgc  
481 tgtgtctgga ggaagaggat aaaggacaag ctgccccaaag tcctagcggg cagctcgaag  
541 aagtgaaact tacacgttgg tctcctgttt ccttaccaag cttttaccat ggtaaccctt  
601 ggtcccgttc agccaccacc accccaccca gcacacctcc aacctcagcc agacaaggtt  
661 gttgacacaa gagagccctc aggggcacag agagagtctg gacacgtggg  
  
    G/GG  
    agtcagccg  
721 tgtatcatcg gaggcggccg ggcacatggc agggatgagg gaaagaccaa gagtcctctg  
781 ttgggcccaa gtcctagaca gacaaaacct agacaatcac gtggctggct gcatgccctg  
841 tggctgttgg gctggggcca ggaggagggg gggggcgtct ttctggagg tggtcagag  
901 caccgggtgg acagccctgg gggaaaactt ccacgttttg atggaggta tctttgataa  
961 ctccacagtg acctggttcg ccaaaggaaa agcaggcaac gtgagctgtt tttttttct
```

Obr. 3-5 – Mutace (-675)4G/5G v sekvenci genu PAI1 - podle NCBI [RefSeq, 2013]

Prevalence 4G alely byla významně vyšší u pacientů s infarktem myokardu před dosažením věku 45 let (alelická frekvence 0,63) než u populační kontroly (alelická frekvence 0,53) [Eriksson, 1995]. Margaglione [1998] publikoval zvýšené riziko rodového výskytu ischemické choroby srdeční u homozygotů pro 4G alelu (OR 1,62). Frekvence alely 4G byla neobvykle vysoká v rodech s výskytem obezity a hypercholesterolémie.

Z komplikací gravidity hodnotil Yamada v roce 2000 vztah mezi preeklampsii a PAI1 4G/5G. Frekvence homozygotů 4G byla významně vyšší oproti kontrolám. Dossenbach-Glaninger (2003) publikovala na malém souboru 47 žen s RPL asociaci 4G/4G homozygotního genotypu s RPL.

3.4.5 Mutace intron F G79A, A(-13)G a R255H genu pro protein Z

MIM 176895

Protein Z; PROZ

Alternativní názvy; symboly:

PZ

Symbol genu schválený HGNC: PROZ

Cytogenetický lokus: 13q34

Genomické souřadnice (GRCh37): 13:113,812,967 - 113,826,697 (NCBI)

Protein Z (PZ) je vitamin K-dependentní plazmatický protein, jehož funkcí je v komplexu s protein Z-dependentním inhibítozem proteáz (SERPINEA10, ZPI, MIM 605271) inhibovat aktivovaný koagulační faktor Xa. Nízké hladiny PZ a ZPI vedou k významnému protrombotickému stavu [Broze, 1984; Broze 2001]. Struktura proteinu Z je podobná jako u faktorů VII (F7, MIM 613878), IX (F9, MIM 300746), X (F10, MIM 613872) a proteinu C (PROC, MIM 612283). Fujimaki [1998] určil velikost genu PROZ 14 kb a identifikoval 9 exonů, včetně jednoho alternativního.

U člověka je PZ charakterizován neobvykle širokou distribucí v plazmě a významným poklesem hladin po podání warfarinu. Zdá se, že izolovaný deficit PZ nepředstavuje samostatný rizikový faktor venózní trombózy a mozkové ischemie [Yin, 2000; Vasse, 2001], ale jako kofaktor zvyšuje její riziko v přítomnosti jiných známých rizikových faktorů jako FV Leiden, faktor II G20210A nebo hyperhomocysteinémie [Kemkes-Matthes, 2002]. Gris [2002] popsal deficit proteinu Z i u časných těhotenských ztrát.

Alelické varianty

Protein Z patří k méně prozkoumaným kofaktorům hemokoagulačního systému. Publikovaných studií, zkoumajících vztah mutací genu PROZ a hladiny PZ, je velmi málo [Le Cam-Duchez, 2009]. Na základě literární rešerše byly identifikovány tři nejčastější alelické varianty ovlivňující funkci proteinu Z a zařazeny do předkládané práce. Varianty jsou v práci označovány v souladu s předchozími publikacemi.

Lichy [2004] pozoroval významně nižší frekvenci mutace v 6. intronu genu PROZ G79A v souboru nemocných s ischemickou cévní mozkovou příhodou a formuloval hypotézu, že A alela uvedeného polymorfismu představuje protektivní

faktor cévní trombózy CNS. Stejnou asociaci na malém souboru žen s RPL později publikovala Dossenbach-Glaninger [2008].

```
>gnl|dbSNP|rs3024735|allelePos=501|totalLen=1001|taxid=9606|
  snpclass=1|alleles='A/G'|mol=Genomic|build=138
CATCCTCCTT CCTTCTGTAG TACTGGGTGA AGCCCGCGGA TTTGTGATAA GCAGTTGCCA
CGACTCAGAA GGTGGTCCGC GTCTCCACGC TGGAGCAATG GCCATGCTAG AAAGTGCAGT
TTCTGTCACT AGTGCTTGCT CGGACCACTC TGAGCTAAAC CATGAGTGCT GTGAGGGGTG
GTTTAACTCC AGTCTGTGTG TCTGTGAATT ACTGCACATT CATCAGCATT AAGGATAAGA
TTATAATGGT TAGTACCATA GACGGAATTA TGCAACGGTT AACACCATAG ACAGAGTCCG
ATATTCGCTG AGAAGGCGCT GATTTTTATT CTCATGTTGC TGCCGCAAAT GCAGACCAGT
GTGCCTGCGG GGTGCTGACC TCTGAGAAGC GTGCACCGGA TCTACAGGAC CTCCCGTGGC
AGGTAACAGA GCGCTCTCCG CGTGCTTCAA TTTATTGTTA TGACTTTCAC CTCACTTGTC
ATTTCTTAAA TAGAAATGTT
R
ACAAC TAAGT GAATCAGGCA TCCTGACTTT GATGGGCTAC TGA CTGCACT GACCAACCTC
TATTCACACT TCCAACCATG TTCTAATGCC GAGTTCATAA CTAATACAAA AGGACAGCAT
TATTTACAGC CCCAAGACC TTCTCTCTGC AGTTCCAAAC TGTTACCAAT GTCATTTTCT
CAGAACATAA GCATCTCAA ATCTCTGCTC TCGGCTGCTG GCCTGGCATT CTAGCTTTGT
TACTTTGTTC ACTAAATTC TCTAGTTTGG CATTCAATTT TGTTCTCCTT TTCCCCTCCT
TGGCTGGTTT AGAAGTTAAC CATTCAATTT TTTTGGTTT GTTTTTTTTG AGATGGAGTC
TCAATCTGTC ACCCAGCCTG GAGTGCAGTG GTCCAGTCCC GGCTCACTGC AACCTCTGCC
TCCTGGGCAC AAGCGCTTTC CCTGCCTCCA CCTCTGAGT AGCTGGGATT ACAGGAATGT
```

**Obr. 3-6 – Mutace v intronu F G79A v sekvenci genu PROZ -
- podle NCBI [dbSNP, 2013]**

Ve stejném souboru nemocných s ischemickou cévní mozkovou příhodou Lichy [2004] zkoumal frekvenci substituci PROZ A(-13)G v promotorové oblasti genu bez průkazu asociace s onemocněním. Studie frekvence této mutace v souvislosti s RPL nebo s jinými komplikacemi gravidity nebyla literární rešerší nalezena.

Homo sapiens chromosome 13, GRCh37.p13 Primary Assembly,

NCBI RefSeq: NC_000013.10, REGION: 113812506..113813465

```
1   cactatttgg cccttccccg ctttctccct cctccctccc tcccttcctt ttctcccctt
61  ccttctttcc atcctcctgc tttccctccc tcactccctc ctgtctcttt ccctcgttct
121 tttctgtgta ttccacacac acctagaacg taagctgcat gtgactttgt ctgtcccgcc
181 cagtgcctgtg tccccagggc ctatctcacc tccattgacc acacacgggc atgggtgccca
241 ccttccacct tgcacctgct gcctttacct tctgttctct gtctccctaa atatctccca
301 gggctcctctg agccttcacc gttcatttct ctgcctggcc tcaaacagaa aacgtcagga
361 gggaagcaca cagctgcaca ggctcgtgcc cgaggctcct gctgccggca cctccccag
421 cctggacttt ggctgtgttt gtagccctgt cccagc
```

R

```
   ctc cgggtgggaa tggcaggctg
481 cgtcccactg ctccagggcc tggctcctggt cctcgcctc catcgtgtgg agccctcagg
541 taggcatctg gcttacctgt ctgttggtgcc tgtgctgtgt ctttcttgac tcgggtccatg
601 gtggatttgt agatgaggct ttttccagga gccagaggag ccctgagtgc ccagactagt
661 cttaattccc ctgaaaaagc tgtttggatc tttatcattt ggtgacaagt atttgggaca
721 tgatagtgtc acttggggtc ctccaagag atgcccaaat ggaaagaagc ctgtgtgcag
781 gggattcagc cgggaaaggc cggggagagg ggagggggaa agggggagga gtggggggag
841 gcctgggttg ggcatggac gaggggaggg ggtggggcag gctgagcca gactgcaatg
901 tgggcagaga gagccttggc caggccagcc agaatgccc agtcttgagt caggagacat
```

Obr. 3-1 – Mutace A(-13)G genu PROZ - podle NCBI [RefSeq, 2013]

Kemkes-Matthes [2005] identifikovala v souboru nemocných s hlubokou žilní trombózou substituci R255H v exonu 8 genu PROZ. Mutace byla zachycena ve 14,4 % souboru nemocných oproti 5,1 % u kontrol bez trombotické příhody. Hladiny proteinu Z mezi soubory se významně nelišily. Podle dostupných zdrojů nebyla tato studie nikdy replikována a neexistují ani údaje u výskytu mutace PROZ R255H u žen s RPL.

Homo sapiens protein Z, vitamin K-dependent plasma glycoprotein (PROZ), mRNA.

NCBI RefSeq: NM_003891.1

```
541 tgagaagcgt gcaccggatc tacaggacct cccgtggcag gtaaagttaa caaattccga
601 aggaaaagac ttctgtggtg gtgttataat acgggaaaat tttgtactga caacagcaaa
661 atgttctactg ttacacagga atattactgt aaaaacatat ttaacagaa cgagccaaga
721 cccgctgatg atcaagataa cgcacgtcca tgtgcacatg cggatgacg cggacgcggg
781 ggagaatgac ctgtcactgc tggagctgga gtggcccatc cagtgccag gtgcggggct
841 ccccgctgtc acccctgaga aagacttcgc tgagcacctc ctcatccc
```

R

```
c gcaccagggg
901 ctcctcagc ggctgggcac gcaatggcac tgacctgggc aactcgctga ccacgcggcc
961 tgtcacactt gtggaggggg aggagtgcgg gcaggtcctg aatgtgactg tcaccaccag
1021 gacctactgt gagagaagca gcgtggcggc catgcactgg atggatggaa gtgtggtcac
1081 cagagaacac agaggctcct ggtttctcac gggggtcctg ggctcgcagc cagtaggagg
1141 gcaggctcac atggctcctg tcaccaaggt ctccaggtac tactctggt ttaaacagat
1201 catgaactaa ctgaaactca gctagccaga atgaacaaca caaccggaag cgggattcca
```

Obr. 3-8 – Mutace R255H v sekvenci genu PROZ - podle NCBI [RefSeq, 2013]

3.5 Genetické příčiny RPL - budoucí směry

Dnešní klinická praxe spoléhá na vyšetřování několika faktorů asociovaných se zvýšeným rizikem RPL. Mezi ně patří chromosomální aberace rodičů a maternální anatomické, endokrinologické, imunologické a trombofilní poruchy [Kwak-Kim, 2009; Tang, 2010; ASRM, 2012]. Kromě studií dalších relevantních faktorů souvisejících se životním prostředím a životním stylem sílí také důkazy, že RPL má významnou genetickou predispozici [Rull, 2012]. To je v souladu s původním pozorováním 2 – 7krát zvýšené prevalence RPL mezi příbuznými prvního stupně ve srovnání s obecnou populací [Christiansen, 1996]. Nedávno publikovaná celogenomová studie sourozeneckých párů s idiopatickým RPL potvrdila heterogenitu přispívajících genetických faktorů [Kolte, 2010].

Genetické a genomické studie RPL mohou sledovat tři hlavní cíle: 1. identifikovat DNA či RNA markery s přímou prediktivní hodnotou pro riziko opakovaných těhotenských ztrát vyšetřovaného páru; 2. mapovat genové nebo proteinové expresní profily, metabolické dráhy a genové sítě; 3. z výsledku

provedených studií identifikovat nové lokusy kódující nové klinicky využitelné neinvazivní biomarkery. Tyto biomarkery Christiansen [2008] klasifikuje do tří skupin: 1. varianty asociované s nadměrnou imunitní odpovědí a autoimunitou; 2. varianty s významem pro vnímavost k inzulínu a androgenům a 3. varianty asociované s trombofilií.

Jednou z nejobtížnějších otázek výzkumu genetiky RPL je výběr studovaného objektu: žena, muž, fétus a placenta. V genetickém či genomickém kontextu to znamená možnost testovat tři různé genomy (matka, otec, fétus/placenta) a čtyři epigenomy (odlišné pro fétus a placentu). Ideální studie by tedy měla zahrnovat vyšetření obou partnerů dobře definovaného páru s RPL, stejně jako produktu koncepce neúspěšné gravidity a případného živě rozeného dítěte stejného páru (jako vnitřní kontroly). Dosud publikované na hypotéze založené studie více než 90 kandidátních genů měly v tomto směru významná omezení a neprokázaly asociaci sledovaného polymorfismu s RPL, případně se výsledky nepodařilo replikovat na následných studiích nebo v různých studiích vykazovaly opačné výsledky [Rull, 2012].

Vzhledem k omezením na hypotéze založených studií může budoucnost spočívat v hypothesis-free celogenomových asociačních studiích umožněných novými technologiemi mikroarray a sekvenování nové generace. Hlavní obtíž zůstává získání dostatečného počtu dobře definovaných případů RPL, potřebného vzhledem k významné heterogenitě sledovaného fenotypu [Eichler, 2010]. První studie 26 euploidních produktů koncepce ze spontánních potratů zaměřená na průkaz variant počtu kopií (CNV) různých úseků genetického materiálu metodou aCGH zachytila 11 unikátních CNV, včetně 86 kb duplikace genu TIMP2 a 72 kb delece genu CTNNA3. Oba tyto geny jsou imprintovány a maternálně exprimovány v placentě [Rajcan-Separovic, 2010]. Další studie mapující běžné CNV prokazuje zvýšenou prevalenci 52 kb duplikace na chromosomu 5 u dánských a estonských párů s RPL [Nagirnaja, 2011].

Tyto pilotní studie upozorňují na možný směr výzkumu vzácných i běžných CNV jako rizikových faktorů RPL a ukazují, že budoucí směry výzkumu biomarkerů RPL budou záviset na integraci alternativních přístupů (DNA varianty, genová a proteinová exprese, epigenetická regulace) a na široké spolupráci sítě výzkumných center a klinických pracovišť, poskytujících péči párům s RPL [Rull, 2012].

Technologie sekvenování příští generace mohou produkovat velké množství sekvenačních dat s velmi malými náklady. Fechtel [2011] na příkladu „hemostaseomu“, tj. souboru 109 genů aktivních v hemokoagulačním a fibrinolytickém systému, demonstruje metodický přístup ke studiu genových variant, které mohou způsobit onemocnění u jedinců, jejichž hemostatická rovnováha je vychýlena k hypokoagulačnímu nebo protrombotickému fenotypu. Lotta [2012] publikoval velkou studii 186 hemostatických a prozánětlivých genů. Dosud však chybí dostatečná infromatická podpora, takže je velmi obtížné objemy získaných dat efektivně interpretovat.

4 Vlastní řešení a výsledky

4.1 Studovaný soubor a metody

4.1.1 Soubor

Sledovaný soubor tvořilo 206 žen ve věku 24 – 45 let (medián 32 roky) se 2 – 8 RPL, které dosud nikdy neporodily. U žádné ze sledovaných žen nebyla prokázána jiná možná příčina RPL jako vrozené chromosomální aberace, vrozené či získané anomálie reprodukčních orgánů, infekční a endokrinologická onemocnění. Ženy zařazené do studie také měly negativní anamnézu genitálních infekcí, trombocytopenie a klinického autoimunního onemocnění a nikdy neprodělaly žilní ani tepennou trombózu.

Vzhledem k tomu, že definice RPL není jasně stanovena, rozdělili jsme pacientky do dvou skupin se dvěma RPL (112 žen) a třemi a více RPL (94 žen). Všechny ženy byly v péči poradny reprodukční imunologie Gynekologicko-porodnické kliniky nebo ambulance Ústavu lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň

Do kontrolní skupiny bylo zařazeno osmdesát čtyři zdravých, fertálních žen ve věku 27 - 41 let (medián 33 roky), které úspěšně porodily jedno nebo dvě děti. V době studie nebyly těhotné a neužívaly žádné léky včetně případné orální kontracepce.

Vzorky srážlivé krve pro imunologickou analýzu a EDTA krve pro genetickou analýzu byly skladovány při – 18 °C až do vyšetření.

Genetická analýza byla úspěšně provedena v první fázi studie u 206 sledovaných žen a 62 kontrol, ve druhé části studie u 157 sledovaných žen a 74 kontrol. Ve třetí, poslední části studie byla genetická analýza úspěšně provedena u 170 sledovaných žen a 74 kontrol.

Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Plzni a Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví České republiky. Každá účastnice podepsala informovaný souhlas se studií.

4.1.2 Imunologické analýzy

Pro detekci aPL proti kyselině fosfatidové, fosfatidylethanolaminu, fosfatidylinositolu, fosfatidyl-DL-glycerolu a fosfatidyl-L-serinu byla použita

metoda ELISA s in-house připravenými soupravami. Polystyrénové mikrotitrační destičky byly pokryty 50 µl fosfolipidu rozpuštěného v 1 ml methanolu a ponechány přes noc vyschnout při teplotě 4 °C. Destičky byly poté blokovány roztokem fetálního telecího séra v 1 M pufru TBS (250mM Tris s 1.5M NaCl) po dobu 30 min při laboratorní teplotě. Následně byly destičky vymyty blokovacím pufrům (Na₂CO₃, NaHCO₃, NaN₃, pH 9,6). Sérum pacientek a kontrol (vždy v dubletech) bylo naředěno 1: 50 v TBS s 10 % fetálního séra a nanášeno do reagenčních jamek. Destičky byly inkubovány 2 hod při laboratorní teplotě a následně 5krát promyty TBS s 0,05% Tween 20. Potom bylo do jamek přidáno 50 µl s peroxydázou konjugované protilátky proti lidskému imunoglobulinu IgG, IgA nebo IgM a destičky byly inkubovány 1 hod při laboratorní teplotě a následně opět 5krát promyty v TBS-Tween s 0,05 % Tween 20. Do každé jamky bylo přidáno 50 µl roztoku substrátu a inkubováno ve tmě 30 min při laboratorní teplotě. Poté byla reakce zastavena přidáním 50 µl 2 M kyseliny sírové. Optická denzita byla stanovena skenerem Titertek Multiscan MCC/340 (Flow Laboratories, London, UK) při vlnové délce 492 nm. K odečtení pozadí byla použita séra všech příslušných pacientek v ředění 1:50 v identických mikrotitračních destičkách pokrytých methanolem, ale bez fosfolipidu.

Tab. 4-1 - Cut-off hodnoty pro in-house ELISA ke stanovení aPL v OD

aPL proti	třída	3 SD	95. percentil
kyselině fosfatidové	IgG	0,113	0,142
	IgM	0,138	0,151
fosfatidylethanolaminu	IgG	0,199	0,184
	IgM	0,111	0,101
fosfatidyl-DL-glycerolu	IgG	0,228	0,200
	IgM	0,225	0,252
fosfatidylinositolu	IgG	0,199	0,188
	IgM	0,151	0,149
fosfatidyl-L-serinu	IgG	0,120	0,134
	IgM	0,192	0,183

Použity byly tyto fosfolipidy: kyselina fosfatidová, fosfatidyl-L-serin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylinositol, fosfatidyl-DL-glycerol (Sigma, St. Louis, MO, USA). Cut-off hodnoty pro jednotlivé aPL a izotypy jsme stanovili na úrovni 3 SD nebo 95. percentilu kalkulovaného softwarem Statgraphics (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA).

Pro detekci dalších aPL protilátek byly použity komerční ELISA soupravy: anti-annexin V (Szabo-Scandic HandelsgmbH & Co KG, Vienna, Austria), anti-beta2-GPI (Immunotech, Praha, Česká republika), anti-kardiolipin (Organtec Diagnostika GmbH, Mainz, Germany).

Tab. 4-2 - Cut-off hodnoty pro komerční ELISA ke stanovení aPL

aPL proti	třída	IU.ml ⁻¹
annexinu V	IgG	0
beta-2-glykoproteinu I	IgG	20
	IgA	10
kardiolipinu	IgG	10
	IgM	7

Stanovení pozitivních hladin aPL bylo opakováno po 3 měsících k potvrzení diagnózy APS.

4.1.3 Genetické analýzy

Izolace genomické DNA

Vzorky genomické DNA pro všechny analýzy jsme izolovali z EDTA plné krve za použití standardních izolačních souprav Qiagen Blood Isolation Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) a Blood Isolation Kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany) podle protokolu výrobce.

Izolační soupravy využívají principu adsorpční chromatografie. Po odstranění erytrocytů lyzačním pufrem a destrukci proteinové komponenty vzorku pomocí proteázy je lyzát přenesen do mikrokolonky, ve které dojde k adsorpci DNA na membránu. Vhodná koncentrace iontů a hodnota pH přitom brání zachycení kontaminujících produktů. Následuje promytí kolonky dvěma různými pufrými, které

dále optimalizuje čistotu DNA, aniž by narušilo její vazbu na silikátovou membránu. Izolace je zakončena elucí vzorku DNA elučním pufrem do vhodné mikrozkušavky. Vzorky byly uloženy při – 18 °C až do doby analýzy.

Leidenská mutace genu pro faktor V (F5 G1691A)

Genotyp faktoru V Leiden byl stanoven in-house metodou analýzy křivky tání PCR produktu detekované rezonančním přenosem fluorescenční energie (Fluorescence Resonance Energy Transfer; FRET). Metoda detekuje změnu fluorescenčního signálu dvojice oligonukleotidových sond značených fluoroforem a zhášedlem. SONDY jsou komplementární ke dvěma těsně vedle sebe položeným sekvencím detekovaného PCR produktu. Ve fázi annealingu obou sond zhášedlo potlačuje fluorescenční signál fluoroforu, při teplotní denaturaci dochází k opětovnému nárůstu signálu. Síla vazby sondy v místě DNA varianty je ovlivněna stupněm komplementarity. V podmínkách neúplné komplementarity (mismatch) jedné z alel dochází k porušení vazby při nižší teplotě než u plně komplementární alely a analyzátor je schopen odlišit dva různé vrcholy nárůstu fluorescenčního signálu zdravé (wild-type) a mutované alely.

Sekvence oligonukleotidových primerů:

Forward primer: 5'-CCCCATTATTTAGCCAGGAG-3'

Reverse primer: 5'-ATGAGAGACATCGCCTCTGG-3'

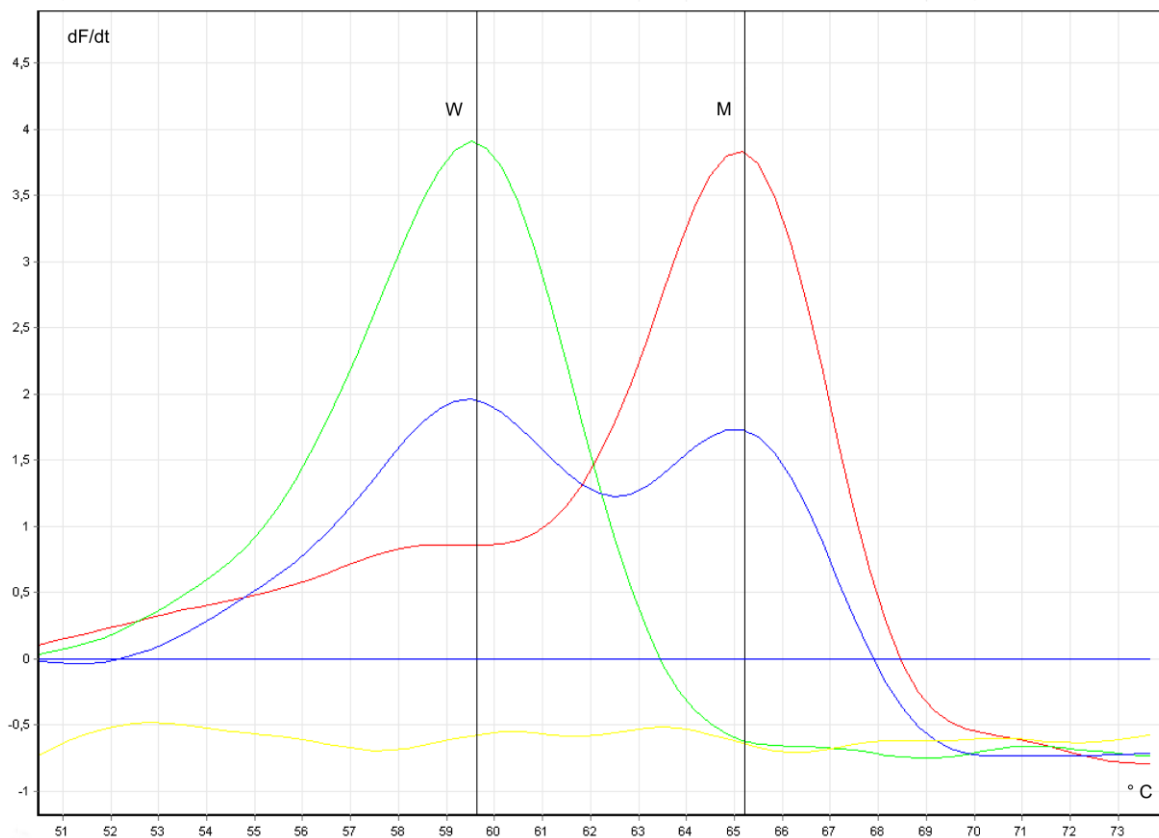
Sekvence oligonukleotidových sond:

Sonda 1: 5'-AGATCCCTGGACAGGCAAGGAATA-FAM-3'

Sonda 2: 5'-Cy5-GGTATTTTGTCTTGAAGTAACCTTTCAG-Phos-3'

PCR reakce probíhala v reakčním objemu 25 µl s výslednými koncentracemi: forward primer 1200 nM, reverse primer 120 nM, sonda 1 i sonda 2 140 nM, nukleotidy 200 µM, 2 U Taq DNA polymerázy v 1x reakčním pufru s 3 mM MgCl₂ a přidavkem 5 % DMSO, 30 ng genomické DNA.

Teplotní profil PCR reakce: počáteční denaturace 95 °C/2 min, 38 cyklů (94 °C/15 s, 54 °C/20 s, 72 °C/10 s), denaturace 95 °C/1 min, renaturace 50 °C/1 min a analýza teploty tání PCR produktu 50 - 80 °C s krokem 1 °C/3 s. Teplotní vrchol zdravé alely cca 60 °C, vrchol mutované alely cca 66 °C.



Obr. 4-1 - Analýza křivky tání PCR produktu - faktor V Leiden

Mutace genu pro methylenetetrahydrofolát reduktázu C677T a A1298C

Genotypy MTHFR C677T a A1298C byly stanoveny in-house metodou analýzy křivky tání PCR produktu detekované rezonančním přenosem fluorescenční energie (Fluorescence Resonance Energy Transfer; FRET), upravenou dle Nakamury [2002].

MTHFR C677T

Sekvence oligonukleotidových primerů:

Forward primer: 5'-TGGCAGGTTACCCCAAAGG-3'

Reverse primer: 5'-TGATGCCCATGTTCGGTGC-3'

Sekvence oligonukleotidových sond:

Sonda 1: 5'-TGAGGCTGACCTGAAGCACTTGAAGGAGAAGGTGTCT-6-FAM-3'

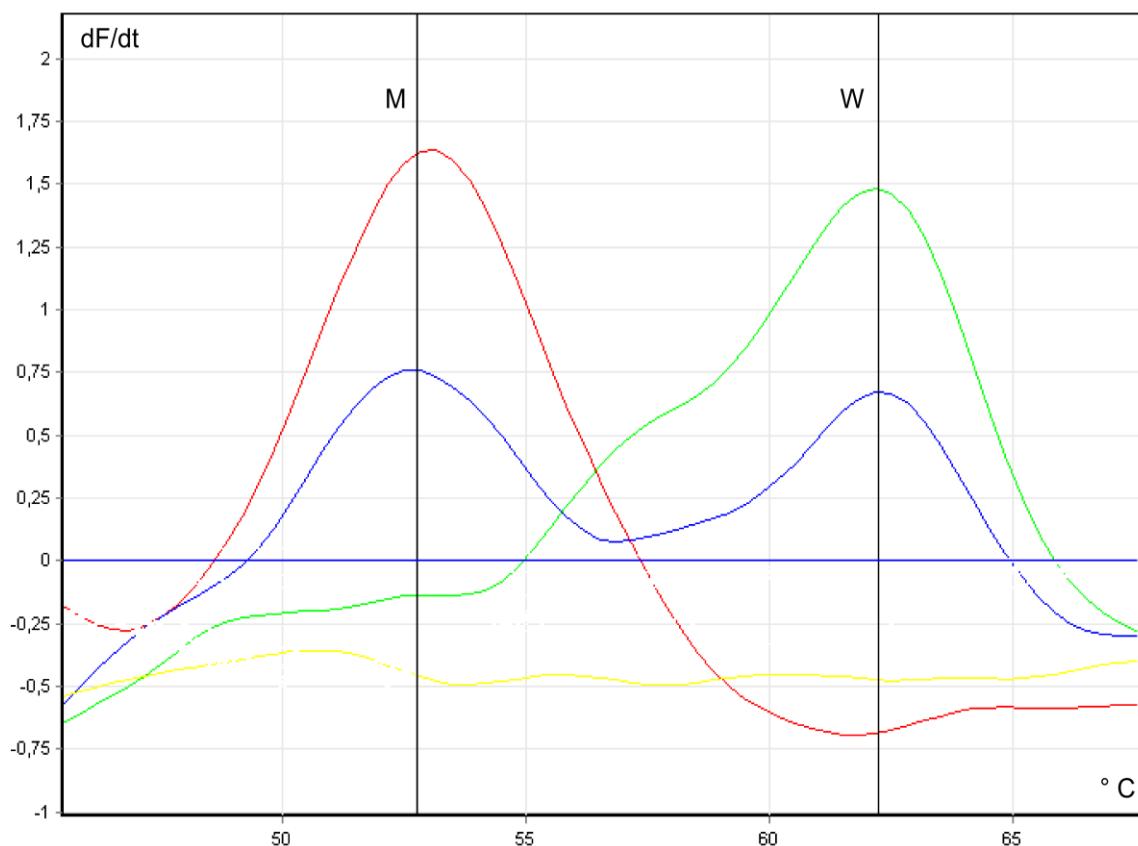
Sonda 2: 5'-Cy5-CGGGAGCCGATTTTCATCAT-Phos-3'

PCR reakce probíhala v reakčním objemu 25 μ l s výslednými koncentracemi: forward primer 80 nM, reverse primer 480 nM, sonda 1 i sonda 2 150 nM,

nukleotidů 200 μM , 2 U Taq DNA polymerázy v 1x reakčním pufru s 2,5 mM MgCl_2 a přidavkem 5 % DMSO, 60 ng genomické DNA.

Teplotní profil PCR reakce: počáteční denaturace 95 °C/2 min, 38 cyklů (94 °C/10 s, 55 °C/20 s, 72 °C/10 s), denaturace 95 °C/45 s, renaturace 40 °C/20 s a analýza teploty tání PCR produktu 45 - 71 °C s krokem 1 °C/2 s.

Teplotní vrchol mutované alely cca 54 °C, vrchol zdravé alely cca 63 °C.



Obr. 4-2 - Analýza křivky tání PCR produktu - MTHFR C677T

MTHFR A1298C

Sekvence oligonukleotidových primerů:

Forward primer: 5'-CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC-3'

Reverse primer: 5'-CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG-3'

Sekvence oligonukleotidových sond:

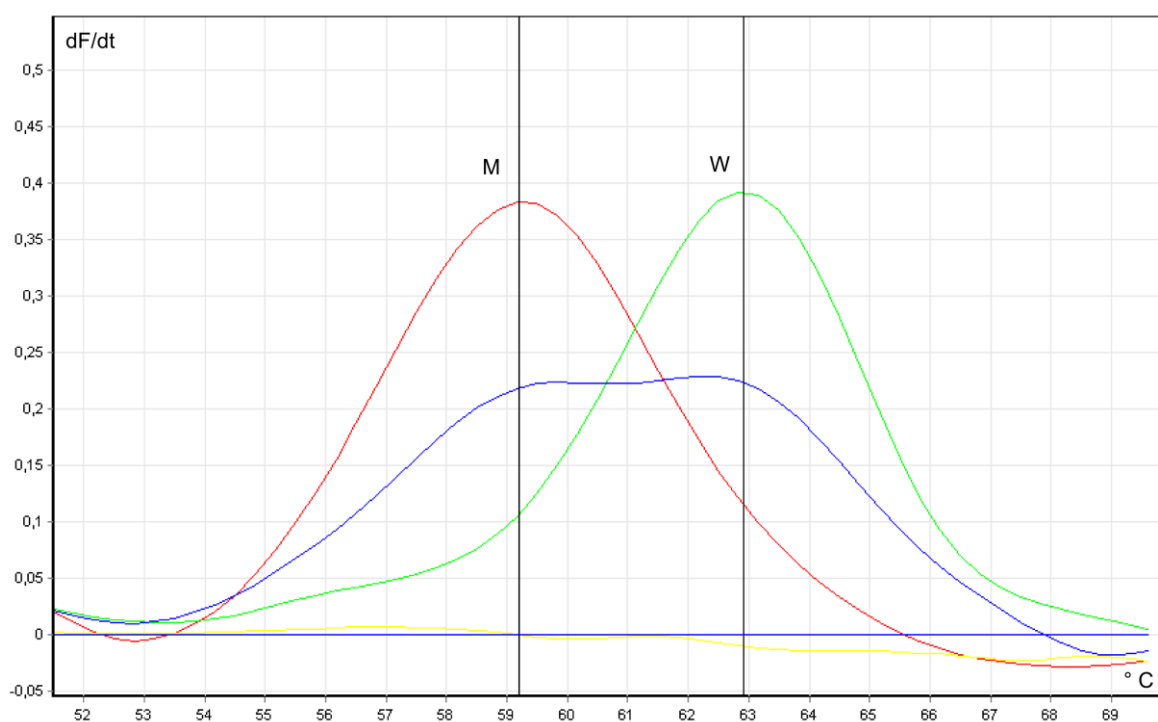
Sonda 1: 5'-AAGGAGGAGCTGCTGAAGATGTGGGGGGAGGAGCT-JOE-3'

Sonda 2: 5'-LCRed705-ACCAGTGAAGAAAAGTGTCCTTTGA-Phos-3'

PCR reakce probíhala v reakčním objemu 25 μ l s výslednými koncentracemi: forward primer 80 nM, reverse primer 480 nM, sonda 1 i sonda 2 300 nM, nukleotidy 200 μ M, 1,75 U Taq DNA polymerázy v 1x reakčním pufru s 2,5 mM $MgCl_2$ a přidavkem 5 % DMSO, 60 ng genomické DNA.

Teplotní profil PCR reakce: počáteční denaturace 95 °C/2 min, 38 cyklů (95 °C/10 s, 55 °C/20 s, 72 °C/10 s), denaturace 95 °C/45 s, renaturace 40 °C/20 a analýza teploty tání PCR produktu 55 - 75 °C s krokem 1 °C/2 s.

Teplotní vrchol mutované alely cca 59 °C, vrchol zdravé alely cca 63 °C.



Obr. 4-3 - Analýza křivky tání PCR produktu - MTHFR A1298C

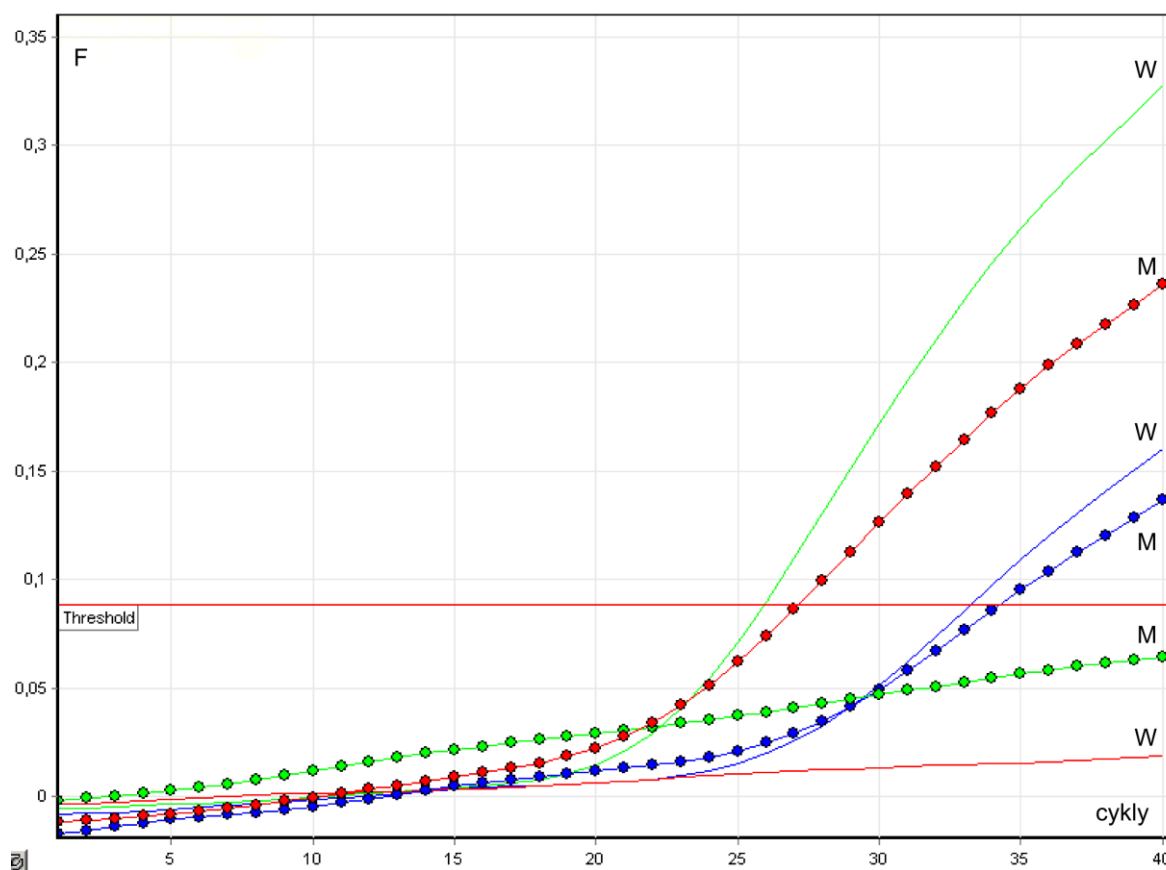
Všechny uvedené FRET analýzy byly provedeny v genetickém analyzátoru pro PCR v reálném čase Rotor-Gene 2000 (Corbett-Research, Sydney, Australia). Dodavatelé fluoroforem značených FRET sond: Biosearch Technologies, Novato, CA, USA a Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Každý běh zahrnoval pozitivní a NTC kontrolu.

Mutace genu pro faktor II G20210A

Genotyp mutace genu pro faktor II G20210A byl stanoven za použití komerční diagnostické soupravy pro PCR kvantifikaci v reálném čase QGENEFII (Institute of Applied Biotechnologies Inc., Praha, Česká republika) podle protokolu výrobce.

Sekvence oligonukleotidových primerů a sond výrobce neuvádí. Teplotní profil PCR reakce: počáteční denaturace 95 °C/8 min, 40 cyklů (95 °C/20 s, 60 °C/60 s), detekce fluorescenčního signálu amplifikačních produktů v reálném čase v průběhu amplifikace.

Analýzy byly provedeny v genetickém analyzátoru pro PCR v reálném čase Rotor-Gene 2000 (Corbett-Research, Sydney, Australia). Každý běh zahrnoval pozitivní a NTC kontrolu.



Obr. 4-4 - Analýza křivky tání PCR produktu – faktor II G20210A

Inzerčně/deleční polymorfismus PAI1 (-675)4G/5G

Genotyp inzerčního/delečního polymorfismu PAI1 (-675)4G/5G byl stanoven modifikovanou metodou PCR-RFLP podle Margaglione [1997]. V původní publikaci je v uvedené sekvenci uvedena další záměna nukleotidu (kromě původní

vytvářející štěpné místo pro restriční endonukleázu *BsII*) oproti databázi GeneBank (gi:189579, J03836.1). Z tohoto důvodu byla sekvence forward primeru modifikována tak, aby odpovídala referenční sekvenci.

Oligonukleotidové primery:

PAI1 forward: 5'-CACAGAGAGAGTCTGGCCACG-3'

PAI1 reverse: 5'-CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3'

PCR reakce probíhala v reakčním objemu 25 µl s koncentrací primerů 570 nM, nukleotidů 200 µM, 1,75 U Taq DNA polymerázy (Red Taq Polymerase, Sigma–Aldrich, MO, USA) v 1x Red Taq reakčním pufru s 1,1µM MgCl₂ a 60 ng genomické DNA.

Teplotní profil PCR reakce: počáteční denaturace 94 °C/3 min, 40 cyklů (94 °C/20 s, 56 °C/20 s, 72 °C/20 s) a závěrečná extenze PCR produktu 72 °C/5 min.

Výsledný PCR produkt byl štěpen restriční endonukleázou *BsII* podle protokolu výrobce (Fermentas Thermofisher Scientific, MA, USA). Fragmenty byly vizualizovány na 3% agarózovém gelu značeném GelRed. Alela (-675)5G byla detekována podle fragmentu velikosti 77 bp, alela (-675)4G podle produktu velikosti 98 bp.

Mutace PROZ intron F G79A, PROZ A(-13)G, PROZ R255H

Genotypy polymorfismů genu pro protein Z - PROZ intron F G79A, PROZ A(-13)G a PROZ R255H byly stanoveny klasickou metodou PCR-RFLP.

Oligonukleotidové primery:

G79A - forward: 5'-TAACACCATAGACAGAGTCCGATATTCGC-3'

G79A - reverse: 5'-ATGAACTCGGCATTAGAACATGGTTGGAA-3'

A13G - forward: 5'-GGGTCCTCTGAGCCTTCACCGTTCATTT-3'

A13G - reverse: 5'-CAGGCACAACAGACAGGTAAGCCAGATG-3'

R255H - forward: 5'-GAACGAGCCAAGACCCGCTGATGATCAAGA-3'

R255H - reverse: 5'-CGCTGAGGAGGCCCTGGCG-3'

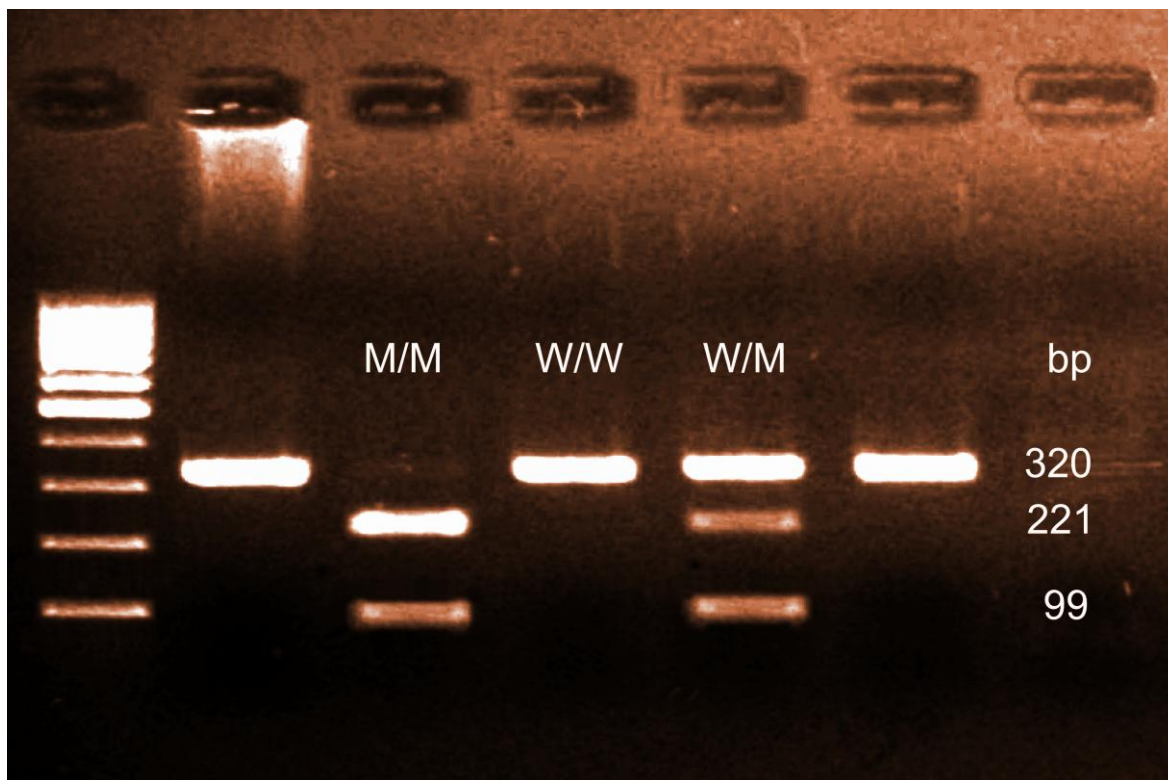
PCR reakce probíhaly zvlášť pro každý pár primerů v celkovém reakčním objemu 25µl. Všechny PCR reakční směsi měly stejné koncentrace: primery 280 nM, nukleotidy 200 µM, 1,25 U Taq DNA polymerázy (Red Taq Polymerase,

Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) v 1x Red Taq reakčním pufru s 1,1 μ M MgCl₂ a 60 ng genomické DNA. Pro mutace G79A and R255H bylo nutné zvýšit koncentraci hořečnatých iontů přidáním 0,5 μ l 25mM MgCl₂.

PCR reakce ke stanovení všech tří mutací probíhaly při stejném teplotním profilu: počáteční denaturace 95 °C/3 min, 35 cyklů (95 °C/1 min, 65 °C/1 min, 72 °C/1 min) a závěrečná extenze PCR produktu 72 °C/7 min. Velikost získaných PCR produktů činila 320 bp (intron F G79A), 272 bp pro variantu A(-13)G a 204 bp (R255H).

PCR produkt byl štěpen příslušnými restrikcími endonukleázami: *KspAI* pro mutaci int. F G79A a *HhaI* pro mutace A(-13)G a R255H podle protokolu výrobce (Fermentas Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Fragменты byly vizualizovány na 2,5% agarózovém gelu značeném GelRed. Alela int. F 79A byla štěpena do dvou fragmentů o velikosti 221 bp a 99 bp, alela (-13)G do fragmentů 157 bp a 115 bp a alela 255H do fragmentů 184 bp a 20 bp.

Všechny PCR-RFLP reakce byly provedeny na PCR cyklerech T-personal (Biometra GmbH, Goettingen, Germany) nebo Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Každý běh zahrnoval pozitivní a NTC kontrolu.



**Obr. 4-5 – Ukázka výsledku RFLP analýzy na agarózovém gelu -
- PROZ intron F G79A**

4.1.4 Statistická analýza

Ze získaných dat byly kalkulovány frekvence výskytu aPL, alelické frekvence sledovaných genových variant a distribuce genotypů. Pro účely statistického hodnocení v první části studie (vyšetření aPL a klasických trombofilních mutací) byly definovány následující pojmy: trombofilní faktor (TF) – přítomnost jakékoli mutované alely sledovaných genů a trombofilní stav (TS) – přítomnost mutace FV Leiden v heterozygotním nebo homozygotním stavu, mutace FII G20210A v heterozygotním nebo homozygotním stavu, MTHFR C677T nebo A1298C v homozygotním stavu, složená heterozygotie MTHFR 677T/1298C nebo jakákoli kombinace výše uvedených genotypů. Shoda sledovaného souboru a kontrol a korelace mezi aPL a trombofilními faktory byly testovány chí-kvadrát testem a Fisherovým exaktním testem. Hladinu významnosti $p < 0,05$ jsme považovali za statisticky významnou. Ke statistické analýze jsme použili software NCSSjr. (NCSS, Kaysville, UT, USA).

4.2 Výsledky

4.2.1 Antifosfolipidové protilátky a trombofilní mutace

Výsledky první části studie prokázaly vysoký výskyt aPL proti fosfatidylinositolu (17 % pozitivních pacientek se 2 RPLa téměř 20 % ve skupině 3 a více RPL) a proti fosfatidyl-L-serinu (25 % pozitivních pacientek se 2 RPL a 19 % ve skupině se 3 a více RPL), jak znázorňuje tabulka 4-3.

Převažovaly protilátky ve třídě IgG. V kontrolní skupině pouze čtyři ženy vykazovaly velmi nízké nesignifikantní hladiny protilátek: dvě aPL proti kardiolipinu ve třídě IgM a po jedné aPL proti fosfatidyl-DL-glycerolu, respektive beta2-GPI.

Tab. 4-3 - Frekvence výskytu sérových aPL u 112 pacientek se dvěma RPL, 94 pacientek se 3 – 8 RPL a u zdravých kontrol

aPL proti:	třída	2 RPL (n=112)		3 – 8 RPL (n=94)		kontroly (n=84)	
		n	%	n	%	n	%
kyselině fosfatidové	IgG	9	8,0	7	7,4	0	0
	IgM	3	2	0	0	0	0
fosfatidylethanolaminu	IgG	11	9,8	8	8,5	0	0
	IgM	2	1,1	0	0	0	0
fosfatidyl-DL-glycerolu	IgG	2	1,8	5	5,3	1	1,2
	IgM	1	0,5	0	0	0	0
fosfatidylinositolu	IgG	16	17	22	19,6 *	0	0
	IgM	1	0,5	1	3,5	0	0
fosfatidyl-L-serinu	IgG	28	25 *	17	18	0	0
	IgM	2	0,5	1	3,5	0	0
kardiolipinu	IgG	8	4,5	3	10,3	0	0
	IgM	1	1,1	0	0	4	4,8
beta-2-glykoproteinu I	IgA	10	8,9	3	2	1	1,2
	IgG	1	0,5	0	0	0	0
annexinu V	IgG	5	4,5	7	7,4	0	0

Pozn.: * $p < 0,01$

Grafické znázornění frekvence sledovaných antifosfolipidových protilátek v sledovaném souboru a u kontrol viz Příloha 9.2.

Trombofilní mutace

Alelické frekvence a distribuci genotypů klasických trombofilních mutací u 206 pacientek se dvěma až osmi RPL uvádí tabulka 4-4. Alelické frekvence ve skupině se 2 RPL i ve skupině se 3 – 8 RPL se významně nelišily od hodnot zjištěných u kontrol ani od frekvencí udávaných pro běžnou populaci České republiky [Raušová, 2005; Veselá, 2005]. Také u distribuce genotypů sledovaných mutací jsme nezjistili statisticky významný rozdíl oproti kontrolnímu souboru ve skupině se 2 RPL ani se 3 – 8 RPL.

Tab. 4-4 - Genotypy a alelické frekvence u 206 pacientek se 2 – 8 RPL a u kontrol

alelická varianta	3 – 8 RPL (n=94)				2 RPL (n=112)				kontroly (n=62)				frekvence v obec. populaci			
	W/ W	M/ M	n	alelická frekvence	W/ W	M/ M	n	alelická frekvence	W/ W	M/ M	n	alelická frekvence		W/ W	M/ M	n
Faktor V Leiden	87	7	0	0,04	101	10	1	0,05	55	6	1	0,07	8	8	0,05	
F II G20210A	92	2	0	0,01	111	1	0	0,005	61	1	0	0,008	1	1	0,015	
MTHFR C677T	40	45*	9	0,34	44	52*	16	0,38	26	31	5	0,33	41	41	0,34	
MTHFR A1298C	49	41*	4	0,26	60	43*	9	0,27	28	26	8	0,34	42	42	0,33	

Pozn.: * včetně 37 složených heterozygotů 677T/1298C

Frekvence aPL v TS pozitivních a negativních skupinách jsou uvedeny v tabulce 4-5. Ve skupině se 3 a více RPL byly ze 43 aPL pozitivních žen 24 TS pozitivní a 19 TS negativních. Oproti tomu z 51 aPL negativních žen bylo pouze 15 TS pozitivních a 36 TS negativních. Ve skupině 3 – 8 RPL jsme tak pozorovali silnou pozitivní korelaci aPL pozitivity a trombofilního stavu ($p < 0,01$). Tento výsledek se ve skupině se 2 RPL neopakoval.

Tab. 4-5 - Distribuce osmi antifosfolipidových protilátek a trombofilního stavu (TS) u 206 pacientek s RPL

	3 – 8 RPL (n=94)			2 RPL (n=112)		
	aPL pozitivní	aPL negativní		aPL pozitivní	aPL negativní	
TS poz.	24	15	p<0,01	29	25	p=0,37
TS neg.	19	36		36	22	

V souboru všech sledovaných 206 pacientek 50 % vykazovalo pozitivitu alespoň jedné antifosfolipidové protilátky a u téměř 90 % byl přítomen alespoň jeden trombofilní faktor. Současný výskyt aPL a alespoň jednoho trombofilního faktoru byl pozorován u 43 % pacientek. Pouze u osmi pacientek s RPL nebyl přítomen žádný rizikový faktor. V kontrolním souboru bylo pouze 6 % žen aPL pozitivních, což je statisticky významně nižší hodnota v porovnání se skupinou pacientek s RPL ($p < 0,01$), zatímco frekvence pozitivity trombofilních faktorů se od skupiny pacientek statisticky nelišila (tabulka 4-6).

Tab. 4-6 - Kodistribuce aPL a trombofilních faktorů (TF) u 206 pacientek s RPL

	2 – 8 RPL (n=206)		kontroly (n=62)	
	n	%	n	%
aPL	103*	50,0	4*	6,5
TF	183	88,8	56	90,3
aPL i TF	89	43,2	3	4,8
žádný faktor	8	3,8	5	8,1

Pozn.: * $p < 0,01$

4.2.2 Antifosfolipidové protilátky a PAI1 (-675)4G

Frekvenci alely PAI1 (-675)4G a distribuci genotypů ve skupině 157 pacientek se dvěma až osmi RPL a a v souboru 74 zdravých kontrol ukazuje tabulka 4-7. Alela PAI1 4G byla pozorována u 134 (85 %) ze 157 sledovaných žen a u 64 (87 %) ze 74 kontrol, což odpovídalo kalkulované alelické frekvenci 0,607 a 0,500. V skupině s RPL však bylo zachyceno 59 (38 %) 4G/4G homozygotů oproti pouhým 10 (14 %) v souboru kontrol, distribuce genotypů byla statisticky vysoce významně odlišná ($p < 0,0005$).

Tab. 4-7 - Distribuce genotypů a alelická frekvence PAI1 (-675)4G/5G u 157 pacientek s RPL a 74 kontrol

	2 – 8 RPL (n=157)				kontroly (n=74)					
alelická varianta	W/W	W/M	M/M	n	alelická frekvence	W/W	W/M	M/M	n	alelická frekvence
PAI1 (-675)4G	23	75	59 *	193	0,615	10	54	10 *	74	0,500

Pozn: * $p < 0,0005$

Frekvence pozitivních aPL ve skupině s homozygotním 4G/4G genotypem oproti ženám s jiným genotypem uvádí tabulka 4-8. Ve skupině žen s 3 – 8 RPL mělo z 26 4G/4G pozitivních žen 15 pozitivní a 11 negativní nález aPL, zatímco u celkem 43 4G/5G heterozygotů a 5G/5G homozygotů byly 21 aPL pozitivní a 22 aPL negativní. Podobný nález jsme učinili ve skupině se 2 RPL, kdy z 33 4G/4G pozitivních žen bylo 17 aPL pozitivních a 16 aPL negativních, zatímco u celkem 55 4G/5G heterozygotů a 5G/5G homozygotů byly 31 aPL pozitivní a 24 aPL negativní. Korelace mezi PAI1 (-675)4G/4G homozygotním genotypem a pozitivitou aPL nebyla zjištěna.

Tab. 4-8 - Distribuce osmi aPL a PAI1 (-675)4G/4G genotypu u 157 pacientek s RPL

	3–8 RPL (n=69)			2 RPL (n=88)		
PAI1 (-675) 4G/4G	aPL pozitivní	aPL negativní		aPL pozitivní	aPL negativní	
pozitivní	15	11	$p=0,480$	17	16	$p=0,660$
negativní	21	22		31	24	

4.2.3 Mutace v genu PROZ

Distribuce genotypů a alelické frekvence sledovaných mutací genu PROZ a alelické frekvence v souboru 170 žen s 2 – 8 RPL jsou uvedeny v tabulce 4-9. Alelické frekvence mutací PROZ intron F G79A, PROZ A(-13)G a PROZ R255H a distribuce genotypů v souboru sledovaných žen s RPL se statisticky významně nelišily od hodnot kontrolního souboru. Při testování mutace PROZ R255H byl zachycen trend k vyššímu zastoupení mutované alely 255H ve sledovaném souboru ($p=0,060$).

Tab. 4-9 - Distribuce genotypů a alelické frekvence mutací PROZ u 170 pacientek se 2 – 8 RPL a 74 kontrol

alelická varianta PROZ	2 – 8 RPL (n=170)					kontroly (n=74)				
	W/W	W/M	M/M	n	alelická frekvence	W/W	W/M	M/M	n	alelická frekvence
int. F G79A	105	60	5	70	0,206	37	31	6	43	0,291
A(-13)G	138	31	1	33	0,097	67	6	1	8	0,054
R255H	142	27	1	29	0,085	70	4	0	4	0,027

Vzhledem k tomuto zachycenému trendu jsme testovali také vztah pozitivních aPL a mutace PROZ R255H v heterozygotním či homozygotním stavu (tabulka 4-10). Korelace mezi přítomností mutace PROZ R255H nebyla zjištěna ve skupině žen se 2 RPL ani ve skupině se 3 – 8 RPL.

Tab. 4-10 - Distribuce osmi aPL a mutace PROZ R255H u 170 pacientek s RPL

PROZ R255H	3–8 RPL (n=78)		p	2 RPL (n=92)		p
	aPL pozitivní	aPL negativní		aPL pozitivní	aPL negativní	
pozitivní	6	7	0,542	10	5	0,276
negativní	36	29		39	38	

5 Diskuze

5.1 aPL, klasické trombofilní mutace a RPL

Ve fyziologické graviditě je imunitní systém organismu těhotné konfrontován s velkým počtem autoimunních i alloimunních antigenů a pro úspěšný průběh gravidity musí být jeho činnost modulována. Imunologické a zejména autoimunitní mechanismy těhotenských ztrát jsou podrobně studovány řadou autorů [McIntyre, 2003; Kwak, 1994; Ulčová-Gallová, 2005b; Shoenfeld, 2006; Mackworth-Young, 2004]. Přítomnost antifosfolipidových protilátek jako známky autoimunitní dysfunkce u klinicky asymptomatických pacientek je považována za jednu z příčin reprodukčního selhání a někteří autoři předpokládali imunologickou etiologii idiopatických těhotenských ztrát až v 80 % případů [Coulam, 1997].

Antifosfolipidové protilátky v graviditě účinkují řadou patogenetických mechanismů. Centrální role byla přisuzována mikrotrombóze, kdy interakce antifosfolipidových protilátek s endoteliálními buňkami a trombocyty vede k poruše cévního zásobení na podkladě placentárních trombóz. Novější studie se zaměřují mimo jiné i na nový mechanismus vzniku arteriální trombózy deciduálních cév na podkladě prokoagulační aktivity monoklonální antifosfolipidové protilátky CIC15 [Poindron, 2011]. Dalšími navrhovanými mechanismy jsou odstranění annexinu V z povrchu trofoblastu, vedoucí k odhalení prokoagulačního povrchu [Rand, 1997], abnormální endovaskulární invaze trofoblastu do deciduálních cév [Sebire, 2002], aPL indukovaná aktivace komplementu, vedoucí k poškození fétu [Girardi, 2004]. Význam annexinu V zdůrazňuje i studie popisující téměř čtyřnásobné (OR 3,88) zvýšení rizika RPL u nosiček haplotypu M2 promotorové oblasti genu pro annexin V [Bogdanova, 2007].

Navrženy byly i další mechanismy: přímá vazba aPL v místě implantace k trofoblastu anebo k placentárním antigenům, vytvářející možnost netrombotického poškození fétu [Shapiro, 1994; Mackworth-Young, 2004].

V první části předkládané studie jsme testovali rozšířený panel osmi aPL. Ve sledovaném souboru žen s RPL byla prokázána přítomnost alespoň jedné aPL v 50 % oproti 6,5 % u žen kontrolního souboru. Tento rozdíl je statisticky vysoce významný a odpovídá hypotéze, že přítomnost antifosfolipidových protilátek je rizikovým faktorem RPL.

Nejvyšší frekvence byla zachycena u protilátky proti fosfatidyl-L-serinu ve třídě IgG (25 % ve skupině se 2 RPL a 18 % ve skupině se 3 – 8 RPL oproti 0 % v kontrolní skupině; $p < 0,01$). Druhým statisticky významným nálezem byla frekvence protilátky proti fosfatidylinositolu ve třídě IgG (17 % ve skupině se 2 RPL a 19,6 % ve skupině se 3 – 8 RPL oproti 0 % v kontrolní skupině; $p < 0,01$). Tento nález je v souladu s dříve publikovanými daty. Na rozdíl od protilátek proti kardiolipinu, představujícím směs různých antigenních epitopů, které mohou vykazovat zkříženou reaktivitu, může být vysoká hladina jednotlivých aPL významným markerem latentního autoimunitního procesu [Ulčová-Gallová, 2005a].

Častým předmětem výzkumu jsou i protilátky proti beta-2-glykoproteinu I. Jedná se o protein vytvářející komplexy s tkáňovými fosfolipidy, který v *in vitro* pokusech vykazuje schopnost inhibovat vnitřní hemokoagulační systém. Někteří autoři navrhovali využití testu přítomnosti protilátek proti beta2-GPI jako prognostického faktoru porodnického APS, jeho senzitivita je však nižší než přítomnost jednotlivých protilátek proti fosfolipidům samotným [Franklin, 2000]. V našem souboru byly protilátky proti beta2-GPI ve třídě IgA zachyceny pouze ve 2 % ve skupině s 3 – 8 RPL a v 8,9 % ve skupině se 2 RPL. Tyto hodnoty nebyly statisticky významně odlišné proti zdravým kontrolám (1,2 %).

Pozornosti autora neunikla relativně vysoká souhrnná frekvence aPL v kontrolním souboru zdravých žen - 6,5 %. Tato hodnota je vyšší než obvykle udávaná bazální frekvence kolem 2 % u zdravých žen [Ruiz-Irastorza, 2010]. Jednalo se o nízké hodnoty běžných aPL u čtyř subjektů (jedenkrát aPL proti kardiolipinu ve třídě IgM, dvakrát proti beta2-GPI a jedenkrát proti fosfatidyl-DL-glycerolu, vždy ve třídě IgG). Tento nález není statisticky významný a kromě možné nespecifické reaktivity aPL proti kardiolipinu jej lze nejpravděpodobněji vysvětlit relativně malou velikostí kontrolního souboru.

Názor, že mutace genů kódujících proteiny aktivní v hemokoagulačním systému (např. FV Leiden, faktor II G20210A, faktor XIII V34L, vzácné dominantní mutace v genech pro antitrombin III, protein C a protein S) a fibrinolytickém systému (např. PAI1 (-675)4G/5G) jsou příčinou dědičné trombofilie a mohou představovat rizikový faktor RPL, protože prohlubují přirozený hyperkoagulační stav organismu těhotné ženy v oblasti kontaktu matky a fétu, je obecně přijímán [Abbate, 2002; Coulam, 2006; Kutteh, 2006]. Nedávná studie více než 90 genových mutací a polymorfismů, do které byly zahrnuty i geny výše uvedených systémů však jejich vztah s RPL jednoznačně neprokázala [Rull, 2012].

Leidenská mutace genu pro koagulační faktor V je považována za nejčastější dominantní mutaci vedoucí k hyperkoagulačnímu stavu v kavkazoidní populaci. Její vztah k pozdním fetálním ztrátám je považován za prokázaný, vztah k časným těhotenským ztrátám a RPL někteří autoři nepotvrdili [Abbate, 2002]. Recentní metaanalýza publikované literatury [Bradley, 2012] však prokazuje vysokou analytickou senzitivitu a specifitu genetického testování FV Leiden a zvýšené riziko RPL u jejích nosiček (OR 2,02, resp 1,93 v průřezových a longitudinálních studiích). Dobře dokumentována je také synergistická role FV Leiden s dalšími dědičnými i environmentálními rizikovými faktory, indukujícími hyperkoagulační stav [Kutteh; 2006].

Vztah mezi heterozygotním nosičstvím mutace faktoru II G20210A a RPL zůstává předmětem diskuze zvláště pro její nízkou frekvenci v obecné populaci i ve sledovaných souborech žen s RPL [Abbate, 2002; Coulam, 2006]. Také zde integrace výsledků velkého počtu studií posiluje názor, že přítomnost mutace F II G20210A zvyšuje riziko RPL s obdobným poměrem šancí jako u Leidenské mutace [Bradley, 2012].

Dalším v minulosti podrobně studovaným faktorem jsou polymorfismy genu pro methylenetetrahydrofolát reduktázu C677T a A1298C. Varianta MTHFR C677T je významným determinantem hyperhomocysteinémie a plazmatických koncentrací folátů v české populaci. V homozygotním stavu je spojována s rizikem arteriální a kapilární trombozy [Veselá, 2005]. Vztah heterozygotního, ale i homozygotního genotypu MTHFR C677T a RPL je diskutabilní, některé průřezové studie uvádějí korelaci v souborech žen s RPL oproti kontrolám [Coulam, 2006], většina autorů však jejich asociaci s RPL odmítá. Varianta MTHFR A1298C neovlivňuje významně hladiny folátů a její vztah k RPL není prokázán [Makino, 2004].

V naší studii nebyly prokázány statisticky významné rozdíly mezi frekvencí čtyř klasických trombofilních mutací (faktor V Leiden, faktor II G20210A, MTHFR C677T a A1298C) mezi sledovaným souborem 206 žen s 2 – 8 RPL a souborem zdravých kontrol. Zjištěné alelické frekvence a distribuce genotypů se neodlišovaly od zdravých kontrol ani od obecných frekvencí stanovených pro českou populaci [Raušová, 2005; Veselá 2005]. Tento výsledek není vzhledem k široké variabilitě výsledků publikovaných studií v rozporu s dosavadním stavem poznání a přispívá k názoru, že testování všech klasických trombofilních mutací není ve vyšetřovacím schématu pacientek s RPL jednoznačným přínosem. V současnosti uplatňované společné doporučení České společnosti pro trombozu a hemostázu a Společnosti lékařské genetiky České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně

ke genetickému testování trombofilních mutací omezuje indikaci testování u žen s opakovanými těhotenskými ztrátami pouze na faktor V Leiden a mutaci faktor II G20210A, a to pouze u žen se třemi a více ztrátami [Kvasnička, 2010].

Za nejzajímavější zjištění první části naší studie považujeme pozorování vztahu mezi výskytem trombofilního stavu a pozitivitou antifosfolipidových protilátek. Vzhledem ke slabým asociacím vyvolávajících faktorů a RPL se obecně předpokládá multifaktoriální model etiologie RPL [Christiansen, 2008] a ve studiích je často volena cesta zvyšování počtu testovaných genetických mutací [Coulam, 2006]. Pokud je však autorovi práce známo, žádná publikovaná studie se dosud nezabývala vzájemným vztahem aPL a trombofilních mutací u pacientek s RPL.

Výsledky naší studie ukázaly, že 96 % žen ze sledovaného souboru bylo pozitivních buď z hlediska přítomnosti některé aPL, nebo některého ze sledovaných trombofilních faktorů. Kombinace obou faktorů byla přítomna u 43 % žen. Frekvence genotypů, které patří mezi obecně přijímané trombofilní stavy (např. faktor V Leiden a mutace faktoru II G20210A v heterozygotním i homozygotním stavu či homozygotní genotyp MTHFR 677TT) byla ve sledovaném souboru zachycena u 93 žen (45 %). Statistickou analýzou byla zjištěna vysoce pozitivní korelace mezi přítomností aPL a pozitivním trombofilním stavem ve skupině s 3 – 8 RPL. aPL a trombofilní mutace tedy nemusí představovat skutečně nezávislé faktory v multifaktoriálním modelu RPL. To by mohlo být vysvětleno například mechanismem opakovaných mikrotrombóz, vznikajících na podkladě dědičného trombofilního stavu a vedoucích ke vzniku nekróz, prezentujících antigeny fosfolipidů buněčných membrán a souvisejících proteinů imunitnímu systému, reagujícímu zvýšenou tvorbou aPL. Korelace mezi hladinami aPL a přítomností dědičných trombofilii by mohla dále oslabovat potřebu genetického testování u žen s RPL a zvyšovat význam vyšetření imunologických. Bez dalších studií, které by toto pozorování potvrdily či vyvrátily, však zůstává navržená úvaha na úrovni domněnek.

5.2 Polymorfismus PAI1 (-675)4G/5G a RPL

Z proteinů aktivních ve fibrinolytickém systému patří inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 k nejvíce studovaným. V genu PAI1 bylo nalezeno několik funkčních polymorfismů, které jsou jasně spojeny se zvýšenou expresí genu, zvýšenou hladinou proteinu PAI-1 a zvýšeným rizikem trombóz, zvláště u pacientů

s dalšími protrombotickými faktory, např. klasickými dědičnými trombofiliemi [Tsantes, 2008].

Také v graviditě je fyziologický prokoagulační stav zprostředkován nejen nárůstem hladin hemokoagulačních faktorů, ale i omezením fibrinolýzy. Placenta si však zachovává v zájmu cévního zásobení plodu normální fibrinolytickou funkci, která může být v případě změny hladin PAI-1 narušena. [Kruithof, 1987; Glueck, 2001]. Homozygotní genotyp 4G/4G polymorfismu PAI1 (-675)4G/5G vede ke zvýšení hladiny proteinu PAI-1 až o 25 % [Lane, 2000].

Glueck [2001] publikoval zvýšenou frekvenci PAI1 4G/4G genotypu (OR 2,0) v souboru 94 žen s pozdními komplikacemi gravidity, jiní autoři tento náleznepotvrdili [Wolf, 2003]. Jako první označila genotyp PAI1 4G/4G za rizikový faktor RPL Dossenbach-Glaninger [2003].

Také výsledky naší studie prokazují statisticky významnou asociaci homozygotního genotypu PAI1 4G/4G s RPL. Ve skupině s RPL bylo zachyceno 59 (38 %) 4G/4G homozygotů oproti pouhým 10 (14 %) v souboru kontrol ($p < 0,0005$). Také výsledky dalších novějších studií naznačují, že asociace PAI1 4G/4G genotypu s RPL je silná [Jeddi-Tehrani, 2011; Ozdemir, 2012]. Význam tohoto polymorfismu jako rizikového faktoru pro poruchu fibrinolýzy zdůraznila i metaanalýza studií zahrnující 126525 pacientů s trombotickou příhodou [Fechtel, 2011].

Ačkoli v našem souboru byla zjištěna vysoká frekvence aPL i homozygotního genotypu PAI1 4G/4G, analýza neprokázala mezi těmito dvěma faktory statisticky významnou asociaci. Na rozdíl od výše uvedené teorie indukce tvorby protilátek mikrotrombózami by zde mohl důvod spočívat ve funkci proteinu PAI-1 ve fibrinolytickém, nikoli hemokoagulačním systému. Studie spojitosti aPL positivity a polymorfismu PAI1 (-675)4G/5G u těhotných neexistují. Honig [2010] popsal izolovaný případ pacientky se čtyřmi potraty ve druhém trimestru gravidity, u které kromě PAI1 4G/4G genotypu nebyl nalezen žádný rizikový faktor. V další graviditě u pacientky došlo k rozvoji porodnického APS.

5.3 Mutace PROZ a RPL

Studie mutací genu pro protein Z představují relativně novou problematiku a snížená hladina proteinu Z je považována především za kofaktor jiných známých trombofilních faktorů jako FV Leiden, F II G20210A nebo hyperhomocysteinémie. Některé publikace spojují deficit PZ s komplikacemi gravidity, jako jsou časné

těhotenské ztráty a předčasný porod [Dörner, 2005; Effraimidou, 2009], i s rizikem arteriálních trombóz u antifosfolipidového syndromu [Paidas, 2005; Vasse, 2008].

Problematické se zdá zachycení vztahu mezi hladinou cirkulujícího proteinu Z a genetickými variantami PROZ [El-Hamid, 2011]. Topalidou [2009] potvrtil asociaci hladiny proteinu Z, ale nikoli přítomnosti mutace PROZ intron F G79A s RPL. Provedená literární rešerše nenalezla studie, zabývající se vztahem vyšetřovaných mutací genu PROZ A(-13)G a R255H a RPL. V současné době se pozornost přesouvá i na gen pro další protein, s kterým protein Z vytváří funkční komplex, protein Z-dependentní inhibitor proteáz (SERPINEA10, ZPI). AlShaikh [2012] ukázal, že deletorní mutace R67X a V303X genu ZPI významně asociují s RPL.

V námi sledovaném souboru nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi alelickými frekvencemi ani distribucí genotypů sledovaných mutací PROZ intron F G79A, PROZ A(-13)G ani PROZ R255H mezi sledovaným souborem žen s RPL a kontrolním souborem. Pozorovaný trend k vyššímu zastoupení mutace PROZ R255H ve sledovaném souboru by mohl naznačovat její asociaci s RPL a pozorování bude třeba ověřit na větším souboru pacientek. Také vztah mezi přítomností mutace PROZ R255H a pozitivitou aPL se nám ve sledovaném souboru prokázat nepodařilo.

5.4 Přínosy a omezení práce, budoucí směry výzkumu

Imunologická část studie těží z širokého laboratorního zázemí jedinečných in-house metodik, které ve sledovaném souboru umožnily testování širokého panelu antifosfolipidových protilátek. V budoucnosti lze předpokládat další zvyšování významu laboratorních testů zaměřených na přímé stanovení genových produktů (proteinů) a funkčních testů, které při znalosti patofyziologie studovaného problému na úrovni funkčních drah a sítí mohou s menšími náklady zajistit vysokou klinickou validitu vyšetřovací metody.

Lze také předpokládat další rozšiřování spektra vyšetřovaných protilátek proti novým antigenům jako například aPL proti mitochondriálnímu kardiolipinu, kyselině lyso(bis)fosfatidové nebo vimentinu [Alessandri, 2011]. Překvapivým, ale do komplexnosti problematiky zapadajícím zjištěním byl také záchyt autoprotilátek proti proteinu Z v souboru žen s RPL [Sater, 2011].

Omezení genetické části studie spočívají v relativně nízkém počtu vyšetřovaných faktorů na relativně malém souboru. Jedna z možností budoucího

výzkumu se zdá být rozšíření studia výskytu mutací genu PROZ, zvláště mutace R255H, na větší soubor žen s RPL, které by mohlo umožnit potvrzení pozorovaného trendu a průkaz asociace těchto mutací s RPL.

Souvisejícím omezením genetické části studie je dočasná nemožnost technicky udržet tempo s extrémně rychlým vývojem poznání a technických přístupů ke studovanému problému. Od doby plánování studie, založené na testování malého počtu vybraných dlouho známých i nověji popsanych genových mutací a polymorfismů, došlo v oblasti technologie genetického testování k obrovskému pokroku.

Nástup technologie výzkumu genomických variant na principu arrayCGH a sekvenování příští generace a rychlý rozvoj infromatických nástrojů umožňujících rychlé vyšetření celých individuálních genomů, proteomů, metabolomů a mutomů, efektivní konstrukci celogenomových asociačních studií i nenákladnou organizaci rozsáhlých metaanalýz digitálně uložených dat pravděpodobně v blízké budoucnosti umožní odhalení složitých závislostí, které - po ověření dalšími metodami – přispějí k získání nových detailních poznatků o etiologii a patogenezi řady onemocnění, k vyhledávání nových biomarkerů a zavádění nových efektivních terapeutických postupů.

6 Závěry

Z výsledků předkládané práce na souboru pacientek s opakovanými těhotenskými ztrátami lze vyvodit následující závěry:

1. část

- **prokázali jsme** statisticky významné zvýšení hladin plazmatické protilátky proti fosfatidyl-L-serinu ve třídě IgG ($p < 0,01$)
- **prokázali jsme** statisticky významné zvýšení hladin plazmatické protilátky proti fosfatidylinositolu ve třídě IgG ($p < 0,01$)
- **neprokázali jsme** změny v alelických frekvencích a distribuci genotypů vyšetřovaných klasických trombofilních mutací
- **prokázali jsme** vysoce pozitivní korelaci mezi klasickým geneticky podmíněným trombofilním stavem a pozitivními hladinami antifosfolipidových protilátek ve skupině se 3 – 8 RPL ($p < 0,01$)

2. část

- **prokázali jsme** statisticky vysoce významné zvýšení frekvence homozygotního genotypu 4G/4G polymorfismu PAI1(-675)4G/5G ($p < 0,0005$)
- **neprokázali jsme** korelaci mezi distribucí homozygotního genotypu 4G/4G polymorfismu PAI1(-675)4G/5G a pozitivními hladinami antifosfolipidových protilátek

3. část

- **neprokázali jsme** změny v alelických frekvencích a distribuci genotypů vyšetřovaných mutací genu PROZ
- **neprokázali jsme** vztah mezi přítomností mutace PROZ R255H v heterozygotním nebo homozygotním stavu a pozitivními hladinami antifosfolipidových protilátek

Na základě zjištěných výsledků se domníváme, že je možné doporučit vyšetření rozšířeného panelu antifosfolipidových protilátek v rámci specializované péče o ženy s opakovanými časnými těhotenskými ztrátami.

Výsledky studie nepotvrzují vhodnost rutinního genetického testování klasických trombofilních mutací, tj. nejen polymorfismů MTHFR C677T a A1298C, ale ani mutací faktor V Leiden a faktor II G20210A u žen

s opakovanými těhotenskými ztrátami. Je vhodné dodržovat konzervativní přístup k problematice genetického testování trombofilních stavů, stanovený společným doporučením České společnosti pro trombózu a hemostázu a Společnosti lékařské genetiky České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně.

Testování přítomnosti homozygotního genotypu PAI1 (-675)4G/4G by dle autorova názoru mohlo být využito v rámci komplexní péče o ženy s opakovanými časnými těhotenskými ztrátami ve specializovaných centrech.

Vhodnost testování sledovaných mutací genu pro protein Z u žen s opakovanými časnými těhotenskými ztrátami v rutinní praxi výsledky práce nepotvrdily, jedná se však o slibnou oblast, vyžadující další výzkum.

Výsledky studie byly zveřejněny ve dvou publikacích v impaktovaném periodiku (viz příloha 9.3) a jsou základem dalších dosud nepublikovaných prací.

Stanovené cíle předkládané práce tedy byly splněny.

7 Literatura

ABBATE, R., SOFI, F., GENSINI, F., et al. Thrombophilias as risk factors for disorders of pregnancy and fetal damage. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 2002, 32, 318-21.

AGARWAL, A., APONTE-MELLADO, A., PREMKUMAR, B.J., et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2012, 10, 49.

ALESSANDRI, C., CONTI, F., PENDOLINO, M., et al. New autoantigens in the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun. Rev.* 2011, 10(10), 609-16.

ALLISON, J.L. a SCHUST, D.J. Recurrent first trimester pregnancy loss: revised definitions and novel causes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2009, 16(6), 446-50.

ALSHAIKH, F.S., FINAN, R.R., ALMAWI, A.W., et al. Association of the R67X and W303X non-sense polymorphisms in the protein Z-dependent protease inhibitor gene with idiopathic recurrent miscarriage. *Mol. Hum. Reprod.* 2012, 18(3), 156-60.

ANDERSEN, A.M., ANDERSEN, P.K., OLSEN, J., et al. Moderate alcohol intake during pregnancy and risk of fetal death. *Int. J. Epidemiol.* 2012, 41, 405–413.

ARREDONDO, F. a NOBLE, L.S. Endocrinology of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod. Med.* 2006, 24, 33–39.

ASRM [American Society for Reproductive Medicine]. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil. Steril.* 2013, 99(1), 63.

ASRM [American Society for Reproductive Medicine]. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil. Steril.* 2012, 98(5), 1103-11.

BAJEKAL, N. a LI, T.C. Fibroids, infertility and pregnancy wastage. *Hum. Reprod. Update.* 2000, 6(6), 614-20

BEAMAN, K.D., NTRIVALAS, E., MALLERS, T.M., et al. Immune etiology of recurrent pregnancy loss and its diagnosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2012, 67(4), 319-25.

BECH, B.H., NOHR, E.A., VAETH, M., et al. Coffee and fetal death: a cohort study with prospective data. *Am. J. Epidemiol.* 2005, 162, 983–990.

BENAGIANO, G., D'ARCANGUES, C., HARRIS REQUEJO, J., et al. The special programme of research in human reproduction: forty years of activities to achieve reproductive health for all. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2012, 74(3), 190-217.

BENNETT, S.A., BAGOT, C.N. a ARYA, R. Pregnancy loss and thrombophilia: the elusive link. *Br. J. Haematol.* 2012, 157(5), 529-42.

- BERTINA, R.M., KOELEMAN, B.P., KOSTER, T., et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994, 369(6475), 64-7.
- BOGDANOVA, N., HORST, J., CHLYSTUN, M., et al. A common haplotype of the annexin A5 (ANXA5) gene promoter is associated with recurrent pregnancy loss. *Hum. Molec. Genet.* 2007, 16, 573-578.
- BRADLEY, L.A., PALOMAKI, G.E., BIENSTOCK, J., et al. 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(1), 39-50.
- BRIER, N. Anxiety after miscarriage: a review of the empirical literature and implications for clinical practice. *Birth*. 2004, 31, 138-42.
- BRIGHAM, S.A., CONLON, C. a FARQUHARSON, R.G. A longitudinal study of pregnancy outcome following idiopathic recurrent miscarriage. *Hum. Reprod.* 1999, 14, 2868-2871.
- BROZE, G.J.JR. Protein Z-dependent regulation of coagulation. *Thromb. Haemost.* 2001, 86(1), 8-13.
- BROZE, G. J.JR. a MILETICH, J. P. Human protein Z. *J. Clin. Invest.* 1984, 73, 933-938.
- CALLEJA-AGIUS, J., JAUNIAUX, E., PIZZEY, A.R., et al. Investigation of systemic inflammatory response in first trimester pregnancy failure. *Hum. Reprod.* 2012, 27(2), 349-57.
- CERVERA, R., PIETTE, J.C.H., FONT, J., et al. Antiphospholipid Syndrome. Clinical and Immunologic Manifestations and Patterns of Disease Expression in a Cohort of 1, 000 Patients. *Arthritis & Rheumatism*. 2002, 46, 1019-1027
- COCKSEEDGE, K.A., SARAVELOS, S.H., METWALLY, M., et al. How common is polycystic ovary syndrome in recurrent miscarriage? *Reprod. Biomed. Online*. 2009, 19(4), 572-6.
- COULAM, C., KAIED, B., JANOWITZ, P., et al. Antiphospholipid antibodies associated with implantation failure after IVF/ET. *J. Assist. Reprod. Genet.* 1997, 14, 603-6.
- COULAM, C.B. a JEYENDRAN, R.S. Thrombophilic gene polymorphisms are risk factors for unexplained infertility. *Fertil. Steril.* 2009, 91(4 Suppl), 1516-7.
- dbSNP [Database of Single Nucleotide Polymorphisms]. [online] Bethesda (MD, USA): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. [cit. 2013-10-11] Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
- DERKSEN, R.H.W.M. a GROOT, P.G. The obstetric antiphospholipid syndrome. *J. Reprod. Immunol.* 2008, 77, 41-50.

- DIZON-TOWNSON, D., MILLER, C., SIBAI, B., et al. The relationship of the factor V Leiden mutation and pregnancy outcomes for mother and fetus. *Obstet. Gynecol.* 2005, 106, 517–24
- DÖRNER, T., HOPPE, B., SALAMA, A., et al. Antibodies against protein Z and fetal loss: current perspectives. *Clin. Exp. Med.* 2005, 5(2), 50–4.
- DOSENBACH-GLANINGER, A., van TROTSENBURG, M., DOSENBACH, M., et al. Plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G polymorphism and coagulation factor XIII Val34Leu polymorphism: impaired fibrinolysis and early pregnancy loss. *Clin. Chem.* 2003, 49, 1081–1086.
- DOSENBACH-GLANINGER, A., van TROTSENBURG, M., HELMER, H., et al. Association of the protein Z intron F G79A gene polymorphism with recurrent pregnancy loss. *Fertil. Steril.* 2008, 90(4), 1155–60.
- EFFRAIMIDOU, S., FARMAKIOTIS, D. a TOPALIDOU, M. Protein Z levels and recurrent pregnancy loss. *Fertil. Steril.* 2009, 91(5), e27.
- EICHLER, E.E., FLINT, J., GIBSON, G., et al. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat. Rev. Genet.* 2010, 11, 446–450.
- EL-HAMID, S.A. a EL-KHAYAT, W. Relationship of the protein Z intron F G79A and IL6 C634G gene polymorphisms with the risk of recurrent pregnancy loss in Egyptian women. *J. Investig. Med.* 2011, 59(4), 655–60.
- ERIKSSON, P., KALLIN, B., van HOOFT, F.M., et al.. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator 1 gene is associated with myocardial infarction. *PNAS.* 1995, 92, 1851–1855.
- FARQUHARSON, R.G., JAUNIAUX, E. a EXALTO, N. Updated and revised nomenclature for description of early pregnancy events. *Hum. Reprod.* 2005, 20, 3008–3011.
- FECHTEL, K., OSTERBURG, M.L., KEHRER-SAWATZKI, H., et al. Delineating the Hemostaseome as an aid to individualize the analysis of the hereditary basis of thrombotic and bleeding disorders *Hum. Genet.* 2011, 130(1), 149–166.
- FORD, H.B. a SCHUST, D.J. Recurrent Pregnancy Loss: Etiology, Diagnosis, and Therapy. *Rev. Obstet. Gynecol.* 2009, 2(2), 76–83.
- FRANKLIN, R.D., HOLLIER, N. a KUTTEH, W.H. beta2-Glycoprotein 1 as a marker of antiphospholipid syndrome in women with recurrent pregnancy loss. *Fertil. Steril.* 2000, 73(3), 531–5.
- FRANSEN, M.T., KOREVAAR, J.C., van der VEEN, F., et al. Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: index-control study. *BMJ.* 2006, 332, 759–7.
- FRANSEN, M.T., MUSTERS, A.M., van der VEEN, F., et al. Reproductive outcome after PGD in couples with recurrent miscarriage carrying a structural

- chromosome abnormality: a systematic review. *Hum. Reprod. Update.* 2011, 17(4), 467-75.
- FUJIMAKI, K., YAMAZAKI, T., TANIWAKI, M., et al. The gene for human protein Z is localized to chromosome 13 at band q34 and is coded by eight regular exons and one alternative exon. *Biochemistry.* 1998, 37, 6838-6846.
- GIRARDI, G., REDECHA, P. a SALMON, J.E. Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nature Medicine.* 2004, 10, 1222–1226.
- GLUECK, C.J., KUPFERMINC, M.J., FONTAINE, R.N., et al. Genetic hypofibrinolysis in complicated pregnancies. *Obstet. Gynecol.* 2001, 97, 44–48.
- GOHIL, R., PECK, G. a SHARMA, P. The genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving approximately 120, 000 cases and 180, 000 controls. *Thromb. Haemost.* 2009, 102, 360–370.
- GOODMAN, C.S., COULAM, C.B., JEYENDRAN, R.S., et al. Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? *Am. J. Reprod. Immunol.* 2006, 56, 230-6.
- GREER, I.A. Thrombophilia: implications for pregnancy outcome. *Thromb. Res.* 2003, 109, 73-81.
- GRIS, J.C., QUÉRÉ, I., DECHAUD, H., et al. High frequency of protein Z deficiency in patients with unexplained early fetal loss. *Blood.* 2002, 99(7), 2606-8.
- HIRMEROVA, J., ULCOVA-GALLOVA, Z., SEIDLEROVA, J., et al. Laboratory evaluation of antiphospholipid antibodies in patients with venous thromboembolism. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2010, 16(3), 317-324
- HODES-WERTZ, B., GRIFO, J., GHADIR, S., et al. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. *Fertil. Steril.* 2012, 98(3), 675-80.
- HOGGE, W.A., BYRNES, A.L., LANASA, M.C., et al. The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2003, 189, 397–400.
- HOMAN, G.F., DAVIES, M. a NORMAN, R. The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Hum. Reprod. Update.* 2007;11, 209–223.
- HONIG, A., ENGEL, J.B., SEGERER, S.E., et al. Pregnancy-triggered antiphospholipid syndrome in a patient with multiple late miscarriages. *Hum. Reprod.* 2010, 25(11), 2753-4.
- HRADECKY, L., SUBRT, I. a ULCOVA-GALLOVA, Z. Urgent termination of pregnancy in pre-eclampsia and panel of antiphospholipid antibodies. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2009, 62(6), 412-7.
- CHRISTIANSEN, O.B. A fresh look at the causes and treatments of recurrent miscarriage, especially its immunological aspects. *Hum. Reprod. Update.* 1996, 2, 271–293.

- CHRISTIANSEN, O.B., STEFFENSEN, R., NIELSEN, H.S., et al. Multifactorial etiology of recurrent miscarriage and its scientific and clinical implications. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2008, 66(4), 257-67.
- JACOBS, P.A. a HASSOLD, T. Chromosome abnormalities: origin and etiology in abortions and livebirths. In: VOGEL, F., SPERLING, K., eds. *Human genetics*. Berlin: Springer-Verlag, 1987, 233–44.
- JAUNIAUX, E., FARQUHARSON, R.G., CHRISTIANSEN, O.B., et al. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum. Reprod.* 2006, 21(9), 2216-22.
- JEDDI-TEHRANI, M., TORABI, R., MOHAMMADZADEH, A., et al. Investigating Association of Three Polymorphisms of Coagulation Factor XIII and Recurrent Pregnancy Loss. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010, 64(3), 212-7.
- JEDDI-TEHRANI, M., TORABI, R., ZARNANI, A.H., et al. Analysis of Plasminogen Activator Inhibitor-1, Integrin Beta3, Beta Fibrinogen, and Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms in Iranian Women with Recurrent Pregnancy Loss. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2011, 66(2), 149-56.
- KEMKES-MATTHES, B., MATTHES, K.J., SOURI, M., et al. R225H amino acid substitution of protein Z identified in patients with factor V Leiden mutation. *Brit. J. Haemat.* 2005, 128, 248-252.
- KEMKES-MATTHES, B., NEES, M., KÜHNEL, G., et al. Protein Z influences the prothrombotic phenotype in Factor V Leiden patients. *Thrombosis Research.* 2002, 106(4-5), 183-5.
- KOLTE, A.M., STEFFENSEN, R., NIELSEN, H.S., et al. Study of the structure and impact of human leukocyte antigen (HLA)-G-A, HLA-G-B, and HLA-G-DRB1 haplotypes in families with recurrent miscarriage. *Hum. Immunol.* 2010, 71, 482–488.
- KRONE, K.A., ALLEN, K.L. a MCCRAE, K.R. Impaired Fibrinolysis in the Antiphospholipid Syndrome *Curr. Rheumatol. Rep.* 2010, 12(1), 53–57.
- KRUITHOF, E.K., TRAN-THANG, C., GUDINCHET, A., et al. Fibrinolysis in pregnancy: a study of plasminogen activator inhibitors. *Blood.* 1987, 69, 460 - 6.
- KUTTEH, W.H. a TRIPLETT, D.A. Thrombophilias and recurrent pregnancy loss. *Semin. Reprod. Med.* 2006, 24, 54-66.
- KVASNIČKA, J. Dědičné trombofilie – doporučení k provádění genetických testů v klinické praxi. *Časopis lékařů českých.* 2010, 149(10), 424-427.
- KWAK, J.Z.H., BARINI, R. a GILMAN-SACHS, A. Downregulation of maternal antiphospholipid antibodies during early pregnancy outcome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1994, 71, 239-246.
- KWAK-KIM, J., AGCAOILI, M.S., ALETA, L., et al. Management of women with recurrent pregnancy losses and antiphospholipid antibody syndrome. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2013, 69(6), 596-607.

- KWAK-KIM, J., YANG, K.M. a GILMAN-SACHS, A. Recurrent pregnancy loss: A disease of inflammation and coagulation. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2009, 35(4), 609-22.
- LANE, D.A. a GRANT, P.J. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease (review article). *Blood.* 2000, 95, 1517–1532.
- LARSEN, E.C., CHRISTIANSEN, O.B., KOLTE, A.M., et al. New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Medicine.* 2013, 11, 154.
- LE CAM-DUCHEZ, V., BARBAY, V., BAL DIT SOLLIER, C., et al. Haplotypic or genotypic combinations of three protein Z polymorphisms influence protein Z plasma level. *Thromb. Haemost.* 2009, 101(1), 212-4.
- LI, T.C., SPUIJBROEK, M.D., TUCKERMAN, E., et al. Endocrinological and endometrial factors in recurrent miscarriage. *BJOG.* 2000, 107, 1471–1479.
- LICHY, C., KROPP, S., DONG-SI, T., et al. A common polymorphism of the protein Z gene is associated with protein Z plasma levels and with risk of cerebral ischemia in the young. *Stroke.* 2004, 35, 40-45.
- LIN, P.C. Reproductive outcomes in women with uterine anomalies. *J. Womens Health (Larchmt).* 2004, 13(1), 33-9.
- LOTTA, L.A., WANG, M., YU, J., et al. Identification of genetic risk variants for deep vein thrombosis by multiplexed next-generation sequencing of 186 hemostatic/pro-inflammatory genes *BMC Med. Genomics.* 2012, 5, 7.
- MACKWORTH-YOUNG, C.G. Antiphospholipid syndrome: multiple mechanisms. *Clin. Exp. Immunol.* 2004, 136, 393-401.
- MAKINO, A., NAKANISHI, T., SUGIURA-OGASAWARA, M., et al. No association of C677T methylenetetrahydrofolate reductase and an endothelial nitric oxide synthase polymorphism with recurrent pregnancy loss. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2004, 52, 60-6.
- MARGAGLIONE, M., CAPPUCCI, G., COLAIZZO, D., et al. The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998, 18(2), 152-6.
- MARGAGLIONE, M., GRANDONE, E., VECCHIONE, G., et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) antigen plasma levels in subjects attending a metabolic ward: relation to polymorphisms of PAI-1 and angiotensin converting enzyme (ACE) genes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997, 17(10), 2082-7.
- MCINTYRE, J.A., WAGENKNECHT, D.R. a FAULK, W.P. Antiphospholipid antibodies: discovery, definitions, detection and disease. *Progress in Lipid Res.* 2003, 42, 176-237.
- METWALLY, M., SARAVELLOS, S.H., LEDGER, W.L., et al. Body mass index and risk of miscarriage in women with recurrent miscarriage. *Fertil. Steril.* 2010, 94, 290–295.

- MIYAKIS, S., LOCKSHIN, M.D., ATSUMI, T., et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost.* 2006, 4, 295–306.
- NAGIRNAJA, L., KASAK, L., PALTA, P., et al. Role of DNA copy number variations in genetic predisposition to recurrent pregnancy loss. *J. Reprod. Immunol.* 2011, 90, 145.
- NAKAMURA, S., AOSHIMA, T., IKEDA, M., et al. Simultaneous detection of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms, C677T and A1298C, by melting curve analysis with Light Cycler. *Anal. Biochem.* 2002, 306, 340-3.
- OMIM [Online Mendelian Inheritance In Man]. [online] McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD, USA) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA). Johns Hopkins University, © 1996-2013. [cit. 2013-10-11] Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
- OZDEMIR, O., YENICESU, G.I., SILAN, F., et al. Recurrent pregnancy loss and its relation to combined parental thrombophilic gene mutations. *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* 2012, 16(4), 279-86.
- PAIDAS, M.J., KU, D.H., LANGHOFF-ROOS, J., et al. Inherited thrombophilias and adverse pregnancy outcome: screening and management. *Semin. Perinatol.* 2005, 29(3), 150-63.
- PIHUSCH, R., BUCHHOLZ, T., LOHSE, P., et al. Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2001, 46(2), 124-31.
- POINDRON, V., BERAT, R., KNAPP, A.M., et al. Evidence for heterogeneity of the obstetric antiphospholipid syndrome: thrombosis can be critical for antiphospholipid-induced pregnancy loss. *J. Thromb. Haemost.* 2011, 9(10), 1937-47.
- QUENBY, S., VINCE, G., FARQUHARSON, R., et al. Recurrent miscarriage: a defect in nature's quality control? *Hum. Reprod.* 2002, 17, 1959–1963.
- RAGA, F., BAUSET, C., REMOHI, J., et al. Reproductive impact of congenital Müllerian anomalies. *Hum. Reprod.* 1997, 12(10), 2277-81.
- RAJCAN-SEPAROVIC, E., DIEGO-ALVAREZ, D., ROBINSON, W.P., et al. Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Hum. Reprod.* 2010, 25, 2913–2922.
- RAND, J.H., WU, X.X., ANDREE, H.A., et al. Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome—a possible thrombogenic mechanism. *New England Journal of Medicine.* 1997, 337, 154–160.
- RAUŠOVÁ, E., HADAČOVÁ, I. a MACEK, M. Hereditární trombofilie – jeden z modelů molekulární medicíny. *Klin. Biochem. Metab.* 2005, 13 , 68–76.

- RefSeq [Reference Sequence]. [online] Bethesda (MD, USA): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. [cit. 2013-10-13] Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>
- REY, E., KAHN, S.R., DAVID, M., et al. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet*. 2003, 361, 901–908.
- RUIZ-IRASTORZA, G., CROWTHER, M., BRANCH, W., et al. Antiphospholipid syndrome. *Lancet*. 2010, 376(9751), 1498-509.
- RULL, K., NAGIRNAJA, L. a LAAN, M. Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions. *Front. Gene*. 2012, 3, 34.
- SARAVELLOS, S.H., COCKSEGE, K.A. a LI, T.C. Prevalence and diagnosis of congenital uterine anomalies in women with reproductive failure: a critical appraisal. *Hum. Reprod. Update*. 2008, 14, 415–429.
- SARAVELLOS, S.H. a REGAN, L. The importance of preconception counseling and early pregnancy monitoring. *Semin. Reprod. Med*. 2011, 29(6), 557-68.
- SATER, M.S., FINAN, R.R., AL-HAMMAD, S.A., et al. High Frequency of anti-protein Z IgM and IgG autoantibodies in women with idiopathic recurrent spontaneous miscarriage. *Am. J. Reprod. Immunol*. 2011, 65(5), 526-31.
- SEBIRE, N.J., FOX, H., BACKOS, M., et al. Defective endovascular trophoblast invasion in primary antiphospholipid antibody syndrome-associated early pregnancy failure. *Human Reproduction*. 2002, 17, 1067–1071.
- SHAPIRO, G.A. Antiphospholipid syndrome in obstetrics and gynecology. *Semin. Throm. Haemost*. 1994, 20, 64-70.
- SHOENFELD, Y., CARP, H.J., MOLINA, V., et al. Autoantibodies and prediction of reproductive. *Am. J. Reprod. Immunol*. 2006, 56, 337-44.
- SILVER, R.M., ZHAO, Y., SPONG, C.Y., et al. Prothrombin gene G20210A mutation and obstetric complications *Obstet. Gynecol*. 2010, 115, 14–20.
- STAGNARO-GREEN, A. a GLINOER, D. Thyroid autoimmunity and the risk of miscarriage. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab*. 2004, 18, 167–181.
- STEPHENSON, M.D. a SIERRA, S. Reproductive outcomes in recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a structural chromosome rearrangement. *Hum. Reprod*. 2006, 21, 1076–1082.
- STEPHENSON, M.D. Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil. Steril*. 1996, 66(1), 24-9.
- STRAY-PEDERSEN, B. a STRAY-PEDERSEN, S. Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 1984, 148, 140-146.
- TANG, A.W. a QUENBY, S. Recent thoughts on management and prevention of recurrent early pregnancy loss. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol*. 2010, 22, 446–451.

TEKLENBURG, G., SALKER, M., MOLOKHIA, M., et al. Natural selection of human embryos: decidualizing endometrial stromal cells serve as sensors of embryo quality upon implantation. *PLoS One*. 2010, 5(4), e10258.

THELLIN, O., COUMANS, B., ZORZI, W., et al. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Curr. Opin. Immunol.* 2000, 12(6), 731-7.

TOPALIDOU, M., EFFRAIMIDOU, S., FARMAKIOTIS, D., et al. Low protein Z levels, but not the intron F G79A polymorphism, are associated with unexplained pregnancy loss. *Thromb. Res.* 2009, 124(1), 24-7.

TSANTES, A.E., NIKOLOPOULOS, G.K., BAGOS, P.G., et al. The effect of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism on the thrombotic risk. *Thromb. Res.* 2008, 122(6), 736-42.

ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z. Neplodnost - útok imunity : metody vyšetření, příčiny neplodnosti, důvody potráčovosti, metody léčby, nejčastější otázky. Grada: Praha, 2006, Vyd. 1.

ULCOVA-GALLOVA, Z., KRAUZ, V., NOVAKOVA, P., et al. Anti-Phospholipid Antibodies against Phosphatidylinositol, and Phosphatidylserine are More Significant in Reproductive Failure than Antibodies against Cardiolipin only. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2005, 54, 112-117.

ULCOVA-GALLOVA, Z. Antiphospholipid Antibodies and Reproductive Failure. In: MARKERT, U.R., ed. *Immunology of Gametes and Embryo Implantation*. Basel: Karger, 2005, 88, 139-149.

VASSE, M. Protein Z, a protein seeking a pathology. *Thromb. Haemost.* 2008, 100(4), 548-56.

VASSE, M., GUEGAN-MASSARDIER, E., BORG, J.-Y., et al. Frequency of protein Z deficiency in patients with ischaemic stroke. (Letter) *Lancet*. 2001, 357, 933-934.

VESELÁ, K., PAVLÍKOVÁ, M., JANOŠÍKOVÁ, B., et al. Genetic determinants of folate status in Central Bohemia. *Physiol. Res.* 2005, 54, 295-303.

WILCOX, A.J., WEINBERG, C.R., O'CONNOR, J.F., et al. Incidence of early loss of pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 1988, 319(4), 189-94.

WISBORG, K., KESMODEL, U., HENRIKSEN, T.B., et al. A prospective study of maternal smoking and spontaneous abortion. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2003, 82, 936-941.

WOLF, C.E., HAUBELT, H., PAUER, H.U., et al. Recurrent pregnancy loss and its relation to FV Leiden, FII G20210A and polymorphisms of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 2003, 33(3), 134-7.

YENICESU, G.I., CETIN, M., OZDEMIR, O., et al. A prospective case-control study analyzes 12 thrombophilic gene mutations in Turkish couples with recurrent pregnancy loss. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010, 63(2), 126-36.

YIN, Z.-F., HUANG, Z.-F., CUI, J., et al. Prothrombotic phenotype of protein Z deficiency. *PNAS.* 2000, 97, 6734-6738.

ZEGERS-HOCHSCHILD, F., ADAMSON, G.D., de MOUZON, J., et al. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009. *Hum. Reprod.* 2009, 24, 2683–2687.

8 Publikační činnost autora

8.1 Publikace související s tématem práce

SUBRT, I., ULCOVA-GALLOVA, Z., CERNA, M., HEJNALOVA, M., SLOVANOVÁ, J., BIBKOVA, K., MICANOVA, Z. Recurrent pregnancy loss, plasminogen activator inhibitor-1 (-675) 4G/5G polymorphism and antiphospholipid antibodies in Czech women. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2013, 70(1), 54-8. **IMPACT FACTOR 3,317**

ULCOVA-GALLOVA, Z., SUBRT, I. Immunological cause of recurrent pregnancy loss complicated by genetic thrombophilic factors, and results of the treatment. *Journal of Reproductive Immunology.* 2010, 86(1), 53-53.

ŠIGUTOVÁ, P., HAJŠMANOVÁ, Z., ŠLECHTOVÁ, J., ŠUBRT, I., HRADECKÝ, L., ULČOVÁ-GALLOVÁ, Z. Sledování hemokoagulačních změn v průběhu těhotenství žen s opakovaným potrácením v závislosti na podávání nízkomolekulárního heparinu. *Česká Gynekol.* 2009, 74(5), 348-54.

SUBRT, I., ULCOVA-GALLOVA, Z., BIBKOVA, K., MICANOVA, Z., HEJNALOVA, M., CERNA, M., HRADECKY, L., NOVOTNY, Z. Recurrent pregnancy loss and frequency of eight antiphospholipid antibodies and genetic thrombophilic factors in Czech women. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008, 59(3), 193-200. **IMPACT FACTOR 3,317**

8.2 Přednášková činnost související s tématem práce

Šubrt, I., Ulčová-Gallová, Z., Bibková, K., Hejnalová, M., Černá, M.: Trombofilní faktory a habituální potrácení-multifaktoriální model. Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky ČLS JEP a 40.výročí cytogenetické konference, Praha, 19.-21.9.2007.

Ulcova-Gallova, Z., Subrt, I., Bibkova, K., Micanova, Z.: Unexplained repeated pregnancy losses and proportion of various types of antiphospholipid antibodies, thyroid antibodies, and thrombophilic factors. Sixth meeting of European Forum on Antiphospholipid Antibodies. Ljublanja, Slovenia. Oct. 12-13, 2007.

Šubrt, I., Černá, M., Hejnalová, M., Slovanová, J. Mutace v genech pro PAI-1 a protein Z u pacientek s opakovanými spontánními potraty. Večer Spolku lékařů ČLS JEP, Plzeň, 7.4.2010

Subrt, I., Ulcova-Gallova, Z., Cerna, M., Hejnalova, M., Slovanova, J., Bibkova, K., Micanova, Z. Antiphospholipid antibodies and genetic thrombophilic factors in Czech women with recurrent pregnancy loss. Antiphospholipid Antibodies in Medicine, Pilsen, 25.6.2011

8.3 Jiné publikace

DVORAK, P., LYSAK, D., VOKURKA, S., MICHALOVA, K., SAROVA, I., JONASOVA, A., HRUBA, M., RYKOVSKA, A., SUBRT, I. The translocation t(2;11)(p21;q23) without MLL gene rearrangement - a possible marker of good prognosis in myelodysplastic syndrome patients. *Hematol. Oncol.* 2013, Aug 16. 2013 Aug 16. doi: 10.1002/hon.2089. [Epub ahead of print] **IMPACT FACTOR 2,036**

HIRMEROVA, J., SEIDLEROVA, J., SUBRT, I. Deep vein thrombosis and/or pulmonary embolism concurrent with superficial vein thrombosis of the legs: cross-sectional single center study of prevalence and risk factors. *Int. Angiol.* 2013, 32(4), 410-6. **IMPACT FACTOR 1,462**

HRUBA, M., SUBRT, I. Multiclonal monoallelic 13q14 interstitial deletion in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma.* 2013, 54(2), 413-6. **IMPACT FACTOR 2,364**

HRUBA, M., DVORAK, P., WEBEROVA, L., SUBRT, I. Independent coexistence of clones with 13q14 deletion at reciprocal translocation breakpoint and 13q14 interstitial deletion in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma.* 2012, 53(10), 2054-62. **IMPACT FACTOR 2,364**

BROZKOVA, D., MAZANEC, R., HABERLOVA, J., SAKMARYOVA, I., SUBRT, I., SEEMAN, P. Six new gap junction beta 1 gene mutations and their phenotypic expression in Czech patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* 2010, 14(1), 3-7. **IMPACT FACTOR 1,444**

HRADECKY, L., SUBRT, I., ULCOVA-GALLOVA, Z. Urgent termination of pregnancy in pre-eclampsia and panel of antiphospholipid antibodies. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2009, 62(6), 412-7. **IMPACT FACTOR 3,317**

NOVOTNY, Z., KRIZAN, J., SIMA, R., SIMA, P., UHER, P., ZECH, N., HUTELOVA, R., BABOROVA, P., ULCOVA-GALLOVA, Z., SUBRT, I., ULMANOVA, E., HOUDEK, Z., ROKYTA, Z., BABUSKA, V., KRALICKOVA, M. Leukaemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women diagnosed with unexplained infertility and endometriosis have a negative impact on the IVF outcome. A pilot study. *Folia Biol. (Praha).* 2009, 55(3), 92-7. **IMPACT FACTOR 0,596**

DVORAK, P., HRUBA, M., SUBRT, I. Development of acute myeloid leukemia associated with Ph-negative clone with inv(3)(q21q26) during imatinib therapy for chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 2009, 33(6), 860-1. **IMPACT FACTOR 2,587**

GOETZ, P., BARTA, I., CERVINKA, M., GAILLYOVA, R., JUTTNEROVA, V., KOHOUTOVA, M., REISCHIG, J., SANTAVY, J., SEDLACEK, Z., SEEMANOVA, E., SUBRT, I., SVOBODA, A. Education of Medical Genetics in Czech Republic. *Eur. J. Hum. Genet.* 2005, 13(13), 374. **IMPACT FACTOR 4,003**

SYKORA, J., SUBRT, I., DIDEK, P., SIALA, K., SCHWARZ, J., MACHALOVA, V., VARVAROVSKA, J., PAZDIORA, P., POZLER, O., STOZICKY, F. Cytokine tumor necrosis factor-alpha A promoter gene polymorphism at position -308 G>A and pediatric inflammatory bowel disease: implications in ulcerative colitis and Crohn's disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2006, 42(5), 479-87. **IMPACT FACTOR 2.102**

MAYER, O. JR., SIMON, J., HOLUBEC, L., PIKNER, R., SUBRT, I. Fenofibrate-induced hyperhomocysteinemia may be prevented by folate co-administration. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2003, 59(5-6), 367-71. **IMPACT FACTOR 2,177**

MAYER, O. JR., SIMON, J., ROSOLOVA, H., HROMADKA, M., SUBRT, I., VOBRUBOVA, I. The effects of folate supplementation on some coagulation parameters and oxidative status surrogates. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2002, 58(1), 1-5. **IMPACT FACTOR 2,177**

8.4 Jiná přednášková činnost

Dvořák, P., Hrubá, M., Šubrt, I., Harmáčková, L., Pittrová, M., Kulová, V., Čechová, L. Fenomén Ph-negativních klonů u pacientů s CML léčených inhibitory tyrozinových kináz. Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky ČLS JEP a 40. výročí cytogenetické konference, Praha, 19.-21.9.2007.

Šubrt, I., Hrubá, M., Jaklová, R. Fenotyp dítěte s nevyváženou translokací subtelomerických oblastí chromosomu 17 a 22 – varianta syndromu delece 22q13.3. Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky ČLS JEP a 40.výročí cytogenetické konference, Praha, 19.-21.9.2007.

Šubrt, I., Jaklová, R., Polendová, D., Vohradská, P.: Záchyt chromosomálních aberací a VVV na ÚLG LF UK a FN Plzeň 2006-2007. Večer ČLS JEP Plzeň, 23.4.2008.

Černá, M., Hejnalová, M., Slovanová, J., Šubrt, I., Ulčová-Gallová, Z.: Trombofilní faktory a habituální potrácení. Večer ČLS JEP Plzeň, 23.4.2008.

Ulcova-Gallova, Z., Korabecna, M., Horinek, A. Subrt, I.: Cell-free fetal DNA in antiphospholipid syndrome. The European Congress of Reproductive Immunology. Moscow, Russia. June 30-July 3, 2008.

Ulčová-Gallová, Z., Šubrt, I., Bibková, K., Hejnalová, M., Mičanová, Z., Černá, M.: Antifosfolipidové protilátky a trombofilní faktory. XXV. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů. Praha. 29.10.-1.11.2008.

Polendová, D., Jaklová, R., Šubrt, I.: Kazuistiky z onkogenetické ambulance Ústavu lékařské genetiky. Večer ČLS JEP Plzeň, 23.4.2009.

Vohradská, P., Hrubá, M., Dvořák, P., Šubrt, I.: Familiární výskyt translokační formy mikrodelece 22q11.2. Večer ČLS JEP Plzeň, 23.4.2009.

Šubrt, I., Sedláček, D., Šafrová, M., Černá, M., Hejnalová, M., Slovanová, J.: Mutace cytokinových receptorů u HIV pozitivních pacientů. Večer ČLS JEP Plzeň, 23.4.2009.

Dvořák, P., Hrubá, M., Šubrt, I.: Přetrvávající cytogenetické klony po chemoterapeutické léčbě u pacientů s akutní myeloidní leukémií. XXIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. Olomouc. 6/2009.

Hrubá, M., Dvořák, P., Harmáčková, L., Pittrová, M., Čechová, L., Šubrt, I.: Cytogenetická metafázní analýza B-CLL buněk po imunostimulaci CpG oligonukleotidem a interleukinem 2. XXIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. Olomouc. 6/2009.

Hrubá, M., Dvořák, P., Čechová, L., Šubrt, I.: Výskyt chromosomových translokací u B chronické lymfatické leukémie. 42. výroční cytogenetická konference Biologické společnosti ČAV, Praha, 10.-11.9.2009.

Vohradská, P., Hrubá, M., Dvořák, P., Jaklová, R., Šubrt, I.: Familiární výskyt translokační formy mikrodelece 22q11.2. 42. výroční cytogenetická konference Biologické společnosti ČAV, Praha, 10.-11.9.2009.

Kočárek, E., Novotná, D., Malíková, M., Puchmajerová, A., Flaschová, E., Kytnarová, J., Baxová, A., Šubrt, I., Hrubá, M., Staňková, V., Tužilová, M., Goetz, P., Havlovicová, M.: Diagnostika kryptických chromosomových aberací metodou FISH – malé ohlédnutí za výsledky minulých let. 42. výroční cytogenetická konference Biologické společnosti ČAV, Praha, 10.-11.9.2009.

Černá, M., Slovanová, J., Šafrová, M., Nováková, M., Šubrt, I.: Vyšetření mutací v genu pro TPMT u pacientů s idiopatickým střevním zánětem. Večer Spolku lékařů ČLS JEP, Plzeň, 7.4.2010

Hrubá, M., Dvořák, P., Weberová, L., Šubrt, I.: Výskyt a význam chromosomových translokací v buňkách B-chronické lymfatické leukémie. Večer Spolku lékařů ČLS JEP, Plzeň, 7.4.2010

Dvořák, P., Hrubá, M., Šubrt, I., Weberová, L., Harmáčková, L., Pittrová, M., Lebová, K.: Cytogenetická analýza přestaveb E2A genu (19p13.3) u B-akutní lymfoblastické leukémie. Večer Spolku lékařů ČLS JEP, Plzeň, 7.4.2010

Dvořák, P., Hrubá, M., Harmáčková, L., Pittrová, M., Lebová, K., Rykovská, A., Šubrt, I.: Cytogenetická vyšetření u hematologických neoplasií s eosinofilií a abnormalitami genů PDGFRA, PDGFRB a FGFR1. Večer Spolku lékařů ČLS JEP, Plzeň, 13.4.2011.

Vohradská, P., Jaklová, R., Hrubá, M., Suchánková, J., Šťastná, M., Šubrt, I.: Translokace chromosomu X a autosomu, fenotypový projev, kasuistiky. Večer Spolku lékařů ČLS JEP, Plzeň, 13.4.2011.

Šubrt, I., Polendová, D., Slovanová, J., Černá, M.: Molekulární diagnostika syndromu Prader-Willi jako onemocnění na podkladě imprintingu. Večer Spolku lékařů ČLS JEP, Plzeň, 13.4.2011.

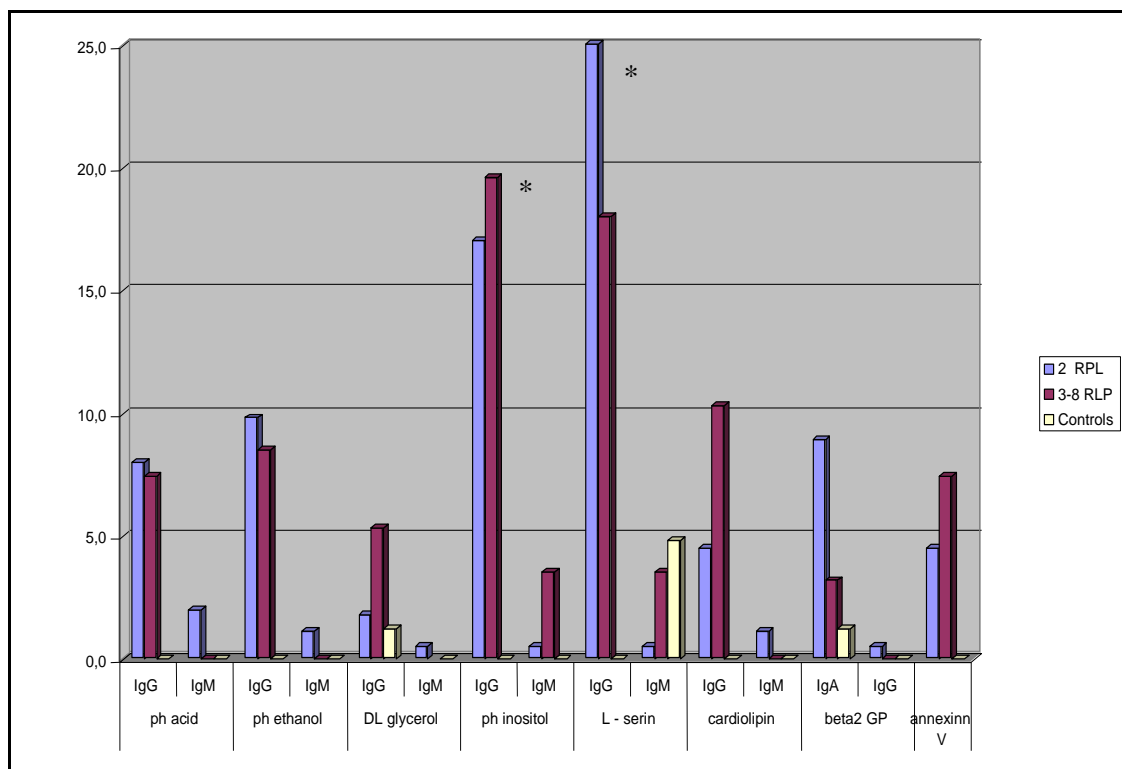
9 Přílohy

9.1 Mezinárodní kódy nukleotidů a aminokyselin podle IUPAC

A	adenin
C	cytosin
G	guanin
T (nebo U)	thymin (nebo uracil)
R	A nebo G
Y	C nebo T
S	G nebo C
W	A nebo T
K	G nebo T
M	A nebo C
B	C nebo G nebo T
D	A nebo G nebo T
H	A nebo C nebo T
V	A nebo C nebo G
N	jakákoli báze
. nebo -	mezera

A	Ala	alanin
C	Cys	cystein
D	Asp	kyselina asparagová
E	Glu	kyselina glutamová
F	Phe	fenylalanin
G	Gly	glycin
H	His	histidin
I	Ile	isoleucin
K	Lys	lysin
L	Leu	leucin
M	Met	methionin
N	Asn	asparagin
P	Pro	prolin
Q	Gln	glutamin
R	Arg	arginin
S	Ser	serin
T	Thr	threonin
V	Val	valin
W	Trp	tryptofan
Y	Tyr	tyrosin

9.2 Graf distribuce sledovaných aPL v souboru 206 žen s 2 – 8 RPL



Pozn.: * $p < 0,01$;

aPL proti kyselině fosfatidové, fosfatidyletanolu, fosfatidyl-DL-glycerolu, fosfatidylinositolu, fosfatidyl-L-serinu, kardiolipinu a annexinu V

9.3 Publikované práce