

**KLINIKA PERINATOLOGII I CHORÓB KOBIECYCH
UNIwersYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO
W POZNANIU**

**ZNACZENIE TROMBOFILII WRODZONEJ W ETIOLOGII
NAWRACAJĄCYCH NIEPOWODZEŃ POŁOŻNICZYCH**

DR N. MED. HUBERT WOLSKI

POZNAŃ 2016

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

WSTĘP

KLASYFIKACJA NAWRACAJĄCYCH UTRAT CIAŻ
EPIDEMIOLOGIA PORONIEŃ NAWRACAJĄCYCH I ZGONÓW WEWNĄTRZMACICZNYCH
NAWRACAJĄCE UTRATY CIAŻ JAKO PROBLEM PSYCHOLOGICZNY I SPOŁECZNY
ETIOLOGIA PORONIEŃ NAWRACAJĄCYCH I ZGONÓW WEWNĄTRZMACICZNYCH
POLIMORFIZMY UKŁADU KRZEPNIĘCIA I FIBRYNOLIZY
TROMBOFIŁA WRODZONA JAKO PRZYCZYNA NAWRACAJĄCYCH UTRAT CIAŻ
CZYNNIK V KRZEPNIĘCIA – POLIMORFIZM *1691G>A* ORAZ *1328C>T*
CZYNNIK II KRZEPNIĘCIA – POLIMORFIZM *20210G>A*
CZYNNIK VII KRZEPNIĘCIA – POLIMORFIZM *R353Q*
REDUKTAZA METYLENOTETRAHYDROFOLIANOWA – POLIMORFIZM *677C>T*, *1298A>C*,
1793G>A
PODSUMOWANIE

CEL PRACY

MATERIAŁ I METODY

CHARAKTERYSTYKA BADANYCH GRUP
METODYKA
IZOLACJA GENOMOWEGO DNA
OZNACZANIE JAKOŚCI I ILOŚCI DNA
REAKCJA PCR/RFLP
APARATURA ZASTOSOWANA W PRACY
METODY STATYSTYCZNE STOSOWANE W PRACY

WYNIKI

ANALIZA DANYCH KLINICZNYCH W BADANYCH GRUPACH KOBIET
ANALIZA WYNIKÓW BADAŃ GENETYCZNYCH
POLIMORFIZM *1691G>A* GENU CZYNNIKA V KRZEPNIĘCIA
POLIMORFIZM *M385T* GENU CZYNNIKA V KRZEPNIĘCIA
POLIMORFIZM *20210G>A* GENU PROTROMBINY
POLIMORFIZM *R353Q (11496G>A)* GENU CZYNNIKA VII KRZEPNIĘCIA
POLIMORFIZM *677C>T* GENU *MTHFR*
POLIMORFIZM *1298A>C* GENU *MTHFR*
POLIMORFIZM *1793G>A* GENU *MTHFR*
ANALIZA PORÓWNAWCZA GENOTYPÓW I ALLELI BADANYCH POLIMORFIZMÓW W ZALEŻNOŚCI
OD LICZBY PORONIEŃ W WYWIADZIE
ANALIZA PORÓWNAWCZA GENOTYPÓW I ALLELI BADANYCH POLIMORFIZMÓW W PODGRUPACH
WYODRĘBNIONYCH W ZALEŻNOŚCI OD CZASU WYSTĄPIENIA PORONIEŃ NAWRACAJĄCYCH
WSPÓŁWYSTĘPOWANIE GENOTYPÓW ANALIZOWANYCH W PRACY POLIMORFIZMÓW
ANALIZA HAPLOTYPÓW GENU CZYNNIKA V KRZEPNIĘCIA *FV* ORAZ GENU *MTHFR*
ANALIZA HAPLOTYPÓW GENU CZYNNIKA V KRZEPNIĘCIA

ANALIZA HAPLOTYPÓW GENU *MTHFR*

SUMARYCZNA ANALIZA WYSTĘPOWANIA CZYNNIKÓW RYZYKA TROMBOFILII WRODZONEJ W
BADANYCH GRUPACH KOBIET Z RPL

ANALIZA DANYCH KLINICZNYCH PACJENTEK W ZALEŻNOŚCI OD POSZCZEGÓLNYCH GENOTYPÓW
BADANYCH W PRACY POLIMORFIZMÓW

DYSKUSJA

UDZIAŁ POLIMORFIZMÓW PROZAKRZEPOWYCH W ETIOLOGII PORONIEŃ NAWRACAJĄCYCH
POLIMORFIZM *1691G>A* ORAZ POLIMORFIZMU *1328T>C* GENU CZYNNIKA V KRZEPNIĘCIA

POLIMORFIZM *20210G>A* GENU II CZYNNIKA KRZEPNIĘCIA

POLIMORFIZM *R353Q* GENU CZYNNIKA VII KRZEPNIĘCIA

POLIMORFIZM *677C>T*, *1298A>C* ORAZ *1793G>A* GENU *MTHFR* W ETIOLOGII RM

INNE POLIMORFIZMY KASKADY KRZEPNIĘCIA I FIBRYNOLIZY A ETIOLOGIA PORONIEŃ
NAWRACAJĄCYCH

ZNACZENIE TROMBOFILII WRODZONEJ W ETIOLOGII IUFD

INNE POLIMORFIZMY A ETIOLOGIA IUFD

POLECANE TESTY W DIAGNOSTYCE TROMBOFILII

PROFILAKTYKA PRZECIWKRZEPOWA U KOBIET Z NAWRACAJĄCYMI UTRATAMI CIĄŻY

POSTĘPOWANIE W PRZYPADKU WYWIADU OBCIĄŻONEGO WYSTĘPOWANIEM NAWRACAJĄCYCH
NIEPOWODZEŃ POŁOŻNICZYCH

ANALIZA WSPÓLWYSTĘPOWANIA GENOTYPÓW ORAZ HAPLOTYPÓW BADANYCH
POLIMORFIZMÓW

OGRANICZENIA WYNIKAJĄCE Z PRZEPROWADZANYCH BADAŃ

PODSUMOWANIE PRZEPROWADZONYCH BADAŃ

WNIOSKI

PIŚMIENNICTWO

STRESZCZENIE W J. POLSKIM

STRESZCZENIE W J. ANGIELSKIM

SPIS TABEL, RYCIN I FOTOGRAFII

APPENDIX

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

aCL	przeciwciała antykardiolipinowe (ang. <i>anticardiolipin antibodies</i>)
ACMG	Amerykańskie Towarzystwo Genetyki Medycznej (ang. <i>American College of Medical Genetics</i>)
ACOG	Amerykańskie Towarzystwo Położników i Ginekologów (ang. <i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>)
APL	przeciwciała antyfosfolipidowe (ang. <i>antiphospholipid antibodies</i>)
ASA	kwasy acetylosalicylowe (ang. <i>acetylosalicylic acid</i>)
APC	aktywowane białko C (ang. <i>activated protein C</i>)
APCR	oporność na aktywowane białko C (ang. <i>activated protein C resistance</i>)
APS	zespół antyfosfolipidowy (ang. <i>antiphospholipid syndrome</i>)
β2-GPI	beta2-glikoproteina I (ang. <i>β2-glycoprotein I</i>)
BMI	wskaźnik masy ciała (ang. <i>body mass index</i>)
CNV	wariacje liczby powtórzeń (ang. <i>copy number variations</i>)
CRL	długość ciemieniowo-siedzeniowa (ang. <i>crown-rump length</i>)
CBS	β-syntaza cysteationiny (ang. <i>cystathionine β-synthase</i>)
CYP450	rodzina cytochrome CYP450 (P450) (ang. <i>cytochrome 450 family</i>)
D	współczynnik nierównowagi sprzężeń (ang. <i>deviation</i>)
DNA	kwasy dezoksyrybonukleinowe (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	kwasy etylenodiaminotetraoctowe (ang. <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
eNOS	endotelialna syntaza NO (ang. <i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
ESHRE	Europejskie Towarzystwo Rozrodu Człowieka i Embriologii (ang. <i>European Society of Human Reproduction and Embryology</i>)
F	czynnik krzepnięcia (ang. <i>coagulation factor</i>)
FAD	dinukleotyd flawinoadeninowy (ang. <i>flavin adenine dinucleotide</i>)
FDP	produkty degradacji fibrynogenu/ fibryny (ang. <i>fibryn degradation products</i>)
FVL	mutacja 1691G>A czynnika V (Leiden) (ang. <i>factor V Leiden</i>)
GSTA1	glutation-S-transferaza alfa 1 (ang. <i>glutathione S-transferase</i>)
Hcy	homocysteina (ang. <i>homocysteine</i>)
HELLP	anemia hemolityczna, podwyższenie enzymów wątrobowych, obniżenie liczby płytek (ang. <i>hemolytic anemia, elevated liver enzymes, low platelet count</i>)
HHcy	hiperhomocysteinemia (ang. <i>hyperhomocysteinemia</i>)
ICSI	metoda wprowadzenia plemnika do cytoplazmy komórki jajowej (ang. <i>intracytoplasmic sperm injection</i>)
IL-1ra	antagonista receptora interleukiny 1 (ang. <i>interleukin 1 receptor antagonist</i>)
IUFD	zgon wewnątrzmaciczny (ang. <i>intrauterine fetal death</i>)
IUGR	wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu (ang. <i>intrauterine growth retardation</i>)
LA	antykoagulant toczniowy (ang. <i>lupus anticoagulant, lupus antibodies</i>)
LD	nierównowaga sprzężeń (ang. <i>linkage disequilibrium</i>)
LMWH	heparyna drobnocząsteczkowa (ang. <i>low molecular weight heparin</i>)
LOD	logarytm szans (ang. <i>logarithm of the likelihood odds ratio</i>)
MTHFR	reduktaza 5,10-metylenotetrahydrofolianowa (ang. <i>5,10-methylenetetrahydrofolate reductase</i>)

mRNA	matrycowy RNA (ang. <i>messenger RNA</i>)
NADPH	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NAT2	N-acetylotransferaza 2 (ang. <i>N-acetyltransferase 2</i>)
OD	gęstość optyczna (ang. <i>optical density</i>)
PAI-1	inhibitor fibrynolizy typu-1 (ang. <i>plasminogen activator inhibitor type-1</i>)
PCR	polimerazowa reakcja łańcuchowa (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	stan przedrzucawkowy (ang. <i>preeclampsia</i>)
PGF	łożyskowy czynnik wzrostu (ang. <i>placental growth factor</i>)
Prou-PA	prourokinaza (ang. <i>prourokinase</i>)
PSANZ	Australijskie i Nowozelandzkie Towarzystwo Medycyny Perinatalnej (ang. <i>Perinatal Society of Australia and New Zealand</i>)
PSANZ-PDC	klasyfikacja zgonów perinatalnych wg Australijskiego i Nowozelandzkiego Towarzystwa Medycyny Perinatalnej (ang. <i>Perinatal Society of Australia and New Zealand - Perinatal Death Classification</i>)
PTM	mutacja 20210G>A genu protrombiny (ang. <i>prothrombin mutation</i>)
PTSD	zespół stresu pourazowego (ang. <i>posttraumatic stress disorder</i>)
pz	par zasad (ang. <i>base pair</i> , bp)
RFLP	polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. <i>restriction fragments length polymorphism</i>)
RM	poronienia nawracające (ang. <i>recurrent miscarriage</i>)
RPL	nawracające utraty ciąży (ang. <i>recurrent pregnancy loss</i>)
SAM	S-adenozylometionina (ang. <i>S-adenosylmethionine</i>)
SAH	S-adenozylhomocysteina (ang. <i>S-adenosylhomocysteine</i>)
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
TAFI	inhibitor fibrynolizy aktywowany trombiną (ang. <i>thrombin activated fibrinolysis inhibitor</i>)
tPA	tkankowy aktywator plazminogenu (ang. <i>tissue plasminogen activator</i>)
u-PA	urokinazowy aktywator plazminogenu (ang. <i>plasminogen activator urokinase</i>)
UTR	nietranslowane sekwencje w mRNA (ang. <i>untranslated region</i>)
VTE	żylna choroba zakrzepowo- zatorowa (ang. <i>venous thromboembolism</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)
WR	współczynnik ryzyka, iloraz szans (ang. <i>odds ratio</i>)

WSTĘP

Od dawno podkreśla się, jak bardzo znaczącym i trudnym problemem w medycynie perinatalnej jest niemożność zajścia w ciążę, jak również niemożność jej donoszenia. Niepłodność dotyczy około 15% związków partnerskich w wieku rozrodczym. Współcześnie według Sekcji Płodności i Niepłodności Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego oraz Europejskiego Towarzystwa Rozrodu Człowieka i Embriologii szacuje się, że niepłodność w Polsce obejmuje nawet około 1,2 do 1,5 miliona par.

Z drugiej strony nie mniejszym problemem jest niemożność donoszenia ciąży, która dotyczy nawet kilkunastu procent kobiet i obejmuje poronienia samoistne, poronienia nawracające i zgony wewnątrzmaciczne w II połowie ciąży. Właściwa diagnostyka nawracających utrat ciąż jest trudnym wyzwaniem dla każdego lekarza ginekologa. Z jednej strony etiologia tych powikłań w większości przypadków pozostaje niewyjaśniona, z drugiej rezultaty wynikające z zastosowanych metod diagnostycznych i leczniczych często pozostają niezadawalające. Duża liczba osób pozostających w związku partnerskim, zarówno kobiet, jak i mężczyzn doświadczających utraty ciąży wymaga niejednokrotnie zastosowania wielu kompleksowych badań i algorytmów postępowania medycznego, jak również specjalnej opieki psychologicznej. Ze względu na rangę problemu w poznaniu etiopatogenezy tych powikłań zastosowanie znajdują coraz coraz nowocześniejsze metody diagnostyczne mające wskazać możliwe przyczyny występowania nawracających utrat ciąż.

Wiele metod z zakresu biologii molekularnej znalazło zastosowanie również w diagnostyce nawracających utrat ciąż. Jedną z nich jest określenie znaczenia polimorfizmów genów kandydujących, które włączone w szlaki przemian biochemicznych, enzymatycznych i hormonalnych mają istotny udział w patomechanizmie niepowodzeń w ciąży. Badanie polimorfizmów genetycznych może zostać również wykorzystane do wyznaczania nowych markerów ryzyka wystąpienia poronień nawracających i zgonów wewnątrzmacicznych. Stąd coraz więcej badań bezpośrednio bada związek polimorfizmów genetycznych z występowaniem nawracających utrat ciąż (RPL – *recurrent pregnancy loss*).

Wydaje się, że w wielu patologiach dotyczących ciąży ważną rolę odgrywa nadmierna aktywacja procesu wykrzepiania wewnątrzmacicznego w krążeniu maciczno-łożyskowym,

szczególnie nasiloną u kobiet z trombofilią wrodzoną i nabytą. Wiele badań wskazuje na udział wrodzonej trombofilii w etiologii stanu przedrzucawkowego i rzucawki, przedwczesnego oddzielenia łożyska, ograniczenia wewnątrzmacicznego wzrastania płodu oraz żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej. W ostatnich latach analizuje się również udział trombofilii wrodzonej w etiopatogenezie poronień nawracających i zgonu wewnątrzmacicznego płodu w późnym okresie ciąży [Mousa i wsp., 2001, Adelberg i wsp., 2002, Alfirevic i wsp., 2002, Krabbendam i wsp., 2005, Kutteh i wsp., 2006].

KLASYFIKACJA NAWRACAJĄCYCH UTRAT CIĄŻ

Poronienia nawracające (RM – *recurrent miscarriages*) to trzy lub więcej następujących po sobie utrat ciąży przed 22 tygodniem czasu jej trwania. Wyklucza się tutaj ciążę biochemiczną, zaśniadową oraz ektopową. Poronienia nawracające mogą wystąpić z lub bez wcześniej zaistniałej ciąży zakończonej urodzeniem żywego dziecka. Definicję taką przyjęła Światowa Organizacja Zdrowia (WHO – *World Health Organization*) oraz Europejskie Towarzystwo Rozrodu Człowieka i Embriologii (ESHRE – *European Society of Human Reproduction and Embryology*). Przedstawiane przez szereg organizacji polskich i światowych rekomendacje wskazują, że kobiety po trzech i więcej poronieniach należy objąć poszerzoną diagnostyką w kierunku ustalenia przyczyn występujących niepowodzeń. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego proponują jednak objęcie szczególną opieką kobiet już z dwoma następującymi po sobie poronieniami w wywiadzie (utrata ciąży <22 tc.) [Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego, 2008].

Poronienie biochemiczne to utrata ciąży, która potwierdzona została poprzez pozytywny wynik poziomu hormonu beta-hCG w moczu kobiety lub podwyższonego poziomu beta-hCG w surowicy krwi przed potwierdzeniem ultrasonograficznym i histopatologicznym. Poronienie takie najczęściej ma miejsce przed 6 tygodniem ciąży.

Ciąża zaśniadowa powstaje w wyniku nieprawidłowości w procesie zapłodnienia, w wyniku czego dochodzi do nieprawidłowego rozwoju łożyska i płodu (zaśniad niecałkowity) lub szybkiego intensywnego rozwoju tylko nieprawidłowego łożyska (zaśniad całkowity). Ciąży ektopowej rozwija się poza jamą macicy (najczęściej w bańce jajowodu, w dalszej kolejności w obrębie jajnika, szyjki macicy, jamy brzusznej). W obydwu powyższych

sytuacjach po rozpoznaniu wdraża się postępowanie terapeutyczne prowadzące do zakończenia ciąży.

Poronieniem klinicznym określamy sytuację, kiedy nastąpiło zakończenie ciąży po potwierdzeniu ultrasonograficznym i histopatologicznym jej zaistnienia. Poronienia kliniczne można podzielić na wczesne, przed <13 tc. oraz późne pomiędzy 13-22 tc. czasu trwania ciąży. Te właśnie poronienia, w momencie powtarzania się powikłania podlegają klasyfikacji jako nawracające lub nawykowe i podlegają wielokierunkowej rozszerzonej diagnostyce.

Późnym obumarciem wewnątrzmacicznym lub wewnątrzmacicznym zgonem płodu (IUFD – *intrauterine fetal death*) określamy zgon płodu przed jego urodzeniem, który nastąpił w okresie od 22 tc. do końca czasu trwania ciąży. Inna definicja określa zgon wewnątrzmaciczny jako martwe urodzenie płodu z masą co najmniej 500 g. Również w przypadku tego powikłania w przebiegu ciąży należy wdrożyć szczegółową diagnostykę przyczyn jego wystąpienia.

EPIDEMIOLOGIA PORONIEŃ NAWRACAJĄCYCH I ZGONÓW WEWNĄTRZMACICZNYCH

Poronienia nawracające

Ocenia się, że nawet około 60-70% ciąż ulega samoistnemu poronieniu już na wstępnej fazie rozwoju zarodkowego (około 30-35% zarodków jest utraconych przed implantacją, a następne 30-35% tuż po implantacji ale przed terminem spodziewanej miesiączki). Dodatkowe 15% stanowią wczesne poronienia kliniczne, ale tu pojawiają się różnice w zależności od wieku kobiety. W licznych badaniach udokumentowano związek poronień z zaawansowanym wiekiem matki [Sauer i wsp., 2015]. Częstość występowania poronień wczesnych do 12+6 tc. szacowana jest na 10% w wieku 20-24 lata oraz nawet na 51% u kobiet w wieku 40-44 lata [Ticconi i wsp., 2015]. Późne poronienia od 13 do 22 tc. zdarzają się rzadziej i w całości populacji częstość ich występowania ocenia się na kilka procent.

Malformacje płodu obserwowane są w około 85% przypadków wczesnych klinicznych poronień. W tej grupie u 75% płodów obserwuje się nieprawidłowy kariotyp płodu, najczęściej aneuploidie chromosomalne [Saravolos i wsp., 2014].

U większości kobiet poronienia nawracające występują we wczesnym okresie ciąży, z czego znaczna część spowodowana jest obecnością aneuploidii chromosomowych. Aberracje

chromosomowe u płodów opisywane są w dużej grupie 29-60% kobiet z poronieniami nawracającymi. Znacznie mniejszy procent kobiet doświadcza poronień nawracających w późniejszym okresie ciąży. Poronienia te są w znacznie mniejszym stopniu związane z aberracjami chromosomowymi, a częściej spowodowane innymi przyczynami niż genetyczne. Ciekawą obserwacją jest występowanie poronień nawracających u tej samej kobiety w podobnym wieku ciążowym [Saito, 2009].

U 90% kobiet, które doświadczyły jednego poronienia następna ciąża kończy się urodzeniem zdrowego donoszonego noworodka. Dodatkowo pierwiastki i kobiety, u których wcześniejsza ciąża zakończyła się urodzeniem żywego dziecka mają mniejsze szanse na wystąpienie poronienia w następnej ciąży w porównaniu do kobiet, u których wcześniejsza ciąża zakończyła się poronieniem [Saito, 2009].

Okolo 5% par starających się o ciążę doświadcza dwóch następujących po sobie poronień, a okolo 1% par – trzech lub więcej następujących po sobie utrat ciąż. Po 2 następujących po sobie poronieniach 50-60% kobiet rodzi zdrowe donoszone dziecko. Po 3 następujących po sobie poronieniach szansa na następne niepowodzenie wynosi aż 45-50% i również zwiększa się wraz z wiekiem matki [Saito, 2009, Sauer i wsp., 2015].

Zgony wewnątrzmaciczne

Dane pochodzące z 2006 roku przedstawione przez *National Vital Statistics Report* w USA szacują częstość występowania późnych utrat ciąż na 6,05/1000 urodzeń, przy czym jest to wartość o 3% niższa w porównaniu do roku 2005 roku [MacDorman i wsp., 2012]. W skali światowej częstość ta różni się w zależności od jakości opieki zdrowotnej oraz definicji zgonu wewnątrzmacicznego w II i III trymestrze ciąży. Powszechne jest niedoszacowanie tego powikłania położniczego w krajach rozwijających się, co dodatkowo utrudnia przedstawienie rzetelnych ogólnoswiatowych statystyk. W 2006 roku przypuszczalna ogólnoswiatowa liczba późnych utrat ciąż wyniosła okolo 2,64 miliona (od 2,14 do 3,82 miliona). Szacuje się, że w okresie od 1995 roku do 2009 roku nastąpił spadek częstości zgonów wewnątrzmacicznych aż o 14,5%, co prawdopodobnie jest wynikiem poprawy standardów jakości opieki perinatalnej w krajach rozwiniętych [Cousens i wsp., 2011].

W podsumowaniu Lamont i wsp. na podstawie przeglądu baz Embase, Medline, Cochrane Library, PubMed, CINAHL, Scopus wyznaczono ryzyko wystąpienia IUFD w następnej ciąży. Zgon wewnątrzmaciczny zdefiniowano jako obumarcie po 20 tc. lub

urodzenie martwego płodu z masą co najmniej 400 g. Uzyskano dane dotyczące 3 412 079 kobiet z czego u 3 387 538 (99,3%) kobiet odnotowano wcześniej urodzenie żywego noworodka, natomiast u 24 541 (0,7%) kobiet odnotowano urodzenie martwe. W porównaniu do kobiet, które urodziły żywe dziecko z pierwszej ciąży, te kobiety, które doświadczyły IUFD w pierwszej ciąży miały 5 razy wyższe ryzyko ponownego wystąpienia IUFD w drugiej ciąży (WR=4,77). Ta duża analiza pokazuje, że ryzyko IUFD w następnej ciąży jest zdecydowanie wyższe u kobiet, które doświadczyły IUFD już w pierwszej ciąży [Lamont i wsp., 2015].

NAWRACAJĄCE UTRATY CIĄŻ JAKO PROBLEM PSYCHOLOGICZNY I SPOŁECZNY

Pod pojęciem utraty ciąży rozumie się wystąpienie poronienia samoistnego, indukowanego, poronień nawracających oraz zgonu wewnątrzmacicznego. Niewątpliwie każde z tych zdarzeń jest traumatycznym przeżyciem dla obojga partnerów. Szczególnie powtarzające się utraty ciąży stanowią istotny problem medyczny i psychospołeczny. Problem ten dotyczy według niektórych statystyk nawet kilkunastu procent kobiet i ich partnerów. Stąd uważa się, obydwójce partnerzy powinni zostać objęci kompleksową opieką medyczną i psychologiczną [Kolte i wsp., 2015].

W przeprowadzonych badaniach ocenia się, że nawet 20% kobiet, które doświadczyły utraty ciąży cierpi z powodu długoterminowych skutków psychicznych, jak stany lękowe czy depresja. Najsilniejszym z tych skutków jest zespół stresu pourazowego (PTSD – *posttraumatic stress disorder*), który jest zaburzeniem lękowym wywołującym stres o znacznym nasileniu często po długim okresie utajenia (kilka tygodni lub miesięcy). Zespół PTSD, najczęściej o zmiennym przebiegu, może w rzadkich przypadkach prowadzić nawet do trwałych zmian osobowości u pacjentki [Craig, 2001, Li i wsp., 2012, Kolte i wsp., 2015].

Najczęściej u kobiet po utracie ciąży istnieje potrzeba udzielenia rutynowej pomocy psychologicznej bezpośrednio po zdarzeniu. W trudniejszych przypadkach czasookres udzielanej pomocy i utrzymanie kontaktu z zespołem doświadczonych psychologów klinicznych może ulec wydłużeniu i jest różny w indywidualnych przypadkach. Obok pomocy psychologicznej w ostrych przypadkach kryzysu psychicznego bezpośrednio po utracie ciąży, należy zwrócić również uwagę na wskazanie grupy kobiet, u których z powodów pewnych uwarunkowań (brak wsparcia partnera i rodziny, zaburzenia osobowości, wcześniejsze nerwice) wzrasta ryzyko narastania problemów psychicznych w późniejszym

okresie po utracie ciąży. Szczególną sytuacją są poronienia nawracające i zgony wewnątrzmaciczne w późnej ciąży ujawniające doświadczenie utraty u obojga partnerów, czasem również uczucia osierocenia, szczególnie w przypadkach kiedy partnerzy nie mają dzieci. Okoliczności takie prowadzą do nałożenia się elementów reakcji psychologicznej i rozwinięcia syndromu żalu patologicznego, co wymaga profesjonalnej i kompleksowej pomocy psychoterapeutycznej. W żalu patologicznym emocje po stracie dziecka są trwałe i nie mijają po upływie dłuższego czasu. Z upływem czasu problem narasta, obserwuje się niechęć do zaakceptowania poniesionej straty i niemożność podjęcia własnego życia [Craig, 2001, Mevorach-Zussman i wsp., 2012, Kagami i wsp., 2012].

Czynniki ryzyka dla rozwinięcia się patologicznego żalu po stracie dziecka to brak wsparcia ze strony rodziny oraz społeczeństwa, brak właściwej opieki socjalnej, istniejące uprzednio lub pojawiające się po stracie trudności w związku partnerskim, brak dzieci w związku, ambiwalentne uczucia co do decyzji ponownego zajścia w ciążę. Ważnym czynnikiem są również istniejące zaburzenia osobowości prowadzące niejednokrotnie do problemów psychiatrycznych. Ryzyko pojawienia się uczucia żalu patologicznego występuje również często po zakończeniu ciąży z powodu istniejących wad płodu. Ponadto badania wskazały, że kobiety i mężczyźni wykazują odmienne wzorce wyrażania żalu po stracie dziecka, a szczególnie żalu patologicznego, co dodatkowo może nasilać trudności komunikacyjne w związku partnerskim. Utrata płodu lub dziecka pozostawia bardzo duży wpływ psychiczny zarówno na osobowości indywidualne partnerów, jak i na funkcjonowanie całego związku. Niestety nie dysponujemy obecnie wystarczającą ilością badań dokumentujących ten problem. Brakuje szczególnie badań długoterminowych oceniających sekwencję następujących po sobie stanów emocjonalnych i ich wpływu na psychikę pacjentki [Kersting i wsp. 2012, Li i wsp., 2012].

W obecnym czasie dostępne szeroko media często sugerują społeczeństwu, że kariera zawodowa oraz rozwój indywidualny są ważniejsze od życia rodzinnego i planowanego rozrodu. Często te wyobrażenia w społeczeństwie doprowadzają do odkładania macierzyństwa na późniejszy wiek [Heazell i wsp., 2015]. Na podstawie długotrwałych obserwacji wiadomo, że zaawansowany wiek matki jest czynnikiem ryzyka niepłodności i wad genetycznych płodu [Coughlan i wsp., 2014, Heazell i wsp., 2015]. Z drugiej strony z powodu przesunięcia się wieku rozrodczego opieka położnicza obejmuje obecnie większą liczbę pacjentek w zaawansowanym wieku z poronieniami nawracającymi oraz wewnątrzmacicznymi obumarzami po 20 tc. [Sauer i wsp., 2015]. Specjaliści w medycynie reprodukcyjnej oraz lekarze położnicy powinni promować bardziej realistyczny pogląd na

przebieg ciąży i porodu w zaawansowanym wieku matki. Należy dokładniej przedstawiać czynniki ryzyka i możliwe powikłania związane niejednokrotnie z ciążą po 40 roku życia. Ważne jest także przedstawienie obojgu partnerom dużego prawdopodobieństwa wystąpienia niepowodzeń położniczych w przypadku odkładania decyzji o zajściu w ciążę [Kolte i wsp., 2015, Sauer i wsp., 2015].

ETIOLOGIA PORONIEŃ NAWRACAJĄCYCH I ZGONÓW WEWNĄTRZMACICZNYCH

Przyczyny nawracających utrat ciąż są bardzo różnorodne i obejmują czynniki genetyczne, hormonalne, anatomiczne, immunologiczne, prozakrzepowe oraz środowiskowe. Stąd diagnostyka nawracających utrat ciąż jest trudna i niekiedy bardzo czasochłonna [Yu i wsp., 2002, Larsen i wsp., 2013]. Analiza przyczyn RPL powinna obejmować wszystkie możliwe czynniki z powyższych kategorii. Analizę tę należy rozpocząć od przeprowadzenia dokładnego wywiadu położniczego oraz szczegółowej oceny stanu zdrowia kobiety i jej partnera. Niekiedy potrzebna jest również specjalistyczna konsultacja internistyczna [Kaandorp i wsp., 2014]. Diagnostyka biochemiczna i hormonalna pomoże wykluczyć lub potwierdzić występowanie cukrzycy, czy chorób tarczycy. Dokładne badanie ultrasonograficzne może wskazać na wady macicy jako przyczynę nawracających utrat ciąż. Istotnym elementem są badania w kierunku trombofilii wrodzonej i nabytej. Absolutnie niezbędna jest diagnostyka obojga partnerów pod względem prawidłowości garnituru chromosomowego [Saravolos i wsp., 2012]. Innym, niemniej ważnym, punktem jest ocena występowania zakażeń układu rozrodczego. Pod uwagę należy wziąć także styl życia kobiety, wpływ stresu, stosowane używki, jak np. częste jeszcze w naszym społeczeństwie palenie papierosów [Saito, 2009, Clark i wsp., 2014].

Przyczyny poronień nawracających

Jako wiodącą przyczynę poronień samoistnych wskazuje się genetyczne nieprawidłowości występujące u płodu. Poronienia nawracające prawdopodobnie mają bardziej złożoną etiologię i spowodowane są obecnością nieprawidłowości chromosomalnych, ale również trombofilii u matki, dysfunkcji układu immunologicznego, zaburzeniami endokrynologicznymi. Jednak żadna z wymienionych powyżej przyczyn nie jest specyficzna tylko dla nawracających utrat ciąż. Dlatego w ostatnich latach powstały nowe koncepcje dotyczące etiologii poronień samoistnych i nawracających. Poronienia późne w II

trymestrze ciąży mają bardzo różnorodne przyczyny, najczęściej nakładające się na siebie nawzajem [McNamee i wsp., 2014, Afroze i wsp., 2014]. Dodatkowo pacjentki z poronieniami w II trymestrze ciąży w wywiadzie znajdują się w grupie zwiększonego ryzyka wystąpienia następnego poronienia oraz porodu przedwczesnego. Prawdopodobnie najbardziej różnorodną grupę pod względem przyczyn prezentują kobiety z niewyjaśnionymi poronieniami [Christiansen i wsp., 2006, McNamee i wsp., 2012, McNamee i wsp., 2014, Afroze i wsp., 2014].

Czynniki genetyczne

Od dawna wiadomo, że potencjał reprodukcyjny człowieka nie jest w pełni efektywny i nie wszystkie zaistniałe ciąży kończą się urodzeniem zdrowego donoszonego noworodka. Nieefektywność potencjału rozrodczego człowieka wynika z faktu, że już około 70% zapłodnionych zarodków ludzkich ulega poronieniu we wczesnym okresie ciąży [Hyde i wsp., 2015]. Najczęstszą przyczyną poronień samoistnych, jak również nawracających szczególnie w I trymestrze ciąży (najczęstsza przyczyna poronień przed 10 tc.) jest występująca u płodu aneuploidia. Z drugiej strony co najmniej 50% wszystkich poronień związanych jest z nieprawidłowościami cytogenetycznymi - trisomią, poliploidią i monosomią chromosomu X [Saito, 2009, Vaiman i wsp., 2015].

Uważa się, że w przypadku poronień nawracających istnieją dodatkowe, i nie zawsze wykryte, powtarzające się w kolejnych ciążach nieprawidłowości genetyczne. Stąd istnieje konieczność badania kariotypu obojga rodziców dla stwierdzenia etiologii poronień i rokowania przebiegu następnej ciąży. W 2-4% przypadków par z RM jeden z partnerów (najczęściej kobieta) wykazuje rearanżacje strukturalne chromosomów. Najczęściej są to translokacje zrównoważone. Z wysokim ryzykiem poronień związane są także inwersje chromosomów. Z drugiej strony badania pokazują, że sperma mężczyzn z par, u których odnotowano poronienia nawracające wykazuje wysoki stopień uszkodzenia DNA i nieprawidłowej budowy chromosomów [Christiansen i wsp., 2006, Hyde i wsp., 2015].

Stąd ważna rola przeprowadzanych obecnie testów genetycznych, jak badania kariotypu obydwójga rodziców, określenia nieprawidłowości struktury i liczby chromosomów (badania *microarray*) [Kutteh, 2015]. W poronieniach nawracających ważnym punktem jest badanie genetyczne fragmentów kosmówki uzyskanych po wyłżeczkowaniu jamy macicy. Ma to znaczenie wyjaśniające bezpośrednio przyczynę poronienia, jak również znaczenie prognostyczne dla przyszłych ciąż [Shahine i wsp., 2015]. Obecnie uważa się, że u par z

poronieniami nawracającymi obiecujące rezultaty daje również genetyczna diagnostyka przedimplantacyjna [Hyde i wsp., 2015].

Czynniki hormonalne i endokrynne

Zaburzenia hormonalne są przyczyną około 8-15% poronień nawracających. Zarówno lokalny maciczo-łożyskowy, jak i maczyny system hormonalny jest niesłuchanie ważny w utrzymaniu i prawidłowym rozwoju wczesnej ciąży [Larsen i wsp., 2013]. W tym zakresie najczęstszymi przyczynami RM u matki są niewydolność fazy lutealnej, zaburzenia czynności tarczycy, zespół policystycznych jajników (PCOS – *polycystic ovary syndrome*), hiperprolaktynemia i zaburzenia hormonalne oraz insulinooporność w przebiegu cukrzycy [Carp, 2015]. Również podwyższony poziom androgenów u kobiet oraz endometrioza uważane są przez niektórych autorów za przyczyny RM [Pluchino i wsp., 2014].

U około 8-10% kobiet z poronieniami nawracającymi stwierdza się zespół PCO co związane jest hiperandrogenemią, otyłością i hiperinsulinemią. Mechanizm poronień w PCOS skorelowany jest z otyłością i insulinoopornością. W dalszym następstwie powoduje to zaburzenia odpowiedzi fibrynolitycznej i prowadzi do nieprawidłowej implantacji embrionu [Arredondo i wsp., 2006]. Dyskusyjna jest natomiast rola udziału zwiększonego poziomu prolaktyny oraz niewydolności fazy lutealnej w patomechanizmie RM. Z drugiej strony wykazano korzystną rolę podawania bromokryptyny i kabergoliny w redukcji wskaźnika poronień u niektórych kobiet z RM [Arredondo i wsp., 2006].

Zarówno hipo-, jak i hipertyreozą może być przyczyną nieprawidłowego przebiegu ciąży i złego stanu urodzeniowego noworodka. Subkliniczna postać hipotyreozy i obecność przeciwciał przeciw-tarczycowych powodują wzrost ryzyka wystąpienia RPL. Niektóre badania przeprowadzone u kobiet z subkliniczną postacią hipotyreozy pokazują obniżenie ryzyka RM, porodu przedwczesnego jak również poprawę stanu noworodka w przypadku zastosowanego leczenia. Inne analizy wskazują na brak jakichkolwiek korzyści w powyższym przypadku. Obecność przeciwciał przeciw-tarczycowych wiązana jest z poronieniami samoistnymi, nawracającymi, jak również z porodem przedwczesnym. Obecne rekomendacje wskazują na potrzebę leczenia zarówno hipo-, jak i hipertyreozą. Również subkliniczna hipotyreoza w przebiegu ciąży wymaga leczenia substytucyjnego [Sarkar i wsp., 2012, Negro i wsp., 2014].

Niewątpliwie również choroby autoimmunologiczne związane są z występowaniem RM (także te przebiegające z eutyreozą). Interesującym faktem jest również odnotowanie

wzrostu ryzyka niepłodności oraz poronień nawracających u kobiet z niskim poziomem przeciwciał przeciwtarczycowych oraz obniżonym poziomem witaminy D [Twig i wsp., 2012]. Co więcej opisano interakcję pomiędzy przeciwciałami przeciwtarczycowymi oraz antyfosfolipidowymi i ich znaczenie w etiologii RM [De Carolis i wsp., 2004].

Czynniki anatomiczne

Potwierdzone wady anatomiczne macicy stanowią przyczynę poronień nawracających u około 10-15% kobiet. Najczęstsza wada macicy to przegroda macicy, co powoduje niekiedy znacznego stopnia niedokrwienie macicy w obrębie przegrody i nieprawidłowy rozwój zarodka i na tym tle wystąpienie poronień nawracających. Przyjmuje się, że im większa przegroda tym większe prawdopodobieństwo wystąpienia poronienia. Dodatkowo zaobserwowano, że u kobiet z macicą łukowatą częściej dochodzi do poronień późnych w II trymestrze ciąży [Guimarães Filho i wsp., 2006a, Ford i wsp., 2009].

Również mięśniaki podśluzówkowe oraz włókniaki mogą być przyczyną deformacji jamy macicy oraz błony śluzowej macicy. W ten sposób niekorzystnie wpływają na implantację, oraz w następstwie, powodują wzrost ryzyka wystąpienia RM. Natomiast związek pomiędzy mięśniakami śródściennymi i podsurowicówkowymi a ryzykiem RM jest nadal kontrowersyjny [Guimarães Filho i wsp., 2006b].

Adenomioza nie jest bezpośrednio związana z niepłodnością jednak wcześniejsze studia pokazały, że adenomioza w mechanizmie immunologicznym może powodować wystąpienie RM. Nadal dyskusyjny jest związek zespołu Ashermana, zrostów wewnątrzmacicznych, polipów endometroidalnych oraz endometriozy z bezpośrednim występowaniem RM [Tomassetti i wsp., 2006]. Natomiast niewydolność cieśniowo-szyjkowa może być przyczyną późnych poronień nawracających w II trymestrze ciąży [Saito, 2009].

Czynniki immunologiczne

Zespół antyfosfolipidowy

Dużo badań wskazuje na związek pomiędzy obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych (APL – *antiphospholipid antibodies*) a występowaniem RM, szczególnie we wczesnym I trymestrze ciąży [Wong i wsp., 2014, Esteve-Valverde i wsp., 2015]. Obecność przeciwciał antyfosfolipidowych wiąże się ze zmianami prozakrzepowymi w drobnych naczyniach żylnych krążenia maciczno-łożyskowego i może być przyczyną obumarcia wewnątrzmacicznego płodu, zarówno we wczesnym okresie ciąży, jak i w II połowie czasu jej trwania [Ernest i wsp., 2011,

Wong i wsp. 2014]. Obecność przeciwciał APL jak przeciwciała antykardiolipinowe (aCL - *anticardiolipin antibodies*), przeciwciała przeciw beta2-glikoproteinie I (β 2-GPI - *β 2-glycoprotein I antibodies*) oraz antykoagulant tocznia (LA – *lupus anticoagulant*) u ciężarnych związana jest z występowaniem wielu powikłań. Najczęściej wymieniane tu są: poronienia nawracające, stan przedrzucawkowy (szczególnie postać wczesna *early-onset PE*), zespół HELLP (*Hemolytic anemia, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count*), poród przedwczesny, wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu (IUGR – *intrauterine growth restriction*), zgon wewnątrzmaciczny, przedwczesne oddzielenie łożyska, obecność krwiaka podkosmówkowego [de Jesus i wsp., 2014, Patil i wsp., 2015].

Rozpoznanie zespołu antyfosfolipidowego (APS – *antiphospholipid syndrome*) powinno nastąpić na podstawie kryteriów opracowanych i przyjętych na międzynarodowym kongresie w Sydney (2006) i obejmować kryteria kliniczne i laboratoryjne [Miyakis i wsp., 2006]. U 5-15% kobiet z RM spostrzega się podwyższone miano przeciwciał APL. Rozpoznanie klasycznego położniczego APS odnosi się do kobiet, u których miano przeciwciał wzrasta tylko w ciąży i w czasie diagnostyki nie występuje żylna choroba zakrzepowo-zatorowa. Istnieją dowody wskazujące na korzyści zastosowania profilaktyki przeciwzakrzepowej u kobiet z zespołem APS pozwalającej na uniknięcie powikłań związanych z obecnością przeciwciał APL [Ernest i wsp., 2011, de Jesus i wsp., 2014].

Dysfunkcja autoimmunologiczna

Podczas ciąży matczyny układ immunologiczny musi ulec specjalnym zmianom pozwalającym na tolerancję semi-allogenicznego przeszczepu jakim jest płód. W zmianie odpowiedzi immunologicznej u matki niesłychanie istotną rolę odgrywają jednostka płodowo-maciczna oraz mechanizmy lokalne i systemowe [Quenby i wsp., 2006]. Podkreśla się uprzywilejowaną rolę stanu immunologicznego płodu, a wiele autorów próbuje również wyjaśnić zaangażowanie procesów immunologicznych w patofizjologię RM w badaniach przeprowadzanych na zwierzętach doświadczalnych [Bonney i wsp., 2014]. Dokładny jednak przebieg procesu, który zapobiega odrzuceniu płodu nie jest do końca poznany.

Obecnie sugeruje się, że w etiologii RM udział biorą dysregulacja immunologiczna oraz zaburzenia w budowie DNA w plemnikach [Larsen i wsp., 2013]. Dla prawidłowego przebiegu procesu implantacji potrzebne jest więc działanie wielu mediatorów immunologicznych, które regulują kolejne etapy inwazji trofoblastu. Prawdopodobnie kluczowym mechanizmem dla właściwego rozwoju ciąży jest utrzymanie równowagi w układzie cytokin Th1/Th2 z przewagą korzystnego działania cytokin typu Th2 [Krieg i wsp.,

2015]. Innym mechanizmem korzystnym dla prawidłowego rozwoju wczesnej ciąży jest redukcja aktywności komórek *natural killers* w macicy [Ford i wsp., 2009]. Prawdopodobnie również złożona równowaga pomiędzy progesteronem, gonadotropiną kosmówkową (beta-hCG) i łożyskowym czynnikiem wzrostu (PGF - *placental growth factor*), wpływa na odpowiedź immunologiczną i mechanizmy matczynej tolerancji na płodowe i ojcowskie antygeny [Ford i wsp., 2009]. W badaniach doświadczalnych na zwierzętach zaburzenia w zakresie powyższych procesów immunologicznych są przyczyną poronień nawracających [Ford i wsp., 2009, Krieg i wsp., 2015].

Przyczyną poronień nawracających mogą być również inne procesy zapalne, jak zapalenie błony śluzowej macicy (*endometritis*), czy procesy zapalne przebiegające w jajowodach [Saito, 2009, Ford i wsp., 2009].

Badania przyczyn RM skupiają się również na zaburzeniach na zaburzeniach spermatogenezy, jak również na procesach regulacji implantacji wynikających z zaburzenia odpowiedzi endometrium na implantację [Saravolos i wsp., 2012].

Czynniki infekcyjne

Infekcje są stosunkowo rzadką przyczyną poronień samoistnych i nawracających. Ocenia się, że 1 do 4% RM spowodowane jest infekcjami bakteryjnymi oraz wirusowymi. Obecność czynników infekcyjnych związana jest przede wszystkim z poronieniami wczesnym [Nigro i wsp., 2011]. Za najczęstsze czynniki etiologiczne uważa się mikroorganizmy z rodzaju *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Listeria*, *Toxoplasma*, *Rubella*, *Cytomegalovirus*, *Herpes virus*, *Parvovirus* [Saito, 2009, Ford i wsp., 2009]. Mechanizmy włączone w patofizjologię RM w przypadku infekcji to powstawanie toksycznych metabolitów, rozwój odpowiedzi immunologicznej w procesie zapalnym, przewlekłe zapalenie błony śluzowej macicy oraz wystąpienie zapalenia błon płodowych i kosmówki (*chorioamnionitis*). Wiele badań wykazuje związek poronień nawracających z obecnością *Chlamydia trachomatis* w pochwie i kanale szyjki macicy [Eggert-Kruse i wsp., 2014, Kishore i wsp., 2003]. Ciekawe doniesienia związane są z obecnością zakażenia wirusami HPV i występowaniem poronień [Ticconi i wsp., 2013]. Również wirusy z rodzaju *Herpes* będąc przyczyną nawracających infekcji dróg rodnych mogą powodować nawracające utraty ciąży. W grupie kobiet z waginozą bakteryjną częściej obserwowano występowanie poronień nawracających. W doniesieniach wskazuje się na możliwą rolę infekcji parwowirusem B19 w etiologii poronień nawracających [Kishore i wsp., 2006].

Z pewnością u kobiet z wywiadem obciążonym poronieniami nawracającymi istnieje potrzeba przeprowadzenia diagnostyki również kierunku obecności infekcji bakteryjnych i wirusowych celem włączenia antybiotykoterapii celowanej lub leczenia lekami przeciwwirusowymi [Rekomendacje *Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine* 2012].

Czynniki środowiskowe

Na podstawie badań wskazuje się na wpływ niektórych niekorzystnych czynników środowiskowych na występowanie nawracających utrat ciąży. Co więcej sugeruje się współdziałanie czynników środowiskowych i czynników genetycznych w etiologii RM oraz IUFD. Palenie papierosów, nadmierne spożycie kofeiny oraz alkoholu, jak również stosowanie narkotyków (kokaina) uznawane są jako możliwe przyczyny RPL. Spostrzega się także większy odsetek niepowodzeń położniczych u kobiet otyłych.

Obecnie uważa się, że już małe ilości alkoholu podwyższają ryzyko wystąpienia poronienia, a ryzyko wzrasta proporcjonalnie do ilości spożywanego alkoholu na dobę. Spożywanie ponad 4 drinków na tydzień powoduje znaczny wzrost ryzyka wystąpienia poronienia w I trymestrze ciąży (WR=2,82) [Andersen i wsp., 2012]. Wiele badań dotyczy również spożywania kofeiny przez kobiety ciężarne. Tutaj nie spostrzega się wzrostu ryzyka wystąpienia poronienia przy spożywaniu 1-2 filiżanek kawy dziennie. Tylko w przypadku gdy ciężarna spożywa ponad 7 filiżanek kawy na dzień spostrzeżono większe ryzyko wystąpienia poronienia (WR=1,48) [Bech i wsp., 2005].

Palenie papierosów jest dobrze udokumentowanym czynnikiem ryzyka wystąpienia powikłań naczyniowych w krążeniu łożyskowo-macicznym w późnej ciąży. Sprzeczne doniesienia dotyczą natomiast wystąpienia poronień, w tym również poronień nawracających. Niektóre badania donoszą o znacznym wzroście ryzyka poronień u kobiet palaczek papierosów [Saravolos i wsp., 2011]. Natomiast duże prospektywne badanie (24608 ciężarnych) nie pokazało wzrostu ryzyka wystąpienia poronienia u kobiet palaczek [Wisborg i wsp., 2003].

Innym czynnikiem zwiększającym ryzyko poronienia jest otyłość u matki. Metwally i wsp. w przeprowadzonej meta-analizie pokazali wzrost ryzyka poronień samoistnych i nawracających u kobiet ze wskaźnikiem masy ciała (BMI – *body mass index*) powyżej 25 kg/m² w porównaniu do kobiet z BMI poniżej 25 kg/m² [Metwally i wsp., 2008].

Niektóre przeprowadzone badania analizują również związek występowania poronień samoistnych i nawracających z niekorzystnym oddziaływaniem stresu i ćwiczeń fizycznych u ciężarnych. Zależność ta pozostaje jednak dyskusyjna [Saravelos i wsp., 2011].

Trombofilia wrodzona

Niewątpliwie istotną rolę w etiologii nawracających utrat ciąży odgrywają warianty polimorficzne genów włączonych w patomechanizm poronień nawracających i zgonu wewnątrzmacicznego w II połowie ciąży. Szczególną uwagę zwraca się na polimorfizmy w zakresie układu krzepnięcia i fibrynolizy, których obecność wiąże się z gotowością prozakrzepową i zmianami w krążeniu maciczno-łożyskowym [Saito, 2009, Ford i wsp., 2009, Rambaldi i wsp., 2014]. Obecnie istnieje wiele badań dokumentujących związek trombofilii wrodzonej z występowaniem nawracających niepowodzeń położniczych. Mechanizmem łączącym trombofilie wrodzone z występowaniem poronień i obumarcia wewnątrzmacicznego jest zakrzepica w drobnych naczyniach krążenia maciczno-łożyskowego [Bonnar i wsp. 1998, Bonnar i wsp., 1999, Middeldorp i wsp., 2014].

Za najistotniejsze przyczyny trombofilii wrodzonej uważa się obecność czynnika V Leiden (*1691G>A*) (FVL – *factor V Leiden*), polimorfizmu *20210G>A* genu protrombiny (PTM – *prothrombin mutation*), polimorfizmów czynnika VII krzepnięcia, genu inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1 – *inhibitor activator plasminogen 1*), czy polimorfizmu genu reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR – *methyltetrahydrofolate reductase*). Za rzadsze przyczyny nawykowych niepowodzeń uważa się niedobór białka C, białka S oraz antytrombiny III. Badanie potwierdzające znaczenie trombofilii wrodzonej w etiologii nawracających utrat ciąży prowadzone są w wielu ośrodkach na całym świecie i dotyczą różnych etnicznie populacji [Kupferminc i wsp., 1999, Alonso i wsp., 2002, Kist i wsp., 2008, Bennet i wsp., 2012, Vaiman i wsp., 2015].

Niektórzy autorzy wskazują również na wzrost ryzyka wystąpienia niepowodzeń w ciąży, w tym szczególnie RM oraz IUFD u kobiet nosicielek trombofilii złożonej [Larciprete i wsp., 2010]. Warto zwrócić uwagę, że dotąd opublikowano mało badań dotyczących związku trombofilii ojcowskiej z występowaniem poronień nawracających i zgonu wewnątrzmacicznego [Jaleel i wsp., 2013, Udry i wsp., 2014].

Najczęstsze przyczyny, najczęściej stosowane metody diagnostyczne oraz możliwości terapeutyczne w przypadku poronień nawracających przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Przyczyny, diagnostyka oraz możliwości terapeutyczne poronień nawracających.

	<i>Przyczyny</i>	<i>Diagnostyka</i>	<i>Możliwości terapeutyczne</i>
<i>Czynniki genetyczne</i>	Aberracje chromosomalne - trisomia, monosomia X, triploidia, tetraploidia Aberracje strukturalne - translokacje nie zrównoważone Mutacje jedno- i wielogenowy (np. mutacje w genie dla kolagenu)	Oznaczanie kariotypu rodziców	Poradnictwo genetyczne IVF po wykonaniu przedimplantacyjnej diagnostyki genetycznej
<i>Czynniki hormonalne</i>	Niewydolność fazy lutealnej Hiperprolaktynemia Hipotyreoza Zaburzenia wydzielania gonadotropin Niewyrównana cukrzyca	Badania hormonalne (TSH, T3, T4, PRL) Test insulinooporności Test rezerwy jajników Przeciwciała przeciwciężarowe	Terapia hormonalna (suplementacja II fazy cyklu, podawanie hormonów tarczycy, metformina) leczenie cukrzycy
<i>Czynniki anatomiczne</i>	Wady wrodzone - przegroda macicy, macica podwójna, dwurożna, łukowata Zespół Ashermana Niewydolność cieśniowo-szyjkowa	Ultrasonografia 2D lub 3D Histerosalpingografia Histeroskopia	Histeroscopia - Resekcja przegrody, zrostów, mięśniaków podśluzówkowych Myomektomia – w przypadku mięśniaków śródściennych i podsurowicówkowych >5 cm
<i>Czynniki infekcyjne</i>	TORCH Chlamydia, Ureaplasma, Mycoplasma Listeria monocytogenes	Posiew z kanału szyjki i pochwy Panel urogenitalny	Terapia antybiotykowa
<i>Czynniki środowiskowe</i>	Palenie papierosów, alkohol, narkotyki	Palenie papierosów Alkohol Narkotyki	Poradnictwo psychologiczne Odsunięcie od czynników narażenia
<i>Czynniki immunologiczne</i>	Trombofilia nabyta – zespół APS	Poziom przeciwciał APL (kardiolipina, antykoagulant tocznia, przeciwciała przeciwko B2-glikoproteinie I)	Profilaktyka ASA oraz LMWH w małych dawkach
<i>Trombofilie wrodzone</i>	Obecność polimorfizmów w czynnikach układu krzepnięcia i fibrynolizy	Poziom homocysteiny Oporność na aktywowane białko C Oznaczanie mutacji Leiden, protrombiny MTHFR	Profilaktyka ASA oraz LMWH w małych dawkach Hiperhomocysteinemia – podawanie FA, wit. B6, B12

Etiologia zgonów wewnątrzmacicznych

Przyczyny zgonów wewnątrzmacicznych najczęściej można zakwalifikować jako matczyne, płodowe lub łożyskowe. Do czynników matczynych należą czas trwania ciąży >42 tc., nieprawidłowo kontrolowana cukrzyca, choroby towarzyszące: toczeń układowy, zespół antyfosfolipidowy, infekcje, nadciśnienie tętnicze, stan przedrzucawkowy/rzucawka, hemoglobinopatie. Jako przyczyny matczyne wymienia się także zaawansowany wiek matki, konflikt serologiczny, pęknięcie macicy, uraz lub nagły zgon matki. W tej grupie przyczyn znajdują się również trombofilie wrodzone i nabyte. Czynniki płodowe wpływające na wystąpienie IUFD to ciąża wielopłodowa, wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu, wady wrodzone, nieprawidłowości genetyczne, infekcje, obrzęk uogólniony o różnej etiologii. Ostatnie grupa przyczyn łożyskowych przyczyn IUFD obejmuje nieprawidłowości dotyczące pępowiny, przedwczesne oddzielenie łożyska, przedwczesne pęknięcie błon płodowych, naczynia przodujące, krwotok płodowo-matczyny, niewydolność łożyskowa) [Rekomendacje *Stillbirth Collaborative Research Network Writing Group* 2011]. Niestety etiologia zgonów wewnątrzmacicznych w II połowie ciąży pozostaje nieznana w aż w 25-60% przypadków.

Wyniki jednej z analiz wskazują, że czynnik łożyskowy występuje aż w 64,9% przypadków późnych zgonów wewnątrzmacicznych [Korteweg i wsp., 2009]. Metaanaliza 96 badań populacyjnych wykazała, że matczyne nadwaga oraz otyłość jest najważniejszym modyfikowalnym czynnikiem ryzyka. Istotnym natomiast czynnikiem ryzyka wystąpienia IUFD jest zaawansowany wiek matki (>35 rż.) oraz palenie tytoniu. Czynnikiem największego ryzyka okazały się natomiast wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu oraz oddzielenie łożyska [Flenady i wsp., 2011, Aune i wsp., 2014]. Co więcej, cukrzyca przedciążowa oraz nadciśnienie przewlekłe i w rozwijające się w przebiegu ciąży również znacznie zwiększają ryzyko wystąpienia tego powikłania położniczego [Gardosi i wsp., 2013]. Późne utraty ciąży częściej występują u Afroamerykanek, u pacjentek z obciążonym wywiadem w kierunku obumarcia wewnątrzmacicznego w II trymestrze ciąży lub IUGR, u pacjentek z niemożnością donoszenia ciąży, a także w przypadku zaawansowanego wieku ojca [Gardosi i wsp., 2013].

Ustalenie przyczyny zgonu wewnątrzmacicznego w II połowie ciąży jest niezwykle istotne z uwagi na przyszłe poradnictwo przedkoncepcyjne, prowadzenie kolejnej ciąży, czy diagnostykę prenatalną. W przypadku oczywistych przyczyn, jak np. wypadnięcie pępowiny dalsze badania zwykle nie są konieczne. W sytuacji anencefalii płodu, przedwczesnego

oddzielania łożyska dalsze analizy ogranicza się do badań toksykologicznych oraz badań przesiewowych w kierunku trombofilii. Jednak biorąc pod uwagę fakt, że aż w 60% przypadków etiologia pozostaje niejasna najważniejszym badaniem jest sekcja płodu. Alternatywą jest przeprowadzenie rezonansu magnetycznego obumarłego płodu. Co więcej, należy wnikliwie zbadać histopatologicznie łożysko oraz błony płodowe, łącznie z wykonaniem posiewów bakteriologicznych. Niezwykle istotne są również badania genetyczne płodu, ewentualnie obojga rodziców.

Wyróżnia się wiele systemów klasyfikacji przyczyn w etiologii zgonów wewnątrzmacicznych. Najbardziej znanymi jest klasyfikacja Tulip, w modyfikacji Wigglesworth oraz Aberdeen. Obecnie korzysta się również z klasyfikacji Re Co De (*Relevant Condition at Death*) oraz klasyfikacji utworzonej przez Australijskie Towarzystwo Medycyny Perinatalnej opisywanej skrótem PSANZ-PDC (*Perinatal Society of Australia and New Zealand - Perinatal Death Classification*). Klasyfikacje Wigglesworth, oraz Aberdeen wskazują tylko matczyne i płodowe czynniki jako przyczyny zgonu wewnątrzmacicznego, natomiast klasyfikacje Tulip oraz PSANZ-PDC oprócz matczynych i płodowych, analizują również łożyskowe czynniki mające wpływ na zgon wewnątrzmaciczny [Choudhary i wsp., 2014, Korteweg i wsp., 2008, Lu i wsp., 2009]. Określenie przyczyny IUFD jest niesłychanie istotne dla prowadzenia następnych ciąży, niestety w większości przypadków IUFD przyczyna pozostaje nieznana [Korteweg i wsp., 2006, Gordijn i wsp., 2009].

Wiele badań dotyczy przyczyn etiologicznych IUFD. Ogólnie przyjmuje się, że ciąża po uprzednim IUFD wykazuje 2-10-krotny wzrost ryzyka wystąpienia następnego epizodu IUFD, jak również wzrost wystąpienia innych powikłań. Lęk związany z obawą przed następnym niepowodzeniem, jak również wystąpienie innych komplikacji w ciąży wiąże się n niejednokrotnie z pojęciem decyzji o wcześniejszym zakończeniu porodu. Jednak niektóre badania pokazują, że poród przed 39 tc. nie prowadzi do redukcji ryzyka IUFD i redukcji wystąpienia innych powikłań u kobiet z wcześniejszym IUFD. Wybór optymalnego czasu zakończenia ciąży u kobiet z wcześniejszym epizodem IUFD jest bardzo trudny i wymaga dużego doświadczenia klinicznego [Silver i wsp., 2011]. W badaniu Heuser i wsp. oceniano ryzyko pojawienia się następnego IUFD w zależności od wieku ciążowego wystąpienia poprzedniego epizodu IUFD. Retrospektywnie oceniano grupę kobiet, które urodziły martwy płód z co najmniej jeszcze jedną ciążą po epizodzie IUFD. Analizowano grupę 2 887 matek oraz 5 090 następnych porodów w tej grupie. U kobiet, u których IUFD wystąpiło pomiędzy 20-23 tc. ryzyko wystąpienia następnego niepowodzenia i IUFD wzrastało 3-krotnie (RR=2,9). Kobiety z IUFD pomiędzy 28-31 tc. i po 40 tc. miały odpowiednio 2,5 oraz 3,5

zwiększone ryzyko wystąpienia następnego epizodu IUFD. Wiek ciążowy pierwszego epizodu IUFD stanowi czynnik predykcyjny wystąpienia następnego epizodu IUFD. Ten efekt jest bardzo wyraźny u kobiet z bardzo wczesnymi obumarzami oraz z epizodem IUFD po terminie porodu [Heuser i wsp., 2014].

Wydaje się również, że określenie przyczyny IUFD i udziału czynników ryzyka powinno następować z zastosowaniem takiej samej klasyfikacji we wszystkich przypadkach IUFD u tej samej kobiety. Powoduje to lepsze zrozumienie patofizjologii IUFD i powoduje wzrost przewidywalności wystąpienia następnego epizodu IUFD [Nijkamp i wsp., 2013]. Ciekawe badanie dotyczyło oceny wpływu obecności przeciwciał APL na wystąpienie IUFD. Retrospektywnie 515 pacjentek badano na obecność przeciwciał (przeciwjądrowych, przeciwmitochondrialnych, przeciwciał przeciw peroksydazie, przeciw tyroglobulinie oraz przeciwciała APL). Z wszystkich pacjentek 212 miało jeden lub więcej rodzajów przeciwciał, natomiast u 303 pacjentki nie potwierdzono obecności żadnego rodzaju przeciwciał. Z całej grupy u 119 pacjentek stwierdzono obecność RPL (2 lub więcej utrat ciąż) [Mumusoglu i wsp., 2015]. Częstość IUFD była statystycznie istotnie wyższa u kobiet z pozytywnym wynikiem w kierunku obecności jednego lub więcej rodzajów przeciwciał (17,0% vs. 10,6%, $p=0,002$). Stąd u kobiet z wywiadem w kierunku IUFD powinien zostać rozważony skrining w kierunku obecności niektórych przeciwciał [Mumusoglu i wsp., 2015].

Interesujące przeprowadzili również Pariente i wsp. oceniając u kobiet z IUFD zwiększenie ryzyka wystąpienia arterosklerozy i powikłań naczyniowych w późniejszym okresie życia [Pariente i wsp., 2014]. Analizę długoterminowych powikłań związanych z arterosklerozą naczyń przeprowadzono w grupach kobiet z lub bez wcześniejszego epizodu IUFD (analiza na przestrzeni 25 lat). Z ogólnej liczby 99 280 porodów włączonych do badania 1 879 porodów (1,9%) nastąpiło u pacjentek z co najmniej 1 wcześniejszym epizodem IUFD. Pacjentki z przebyłym epizodem IUFD wykazywały znacząco wyższe ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych i chorób nerek. Znaleziono również związek pomiędzy liczbą IUFD a zwiększonym ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych w późniejszym życiu. IUFD jest niezależnym czynnikiem ryzyka dla długoterminowych zmian aterosklerotycznych w naczyniach matki, a ryzyko to rośnie wraz ze wzrostem liczby epizodów IUFD [Pariente i wsp., 2014].

Szczególną pozycję w etiologii IUFD zajmuje czynnik matczyny, jakim jest trombofilia wrodzona spowodowana obecnością polimorfizmów genów kaskady krzepnięcia i fibrynolizy [Hefler i wsp., 2004, Simchen i wsp., 2010, Flenady i wsp., 2011].

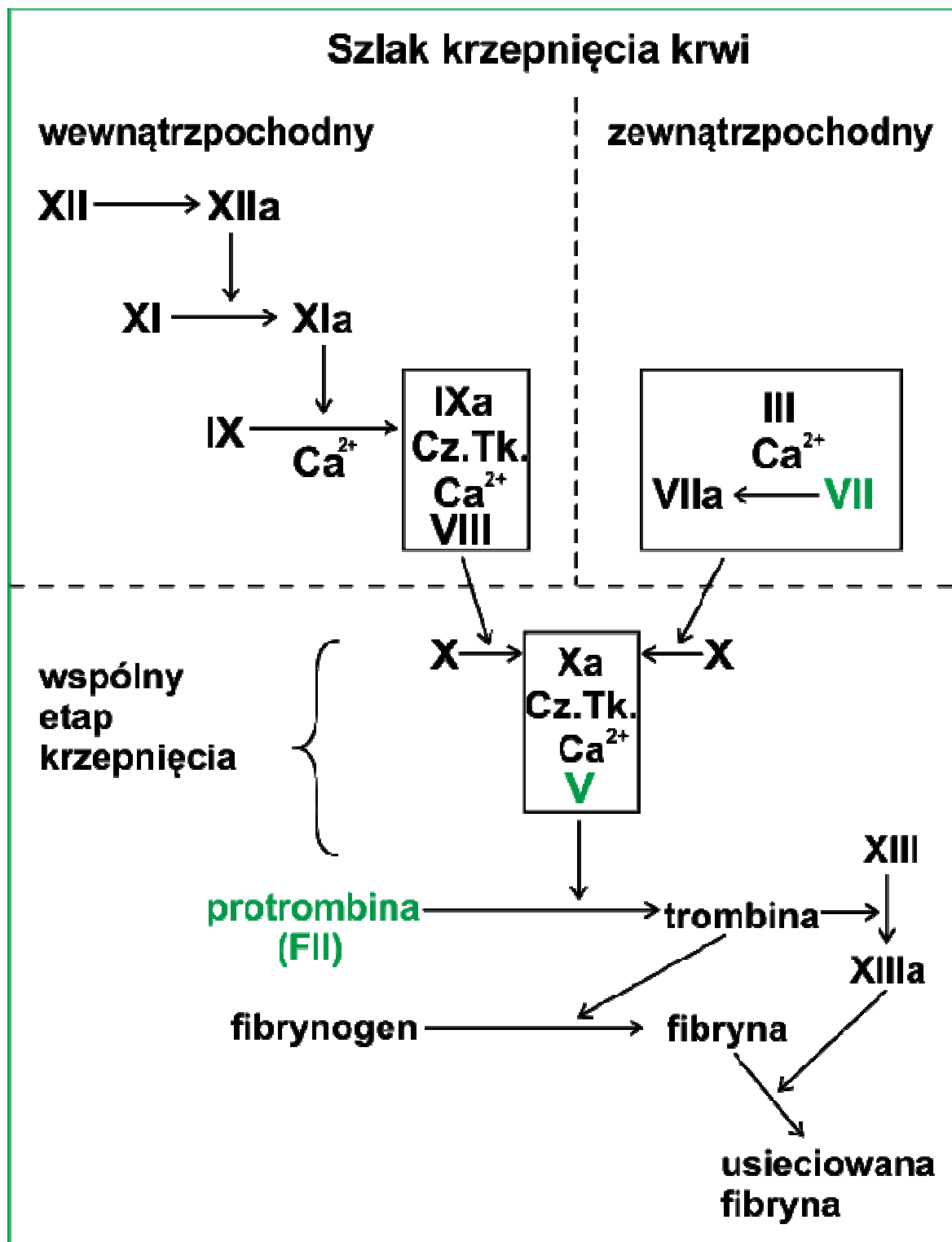
POLIMORFIZMY UKŁADU KRZEPNIĘCIA I FIBRYNOLIZY

Układ krzepnięcia i fibrynolizy jest szeregiem procesów zapewniających właściwą hemostazę w organizmie człowieka. Aktywacja procesów przebiega w sposób kaskadowy i bardzo dynamiczny, a aktywne postaci czynników krzepnięcia powstają ze swoich nieaktywnych prekursorów. Ważną rolę w kaskadzie krzepnięcia odgrywa wspólne działanie niektórych czynników. Jednym z kompleksów czynników jest kompleks tenazy (czynnik VIIIa-IXa-X, fosfolipidy, jony wapnia), w którym aktywacji ulega czynnik X, drugim natomiast kompleks protrombinazy (Va-Xa-II, fosfolipidy, jony wapnia), w którym aktywacji ulega czynnik II (przekształcenie protrombiny w trombinę) [Hoffman i wsp., 2001, Lewandowski, 2010].

Obecnie wyróżnia się stan spoczynkowy i stan aktywny układu krzepnięcia. Aktywny stan ma miejsce w przypadku uszkodzenia ściany naczynia i rozpoczęcia procesu generacji trombiny na fibroblastach i kolagenie ściany naczynia. Następuje szybkie gromadzenie się płytek krwi, które pokrywają miejsce uszkodzenia. Dalszy proces toczy się już na fosfolipidach płytek krwi, gdzie uaktywniane są kompleksy tenazy i protrombinazy. W stanie aktywnym, na skutek uszkodzenia ściany naczynia, dochodzi do szybkiej generacji trombiny w fazie inicjacji oraz fazie rozprzestrzeniania [Hoffman i wsp., 2001].

W fazie spoczynkowej obserwuje się tzw. krzepnięcia podprogowe. W trombofilii wrodzonej w obecności np. czynnika V Leiden (*1691G>A*) oraz mutacji protrombiny (*20210G>A*) szczególnie nasilony jest proces krzepnięcia podprogowego, które u kobiet ciężarnych może powodować zwiększone wykrzepianie w naczyniach krążenia maciczo-łożyskowego. W łożysku obserwowane są zakrzepy i zawały oraz zmiany zakrzepowo-zapalne [Rao i wsp., 1998]. Zakrzepy najczęściej zlokalizowane są międzykosmkowo. W przypadku naczyń wyróżnia się mikrozakrzepy w naczyniach kosmkowych oraz zakrzepy w innych większych naczyniach krążenia maciczo-łożyskowego. W tętnicach spiralnych natomiast obserwuje się proces miażdżycopodobny i zaburzoną inwazję trofoblastu do ścian naczyń. W następstwie tych procesów dochodzi do rozwoju wielu powikłań położniczych [Kupferminc i wsp., 1999].

Uproszczony schemat układu krzepnięcia przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Schemat układu krzepnięcia.

TROMBOFIŁA WRODZONA JAKO PRZYCZYNA NAWRACAJĄCYCH UTRAT CIAŻ

CZYNNIK V KRZEPNIĘCIA – POLIMORFIZM *1691G>A* ORAZ *1328C>T*

Czynnik V krzepnięcia, nazywany również proakceleryną, chemicznie jest glikoproteiną o ciężarze około 300 kilo Daltonów [Segers i wsp., 2007]. W procesie krzepnięcia połączenie aktywnych postaci czynnika V oraz X powoduje znaczne przyspieszenie reakcji przekształcania protrombiny w α -trombinę w porównaniu do działania samego aktywnego czynnika X [Barhoover i wsp., 2011, Hirbawi i wsp., 2010, Kalafatis i wsp., 2001].

W przebiegu prawidłowej kaskady krzepnięcia aktywna postać czynnika V oraz VIII jest unieczynniana dzięki działaniu aktywowanego kompleksu białka C (APC – *activated protein C*). Białko to jest jednym z kluczowych, endogennych inhibitorów kaskady krzepnięcia (obok antytrombiny III, białka S oraz białka Z) biorących udział w regulacji hemostazy [Dahlbäck, 2008a]. Reakcja ta przebiega w obecności nieenzymatycznego kofaktora - białka S oraz jonów Ca^{+2} . Aktywna postać FVa jest neutralizowana poprzez proteolityczne cięcie łańcucha ciężkiego w kilku miejscach. Pierwszą reakcją jest cięcie w pozycji Arg506, co pociąga za sobą szybsze czasowo cięcie w miejscu Arg306, a następnie cięcie w pozycji Arg679 oraz Lys994 [Dahlbäck, 2008b, Barhoover i wsp., 2011, Hirbawi i wsp., 2010].

W roku 1993 Dahlback i wsp., w toku badań nad rodzinnym występowaniem żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej zademonstrowali niedobór kofaktora dla działania APC, co opisali jako zjawisko oporności na działanie aktywowanego białka C (APCR - *activated protein C resistance*) [Dahlback i wsp., 1994]. Zjawisko to spowodowane jest obecnością mutacji punktowej w genie kodującym V czynnik krzepnięcia. W dalszej konsekwencji, w 1994 roku Bertina i wsp. zidentyfikowali istnienie mutacji punktowej (*1691G>A*) w eksonie 10 genu kodującego V czynnik krzepnięcia. Mutacja ta, od nazwy miejscowości, nazwana została mutacją Leiden (FVL) [Bertina i wsp., 1994]. Tranzycja dotycząca zasad purynowych: zamiany guaniny na adeninę (*CGA 1691 CAA*) powoduje jednocześnie zmianę sekwencji w łańcuchu białkowym czynnika V, gdzie w pozycji 506 łańcucha aminokwas arginina jest zastępowany przez glutaminę i miejsce cięcia Arg505/Arg506 ulega zamianie na Arg505/Gln506 (Arg506Gln, R506Q). Wystąpienie oporności na działanie białka C związane jest z obecnością genotypu hetero- lub homozygotycznego zmutowanego (*1691GA*, *1691AA*) [Bertina i wsp., 1994, Dahlback i wsp., 1994].

Ponieważ pozycja Arg506 jest jedną z pozycji proteolitycznego cięcia w procesie inaktywacji FVa przez kompleks APC-PS, w przypadku obecności mutacji Gln506 inaktywacja czynnika V zachodzi około 10 razy wolniej, głównie poprzez wolniejsze czasowo cięcie w pozycji Arg306 przez co działanie FVa jest przedłużone i powoduje nasilenie procesu wykrzepiania. Dodatkowo obecność zmiany typu Gln506 uniemożliwia również efektywne działanie FVa jako kofaktora w inaktywacji FVIIIa [Lane i wsp., 2000, Barhoover i wsp., 2011, Hirbawi i wsp., 2010]. Zmutowany FVL wykazuje taką samą aktywność prokoagulacyjną, natomiast jest niepodatny na hydrolizę przez białko APC. W wyniku tego następuje stabilizacja kompleksu protrombinazy, zwiększone wytwarzanie aktywnej trombiny i dalsza aktywacja czynników V i VIII w wyniku dodatniego sprzężenia zwrotnego. Powoduje to powstanie stanu nadkrzepliwości [Orban i wsp., 2005, Segers i wsp., 2007].

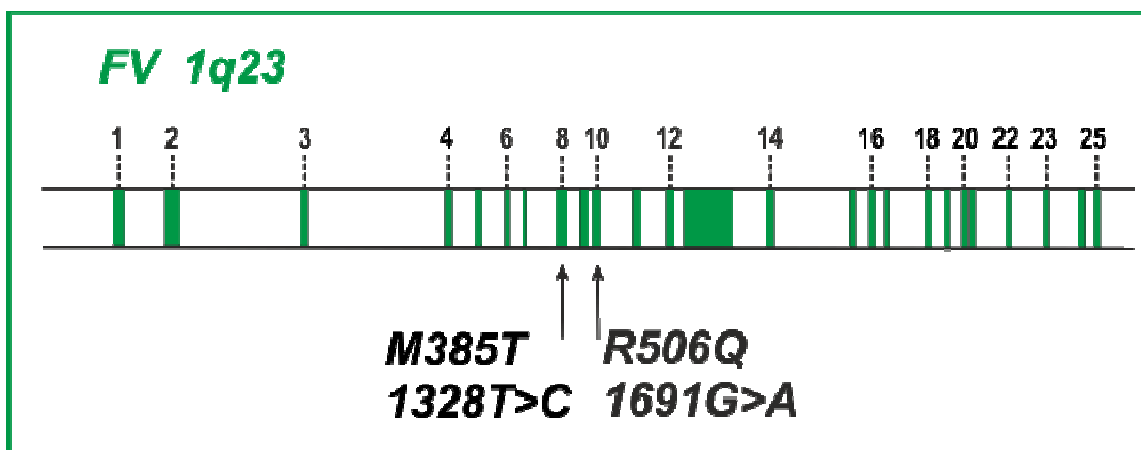
Gen kodujący FV ma długość 80 kilo par zasad, składa się z 25 eksonów, 24 intronów i położony jest na chromosomie 1 (1q21-q25). Do tej pory opisano mutacje mogące być przyczyną powikłań zakrzepowych, jak również obniżenia stężenia i aktywności FV ze skłonnością do powikłań krwotocznych.

Częstość występowania czynnika V Leiden w populacji ogólnej rasy kaukaskiej oceniana jest w większości badań na 5-8% [Rees i wsp., 1999, Ridker i wsp., 1997]. Obecność wariantu heterozygotycznego *1691GA* podnosi ryzyko wystąpienia powikłań zakrzepowych 4-8 razy. U homozygot ryzyko zakrzepicy wzrasta o nawet około 80 razy. Sugeruje się, że zaburzenia naczyniowe w łożysku mogą być spowodowane nieprawidłowościami wynikającymi z obecności zmutowanych wariantów czynnika V Leiden [Ament i wsp., 2003]. Oprócz znanych powikłań związanych z nosicielstwem czynnika V Leiden obserwowano również związek pomiędzy nosicielstwem czynnika V Leiden u matki a wystąpieniem udaru u płodu lub noworodka [Calderwood i wsp., 2005].

Mutacja praktycznie prawie wcale nie występuje u Azjatów, Afrykanów oraz rdzennej ludności australijskiej (Aborygeni). Ryzyko wystąpienia powikłań zakrzepowych znacząco wzrasta wśród osób nosicieli mutacji Leiden (genotyp *1691GA* oraz *1691AA*). W przeprowadzonych do tej pory badaniach odnotowano 2-7 krotny wzrost ryzyka zakrzepicy przy obecności jednego zmutowanego allela *1691A*, natomiast obecność dwóch zmutowanych alleli *1691A* podnosi to ryzyko aż o 40-80, a nawet 100 razy. Istnieją sugestie, że pojawienie się mutacji Leiden w genie FV było swoistym krokiem w ewolucji prowadzącym do zmniejszenia utraty krwi podczas porodu [Zivelin i wsp., 2006].

Warto wspomnieć o istnieniu innych patologicznych wariantów FV, które przyczyniają się do wystąpienia stanu nadkrzepliwości. Są one spowodowane m. in. obecnością mutacji punktowej $1090G>C$ w eksonie 7 ($AGG\ 1090\ ACG$) genu FV, co powoduje zamianę argininy w pozycji 306 łańcucha białkowego na treoninę ($Arg306Thr$). Mutacja ta wykryta została w *Addenbrooke's Hospital* w Cambridge w Wielkiej Brytanii i nazwana mutacją Cambridge, a wariant FV wykazujący obecność tej zmiany nosi nazwę czynnika V Cambridge. Drugi wariant, mutacja Hong Kong ($1090A>G$, $AGG\ 1090\ GGG$), powoduje zmianę w sekwencji białka FV - argininy na glicynę w pozycji 306 ($Arg306Gly$). Mutacja ta wykryta została u 3 Chińczyków: 2 pacjentów z głęboką zakrzepicą żylną oraz u 1 pacjenta nie wykazującego objawów choroby zakrzepowej [Chan i wsp., 1998]. Obydwie mutacje powodują powstanie oporności na aktywowane białko C, dopiero jednak przyszłe badania wyjaśnią właściwe znaczenie tych polimorfizmów w aktywności prozakrzepowej. Inna mutacja $4070A>G$ w genie czynnika V powoduje zamianę aminokwasu histydyny na argininę ($His1299Arg$) i znana jest pod nazwą haplotypu R2. U nosicieli tej formy mutacji spostrzeżono łagodnego stopnia oporność na APC oraz wzrost ryzyka wystąpienia zakrzepicy, szczególnie u pacjentów będących jednocześnie nosicielami mutacji Leiden (ryc. 2).

Polimorfizm zamiany pojedynczego nukleotydu $1328C>T$ ($M395T$, $rs6033$) polega na zamianie tyminy na cytozynę w eksonie 8 genu kodującego czynnik V krzepnięcia. Substytucja nukleotydowa powoduje zamianę aminokwasu w łańcuchu ciężkim białka czynnika V (w pozycji 385 łańcucha białkowego następuje zamiana aminokwasu metioniny na treoniny), co bezpośrednio wpływa na generację trombiny. Polimorfizm ten prawdopodobnie związany jest ze zwiększeniem oporności na aktywowane białko C. Stosunkowo niewiele badań dotyczy związku tego polimorfizmu z występowaniem powikłań w ciąży. Wykazano korelację wariantu $1328C>T$ FV z przedwczesnym oddzieleniem łożyska oraz stanem przedrzucawkowym, szczególnie z jego ciężką postacią [Watanbae i wsp., 2002, Faisal i wsp., 2004, Jaaskelainen i wsp., 2004] (ryc 2).



Rycina 2. Schemat genu czynnika krzepnięcia V Leiden.

Znaczenie mutacji Leiden V czynnika krzepnięcia w położnictwie

W ostatnich latach wskazano na związek występowania trombofilii z pojawianiem się szeregu powikłań w czasie trwania ciąży tj. występowaniem żyłnej choroby zakrzepowatozatorowej (VTE – *venous thromboembolism*) u kobiet ciężarnych, poronień nawracających, wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu, utraty ciąży w II oraz późnym III trymestrze ciąży, przedwczesnego oddzielenia łożyska oraz stanu przedrzucawkowego/rzucawki. Podstawową hipotezą łączącą wrodzone trombofilie z występowaniem powyższych powikłań w ciąży jest obserwacja, że stymulacja układu krzepnięcia spowodowana dysfunkcją endotelium łatwiej ujawnia się u kobiet z defektami uwarunkowanymi genetycznie w zakresie kaskady krzepnięcia, predysponującymi do powikłań zakrzepowych w krążeniu łożyskowym [Carp i wsp., 2002, Cao i wsp., 2013b]. Występowanie tych powikłań prawdopodobnie uwarunkowane jest nieprawidłowym rozwojem łożyska z nieadekwatną perfuzją łożyskową. Tendencja prozakrzepowa może manifestować się jako „zakrzepowe uszkodzenie” krążenia łożyskowego. Zmiany te obecnie określane są w literaturze skrótem PVC (*pregnancy vascular complications*) [Greer i wsp., 2003, Kupferminc, 2005].

Od dawno wiadomo, że sama ciąża jest stanem sprzyjającym powstawaniu „fizjologicznej nadkrzepliwości”. Przy dodatkowej obecności defektów genetycznych związanych z kaskadą krzepnięcia i nasileniem procesu wykrzepiania, w sprzyjających warunkach, może dojść do powstania poważnych powikłań u kobiet ciężarnych, co wpływa

na przebieg ciąży. W chwili obecnej podkreślana jest konieczność wykonania badań u pacjentek z komplikacjami towarzyszącymi ciąży (RM, PE, HELLP, przedwczesne oddzielenie łożyska, IUGR) w kierunku obecności mutacji Leiden. Wiele badań dotyczy możliwego znaczenia czynnika V Leiden w położnictwie, z czego duża część dotyczy stanu przedrzucawkowego [Ward i wsp., 1998, Seremak-Mrozikiewicz 2002a, Seremak-Mrozikiewicz 2002b, Rath, 2011, Haram i wsp., 2014]. Badania te rozpoczęto już w latach 90-tych XX wieku. W roku 1996 Dizon-Towson i wsp. porównując grupę kobiet ze stanem przedrzucawkowym i zdrowych ciężarnych (populacja kobiet z USA) stwierdziła, iż nosicielki mutacji Leiden znajdują się w grupie zwiększonego ryzyka rozwoju tego powikłania (częstość występowania zmutowanego allela Leiden w 8,8% u kobiet z PE) [Dizon-Towson i wsp., 1996]. Związek nosicielstwa czynnika V Leiden z rozwojem stanu przedrzucawkowego, szczególnie ciężkich jego postaci został potwierdzony w wielu badaniach [Coriu i wsp., 2014, Salimi i wsp., 2015].

W pracy Kuperminca i wsp. analizowano częstość występowania polimorfizmów genetycznych związanych z kaskadą krzepnięcia oraz równocześnie częstość występowania nabytych postaci trombofilii (niedobór białka S, niedobór białka C oraz antytrombiny III, obecność przeciwciał antykardiolipinowych) w grupie kobiet z ciężką postacią PE. Stwierdzono występowanie 67% przypadków dziedzicznej lub nabytej postaci zakrzepicy w grupie kobiet z PE potwierdzając w ten sposób duży udział zaburzeń koagulologicznych w etiopatogenezie tej jednostki chorobowej, w tym także udział czynników genetycznych m.in. mutacji Leiden [Kupferminc i wsp., 2000a].

W roku 2004 ukazała się duża metaanaliza wpływu obecności czynnika Leiden na wynik ciąży. Analizie poddano odpowiednio poronienia lub obumarcia wewnątrzmaciczne w pierwszym, drugim oraz trzecim trymestrze ciąży, wystąpienie stanu przedrzucawkowego, hipotrofii płodu i przedwczesnego oddzielenia łożyska. W przypadku jednorazowego zgonu wewnątrzmacicznego ciąży w trzecim trymestrze współczynnik ryzyka wynosił 2,4, wzrastając aż do 10,7 przy powtarzających się stratach ciąży w tym okresie (2 lub więcej IUFD). Współczynnik ryzyka wynosił 2,9 raza dla ciężkiego stanu przedrzucawkowego oraz 4,8 raza dla występowania hipotrofii płodu [Dudding i wsp., 2004]. W innej metaanalizie obejmującej ogółem 19 badań klinicznych (2 742 kobiety z nadciśnieniem w ciąży oraz 2 403 zdrowe ciężarne) wykazano, że obecność zmutowanego allela Leiden podwyższa ryzyko wystąpienia nadciśnienia w ciąży 2,25 raza. Wyniki były zbliżone do siebie w badaniach ograniczonych do rasy kaukaskiej oraz analiz grup z obecnością białkomoczu i ciśnieniem rozkurczowym powyżej 110 mmHg [Kosmas i wsp., 2003]. Prasmusinto i wsp.,

przeprowadzili badania porównując grupy kobiet ze stanem przedrzucawkowym oraz zdrowych ciężarnych w dwóch całkowicie różnych i odległych populacjach. Potwierdzono wzrost występowania czynnika Leiden u matek z PE w populacji niemiecko-chorwackiej oraz rzadkie występowanie czynnika Leiden w Indonezji. Badania te wskazują na konieczność właściwego doboru grup badanych pod względem pochodzenia i czystości etnicznej [Prasmusinto i wsp., 2004].

Znaczenie trombofilii dziedzicznej zasugerowano przede wszystkim w grupach kobiet ze stanem przedrzucawkowym stopnia ciężkiego oraz z zespołem HELLP [Nagy i wsp., 1998]. Wskazano znaczący wpływ mutacji Leiden oraz PTM na rozwój stanu przedrzucawkowego zarówno u nosicielek genotypu hetero-, jak i homozygotycznego [Grandone i wsp., 1997]. Metaanaliza Lin i wsp., wskazuje jednak, że tylko obecność mutacji Leiden jest istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju stanu przedrzucawkowego. W grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym sugeruje się 2 do 9 razy zwiększone ryzyko rozwoju tej choroby u kobiet nosicielek czynnika Leiden [Lin i wsp., 2005].

Istnieje także szereg publikacji nie potwierdzających udziału czynników genetycznych w etiologii PE. Nie znaleziono związku pomiędzy obecnością mutacji Leiden a stanem przedrzucawkowym w dwóch dużych badaniach przeprowadzonych w Holandii oraz w Anglii. Fenotypowo zaburzenia w układzie krzepnięcia oraz oporność na białko C w większym procencie potwierdzone zostały u kobiet ze stanem przedrzucawkowym, ale częstość występowania mutacji Leiden była podobna w grupie badanej z PE oraz w grupie kontrolnej. Podobne obserwacje dotyczyły innych badań nie potwierdzających korelacji pomiędzy występowaniem PE a nosicielstwem mutacji Leiden [Kim i wsp., 2001, Currie *i* wsp., 2002, Morrisson i wsp., 2002, Faisel i wsp., 2004]. Mimo doniesień o predyspozycji rasy czarnej do wystąpienia nadciśnienia w populacji ogólnej i oraz do częstszego występowania PE u kobiet ciężarnych tej rasy, badania przeprowadzone w wśród kobiet z plemienia Zulu nie potwierdziły korelacji występowania mutacji Leiden a występowania PE (100 pacjentek z PE oraz 110 zdrowych ciężarnych) [Hira i wsp., 2003].

Korelacja pomiędzy występowaniem mutacji Leiden oraz *G20210A* genu protrombiny u kobiet z PE oraz zespołem HELLP była badana przez Benedetto i wsp.. W grupie 111 pacjentek z PE - u 14 ciężarnych stwierdzono obecność jednej z dwóch badanych mutacji wskazując na ich znaczenie w patogenezie PE oraz zespołu HELLP [Benedetto i wsp., 2002]. Wskazano również na rolę mutacji Leiden oraz polimorfizmu *20210G>A* w genie protrombiny w przypadku wystąpienia ograniczenia wzrastania wewnątrzmacicznego [Anteby i wsp., 2004].

Wiele badań skupia się obecnie na znaczeniu nosicielstwa mutacji Leiden w etiologii nawracających utrat ciąż. Badania te obejmują szereg populacji etnicznie bardzo różnych [Younis i wsp., 2000, Brenner 2002, Finnan i wsp., 2002, Altintas i wsp., 2007, Yenicesu i wsp., 2010, Hossain i wsp., 2013, Parand i wsp., 2013, Isaoglu i wsp., 2014]. Te grupy kobiet omówiono w następujących rozdziałach.

Nie można również pominąć również pozytywnych efektów obserwowanych nosicieli czynnika V Leiden [Lindqvist, 2015]. Jednym z nich jest zmniejszenie nasilenia krwawień u pacjentów z łagodną i ciężką postacią hemofilii. Na uwagę zasługuje fakt, że około 10% pacjentów z ciężką postacią hemofilii (poniżej 1% poziomu czynnika VIII) wykazuje łagodny fenotyp objawów klinicznych dotyczący ilości i nasilenia krwawień, a także pojawienia się pierwszego epizodu dużego krwawienia prowadzącego do rozpoznania hemofilii [Franchini i wsp., 2010]. Porównanie objawów klinicznych fenotypu pacjentów z ciężką postacią hemofilii A wykazało, że u pacjentów z ciężką hemofilią będących jednocześnie nosicielami mutacji Leiden nasilenie krwawienia było mniejsze. Zauważono również późniejsze wystąpienie krwawień i późniejsze postawienie diagnozy ciężkiej hemofilii u dzieci nosicieli mutacji Leiden [Kalafatis i wsp., 2001]. Obserwacje te dotyczą również obecności innych mutacji związanych z układem krzepnięcia u pacjentów z hemofilią [Lee i wsp., 2000, Ghosh i wsp., 2001, Nowak-Gottl i wsp., 2003]. Innymi korzystnymi efektami obecności czynnika V Leiden jest ograniczenie nasilenia krwawień w przebiegu rozległych operacji; większy procent powodzeń zapłodnienia *in vitro* metodą wprowadzenia plemnika do cytoplazmy komórki jajowej (ICSI - *intra cytoplasmatic sperm injection*) u kobiet heterozygot pod względem czynnika Leiden [Lindqvist i wsp., 2008, Lindqvist, 2015].

Żylna choroba zakrzepowo-zatorowa w obecności czynnika Leiden

Ryzyko wystąpienia zakrzepicy u osób będących nosicielami genotypu heterozygotycznego *1691GA FVL* ocenia się jako podwyższone o około 4-7 razy. Większe jest w przypadku obciążonego wywiadu rodzinnego, to jest kiedy w bliskiej rodzinie (matka, ojciec, brat, siostra) występuje zakrzepica. Prawdopodobnie obecność czynnika Leiden ma również związek z wystąpieniem zakrzepicy tętniczej, zawału serca oraz udaru mózgowego. U nosicieli mutacji Leiden, u których nigdy nie wystąpiła zakrzepica nie ma potrzeby rutynowego stosowania antykoagulantów. Ta grupa osób powinna natomiast pomyśleć o

redukcji bądź wyeliminowaniu czynników ryzyka, które nakładając się na już istniejące ryzyko mogące spowodować wystąpienie zakrzepicy. U tych osób należy również rozważyć czasowe wdrożenie leczenia np. przy planowanym leczeniu operacyjnym lub długotrwałym unieruchomieniu [Martinelli i wsp., 2002].

U większości kobiet ciężarnych nosicielek czynnika Leiden ciąża przebiega prawidłowo i bez większych nieprawidłowości. Kobiety te, jeżeli znany jest fakt ich heterozygotyczności pod względem mutacji Leiden przed ciążą powinny pozostać pod specjalną opieką, wymagając zwiększonej uwagi ze strony lekarza-położnika.

Obecność czynnika Leiden podnosi ryzyko wystąpienia zakrzepicy w ciąży o około 4-7 razy tzn. tak jak u kobiet nieciężarnych. U kobiet ciężarnych, u których zakrzepica naczyń głębokich wystąpiła przed ciążą, w poprzedniej ciąży należy wdrożyć leczenie heparynami drobnocząsteczkowymi w dawkach profilaktycznych. Pojawienie się zakrzepicy w obecnej ciąży wymaga włączenia heparyny drobnocząsteczkowej w dawkach leczniczych.

U kobiet, które są nosicielkami czynnika Leiden i wymagają wdrożenia leczenia hormonalnego lub doustnej antykoncepcji hormonalnej. Przyjmowanie antykoncepcji doustnej podwyższa ryzyko wystąpienia zakrzepicy 3 do 4 razy w porównaniu do kobiet nieprzyjmujących tej formy zapobiegania ciąży. W przypadku nosicielek mutacji Leiden ryzyko to wzrasta do 35 razy. Podobnie w przypadku kobiet stosujących terapię hormonalną w okresie okołomenopauzalnym ryzyko zakrzepicy wzrasta 2-krotnie, nosicielki mutacji Leiden stosujące hormonalną terapię obarczone są ryzykiem 15 razy wyższym. U kobiet nosicielek mutacji Leiden zdecydowanie odradza się przyjmowanie doustnych środków antykoncepcyjnych.

Mimo, że w dotychczasowych badaniach otrzymane wyniki nie są w pełni zgodne większość autorów jest przekonana o wpływie polimorfizmów związanych z kaskadą krzepnięcia na występowanie powikłań w przebiegu ciąży. Coraz częściej uważa się, że nosicielki mutacji Leiden powinny być identyfikowane celem wprowadzenia profilaktyki powikłań zakrzepowych w czasie ciąży, zidentyfikowania grupy ryzyka w przypadkach poronień nawracających, hipotrofii oraz niewyjaśnionych przypadków wewnątrzmacicznego obumarcia płodu. Celowym i właściwym wydaje się, więc prowadzenie dalszych badań dotyczących tego problemu.

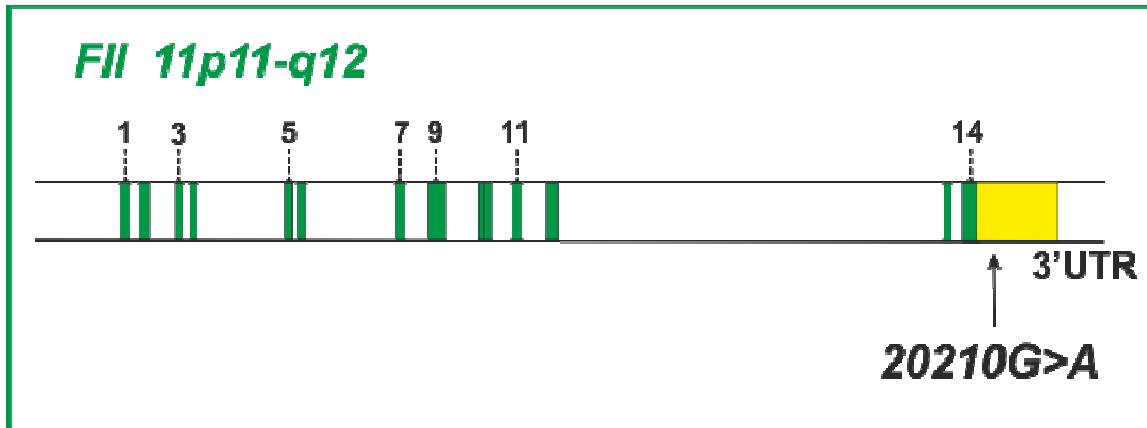
CZYNNIK II KRZEPNIĘCIA – POLIMORFIZM 20210G>A

Czynnik II krzepnięcia nazywany protrombiną jest bardzo istotnym elementem kaskady krzepnięcia. W kaskadzie krzepnięcia ulega transformacji do trombiny przy współdziałaniu czynnika X, zwanego protrombinazą. W prawidłowych warunkach protrombina jest przekształcana do trombiny jedynie w odpowiedzi na krwawienie. W innych sytuacjach nadmierna aktywność trombiny może warunkować rozwój trombofilii i skutkować licznymi powikłaniami. Odwrotną sytuację obserwuje się w przypadku niedoboru trombiny charakteryzującym się tendencją do przedłużonego krwawienia. Jest to zwykle związane z niedoborem witaminy K, niezbędnej do prawidłowej syntezy czynnika II w wątrobie. Protrombina wykazuje właściwości prozakrzepowe, antykoagulacyjne i antyfibrynolityczne, w związku z czym każda zmiana jej aktywności czy stężenia istotnie zaburza równowagę hemostazy.

Protrombina jest glikoproteiną o masie 72 kDa, syntetyzowaną w wątrobie przy współdziałaniu witaminy K. Stężenie czynnika II w osoczu wynosi około 100 mg/L, a czas biologicznego półtrwania - około 30 godzin. Wydzielenie do osocza poprzedza potranslacyjna modyfikacja przy udziale zależnej od witaminy K karboksylazy. Dochodzi do przekształcenia 10 specyficznych reszt glutaminianu w karboksylglutaminiany, które wiążą jony wapnia i umożliwiają oddziaływanie protrombiny z ujemnie naładowanymi błonami fosfolipidowymi płytek krwi. W obrębie struktury protrombiny można wyróżnić dwa regiony wewnętrznej homologii, zlokalizowane między resztami 40 i 270 białka. Ich dokładna rola nie jest w pełni poznana, jednak zakłada się, że mogą one pełnić rolę w oddziaływaniu protrombiny z innymi białkami. Wydzielana przez wątrobę protrombina krąży w osoczu jako zymogen. W trakcie uruchomienia kaskady krzepnięcia podlega natomiast proteolizie do proteazy serynowej trombiny. Przekształcenie protrombiny w trombinę ma miejsce na powierzchni płytek krwi przy udziale kompleksu protrombinazy (fosfolipidy, jony wapnia, czynnik Va, czynnik Xa). Synteza trombiny prowadzi do rozkładu fibrynogenu i powstania fibryny - głównego składnika skrzepu krwi.

Gen kodujący czynnik II krzepnięcia zlokalizowany jest na chromosomie 11 i zawiera 14 eksonów, 13 intronów oraz sekwencje niekodujące (UTR - *untranslated region*) na końcach 5' i 3'. Skrót *PTM* (*prothrombin mutation*) stosowany jest do opisu wariantu genu protrombiny, w którym adenina ulega tranzykcji na guaninę w pozycji 20210 (polimorfizm 20210G>A). Warunkuje to wzrost stężenia protrombiny w osoczu nawet o 20%, a klinicznie manifestuje się jako znacznie wzmożona aktywność prozakrzepowa [Ceelie i wsp., 2001]. Co więcej, polimorfizm ten odpowiada za wzrost aktywności czynnika II w osoczu krwi.

Skutkuje to istotnym zwiększeniem ryzyka powikłań zakrzepowo-zatorowych [Castoldi i wsp., 2000, Castoldi i wsp., 2007]. Polimorfizm ten po raz pierwszy został opisany przez Poorta i wsp. w 1996 roku [Poort i wsp., 1996] (ryc. 3).



Rycina 3. Schemat genu czynnika II krzepnięcia.

Nadmiernie wysokie stężenie protrombiny wiąże się również z nieprawidłowym funkcjonowaniem łożyska poprzez wpływ na adhezję komórek, proliferację mięśni gładkich i powstawanie naczyń krwionośnych. Przyjmuje się, że u nosicieli genotypu heterozygotycznego *20210GA* ryzyko poronienia jest zwiększone ponad dwukrotnie [Garcia i wsp., 1992, Reznikoff-Etievant i wsp., 2001]. Poza tworzeniem fibryny, trombina aktywuje płytki, komórki mięśni gładkich, fibroblasty, komórki mezangialne i makrofagi, które obecne są w obrębie tkanek łożyska [Bar-Shavit i wsp., 1992].

Wariant genetyczny *20210G>A* spotykany jest głównie u przedstawicieli rasy białej. Szacuje się, że po raz pierwszy pojawił się około 24 000 lat temu [Zivelin i wsp., 2006]. Mutacja *PTM* występuje częściej w Europie Południowej, głównie w rejonie śródziemnomorskim [Rosendaal i wsp., 1998, Leroyer i wsp., 1998].

Polimorfizm *20210G>A* genu protrombiny jest drugim z najczęstszych przyczyn wrodzonej trombofilii. Powyższy wariant genetyczny jest obecny u około 6% pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową i u około 20% rodzin z wywiadem obciążonym występowaniem zakrzepicy [Leroyer i wsp., 1998]. Co istotne, ryzyko wystąpienia epizodu zakrzepowo-zatorowego u nosicieli wzrasta tylko około 2,7-krotnie [Lane i wsp., 2000]. *PTM* warunkuje zwiększone ryzyko zakrzepicy zarówno w układzie żylnym, jak i tętnicznym [Poort i wsp., 1996, Rosendaal i wsp., 1997].

Poza polimorfizmem *20210G>A*, innym funkcjonalnym polimorfizmem genu protrombiny warunkującym wzrost stężenia i aktywności czynnika II w surowicy jest *19911A>G*. Polimorfizm *19911A>G* zlokalizowany jest w ostatnim intronie M. Allel *19911A* pozostaje w całkowitym sprzężeniu z allelem *20210A*. Obecność allele *G* w pozycji 19911 buduje motyw intronowy (triplet *GGG*), będący wzmacniaczem splicingu. Jest to bardzo ważne w trakcie przetwarzania grupy U2, do której należy intron M. Wariant genetyczny *19911A>G* oddziałuje również na efektywność splicingu [von Ahsen i wsp., 2004]. Allel *19911G* jest także częścią motywu *CAGGG*, jednego z dziesięciu znanych pentametrowych sekwencji, które umożliwiają określenie położenia krótkich intronów [von Ahsen i wsp., 2004]. Uważa się, że ryzyko zakrzepicy jest zwiększone u nosicieli polimorfizmu *19911A>G* niezależnie od obecności innych genetycznych czynników wpływających na występowanie powikłań zakrzepowo-zatorowych [Martinelli i wsp., 2006, Chinthammitr i wsp., 2006]. Wyniki otrzymane przez grupę badaczy Perez-Ceballos i wsp. sugerują, że genotyp *19911AG* zwiększa ryzyko zakrzepicy żył głębokich u nosicieli genotypu *20210GA* [Perez-Ceballos i wsp., 2002].

Obecność polimorfizmu *20210G>A* genu protrombiny warunkuje zwiększone ryzyko występowania kilku rodzajów powikłań położniczych. Szacuje się, że ryzyko poronienia u kobiet nosicielek genotypu *20210G>A* wzrasta około 2,4 razy, a w przypadku poronień późnych – około 3-krotnie [Brenner i wsp., 1999, Martinelli i wsp., 2000, Pickering i wsp., 2001]. Analiza Kupferminc i wsp. wskazuje również na zwiększone ryzyko rozwoju stanu przedrzucawkowego w przypadku obecności tego polimorfizmu [Kupferminc i wsp., 1999, Kupferminc i wsp., 2000b]. Jednak związek między wariantem *PTM* a poronieniami nawracającymi nie jest w pełni wyjaśniony, na co wskazują rozbieżne wnioski licznych analiz. Prawdopodobnie jest to częściowo uwarunkowane relatywnie niską częstością występowania polimorfizmu *20210G>A* genu czynnika II w populacji ogólnej [Goodman i wsp., 2006].

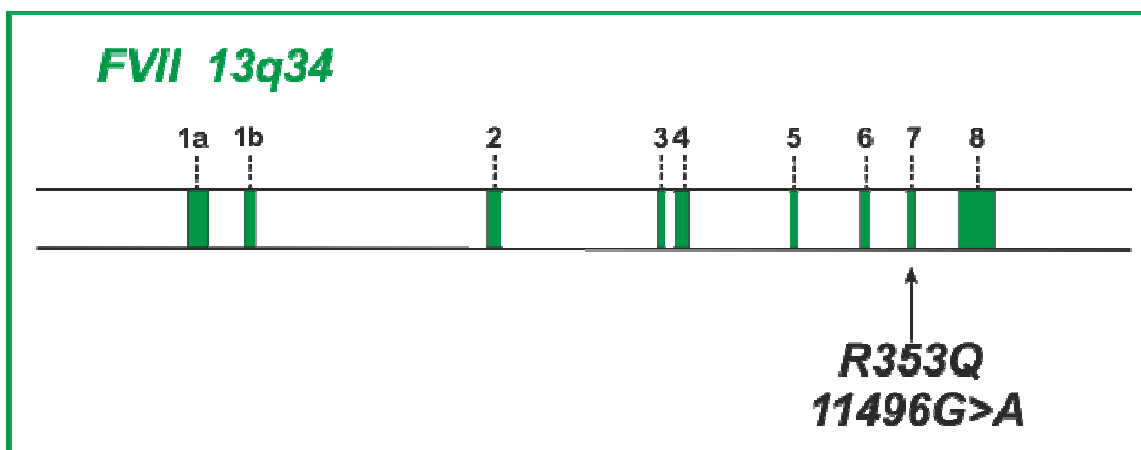
CZYNNIK VII KRZEPNIĘCIA - POLIMORFIZM *R353Q*

Czynnik VII (prokonwertyna), białko zbudowane z 406 aminokwasów pełni ważną rolę w kaskadzie krzepnięcia. Jest to syntetyzowana w wątrobie glikoproteina, której działanie

jest uwarunkowane dostępnością witaminy K. Nieaktywny zymogen wydzielany do krążenia ulega przekształceniu do formy aktywnej czynnika VIIa, która jest częścią zewnątrzpochodnej drogi aktywacji układu krzepnięcia. Czynniki VIIa jest w zasadzie proteazą serynową. Transformacja czynnika VII w jego aktywną formę zachodzi przy udziale czynnika IXa, Xa, XIIa, trombiny oraz plazminy i polega na cięciu pojedynczego wiązania Arg152-Ile153. Kofaktorem tych procesów jest czynnik tkankowy. Utworzony kompleks czynnika VIIa z czynnikiem tkankowym aktywuje czynniki IX i X w czynniki IXa i Xa [Seremak-Mrozikiewicz i wsp., 2009, Bartosh i wsp., 2013].

Poza uwarunkowaniami genetycznymi stężenie czynnika VII w osoczu jest poddane wpływom czynników środowiskowych m.in. wiek, płeć, masa ciała, stężenie lipidów w osoczu, dieta, stosowanie doustnej antykoncepcji czy okres okołomenopauzalny [Hoffman i wsp., 1992]. Związek lipidów dostarczanych z pożywieniem z aktywnością czynnika VII jest tłumaczony zależnością od aktywacji wewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia przez duże lipoproteiny oraz chylomikrony [Green i wsp., 1991].

Gen czynnika VII jest zlokalizowany na krótkim ramieniu 13 chromosomu (13q34, długość 12,8 kpz) i zawiera 9 egzonów. W regionie kodującym czynnika VII znajduje się 1398 par zasad. Istotną cechą genu czynnika VII jest jego duża polimorficzność. Większość z poznanych dotąd wariantów genetycznych warunkuje niedobór czynnika VII i wpływa na ryzyko występowania nadmiernych krwawień. Opisano jednak kilka polimorfizmów, które poprzez zwiększenie aktywności i stężenia czynnika VII w osoczu mogą wiązać się z występowaniem zmian zakrzepowo-zatorowych (ryc. 4) [Fujimaki i wsp., 2009, Seremak-Mrozikiewicz i wsp., 2009].



Rycina 4. Schemat genu czynnika VII krzepnięcia.

Jednym z nich jest polimorfizm *R353Q* (*Arg353Gln*, *11496G>A*), który powoduje zamianę aminokwasu argininy na glutaminę w pozycji 353 łańcucha białkowego. Warunkuje to obniżenie stężenia i aktywności czynnika VII. Sugeruje się, że obecność allela *353R* koreluje z redukcją ryzyka wystąpienia chorób o etiologii zakrzepowej, w tym poronień nawracających. Przy czym nie wiąże się to z ryzykiem krwotoków (u homozygotycznych nosicieli *353RR* obniżenie aktywności czynnika VII o 20-30% normy) [Green i wsp., 1991, Fujimaki i wsp., 2009]. W pracy Mrozikiewicz i wsp. zaobserwowano, że allel *353Q* ma znaczenie funkcjonalne wiążące się ze zjawiskiem tzw. *gene-dose effect*. Efekt ten polega na zmniejszeniu aktywności czynnika VII o 21% u nosicieli jednego zmutowanego allela, natomiast u nosicieli dwóch zmutowanych alleli o 36% [Mrozikiewicz i wsp., 2000, Sabater-Lleal i wsp., 2007].

Funkcjonalny polimorfizm *-323P0/P10* genu czynnika VII krzepnięcia dotyczy insercji sekwencji 10 par zasad (CCTATATCCT) w pozycji -323. Występowanie allela *-323P10* redukuje aktywność czynnika VII w osoczu [Pollak i wsp., 1996]. Sugeruje się, że zmutowany allel insercyjny *-323P10* odpowiada za częściową inhibicję transkrypcji genu czynnika VII, prowadząc do zmniejszonej syntezy i stężenia białka w osoczu. Analiza Humphries i wsp. dowodzi, że wpływ polimorfizmu *-323P0/P10* na aktywność i stężenie czynnika VII w surowicy jest większy niż polimorfizmu *Arg353Gln* [Humphries i wsp., 1996]. Badaniem oceniającym oba powyższe warianty genetyczne jest praca Liu i wsp. Badacze ci ocenili częstość występowania alleli polimorfizmów *Arg353Gln* oraz *-323P0/P10*

u 209 zdrowych mężczyzn i 214 zdrowych kobiet z populacji chińskiej. Odnotowano nierównowagę sprzężeń pomiędzy tymi dwoma wariantami genetycznymi. Ponadto zaobserwowano istotny pod względem statystycznym związek powyższych polimorfizmów ze stężeniem i aktywnością czynnika VII w surowicy, zwłaszcza u kobiet [Liu i wsp., 2002].

Innym funkcjonalnym polimorfizmem jest wariant $-112T>C$, czyli substytucja tyminy na cytozynę w pozycji -122 łańcucha nukleotydowego. Według niektórych badaczy polimorfizmy genu czynnika VII zgrupowane są w trzy główne haplotypy, które wykazują równowagę sprzężeń. Najczęściej występujący haplotyp zawiera allele $670A/-630A/-402G/-323P0/-401G/-122T$. Haplotyp $670C/-630G/-420A/-323P0/-401G/-122T$ koreluje ze zwiększeniem stężenia czynnika VII w surowicy. Z kolei haplotyp $670A/-630A/-402G/-323P10/-401T/-122C$ wiąże się z jego redukcją. Pośrednio jest to dowód na znaczenie polimorfizmu $-122T>C$ w regulacji ekspresji genu czynnika VII [Sabater-Lleal i wsp., 2007]. Reiner i wsp. również wskazują na rolę powyższego polimorfizmu na regulację stężenia czynnika VII i jego znaczenie w podatności na rozwój chorób o podłożu zakrzepowym [Reiner i wsp., 2007].

Sugeruje się również, że polimorfizmy $-402G>A$ oraz $-401G>T$ zlokalizowane w odcinku promotorowym genu czynnika VII są związane z poziomem jego transkrypcji. Allel $-401T$ warunkuje redukcję transkrypcji genu czynnika VII, natomiast allel $-402A$ istotnie ją zwiększa. Zatem istnieje związek powyższych wariantów genetycznych z całkowitym stężeniem czynnika VII w osoczu [van't Hooft i wsp., 1999]. Uważa się, że polimorfizmy $-402G>A$ oraz $-401G>T$ modulują wiązanie się białek jądrowych do promotora genu czynnika VII w komórkach wątroby, zmieniając tym samym ekspresji genu i stopień syntezy czynnika VII.

Korelacja polimorfizmów genetycznych genu czynnika VII krzepnięcia z niepowodzeniami położniczymi jest obecnie szeroko dyskutowana. Liczne badania dotyczą wariantów genu czynnika VII powodujących jego niedobór i mogących skutkować rozwojem groźnych powikłań krwotocznych w trakcie ciąży, porodu czy połogu. Jednak nawet u kobiet nosicielek genotypu heterozygotycznego pod względem mutacji warunkujących niedobór czynnika VII w ciąży obserwuje się wzrost jego stężenia. Ciąża jest stanem prozakrzepowym, co wynika z fizjologicznego wzrostu stężenia wszystkich czynników krzepnięcia, w tym przede wszystkim VII, VIII, X, XII, XIII oraz fibrynogenu [Kulkarni i wsp., 2006]. Jednak już u kobiet będących nosicielkami genotypu homozygotycznego pod względem mutacji

warunkujących niedobór czynnika VII krzepnięcia ryzyko wystąpienia zagrażającego życiu krwotoku w trakcie ciąży, porodu czy położu ulega znacznemu podwyższeniu.

REDUKTAZA METYLENOTETRAHYDROFOLIANOWA – POLIMORFIZM 677C>T, 1298A>C, 1793G>A

Reduktaza metylenotetrahydrofolianowa (MTHFR – *methyltetrahydrofolate reductase*) jest jednym z kluczowych enzymów biorących udział w szlaku metabolizmu folianów. Reduktaza 5,10-metylenotetrahydrofolianowa (MTHFR, EC 1.5.1.20) jest enzymem zależnym od dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD - *flavin adenine dinucleotide*) i wpływa na regulację przemiany homocysteiny, syntezę puryn i pirymydn, metylację białek i kwasów nukleinowych.

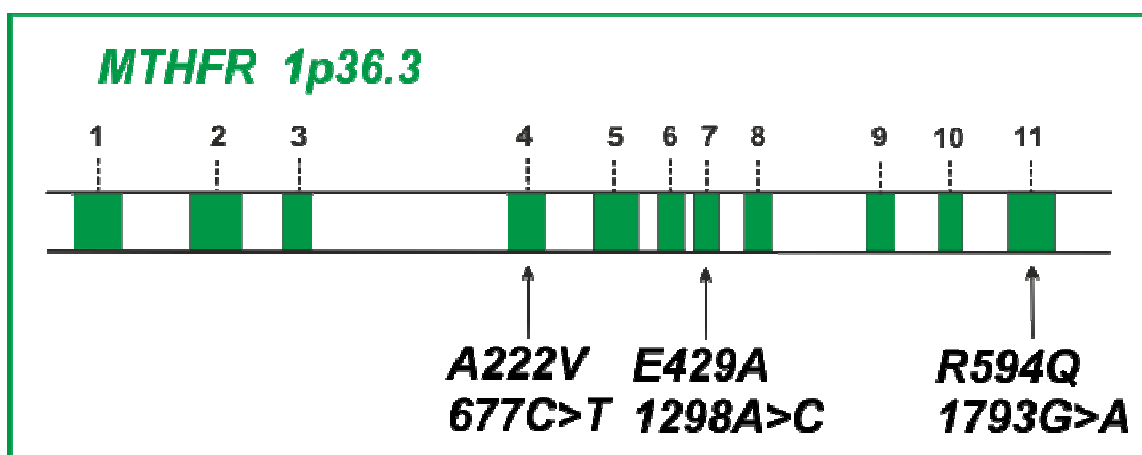
Reduktaza MTHF jest homodimerycznym białkiem zlokalizowanym w cytoplazmie komórek, składa się z dwóch podjednostek o wielkości ok. 77 kDa. Enzym uczestniczy w przekształcaniu metioniny do homocysteiny poprzez formy pośrednie S-adenozylometioninę (SAM – *S-adenosylmethionine*) oraz S-adenozylhomocysteinę (SAH – *S-adenosylhomocysteine*). Przy udziale trypsyny dochodzi do przecięcia każdej z podjednostek na domenę katalityczną oraz regulatorową. Proteoliza MTHFR skutkuje utratą inhibicji enzymu przez S-adenozylometioninę, jednak nie prowadzi to do osłabienia funkcji katalitycznych [Matthews i wsp., 1984]. Opisano występowanie czterech wariantów białka MTHFR: MTHFR1 (2 formy), MTHFR2 i MTHFR3. Powyższe formy mają takie same 3` końce, ale różnią się na końcach 5`. MTHFR katalizuje nieodwracalną konwersję 5,10-metylotetrahydrofolianu (methylene-THF) do 5-metylotetrahydrofolianu, który jest dawca donoru w reakcji remetylacji homocysteiny do metioniny.

Gen kodujący MTHFR zlokalizowany jest na telomerowym końcu chromosomu 1 w pozycji 1p36.3. Gen *MTHFR* składa się z 11 eksonów, a według niektórych badaczy z 13 eksonów [Goyette i wsp., 1994, Homberger i wsp., 2000]. W obrębie genu *MTHFR* odnotowano dotąd występowanie kilku funkcjonalnych polimorfizmów. Jednym z nich jest opisany przez Frosst i wsp. w 1995 roku polimorfizm 677C>T. Jest to zlokalizowana w eksonie czwartym punktowa tranzycja cytozyny na tyminę w pozycji 677, co skutkuje wbudowaniem waliny zamiast alaniny w pozycji 222 łańcucha białkowego. Znajduje się tu miejsce wiążące kofaktor MTHFR - dinukleotyd flawinoadeninowy. W wyniku powyższej tranzycji powstaje termolabilna forma MTHFR o obniżonej aktywności [Frosst i wsp., 1995].

U osób nosicieli zmutowanego genotypu *677TT* spostrzega się wyższe poziomy homocysteiny w moczu w porównaniu do osób nosicieli genotypu niezmutowanego *677CC*. Termolabilną formę enzymu opisał po raz pierwszy Kang i wsp. w roku 1988 [Kang i wsp., 1988].

W 1998 roku van der Put i wsp. zidentyfikowali inny wariant genu MTHFR – polimorfizm *1298A>C*, powodujący wymianę glutaminianu na alaninę w pozycji 429 łańcucha białkowego. Ta transwersja jest zlokalizowana w obrębie domeny regulatorowej, gdzie następuje wiązanie S-adenozylometioniny. Obecność powyższego wariantu genetycznego również skutkuje zmniejszeniem aktywności enzymu [van der Put 1998].

Polimorfizm *1793G>A* warunkuje zamianę guaniny na adeninę w eksonie 11, co prowadzi do zastąpienia argininy na glutaminę w pozycji 594. Polimorfizm ten powoduje zmianę w obrębie C-końca białka, które jest istotne dla jego stabilizacji, a tym samym aktywności i funkcji MTHFR [Rady i wsp., 2002]. Częstość występowania powyższego wariantu genetycznego szacuje się na niższą niż w przypadku polimorfizmów *677C>T* i *1298A>C* (ryc. 5).



Rycina 5. Schemat genu kodującego enzym MTHFR.

MTHFR wspólnie z dinukleotydem nikotynoamidoadeninowym (NADPH - *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) redukuje 5,10-metylenotetrahydrofolian do 5-metylotetrahydrofolianu, który jest substratem w reakcji remetylacji homocysteiny do metioniny. W związku z tym zaburzenia aktywności MTHFR prowadzą do patologicznego wzrostu stężenia homocysteiny w osoczu. Zespół badaczy Kang i wsp. w 1988 roku opisali

termolabilny wariant enzymu MTHFR. Odnotowali, że inkubacja ekstraktu limfocytów w temperaturze 46°C przez 5 minut prowadzi do łagodnej hiperhomocysteinemii [Kang i wsp., 1988]. Hiperhomocysteinemia jest czynnikiem ryzyka występowania wielu patologii, głównie chorób sercowo-naczyniowych, neurodegeneracyjnych, powikłań położniczych, wad rozwojowych płodu oraz wielu nowotworów. U ciężarnych poza istotnym zwiększeniem ryzyka występowania poronień nawracających, może również skutkować rozwojem stanu przedrzucawkowego, hipotrofii płodu, przedwczesnego oddzielenia łożyska, porodu przedwczesnego, zgonu wewnątrzmacicznego, a ponadto wad cewy nerwowej oraz rozszczepu wargi i podniebienia u płodu. Hiperhomocysteinemię często obserwuje się u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca, miażdżycą oraz zakrzepicą. Wysokie stężenie homocysteiny w osoczu prowadzi do uszkodzenia śródbłonna, zwiększenia ekspresji czynnika tkankowego, wzmożenia oksydacji LDL, wzrostu aktywności czynnika V oraz zaburzenia prawidłowych procesów fibrylizacji.

Nadmierne stężenie homocystyny może być skutkiem uwarunkowanego genetycznie spadku aktywności enzymów biorących udział w metabolizmie homocysteiny, niedoborami w żywieniu, lub niektórymi chorobami (nerek, wątroby, nowotwory, nadczynność tarczycy, łuszczyca lub alkoholizm). Spośród czynników genetycznych istotną rolę w rozwoju hiperhomocysteinemii zdają się odgrywać opisane powyżej warianty polimorficzne genu *MTHFR*. Również nieprawidłowości w innych genach kodujących enzymy biorące udział w przemianach homocysteiny mogą być odpowiedzialne za jej patologicznie wysokie stężenie. Wśród czynników środowiskowych hiperhomocysteinemii wymienia się głównie niedobór w diecie kofaktorów oraz substratów enzymów związanych z metabolizmem homocysteiny (witamina B6, B12, kwas foliowy), stosowanie doustnej antykoncepcji (estrogeny mogą zaburzać metabolizm folianów oraz witamin z grupy B), a także palenie papierosów.

Po raz pierwszy związek hiperhomocysteinemii z występowaniem poronień nawracających został opisany w 1993 roku przez Wouters i wsp. [Wouters i wsp., 1993]. Z kolei Nelen i wsp. oraz Brenner i wsp., odnotowali istotną korelację między obecnością genotypu homozygotycznego *677TT MTHFR* a powtarzającymi się utratami ciąży [Brenner i wsp., 1999, Nelen i wsp., 1997, Nelen i wsp., 2000, Ren i wsp., 2006]. W badaniu Nelen i wsp. do grupy badanej włączono 185 kobiet z populacji holenderskiej z wywiadem położniczym obciążonym występowaniem co najmniej dwóch następujących po sobie poronień przed 17 tygodniem ciąży. Grupę kontrolną stanowiło 113 kobiet, u których wykluczono poronienia i inne niepowodzenia położnicze w wywiadzie. Otrzymane wyniki

wskazywały na istotnie statystycznie częstsze występowanie zmutowanego genotypu homozygotycznego *677TT* w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej (WR=3,3; 95%P.U.=1,3-10,1) [Nelen i wsp., 1997]. Jednak w metaanalizie obejmującej 26 badań z 15 państw (pięć z Chin, po trzy z Izraela i Niemiec, po dwa z Austrii, Japonii i Stanów Zjednoczonych i po jednym z innych państw) łącznie zawierających 2120 przypadków poronień nawracających o niejasnej etiologii i 2949 osób włączonych do grupy kontrolnej nie potwierdzono istotności polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR* w zwiększaniu ryzyka występowania powtarzających się utrat cięż [Wang i wsp., 2006].

Znacznie więcej kontrowersji dotyczy polimorfizmu *1298A>C*. Wyniki analiz Wiesberg i wsp, oraz Chango i wsp. wskazują na obniżenie aktywności MTHFR u nosicieli tego wariantu genetycznego [Weisberg i wsp., 2001, Chango i wsp., 2000]. Jednak wiele badań z ostatnich lat neguje funkcjonalność powyższego polimorfizmu. Według Hanson i wsp. wariant *1298A>C* w odróżnieniu od polimorfizmu *677C>T* nie powoduje ani termolabilności białka, ani wzrostu stężenia homocysteiny w osoczu [Hanson i wsp., 2001]. Do podobnych wniosków prowadzi analiza przeprowadzona przez Friso i wsp [Friso i wsp., 2002]. Kilku autorów sugeruje, że nosicielstwo zmutowanych homozygotycznych genotypów obu wariantów genetycznych *677C>T* i *1298A>C* może prowadzić do obumarcia zarodka [Le Marchand i wsp., 2002, Isotalo i wsp., 2000, Zetterberg i wsp., 2002]. Pojawia się również sugestia, że polimorfizm *1298A>C* nie ma istotnego związku z niepowodzeniami położniczymi gdy jest badany osobno, ale tylko w trakcie jednoczesnej analizy z innymi polimorfizmami związanymi z trombofilią wrodzoną [Goodman i wsp., 2006; Subrt i wsp., 2008].

Podsumowanie najczęstszych przyczyn trombofilii wrodzonej przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Najczęstsze przyczyny trombofilii wrodzonej.

	<i>Literatura</i>	<i>% rasa kaukaska</i>	<i>Mutacja/Polimorfizm</i>
<i>Czynnik V Leiden</i>	Bertina i wsp., 1994	4,0 – 5,0	1691G>A
<i>Protrombina</i>	Poort i wsp., 1996	1,7 – 3,0	20210G>A
<i>Niedobór białka C</i>	Griffin i wsp., 1981	0,2 – 0,4	>160 mutacji
<i>Niedobór białka S</i>	Comp i wsp., 1984	0,2 – 1,0	>100 mutacji
<i>Niedobór antytrombiny III</i>	Egeberg i wsp., 1963	0,02	>80 mutacji
<i>MTHFR (677TT)</i>	Frosst i wsp., 1995	4,0 – 13,0	677C>T

PODSUMOWANIE

Wobec narastania problemu niepłodności oraz niemożności donoszenia ciąży celem wielu badań jest obecnie identyfikacja czynników etiologicznych tych powikłań. W tym zakresie doskonale mieszczą się badania dotyczące wariantów polimorficznych genów kandydatów włączonych w procesy krzepnięcia i fibrynolizy. Badania te stają się coraz powszechniejsze w diagnostyce kobiet z obciążonym wywiadem położniczym i coraz szerzej wprowadzane są do codziennej praktyki lekarskiej. Z drugiej strony rekomendacje światowych towarzystw naukowych wskazują na potrzebę przeprowadzania testów genetycznych w wybranych przypadkach nawracających utrat ciąży. Rekomendacje te dotyczą oznaczania obecności czynnika V Leiden, mutacji protrombiny, polimorfizmu enzymu MTHFR oraz niedoborów endogennych inhibitorów krzepnięcia.

Niestety niewiele analiz dotyczy znaczenia polimorfizmów kaskady krzepnięcia i fibrynolizy w populacji kobiet polskich z poronieniami nawracającymi. Brak jest również tego typu analiz genetycznych obejmujących polimorfizmy genów kandydujących w grupach kobiet polskich ze zgonem wewnątrzmacicznym w II połowie ciąży. W badaniach na świecie pokazano niejednokrotnie znaczenie trombofilii wrodzonej w niepowodzeniach położniczych. Dodatkowo pokazano, że średnia masa urodzeniowa noworodków matek z poronieniami nawracającymi w wywiadzie (z lub bez trombofilii wrodzonej) była statystycznie mniejsza w porównaniu do noworodków matek bez obciążonego wywiadu [Canda i wsp., 2012].

Stąd w pracy zdecydowano o analizie wariantów polimorficznych genów związanych z patomechanizmem poronień nawracających i zgonów wewnątrzmacicznych poprzez procesy regulujące delikatną równowagę hemostazy wewnątrznaczyniowej. Wybór genów i polimorfizmów przeprowadzono w oparciu o dostępne w tym zakresie doniesienia z literatury światowej i polskiej, a szczególnie w oparciu o osiągalne metaanalizy obejmujące duże populacyjnie grupy pacjentek. Dodatkowym aspektem o charakterze nowatorskim w pracy jest analiza polimorfizmu *1328T>C* genu czynnika V oraz *R353Q* genu czynnika VII do tej pory stosunkowo mało zbadanych w populacji kobiet polskich.

CEL PRACY

Celem pracy była próba oceny udziału wybranych trombofilii wrodzonych w etiologii powtarzających się utrat cięż (RPL) w grupie kobiet polskich z poronieniami nawracającymi (RM) oraz obumarciem wewnątrzmacicznym (IUFD).

Cel ten realizowano poprzez:

1. Ocenę częstości występowania genotypów i alleli wybranych polimorfizmów genów warunkujących trombofilie wrodzone w grupie kobiet z RPL (RM oraz IUFD) oraz w grupie zdrowych kobiet, u których co najmniej dwie ciąży zakończyły się urodzeniem zdrowego donoszonego noworodka. Do analizy wybrano polimorfizmy genów:
 - a. Czynnika V krzepnięcia FV: *1691G>A, 1328T>C*
 - b. Czynnika II krzepnięcia FII: *20210G>A*
 - c. Czynnika VII krzepnięcia FVII: *R353Q*
 - d. Reduktazy metylenotetrahydrofolianowej MTHFR: *667C>T, 1298A>C, 1793G>A*
2. Ocenę związku badanych polimorfizmów genetycznych w parametrach klinicznych w obydwu grupach badanej RPL oraz kontrolnej
3. Ocenę współwystępowania genotypów badanych polimorfizmów w grupie RPL oraz kontrolnej
4. Analizę korelacji haplotypów badanych polimorfizmów z występowaniem nawracających utrat ciąży.

MATERIAŁ I METODY

CHARAKTERYSTYKA BADANYCH GRUP

Badaniem objęto grupę 420 kobiet z utratami ciąży oraz 400 zdrowych kobiet, u których potwierdzono niepowikłany przebieg co najmniej dwóch ciąży zakończonych urodzeniem zdrowego donoszonego noworodka. Pacjentki do badania kwalifikowano w Klinice Perinatologii i Chorób Kobięcych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Badanie przeprowadzono w latach 2009-2015. Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu 1082/07, 867/15 oraz 210/16. Każda pacjentka została poinformowana o celu i zakresie badań oraz wyraziła na nie pisemną zgodę.

Pacjentki z grupy badanej RPL

Wśród badanych 420 kobiet wydzielono dwie grupy:

1. grupę RM - 359 kobiet z dwoma i więcej poronieniami nawracającymi w I oraz II trymestrze ciąży (do 22 tc.)
2. grupę IUFD - 61 kobiet ze zgonem wewnątrzmacicznym w II (po 22 tc) i III trymestrze ciąży

Następnie grupę RM podzielono w zależności:

1. od liczby poronień
 - a. podgrupa z 2 RM (282 kobiety)
 - b. podgrupa z >3 RM (77 kobiet)
2. od czasu wystąpienia poronień
 - a. podgrupa kobiet z RM <13 tc. (303 kobiety)
 - b. podgrupa kobiet z RM pomiędzy 13 a 22 tc. (56 kobiet)

Grupa RM

Do grupy RM włączono 359 kobiet ($30,99 \pm 4,50$ lat), u których poronienia następowały po sobie w czasie trwania jednego związku partnerskiego. Zakwalifikowane kobiety przechodziły następujące badania: ocena morfologii krwi, wykluczenie trombofilii wrodzonej spowodowanej obecnością białka C, S oraz antytrombiny III oraz trombofilii nabytej poprzez oznaczenie przeciwciał antyfosfolipidowych. U kobiet z tej grupy nie

występowały wcześniej powikłania zakrzepowe. Wiek ciąży obliczano na podstawie ostatniej miesiączki oraz potwierdzano lub korygowano w oparciu o kolejne badania ultrasonograficzne.

Grupa IUFD

Do analizy włączono 61 kobiet ($30,21 \pm 4,01$ lat) z co najmniej jednym potwierdzonym w wywiadzie zgonem wewnątrzmacicznym po 22 tc. W każdym przypadku przeprowadzano dokładny wywiad położniczy i internistyczny. Analizowano następujące dane: socjo-demograficzne (wiek, rodność, objęcie opieką położniczą), kliniczne (wiek ciąży w momencie IUFD, wywiad położniczy i internistyczny, obecne powikłania towarzyszące ciąży). Z badania wyłączano pacjentki o znanej przyczynie IUFD, jak nadciśnienie, stan przedrzucawkowy, przedwczesne oddzielenie łożyska, choroby infekcyjne matki, anemia ciężarnych, wady anatomiczne i genetyczne płodu. Do grupy IUFD włączano pacjentki z niewyjaśnioną przyczyną zgonu płodu.

Kryteria włączenia do grupy RPL

1. Wystąpienie co najmniej 2 następujących po sobie poronień w I lub II trymestrze ciąży (do 22 tc.)
2. Zgon płodu w II trymestrze po 22 tc. lub w III trymestrze z niewyjaśnionych przyczyn prawidłowo zbudowanego anatomicznie płodu udokumentowane przez badanie ultrasonograficzne lub badanie sekcyjne
3. Pozostawanie w jednym związku partnerskim
4. Wykluczenie powikłań zakrzepowych (żylna choroba zakrzepowo-zatorowa, zakrzepica tętnicza, zakrzepica małych naczyń we wszystkich narządach oprócz łożyska)
5. Wykluczenie wad anatomicznych, zaburzeń hormonalnych, chorób endokrynologicznych, autoimmunologicznych i zakaźnych
6. Wykluczenie zespołu antyfosfolipidowego
7. Przynależności do rasy kaukaskiej, narodowość polska

Grupa kontrolna

Do grupy kontrolnej włączono 400 zdrowych kobiet ($30,05 \pm 3,81$ lat), u których w wywiadzie potwierdzono co najmniej 2 ciąże ukończone urodzeniem zdrowego donoszonego noworodka. U wszystkich kobiet z tej grupy przeprowadzano dokładny wywiad położniczy i

internistyczny. Wiek ciążowy potwierdzano z wykorzystaniem daty ostatniej miesiączki oraz biometrii płodu w badaniach ultrasonograficznych w rutynowym prowadzeniu ciąży. W tej grupie wykluczano obecność zespołu antyfosfolipidowego, powikłań zakrzepowych, chorób hormonalnych oraz układowych.

Kryteria włączenia do grupy kontrolnej

1. Potwierdzenie w wywiadzie położniczym co najmniej 2 ciąż ukończonych urodzeniem zdrowego donoszonego noworodka
2. Wywiad położniczy nieobciążony w kierunku wystąpienia poronień nawracających i zgonów wewnątrzmacicznych
3. Pozostawanie w jednym związku partnerskim
4. Wykluczenie powikłań zakrzepowych (żylna choroba zakrzepowo-zatorowa, zakrzepica tętnicza, zakrzepica małych naczyń we wszystkich narządach oprócz łożyska)
5. Wykluczenie zespołu antyfosfolipidowego
6. Przynależności do rasy kaukaskiej, narodowość polska

Dane kliniczne pacjentek z badanych grup przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Charakterystyka pacjentek z poronieniami, obumarciem wewnątrzmacicznym oraz z grupy kontrolnej.

	RM (n=359)		IUFD (n=61)		Grupa kontrolna (n=400)
		p		p	
wiek (lata) średnia ± SD mediana minimum/maksimum	30,99 ± 4,50 31,00 20,00 – 45,00	0,001	30,21 ± 4,01 31,00 22,00 – 41,00	0,74	30,05 ± 3,81 30,00 22,00 – 44,00
ilość RMw wywiadzie					
1 poronienie	0		17		0
2 poronienia	282		10		0
3 i więcej poronień	77	-	3	-	0
IUFD					
jedno	0		55		0
więcej niż jedno	0		6		0
tydzień wystąpienia IUFD					
średnia ± SD	-	-	29,85 ± 4,92	-	-
mediana	-		29		-
minimum/maksimum	-		23 - 40		-
wystąpienie RM					
I trymestr ciąży (<13 tc)	304	-	28	-	-
I i II trymestr ciąży (<21 tc)	55		2		-

*analizowane podgrupy porównywano do grupy kontrolnej

Wszystkie analizowane kobiety z grupy badanej RPL oraz kontrolnej przyjmowały kwas foliowy lub preparaty zawierające kwas foliowy w dawce 400 ug na dobę.

Dla wszystkich analizowanych kobiet obliczano wskaźnik masy ciała (BMI – *body mass index*) według przyjętego wzoru: masa ciała/wzrost². Wynik podawano w metrach/kilogram².

METODYKA

Od każdej z badanych kobiet pobrano około 5 ml krwi obwodowej do próbek typu S-Monovette (Sarstedt, Niemcy) zawierających żel zawierający antykoagulant EDTA w postaci soli dwupotasowej (kwas etylenodiaminotetraoctowy, *ang. ethylene diamine tetraacetic acid*). Probówki z krwią do czasu izolacji DNA były zamrożone w temperaturze minus 20°C. Izolację DNA z leukocytów przeprowadzono za pomocą komercyjnego zestawu do izolacji QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Inc., Niemcy). Częstość występowania badanych w pracy polimorfizmów genetycznych przeprowadzana była metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR - *polymerase chain reaction*) oraz polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP - *restriction fragment length polymorphism*).

W pracy analizowano częstość występowania siedmiu polimorfizmów genów, które mogą mieć związek z występowaniem wrodzonej trombofilii, a tym samym kandydujących do udziału w etiologii niepowodzeń położniczych jakimi są poronienia nawracające i obumarcia wewnątrzmaciczne. Wszystkie badane w pracy polimorfizmy przedstawia tabela 1. Analiza genetyczna przeprowadzona była w Pracowni Biologii Molekularnej w Klinice Perinatologii i Chorób Kobietych UM w Poznaniu.

Tabela 4. Charakterystyka badanych w pracy polimorfizmów.

Gen	Pozycja genu na chromosomie	Nazwa zwyczajowa	Nr w bazie danych NCBI (dbSNP)
MTHFR	1p36.3	<i>677C>T (A222V)</i>	rs1801133
		<i>1298A>C (E429A)</i>	rs1801131
		<i>1793G>A (R594Q)</i>	rs2274976
FV	1q23	<i>1691G>A (R506Q)</i>	rs6025
		<i>1328T>C (M385T)</i>	rs6033
FII	11p11-q12	<i>20210G>A</i>	rs3136516
FVII	13q34	<i>11496G>A (R353Q)</i>	rs6046

IZOLACJA GENOMOWEGO DNA

Do izolacji DNA z leukocytów krwi obwodowej użyto zestawu komercyjnego QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Niemcy). Zestaw ten zapewnia szybki i łatwy sposób izolacji i oczyszczania genomowego DNA z próbek krwi pełnej o objętości 200 µl. Oczyszczony DNA może być wykorzystywany bezpośrednio w dalszych badaniach, takich jak PCR, albo może być przechowywany w temperaturze -20°C do późniejszego użycia. Procedura pozyskiwania materiału genetycznego tym zestawem obejmuje cztery etapy:

1. lizę komórek w próbce krwi

Próbki krwi poddawane są lizie w warunkach denaturujących w wysokiej temperaturze (56°C) w obecności enzymu proteolitycznego proteinazy K i buforu litycznego (AL).

2. wiązanie genomowego DNA w mieszaninie komórkowej do membrany kolumny QIAamp Mini Spin

W celu optymalizacji wiązania genomowego DNA do membrany kolumny do mieszaniny po lizie dodaje się najpierw etanol. Całość nanosi się następnie na kolumnę, gdzie genomowy DNA ulega adsorpcji na membranie z żelu krzemionkowego w miarę przesączania pod wpływem siły odśrodkowej podczas wirowania

3. płukanie membrany kolumny

Związany z membraną kolumny QIAamp Mini Spin genomowy DNA następnie zostaje poddany oczyszczeniu z zanieczyszczeń komórkowych, które są wypłukiwane za pomocą najpierw buforu płuczającego 1 (AW1), a następnie roztworu płuczającego 2 (AW2).

4. wymywanie genomowego DNA z membrany

DNA jest wymywane z membrany kolumny za pomocą 200 µl buforu do wymywania (AE), pięciominutowej inkubacji w temperaturze pokojowej i odwirowaniu przez 1 minutę z prędkością 8000 rpm. Tak otrzywane oczyszczone DNA poddawano dalszej analizie genetycznej.

OZNACZANIE JAKOŚCI I ILOŚCI DNA

Po przeprowadzeniu izolacji kwasu dezoksyrybonukleinowego oznaczano jego jakość i stężenie metodą spektrofotometryczną z zastosowaniem aparatu NanoDrop (Thermo Scientific, USA) ponieważ podczas ekstrakcji kwasów nukleinowych używa się rozpuszczalników organicznych oraz soli, które mogą być inhibitorami w analizie PCR. Badanie polega na zmierzeniu absorbancji przy długości fali 230, 260 i 280 nm w kropli preparatu uzyskanego po izolacji, a spektrofotometr automatycznie przelicza absorbancję na stężenie i czystość oraz wyznacza wykres absorbancji, pomocny przy ustalaniu źródła zanieczyszczeń. Maksimum absorbancji białek wynosi 280 nm, zanieczyszczenia organiczne posiadają najwyższą absorbancję poniżej 240 nm. Dlatego przyjęto 230 nm jako długość fali dobrze określającą stopień zanieczyszczeń rozpuszczalnikami organicznymi. Miarą stopnia czystości kwasów nukleinowych jest stosunek $A_{260}/230$ oraz $A_{260}/280$, który powinien być większy od 1,8.

REAKCJA PCR/RFLP

Warianty polimorficzne analizowano wykorzystując reakcję łańcuchowej polimerazy – (PCR - *polymerase chain reaction*) oraz polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP - *restriction fragment length polymorphism*).

Technika PCR pozwala na amplifikację *in vitro* analizowanego odcinka kwasu dezoksyrybonukleinowego przez enzym polimerazę DNA. Do reakcji niezbędne są następujące składniki:

- bufor zawierający dwuwartościowe jony magnezu
- matrycowy DNA, który będzie powielony,
- trifosforany czterech nukleozydów występujących w DNA (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), które są substratami dla polimerazy,
- komplementarne startery,
- enzym polimeraza DNA, który łączy się ze starterami jednoniciowymi i syntetyzuje nić komplementarną do matrycy DNA,

Reakcja zachodzi w czasie powtarzających się około 30-40 razy cykli składających się z trzech etapów:

- denaturacji matrycowego DNA
- przyłączenia starterów do matrycy

- wydłużania starterów

W prezentowanej pracy stosowane dla poszczególnych reakcji PCR sekwencje starterów były zaczerpnięte z danych literaturowych i zostały przedstawione w tabeli 5. Do wszystkich reakcji PCR używano polimerazy i buforu firmy Novazym (Allegro Taq Polimeraza DNA). Używano załączonego przez producenta buforu z chlorkiem magnezu (700mM TRIS-HCl, pH 9,2/25°C, 166mM (NH₄)₂SO₄, 25mM MgCl₂). Startery używane w reakcjach PCR syntetyzowane były w firmie TibMolbiol (Niemcy), natomiast dNTP zakupiono w firmie Thermo Scientific.

Skład mieszaniny reakcyjnej dla badanych wariantów genetycznych był standardowy i został przedstawiony w tabeli 6.

Reakcję przeprowadzano w termocyklerze Dyad firmy Bio-Rad stosując następujący program:

- Denaturacja wstępna 95°C przez 5 minut,
- Denaturacja właściwa 95°C przez 30 sekund,
- Wiązanie starterów przez 30 sekund,
- Synteza 72°C przez 1 minutę,
- Synteza końcowa 72°C przez 5 minut.

Temperatury przyłączania starterów dla poszczególnych reakcji PCR podano w tabeli 7. Z każdego produktu reakcji PCR 5 µl nałożono na 2% żel agarozowy i poddano elektroforezie, aby sprawdzić wydajność reakcji. Kolejnym etapem badań była analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych.

Metoda RFLP jest powszechnie stosowana w biologii molekularnej, a polega na analizie sekwencji otrzymanego produktu reakcji PCR poprzez analizę obecności lub braku miejsc restrykcyjnych. Stosuje się ją do wykrywania polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP - *single nucleotide polymorphism*). Warunkiem do jej zastosowania jest istnienie enzymu restrykcyjnego, który rozpoznaje interesującą nas sekwencję w wariacie dzikim lub zmutowanym. Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych wykorzystuje enzymy restrykcyjne, określane także jako restryktazy lub endonukleazy restrykcyjne. Są to enzymy izolowane z bakterii zdolne są do rozpoznawania specyficznych sekwencji w DNA oraz do przecinania dwuniciowej cząsteczki DNA.

Wykorzystywane do analizy restrykcyjnej enzymy, wielkości fragmentów po reakcji hydrolizy dla poszczególnych polimorfizmów przedstawiono w tabeli 8. Do każdej z reakcji

wykorzystywano 20 µl produktu PCR, do którego dodawano mieszaninę reakcyjną zawierającą bufor, enzym restrykcyjny oraz wodę i całość inkubowano w cieplarni przez 16 godzin w temperaturze 37°C. Enzym inaktywowano w temperaturze 65°C, przez 20 minut, dodawano bufor obciążający (10 mM Tris-HCl (pH 7,6) 0.03% bromofenol blue, 0,03% xylencyanol FF, 60% glicerol 60 mM EDTA) i nakładano na żel agarozowy.

Analizując elektroforetycznie badane w pracy polimorfizmy wykorzystywano od 2 do 3% żele agarozowe, w zależności od oczekiwanych wielkości produktów reakcji hydrolizy restrykcyjnej. W celu wizualizacji prążków po rozdziale elektroforetycznym do żeli agarozowych dodawano zgodnie z zaleceniami producenta barwnik Midori Green Advanced DNA Stain (Nippon Genetics, Europe GmbH). Elektroforezę przeprowadzano w buforze TBE (89 mM Tris, 89 mM kwas borowy, 2 mM EDTA) przez dwie godziny.

APARATURA ZASTOSOWANA W PRACY

Do przeprowadzenia wszystkich etapów prac laboratoryjnych (izolacji DNA, pomiaru ilościowego DNA, reakcji PCR i RFLP a także elektroforezy wyników tych reakcji) wykorzystano następującą aparaturę:

- zamrażarka niskotemperaturowa (Snijders, Holandia),
- lodówka (Ardo, Polska),
- zamrażarka (Liebherr, Niemcy),
- kuchenka mikrofalowa 3D Power (Daewoo, Korea Pd),
- wytrząsarka WL-1 (Biomix, Polska),
- komora laminarna (UVP, USA),
- pipety z nastawialną objętością (Eppendorf, USA),
- wirówka 5804 R (Eppendorf, USA),
- waga laboratoryjna (Radwag, Polska),
- cieplarka (Memmert, Niemcy),
- termomikser (Eppendorf, USA)
- termocykler Dyad (Bio-Rad, USA),
- spektrofotometr NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA),
- komory do elektroforezy poziomej (Scie-Plas, Anglia), (Consort, Belgia),
- mieszadło magnetyczne MS11H (Wigo, Polska),
- komputerowy system wizualizacji i analizy obrazu UV UVI-KS4000/Image PC (Syngen Biotech, USA),

Oprogramowanie komputerowe

- program statystyczny SPSS 22.0 PL dla Windows
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – National Center for Biotechnology Information (PubMed, OMIM, SNP)
- Haploview 4.2 program (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>).

Tabela 5. Startery użyte do reakcji PCR.

<i>Gen</i>	<i>Polimorfizm</i>	<i>Sekwencja starterów</i>	<i>Literatura</i>
<i>MTHFR</i>	<i>677C>T (A222V)</i>	5' TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA 3' 5' AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG 3'	Frost i wsp. 1995
	<i>1298A>C (E429A)</i>	5' CTT CTA CCT GAA GAG CAA GTC-3' 5' CAT GTC CAC AGC ATG GAG-3'	Hanson i wsp. 2001
	<i>1793G>A (R594Q)</i>	5' CTC TGT GTG TGT GTG CAT GTG TGC G 3' 5' GGG ACA GGA GTG GCT CCA ACG CAG G 3'	Rady i wsp. 2002
<i>FV</i>	<i>1691G>A (R506Q)</i>	5' TGC CCA GTG CTT AAC AAG ACC A 3' 5' CTT GAA GGA AAT GCC CCA TTA 3'	Bertina i wsp. 1994
	<i>1328T>C (M385T)</i>	5' ACA TAC AGT GAA TCC CAG TA 3' 5' ATG AGC ATC TTT TTC TTT TA3'	Faisel i wsp. 2004
<i>FII</i>	<i>20210G>A</i>	5' TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC 3' 5' ATA GCA CTG GGA GCA TTG AAG C3'	Poort i wsp. 1996
<i>FVII</i>	<i>11496G>A (R353Q)</i>	5' GGG AGA CTC CCC AAA TAT CAC 3' 5' ACG CAG CCT TGG CTT TCT CTC 3'	Green i wsp., 1991

Tabela 6. Skład mieszaniny w reakcji PCR.

<i>Składnik (stężenie wyjściowe)</i>									
<i>Polimorfizm</i>	<i>DNA [μl]</i>	<i>Woda [μl]</i>	<i>Bufor PCR z MgCl₂ [10x]</i>	<i>MgCl₂ [25 mM]</i>	<i>dNTP [2,5 mM]</i>	<i>Starter F [50 pmol/ μl]</i>	<i>Starter R [50 pmol/μl]</i>	<i>Polimeraza [5U/ μl]</i>	<i>Objętość końcowa [μl]</i>
<i>MTHFR 677C>T (A222V)</i>	2,0	17,5	2,5	-	2,0	0,4	0,4	0,2	25
<i>MTHFR 1298A>C (E429A)</i>	2,0	16,5	2,5	1,0	2,0	0,4	0,4	0,2	25
<i>MTHFR 1793G>A (R594Q)</i>	2,0	17,5	2,5	-	2,0	0,4	0,4	0,2	25
<i>FV 1691G>A (R506Q)</i>	2,0	17,5	2,5	-	2,0	0,4	0,4	0,2	25
<i>FV 1328T>C (M385T)</i>	2,0	17,5	2,5	-	2,0	0,4	0,4	0,2	25
<i>FII 20210G>A</i>	2,0	17,5	2,5	-	2,0	0,4	0,4	0,2	25
<i>FVII 11496G>A (R353Q)</i>	2,0	17,5	2,5	-	2,0	0,4	0,4	0,2	25

Tabela 7. Warunki dla poszczególnych etapów reakcji PCR.

<i>Polimorfizm</i>	<i>Denaturacja wstępna</i>		<i>Denaturacja</i>		<i>Wiązanie starterów</i>		<i>Synteza</i>		<i>Synteza końcowa</i>		<i>Ilość cykli</i>
	<i>temp [°C].</i>	<i>czas [sek.]</i>	<i>temp [°C]</i>	<i>czas [sek.]</i>	<i>temp [°C]</i>	<i>czas [sek.]</i>	<i>temp [°C]</i>	<i>czas [sek.]</i>	<i>temp [°C]</i>	<i>czas [sek.]</i>	
<i>MTHFR 677C>T (A222V)</i>	95	240	95	30	65	30	72	60	72	600	30
<i>MTHFR 1298A>C (E429A)</i>	95	240	95	30	61	30	72	60	72	600	30
<i>MTHFR 1793G>A (R594Q)</i>	95	240	95	30	69	30	72	60	72	600	30
<i>FV 1691G>A (R506Q)</i>	95	240	95	30	58	30	72	60	72	600	30
<i>FV 1328T>C (M385T)</i>	95	240	95	30	51	30	72	60	72	600	30
<i>FII 20210G>A</i>	95	240	95	30	53	30	72	60	72	600	30
<i>FVII 11496G>A (R353Q)</i>	95	240	95	30	63	30	72	60	72	600	30

Tabela 8. Wielkości fragmentów po reakcji hydrolizy oraz zastosowane enzymy restrykcyjne.

<i>Polimorfizm</i>	<i>Enzym restrykcyjny (producent)</i>	<i>Rozpoznawana sekwencja</i>	<i>Wielkość produktu PCR</i>	<i>Wielkość fragmentów po hydrolizie</i>
MTHFR 677C>T (A222V)	<i>HinfI</i> (Eurx, Polska),	G [^] ANTC	198 pz	CC - 198 pz CT - 198, 175, 23 pz TT - 175, 23 pz
MTHFR 1298A>C (E429A)	<i>MboII</i> (Eurx, Polska)	GAAGA (8/7)	256 pz	AA - 176, 30, 28, 22 pz AC - 204, 30, 28, 22 pz CC - 204, 30, 22 pz
MTHFR 1793G>A (R594Q)	<i>MbiI</i> (Thermo Scientific, USA)	CCGCTC (-3/-3)	310 pz	GG - 233, 77 pz GA - 310, 233, 77 pz AA - 310 pz
FV 1691G>A (R506Q)	<i>MnlI</i> (Eurx, Polska)	CCTC (7/6)	220 pz	GG - 116, 67, 37 pz GA - 153, 116, 67, 37 pz AA - 153, 67 pz
FV 1328T>C (M385T)	<i>RsaI</i> (Eurx, Polska)	GT [^] AC	176 pz	TT - 136, 40 pz TC - 136, 117, 40, 19 pz CC - 117, 40, 19 pz
FII 20210G>A	<i>HindIII</i> (Thermo Scientific, USA)	A [^] AGCTT	345 pz	GG - 345 pz GA - 345, 322, 23 pz AA - 322, 23 pz
FVII 11496G>A (R353Q)	<i>MspI</i> (Eurx, Polska)	C [^] CGG	312 pz	GG - 206, 67, 39 pz GA - 273, 206, 67, 39 pz AA - 273, 39 pz

METODY STATYSTYCZNE STOSOWANE W PRACY

W prezentowanej pracy analizę statystyczną wyników przeprowadzono wykorzystując program statystyczny SPSS 22.0 PL dla Windows. W edytorze danych zamieszczano dane kliniczne pacjentek oraz uzyskane wyniki badaniach wariantów genetycznych.

W przypadku danych klinicznych pacjentek obliczano średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, zakres wartości obserwowanych obliczając wartości maksymalne i minimalne oraz podawano wartość mediany. Do weryfikacji hipotezy o nieistotności różnicy badanego rozkładu zmiennej z rozkładem normalnym używano test Kołmogorova-Smirnova z poprawką Lillieforsa. Dla dwóch zmiennych niepowiązanych w skali interwałowej z rozkładem normalnym i o równych wariancjach stosowano test t-Studenta dla grup niezależnych. Wartości średnie danych klinicznych w zależności od genotypów badanych polimorfizmów w poszczególnych grupach porównywano po analizie wariancji przeprowadzonej testem Kruskala-Wallisa jednoczynnikową analizą wariancji (ANOVA). Wszystkie wyniki przyjęto za istotne statystycznie przy wartościach $p < 0,05$.

W analizie wyników badań genetycznych porównywano częstości występowania genotypów alleli oraz pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną stosując jednostronny test dokładny Fishera, obliczano współczynnik ryzyka (WR) uwzględniając przedział ufności (95%PU). Tutaj także za istotne statystycznie przyjęto te o wartościach $p < 0,05$.

Obserwowane wartości częstości występowania genotypów porównano z wartościami oczekiwanymi, które obliczano na podstawie częstości występowania alleli danego polimorfizmu na podstawie prawa Hardy-Weinberga, opisywanego równaniem:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

gdzie p i q to częstość występowania poszczególnych alleli wariantu genetycznego.

W celu oceny częstości występowania haplotypów oraz nierównowagi sprzężeń polimorfizmów genów *MTHFR* i *FV* stosowano program Haploview (wersja 4.2). Częstość występowania poszczególnych haplotypów w grupach badanych porównywano z grupą kontrolną stosując test Z dla dwóch niezależnych proporcji.

WYNIKI

ANALIZA DANYCH KLINICZNYCH W BADANYCH GRUPACH KOBIET

W pierwszym etapie pracy analizowano dane kliniczne 420 kobiet z obciążonym wywiadem położniczym oraz 400 pacjentek zakwalifikowanych do grupy kontrolnej. Wiek pacjentek z grupy kobiet z poronieniami ($n=359$) pomimo zbliżonych średnich (30,99 vs. 30,05 lat) różnił się statystycznie istotnie ($p=0,001$), ponieważ wariancja, która wyraża stopień rozrzutu badanej cechy wokół wartości średniej była większa w grupie z poronieniami – 20,23 vs. 12,29 w grupie kontrolnej. W grupie kobiet IUFD wiek pacjentek nie różnił się statystycznie od grupy kontrolnej (30,21 vs. 30,05, $p=0,74$). Wartości średnie ciśnienia skurczowego w grupie z dwoma lub więcej poronieniami nie różniły się istotnie statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej (109,86 vs. 111,36 mmHg, $p=0,08$), natomiast w grupie 61 kobiet IUFD różnica była statystycznie istotna (107,67 vs. 111,36 mmHg, $p=0,01$). Również wartości ciśnienia rozkurczowego pacjentek z obu badanych grup kobiet z obciążonym wywiadem różniły się statystycznie istotnie od pacjentek z grupy kontrolnej ($p=0,0005$ oraz $p=0,02$).

U wszystkich badanych pacjentek odnotowano porównywalną średnią wzrostu 165,89 cm w grupie RM, 165,11 cm u kobiet ze zgonem wewnątrzmacicznym i 166,26 cm w grupie kontrolnej, natomiast masa ciała kobiet z grup badanych różniły się statystycznie istotnie od pacjentek z grupy kontrolnej i najniższa była w grupie kontrolnej 59,83 kg, wyższa u kobiet z poronieniami 62,46 kg ($p=0,002$) oraz najwyższa w grupie IUFD 63,17 kg. Wskaźnik masy ciała BMI pomiędzy badanymi grupami i grupą kontrolną różnił się znacząco statystycznie (dla grupy RM: 22,64 vs. 21,58 kg/m², $p=0,0001$ oraz dla grupy IUFD: 23,26 vs. 21,58 kg/m², $p=0,0005$).

W grupie 359 kobiet z RM u 78,55% poronienie występowało dwukrotnie, natomiast u 21,45% trzykrotnie lub więcej. Analizując czas wystąpienia poronień w tej grupie kobiet zaobserwowano poronienia przed 13 tc. u 303 kobiet (84,40%) natomiast poronienia późniejsze u 56 kobiet (15,60%). Jedno IUFD płodu występowało u 55 kobiet (90,16%), natomiast więcej niż jedno stwierdzono w wywiadzie 6 pacjentek (9,84%) z grupy 61 kobiet, które utraciły ciążę po 21 tygodniu jej trwania. Zgony wewnątrzmaciczne w tej grupie średnio występowały w 29,85 tygodniu (zakres 23-40 tc.). Wybrane parametry analizowane w omawianych grupach przedstawiono w tabeli 9, 10, 11.

Tabela 9. Charakterystyka porównawcza grupy RM, obumarciem wewnątrzmacicznym oraz z grupy kontrolnej.

	RM (n=359)		IUFD (n=61)		Grupa kontrolna (n=400)
		<i>p</i>		<i>p</i>	
Wiek (lata)					
średnia \pm SD	30,99 \pm 4,50	0,001	30,21 \pm 4,01	0,74	30,05 \pm 3,81
mediana	31,00		31,00		30,00
minimum/maksimum	20,00 – 45,00		22,00 – 41,00		22,00 – 44,00
RR skurczowe (mmHg)					
średnia \pm SD	109,86 \pm 12,63	0,08	107,67 \pm 10,18	0,01	111,36 \pm 10,70
mediana	110,00		102,50		110,00
minimum/maksimum	80,00 – 140,00		90,00 – 140,00		80,00 – 150,00
RR rozkurczowe (mmHg)					
średnia \pm SD	68,05 \pm 10,11	0,0005	67,42 \pm 12,02	0,02	70,51 \pm 9,24
mediana	70,00		60,00		70,00
minimum/maksimum	50,00 – 100,00		60,00 – 120,00		50,00 – 95,00
Wzrost (cm)					
średnia \pm SD	165,89 \pm 5,58	0,19	165,11 \pm 7,23	0,10	166,42 \pm 5,44
mediana	165,00		165,00		166,00
minimum/maksimum	150,00 – 179,00		150,00 – 183,00		155,00 – 180,00
Masa (kg)					
średnia \pm SD	62,46 \pm 9,25	0,002	63,17 \pm 12,41	0,06	59,83 \pm 9,82
mediana	62,00		60,50		58,00
minimum/maksimum	43,00 – 92,00		44,00 – 99,00		39,00 – 110,00
BMI (kg/m²)					
średnia \pm SD	22,64 \pm 3,25	0,0001	23,26 \pm 4,72	0,0005	21,58 \pm 3,26
mediana	21,97		21,41		20,72
minimum/maksimum	17,19 – 36,85		18,03 – 38,67		16,02 – 38,57
ilość RM w wywiadzie					
1 poronienie	0		17		0
2 poronienia	282		10		0
3 i więcej poronień	77	-	3	-	0
IUFD					
jedno	0		55		0
więcej niż jedno	0		6		0
tydzień wystąpienia IUFD					
średnia \pm SD	-	-	29,85 \pm 4,92	-	-
mediana	-		29		-
minimum/maksimum	-		23 - 40		-
wystąpienie RM					
I trymestr ciąży (<13 tc.)	304	-	28	-	-
I i II trymestr ciąży (13-22tc.)	55		2		-

*analizowane podgrupy porównywano do grupy kontrolnej

Tabela 10. Charakterystyka porównawcza kobiet z podgrupy z dwoma RM, z trzema i więcej RM oraz z grupy kontrolnej.

<i>Dane kliniczne</i>	<i>Grupa RM (n=359)</i>				<i>Grupa kontrolna (n=400)</i>
	<i>2 RM (n=282)</i>		<i>≥3 RM (n=77)</i>		
		<i>p</i>		<i>p</i>	
Wiek (lata) <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>minimum/maksimum</i>	30,63 ± 4,40 30 20 - 45	0,0669	32,29 ± 4,63 32 20 - 43	<0,0001	30,05 ± 3,81 30 22 - 44
RR skurczowe (mmHg) <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>minimum/maksimum</i>	110,05 ± 12,39 110,00 80 - 140	0,1409	109,16 ± 13,45 110,00 80 - 140	0,1147	111,36 ± 10,70 110 80 - 150
RR rozkurczowe (mmHg) <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>minimum/maksimum</i>	67,93 ± 9,79 70,00 50 - 90	0,0005	68,51 ± 11,20 70,00 50 - 100	0,0941	70,51 ± 9,24 70,00 50 - 95
Wzrost (cm) <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>minimum/maksimum</i>	165,77 ± 5,63 165,00 150 - 179	0,1303	166,37 ± 5,43 167,00 157 - 177	0,9411	166,42 ± 5,44 166,00 150,00 - 180,00
Masa (kg) <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>minimum/maksimum</i>	62,38 ± 9,52 62,00 44 - 92	0,0008	62,73 ± 8,20 62,00 43 - 85	0,0154	59,83 ± 9,82 58 39-110
BMI (kg/m²) <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>minimum/maksimum</i>	22,64 ± 3,32 21,80 17,18 - 36,85	0,0001	22,64 ± 3,01 22,34 17,22 - 30,12	0,0085	21,58 ± 3,26 20,72 16,02 - 38,57
wystąpienie RM <i>I trymestr ciąży (< 13 tc.)</i> <i>I i II trymestr ciąży (13-22 tc.)</i>	246 36	-	58 19	-	- -

*analizowane podgrupy porównywano do grupy kontrolnej

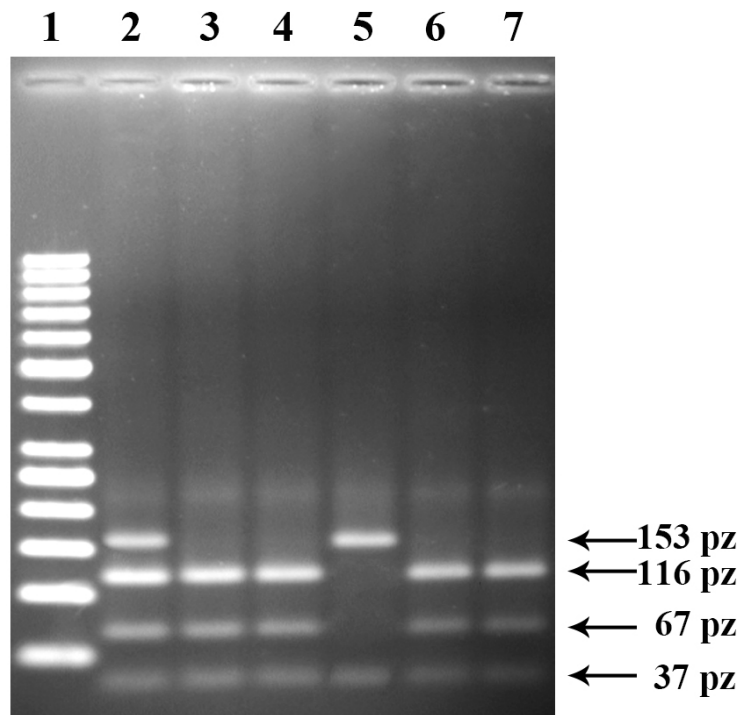
Tabela 11. Charakterystyka porównawcza kobiet z podgrupy RM <13 tc. oraz RM 13-22 tc. oraz z grupy kontrolnej.

<i>Dane kliniczne</i>	<i>Poronienia (n=359)</i>				<i>Grupa kontrolna (n=400)</i>
	<i>RM <13 tc. (n=303)</i>		<i>RM 13-22 tc. (n=56)</i>		
		<i>p</i>		<i>p</i>	
Wiek (lata) <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>minimum/maksimum</i>	30,96 ± 4,36 31 20 - 43	0,0033	31,14 ± 5,16 31 20 - 45	0,0566	30,05 ± 3,81 30 22 - 44
RR skurczowe (mmHg) <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>minimum/maksimum</i>	109,72 ± 12,34 110 80 - 140	0,0601	110,63 ± 14,05 110 80 - 140	0,6468	111,36 ± 10,70 110 80 - 150
RR rozkurczowe (mmHg) <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>minimum/maksimum</i>	67,69 ± 9,96 70 50 - 90	0,0001	70,00 ± 10,69 70 50 - 100	0,7048	70,51 ± 9,24 70,00 50 - 95
Wzrost (cm) <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>minimum/maksimum</i>	166,25 ± 5,46 166 153 - 179	0,6822	163,62 ± 5,77 164 150 - 175	0,0004	166,42 ± 5,44 166,00 150,00 - 180,00
Masa (kg) <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>minimum/maksimum</i>	62,26 ± 9,06 62 43 - 92	0,0008	63,88 ± 10,41 65 46 - 85	0,0043	59,83 ± 9,82 58 39-110
BMI (kg/m²) <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>minimum/maksimum</i>	22,48 ± 3,12 21,92 17,19 - 36,85	0,0002	23,87 ± 3,85 22,65 18,37 - 31,23	0,0001	21,58 ± 3,26 20,72 16,02 - 38,57

*analizowane podgrupy porównywano do grupy kontrolnej

ANALIZA WYNIKÓW BADAŃ GENETYCZNYCH POLIMORFIZM *1691G>A* GENU CZYNNIKA V KRZEPNIĘCIA

W przeprowadzonych badaniach analizowano mutację Leiden genu czynnika V krzepnięcia. Fotografia 3 przedstawia przykładowy wynik uzyskany po hydrolizie z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego *MnII* (Eurx, Polska). Dla genotypu homozygotycznego typu dzikiego *1691GG* uzyskiwano trzy prążki wielkości 116, 67, 37 pz, dla genotypu heterozygotycznego *1691GA* cztery: 153, 116, 37, 37 pz oraz dwa prążki 153, 37 pz w przypadku obecności genotypu homozygotycznego zmutowanego *1691AA* (fot. 1).



Fotografia 1. Analiza genotypów polimorfizmu *1691G>A* genu *FV* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *MnII*. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 3,4,6,7 homozygoty niezmutowane *1691GG*, tor 2 heterozygota *1691GA*, tor 5 homozygota zmutowana *1691AA*.

Rozkład genotypów i alleli dla polimorfizmu *1691G>A* genu czynnika V krzepnięcia we wszystkich grupach z RM, IUFD oraz w grupie kontrolnej spełniał założenia równowagi Hardy-Weinberga.

W wyniku analizy polimorfizmu *1691G>A* genu czynnika V w grupie RM zaobserwowano podobną częstość występowania homozygot niezmutowanych *1691GG* w grupie kontrolnej (92,76 vs. 94,50%, WR=0,75, $p=0,20$), również genotyp heterozygotyczny *1691GA* występował z podobną częstością w grupie badanej (7,24 vs. 5,25%, WR=1,41, $p=0,16$). Obecność genotypu homozygotycznego zmutowanego *1691AA* odnotowano tylko u jednej pacjentki z grupy kontrolnej.

Częstość występowania alleli nie różniła się statystycznie istotnie pomiędzy badanymi grupami: dla zmutowanego allela *1691A* (3,62 vs. 2,88%, WR=1,27, $p=0,25$), a dla allela typu dzikiego *1691G* (96,38 vs. 97,12%, WR=0,79, $p=0,25$) (tab. 12).

Tabela. 12. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1691G>A* genu czynnika V w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>Grupa RM</i> (<i>n=359</i>)		<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=400</i>)		WR	95%PU	P
	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> (%)	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> (%)			
<i>1691GG</i>	333 (92,76)	92,89	378 (94,50)	94,33	0,75	0,41-1,34	0,20
<i>1691GA</i>	26 (7,24)	6,98	21 (5,25)	5,59	1,41	0,78-2,55	0,16
<i>1691AA</i>	0 (0,00)	0,13	1 (0,25)	0,08	—	—	—
<i>Suma</i>	359 (100,00)	100,00	400 (100,00)	100,00			
<i>Allele</i>							
<i>1691G</i>	692 (96,38)	—	777 (97,12)	—	0,79	0,45-1,39	0,25
<i>1691A</i>	26 (3,62)	—	23 (2,88)	—	1,27	0,72-2,25	0,25
<i>Suma</i>	718 (100,00)	—	800 (100,00)	—			

p – test Fishera jednostronny

Porównując częstość występowania mutacji Leiden w grupie kobiet z IUFD odnotowano porównywalną częstość występowania genotypu *1691GG* w grupie kontrolnej (94,50%) w porównaniu do grupy IUFD (90,16%,ns). Jednocześnie zaobserwowano porównywalne występowanie heterozygot *1691GA* w grupie IUFD oraz w grupie kontrolnej. Genotyp ten występował u 9,84% badanych kobiet z IUFD i u 5,25% kobiet z grupy kontrolnej (WR=1,97, ns). Analizując rozkład alleli w tych grupach kobiet stwierdzono podobną częstość występowania zmutowanego wariantu *1691A* u kobiet z IUFD (4,92%) w porównaniu do kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (2,88%) (WR=1,75, p=0,17) (tab. 13).

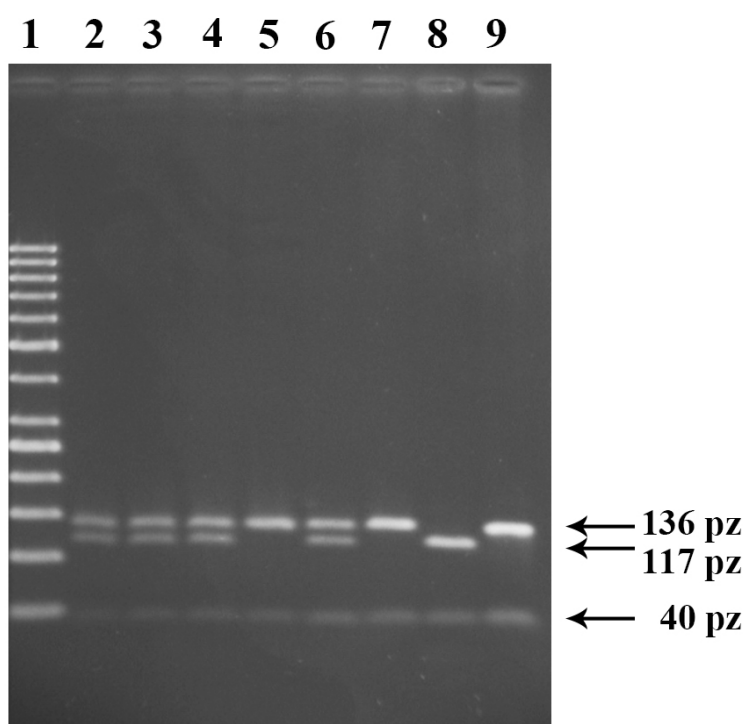
Tabela. 13. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1691G>A* genu czynnika V w grupie kobiet z IUFD oraz w grupie kontrolnej.

<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>Grupa IUFD</i> (<i>n</i> =61)		<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i> =400)		<i>WR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>			
<i>1691GG</i>	55 (90,16)	90,41	378 (94,50)	94,33	0,53	0,21-1,37	0,15
<i>1691GA</i>	6 (9,84)	9,35	21 (5,25)	5,59	1,97	0,76-5,09	0,13
<i>1691AA</i>	0 (0,00)	0,24	1 (0,25)	0,08	—	—	—
<i>Suma</i>	61 (100,00)	100,00	400 (100,00)	100,00			
<i>Allele</i>							
<i>1691G</i>	116 (95,08)	—	777 (97,12)	—	0,57	0,23-1,44	0,17
<i>1691A</i>	6 (4,92)	—	23 (2,88)	—	1,75	0,70-4,38	0,17
<i>Suma</i>	122 (100,00)	—	800 (100,00)	—			

p – test Fishera jednostronny

POLIMORFIZM *M385T* GENU CZYNNIKA V KRZEPNIĘCIA

Drugim analizowanym w pracy wariantem genu czynnika V krzepnięcia krwi był polimorfizm *1328T>C* (*M385T*). Fotografia 5 przedstawia przykładowy wynik uzyskany po hydrolizie produktu PCR o wielkości 176 pz enzymem restrykcyjnym *RsaI*. Dla genotypu homozygotycznego typu dzikiego *1328TT* uzyskiwano dwa prążki wielkości 136 i 40 pz, cztery prążki wielkości 136, 117, 40, 19 pz dla genotypu heterozygotycznego *1328TC* oraz trzy prążki 117, 40 i 19 pz w przypadku obecności genotypu homozygotycznego zmutowanego *1328CC* (fot. 2).



Fotografia 2. Analiza genotypów polimorfizmu *1328T>C* genu *FV* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *RsaI*. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 5, 7, 9 homozygoty niezmutowane *1328TT*, tory 2, 3, 4, 6 heterozygoty *1328TC*, tor 8 homozygota zmutowane *1328CC*.

Rozkład genotypów i alleli dla polimorfizmu *1328T>C* (*M385T*) genu czynnika V krzepnięcia we wszystkich badanych grupach oraz w grupie kontrolnej był zgodny z założeniami równowagi Hardy-Weinberga.

W genie czynnika V krzepnięcia analizowano również drugi polimorfizm *1328T>C*. W grupie poronień nawracających dla tego wariantu genetycznego analiza pokazała podobną częstość występowania genotypu *1328TT* w grupie kobiet z RM (75,77%) oraz w grupie kontrolnej (76,50%) (WR=0,96, ns). Podobne obserwacje dotyczyły częstości występowania genotypu heterozygotycznego *1328TC* (22,56 vs. 22,25%, WR=1,02, ns) oraz homozygotycznego zmutowanego *1328CC* (1,67 vs. 1,25%, WR=1,34, ns).

Również w przypadku allela *1328T* oraz *1328C* odnotowano podobne częstości występowania tych wariantów w grupie RM oraz zdrowych kobiet (dla allela *1328T* 87,05 vs. 87,62%) oraz dla allela zmutowanego *1328C* (12,95 vs. 12,38%) (tab. 14).

Tabela. 14. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1328T>C* genu czynnika V w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

<i>FV</i> <i>1328T>C</i>	<i>Grupa RM</i> (<i>n=359</i>)		<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=400</i>)		<i>WR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> (%)	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> (%)			
<i>1328TT</i>	272 (75,77)	75,77	306 (76,50)	76,78	0,96	0,69-1,34	0,44
<i>1328TC</i>	81 (22,56)	22,55	89 (22,25)	21,69	1,02	0,72-1,43	0,49
<i>1328CC</i>	6 (1,67)	1,68	5 (1,25)	1,53	1,34	0,41-4,44	0,43
<i>Suma</i>	359 (100,00)	100,00	400 (100,00)	100,00			
<i>Allele</i>							
<i>1328T</i>	625 (87,05)	—	701 (87,62)	—	0,95	0,70-1,28	0,40
<i>1328C</i>	93 (12,95)	—	99 (12,38)	—	1,05	0,78-1,43	0,40
<i>Suma</i>	718 (100,00)	—	800 (100,00)	—			

p – test Fishera jednostronny

Analizując polimorfizm *1328T>C* genu czynnika V krzepnięcia w grupie IUFD zaobserwowano porównywalną częstość występowania genotypu niezmutowanego *1328TT* w grupie IUFD oraz grupie kontrolnej (80,33 vs. 76,50%, WR=1,25, ns). Genotyp heterozygotyczny *1328TC* występował z częstością 18,03% w grupie IUFD oraz 22,25% w grupie kontrolnej (ns). Natomiast częstość występowania genotypu zmutowanego *1328CC* w grupie IUFD wynosiła 1,64% oraz w grupie kontrolnej 1,25% (WR=1,32, ns).

Allel niezmutowany *1328T* występował z podobną częstością w grupie IUFD oraz w grupie kontrolnej (89,34 vs. 87,62%) (WR=1,18, ns). Podobną częstość występowania odnotowano również dla zmutowanego allela *1328C* w obydwu grupach kobiet (10,66 vs. 12,38%) (WR=0,84, ns) (tab. 15).

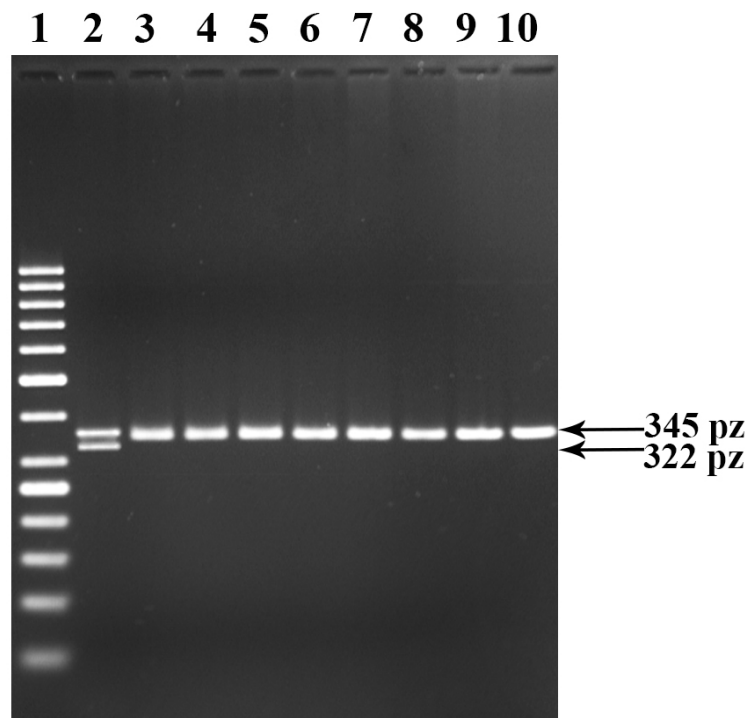
Tabela. 15. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1328T>C* genu czynnika V w grupie kobiet z IUFD oraz w grupie kontrolnej.

<i>FV</i> <i>1328T>C</i>	<i>Grupa IUFD</i> (<i>n=61</i>)		<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=400</i>)		<i>WR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>(%)</i>	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>(%)</i>			
<i>1328TT</i>	49 (80,33)	79,82	306 (76,50)	76,78	1,25	0,64-2,46	0,32
<i>1328TC</i>	11 (18,03)	19,04	89 (22,25)	21,69	0,77	0,38-1,54	0,29
<i>1328CC</i>	1 (1,64)	1,14	5 (1,25)	1,53	1,32	0,15-11,46	0,57
<i>Suma</i>	61 (100,00)	100,00	400 (100,00)	100,00			
<i>Allele</i>							
<i>1328T</i>	109 (89,34)	—	701 (87,62)	—	1,18	0,64-2,18	0,36
<i>1328C</i>	13 (10,66)	—	99 (12,38)	—	0,84	0,46-1,56	0,36
<i>Suma</i>	122 (100,00)	—	800 (100,00)	—			

p – test Fishera jednostronny

POLIMORFIZM 20210G>A GENU PROTROMBINY

W zakresie genu protrombiny w pracy badano polimorfizm 20210G>A genu czynnika II krzepnięcia. Poniższa fotografia żelu agarozowego przedstawia przykładowy rozkład genotypów tego polimorfizmu po procesie hydrolizy enzymem restrykcyjnym *Hind*III. Dla genotypu homozygotycznego niezmutowanego 20210GG uzyskiwano prążek o wielkości 345 pz (brak miejsca dla hydrolizy restrykcyjnej), dwa prążki 345 i 322 pz odczytywano jako obecność genotypu heterozygotycznego 20210GA (miejsce restrykcyjne dla enzymu *Taq*I), natomiast w przypadku obecności genotypu zawierającego oba zmutowane allele 20210AA po hydrolizie powinien być widoczny jeden prążek o wielkości 322 pz, jednak w takiego genotypu nie zaobserwowano u badanych w pracy kobiet (fot. 3).



Fotografia 3. Analiza genotypów polimorfizmu 20210G>A genu *FII* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *Hind*III. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory od 3 do 10 homozygoty niezmutowane 20210GG, tor 2 heterozygota 20210GA.

Badany rozkład genotypów i alleli analizowanego 20210G>A genu czynnika II krzepnięcia we wszystkich badanych grupach oraz w grupie kontrolnej był zgodny z prawem Hardy-Weinberga.

W przypadku analizy rozkładu genotypów polimorfizmu 20210G>A genu czynnika II krzepnięcia w grupie kobiet z RM odnotowano wyższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego 20210GA w grupie kobiet z poronieniami w porównaniu do grupy zdrowych kobiet (3,34 vs. 1,50%, WR=1,50, p=0,08). Zaobserwowana częstość występowania niezmutowanego genotypu homozygotycznego 20210GG była podobna w obydwu badanych grupach (96,66 vs. 98,50% WR=0,44, p=0,08). W obydwu badanych grupach kobiet RM oraz grupie kontrolnej nie odnotowano występowania genotypu homozygotycznego zmutowanego 20210AA.

Również częstość występowania zmutowanego allela 20210A była wyższa w grupie RM w porównaniu do grupy kontrolnej (1,67 vs. 0,75%, WR=2,25, p=0,08) (tab. 16).

Tabela. 16. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 20210G>A genu czynnika II w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

<i>FII</i> 20210G> A	<i>Grupa RM</i> (n=359)		<i>Grupa kontrolna</i> (n=400)		<i>WR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
	<i>wartość obserwowana</i> n (%)	<i>wartość oczekiwana</i> (%)	<i>wartość obserwowana</i> n (%)	<i>wartość oczekiwana</i> (%)			
<i>20210GG</i>	347 (96,66)	96,68	394 (98,50)	98,51	0,44	0,16-1,19	0,08
<i>20210GA</i>	12 (3,34)	3,29	6 (1,50)	1,49	2,27	0,84-6,11	0,08
<i>20210AA</i>	0 (0,00)	0,03	0 (0,00)	0,00	—	—	—
<i>Suma</i>	359 (100,00)	100,00	400 (100,0)	100,00			
<i>Allele</i>							
<i>20210G</i>	706 (98,33)	—	794 (99,25)	—	0,44	0,17-1,19	0,08
<i>20210A</i>	12 (1,67)	—	6 (0,75)	—	2,25	0,84-6,02	0,08
<i>Suma</i>	718 (100,00)	—	800 (100,00)	—			

p – test Fishera jednostronny

Analizując polimorfizm *20210G>A* genu czynnika II krzepnięcia w grupie IUFD zaobserwowano podobną częstość występowania genotypu homozygotycznego *20210GG* w grupie badanej IUFD (98,36%) oraz w grupie kontrolnej (98,50%) (WR=0,91, ns). Również częstość genotypu heterozygotycznego *20210GA* była porównywalna w grupie badanej IUFD (1,64%) oraz w grupie kontrolnej (1,50%) (WR=1,09, ns).

Podobna obserwacja dotyczyła częstości występowania niezmutowanego allela *20210G* (99,18% w grupie IUFD oraz 99,25% w grupie kontrolnej, WR=0,91, ns) oraz zmutowanego allela *20210A* (0,82% w grupie IUFD oraz 0,75% w grupie kontrolnej WR=1,09, ns) (tab. 17).

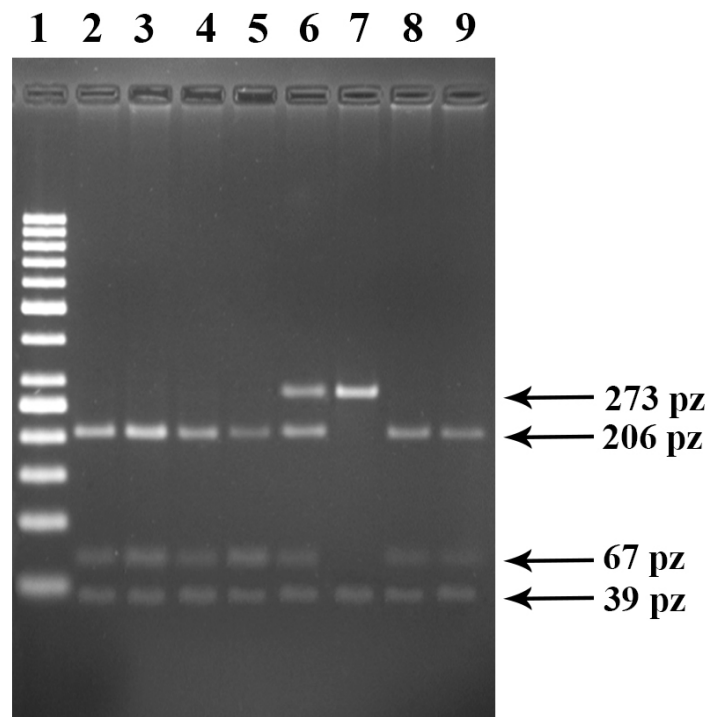
Tabela. 17. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *20210G>A* genu czynnika II w grupie kobiet z IUFD oraz w grupie kontrolnej.

<i>FII</i> <i>20210G></i> <i>A</i>	<i>IUFD</i> (<i>n=61</i>)		<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=400</i>)		<i>WR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>(%)</i>	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>(%)</i>			
<i>20210GG</i>	60 (98,36)	98,37	394 (98,50)	98,51	0,91	0,11-7,72	0,63
<i>20210GA</i>	1 (1,64)	1,62	6 (1,50)	1,49	1,09	0,13-9,25	0,63
<i>20210AA</i>	0 (0,00)	0,01	0 (0,00)	0,00	—	—	
<i>Suma</i>	61 (100,00)	100,00	400 (100,0)	100,00			
<i>Allele</i>							
<i>20210G</i>	121 (99,18)	—	794 (99,25)	—	0,91	0,11-7,66	0,63
<i>20210A</i>	1 (0,82)	—	6 (0,75)	—	1,09	0,13-9,16	0,63
<i>Suma</i>	122 (100,00)	—	800 (100,00)	—			

p – test Fishera jednostronny

POLIMORFIZM *R353Q* (*11496G>A*) GENU CZYNNIKA VII KRZEPNIĘCIA

W pracy analizowano również polimorfizm *R353Q* (*11496G>A*) genu czynnika VII krzepnięcia. Rozkład genotypów dla tego polimorfizmu odczytywano po procesie hydrolizy enzymem restrykcyjnym *MspI*. Obecność genotypu homozygotycznego niezmutowanego *11496GG* odczytywano przy obecności prążków o wielkości 206, 67 oraz 39 pz. W przypadku prążków o wielkości 273 oraz 39 pz odczytywano obecność genotypu homozygotycznego zmutowanego *11496AA*. Heterozygotyczny genotyp *11496GA* odczytywano przy obecności czterech fragmentów: 273, 206, 67 oraz 39 pz. Przykładowy odczytywanych z żelu agarozowego prążków dla tego polimorfizmu przedstawia fotografia 4.



Fotografia 4. Analiza genotypów polimorfizmu *R353Q* (*11496G>A*) genu *FVII* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *MspI*. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 2, 3, 4, 5, 8, 9 homozygoty niezmutowane *11496GG*, tor 6 heterozygota *11496GA*, tor 7 homozygota zmutowana *11496AA*.

Rozkład genotypów i alleli analizowanego polimorfizmu *R353Q* (*11496G>A*) genu czynnika VII krzepnięcia we wszystkich badanych grupach RM, IUFD oraz kontrolnej był zgodny z prawem Hardy-Weinberga.

W przypadku polimorfizmu *R353Q* (*11496G>A*) w grupie kobiet z RM odnotowano porównywalną częstość występowania genotypu typu dzikiego *11496GG* w grupie RM (78,83%) oraz w grupie kontrolnej (75,50%) (WR=1,21, ns). Podobne obserwacje dotyczyły genotypu heterozygotycznego *11496GA*. Genotyp ten występował z częstością 20,61% w grupie RM oraz 23,00% w grupie kontrolnej (WR=0,87, ns). W pracy odnotowano również porównywalną frekwencję genotypu homozygotycznego zmutowanego *11496AA* (0,56% w grupie RM oraz 1,50% w grupie kontrolnej, WR=0,37, ns).

Ponadto odnotowano podobne częstości występowania allela *11496G* (89,14 vs. 87,00% w grupie kontrolnej, WR=1,23, ns) oraz zmutowanego allela *11496A* (10,86 vs. 13,00% w grupie kontrolnej, WR=0,82, ns) (tab. 18).

Tabela. 18. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *R353Q* genu czynnika VII w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

<i>FVII</i> <i>R353Q</i> (<i>11496G>A</i>)	<i>Grupa RM</i> (<i>n=359</i>)		<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=400</i>)		WR	95%PU	p
	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> (%)	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> (%)			
<i>11496GG</i>	283 (78,83)	79,45	302 (75,50)	75,69	1,21	0,86-1,70	0,16
<i>11496GA</i>	74 (20,61)	19,37	92 (23,00)	22,62	0,87	0,62-1,23	0,24
<i>11496AA</i>	2 (0,56)	1,18	6 (1,50)	1,69	0,37	0,07-1,83	0,18
<i>Suma</i>	359 (100,00)	100,00	400 (100,00)	100,00			
<i>Allele</i>							
<i>11496G</i>	640 (89,14)	—	696 (87,00)	—	1,23	0,90-1,68	0,11
<i>11496A</i>	78 (10,86)	—	104 (13,00)	—	0,82	0,60-1,11	0,11
<i>Suma</i>	718 (100,00)	—	800 (100,00)	—			

p – test Fishera jednostronny

W grupie kobiet z IUFD zaobserwowano porównywalne częstości występowania analizowanych genotypów polimorfizmu *R353Q* genu czynnika VII krzepnięcia. Genotyp *11496GG* występował z częstością 78,69% w grupie IUFD oraz częstością 75,50% w grupie kontrolnej (WR=1,20, ns). Genotyp heterozygotyczny *11496GA* występował z częstością 19,67% w grupie IUFD oraz z częstością 23,00% w grupie kontrolnej (WR=0,82, ns). Natomiast genotyp *11496AA* z częstością 1,64% w grupie IUFD oraz z częstością 1,50% w grupie kontrolnej zdrowych kobiet (WR=1,09, ns).

Podobne obserwacje dotyczyły częstości występowania alleli polimorfizmu *R353Q* genu *FVII*. Niezmutowany allel *11496G* występował z częstością 88,52% w grupie IUFD oraz z częstością 87,00% w grupie kobiet zdrowych bez obciążonego wywiadu (WR=1,15, ns). Rozkład zmutowanego allela *11496A* przedstawiał się następująco: 11,48% w grupie IUFD oraz 13,00% w grupie kontrolnej (WR=0,87, ns) (tab. 19).

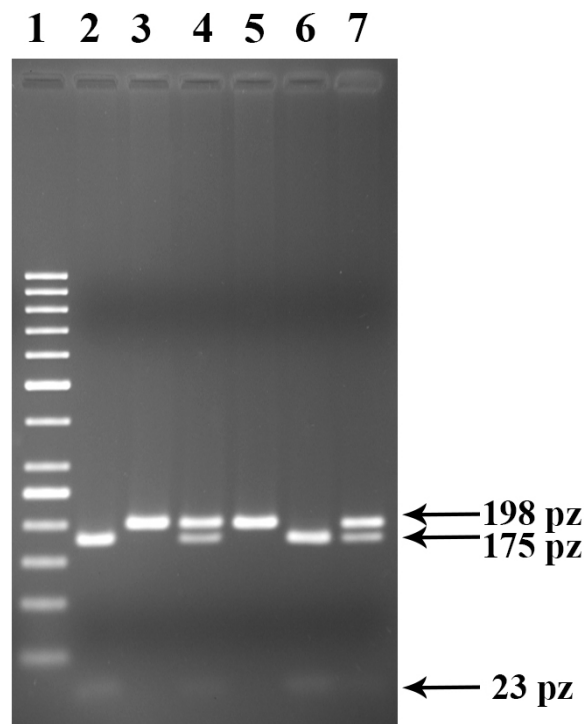
Tabela. 19. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *R353Q* genu czynnika V w grupie kobiet z IUFD oraz w grupie kontrolnej.

<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>Grupa IUFD</i> (<i>n</i> =61)		<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i> =400)		WR	95%PU	<i>p</i>
	<i>wartość obserwowana</i> <i>n</i> (%)	<i>wartość oczekiwana</i> (%)	<i>wartość obserwowana</i> <i>n</i> (%)	<i>wartość oczekiwana</i> (%)			
<i>11496GG</i>	48 (78,69)	78,36	302 (75,50)	75,69	1,20	0,62-2,30	0,36
<i>11496GA</i>	12 (19,67)	20,32	92 (23,00)	22,62	0,82	0,42-1,61	0,35
<i>11496AA</i>	1 (1,64)	1,32	6 (1,50)	1,69	1,09	0,13-9,25	0,63
<i>Suma</i>	61 (100,00)	100,00	400 (100,00)	100,00			
<i>Allele</i>							
<i>11496G</i>	108 (88,52)	—	696 (87,00)	—	1,15	0,64-2,09	0,38
<i>11496A</i>	14 (11,48)	—	104 (13,00)	—	0,87	0,48-1,57	0,38
<i>Suma</i>	122 (100,00)	—	800 (100,00)	—			

p – test Fishera jednostronny

POLIMORFIZM 677C>T GENU *MTHFR*

Jednym z omawianych w pracy jest polimorfizm pojedynczego nukleotydu, zlokalizowany w regionie kodującym genu *MTHFR*. Polimorfizm ten badano metodą PCR uzyskując fragment o wielkości 198 pz, który poddawano następnie hydrolizie restrykcyjnej z zastosowaniem enzymu *HinfI*. Przy obecności homozygotycznego genotypu niezmutowanego 677CC z powodu braku miejsca hydrolizy rozpoznawanego przez enzym restrykcyjny uzyskiwano jeden prążek o wielkości 198 pz. Obecność tyminy powodowała powstanie miejsca rozpoznawanego przez enzym *HinfI*, dlatego genotyp homozygotyczny zmutowany 677TT odczytywano przy obecności 2 prążków 175 i 23 par zasad. Heterozygotyczny genotyp 677CT odczytywano przy obecności trzech fragmentów: 198, 175 i 23 par zasad (fot. 5).



Fotografia 5. Analiza genotypów polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *HinfI*. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 3 i 5 to homozygoty niezmutowane 677CC, tory 4 i 7 heterozygoty 677CT, tory 2 i 6 homozygoty zmutowane 677TT.

Rozkład genotypów i alleli polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* we wszystkich badanych grupach RM, IUFD oraz kontrolnej był zgodny z równowagą Hardy-Weinberga.

Analizując polimorfizm 677C>T genu *MTHFR* w grupie kobiet z RM zaobserwowano, że genotyp homozygotyczny niezmutowany 677CC występował z podobną częstością w grupie kontrolnej (50,25%) oraz w grupie badanej (45,96%) (WR=0,84, ns). Również w przypadku genotypu heterozygotycznego 677CT odnotowano porównywalną frekwencję w grupie RM (42,62%) oraz w grupie kontrolnej (41,00%) (WR=1,07, ns). Podobna obserwacja dotyczyła genotypu zmutowanego 677TT (WR=1,34, ns) w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej.

Analiza częstości występowania alleli tego polimorfizmu wykazała podobną frekwencję niezmutowanego allela 677C w grupie RM w porównaniu do grupy kontrolnej (67,27 vs. 70,75% w grupie kontrolnej, WR=0,85, p=0,08) oraz allela 677T w grupie badanej RM w porównaniu do grupy kobiet kontrolnej (32,73 vs. 29,25% w grupie kontrolnej, WR=1,18, p=0,08) (tab. 20).

Tabela. 20. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> 677C>T	<i>Grupa RM</i> (n=359)		<i>Grupa kontrolna</i> (n=400)		WR	95%PU	P
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)			
677CC	165 (45,96)	45,25	201 (50,25)	50,05	0,84	0,63-1,12	0,13
677CT	153 (42,62)	44,04	164 (41,00)	41,39	1,07	0,80-1,43	0,35
677TT	41 (11,42)	10,71	35 (8,75)	8,56	1,34	0,84-2,16	0,13
Suma	359 (100,00)	100,00	400 (100,00)	100,00			
Allele							
677C	483 (67,27)	—	566 (70,75)	—	0,85	0,68-1,06	0,08
677T	235 (32,73)	—	234 (29,25)	—	1,18	0,94-1,46	0,08
Suma	718 (100,00)	—	800 (100,00)	—			

p – test Fishera jednostronny

W podgrupie kobiet, w których wywiadzie położniczym odnotowano IUFD rozkład częstość występowania genotypów przedstawiał się następująco: 677CC 59,02%, 677CT 27,87% oraz 677TT 13,11%. Genotyp heterozygotyczny 677CT stwierdzono u 41,00% kobiet z grupy kontrolnej i tylko u 27,87% kobiet z IUFD ($p=0,03$). Częstość występowania niezmutowanego allela 677C oraz allela zmutowanego 677T była podobna w grupie IUFD oraz kontrolnej (allel 677C: 72,95 vs. 70,75%, $p=0,35$ allel 677T: 27,05 vs. 29,25%, $p=0,35$) (tab. 21).

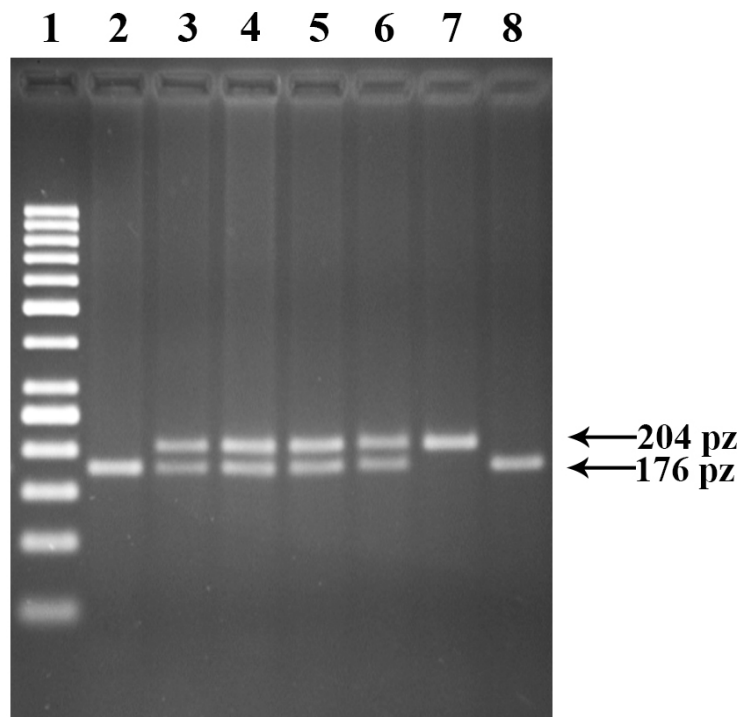
Tabela. 21. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* w grupie kobiet z obumarciem wewnątrzmacicznym oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> 677C>T	<i>Grupa IUFD</i> (<i>n</i> =61)		<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i> =400)		<i>WR</i>	<i>95%PU</i>	<i>P</i>
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserwowana</i> <i>n</i> (%)	<i>wartość oczekiwana</i> (%)	<i>wartość obserwowana</i> <i>n</i> (%)	<i>wartość oczekiwana</i> (%)			
677CC	36 (59,02)	53,22	201 (50,25)	50,05	1,43	0,83-2,46	0,13
677CT	17 (27,87)	39,46	164 (41,00)	41,39	0,56	0,31-1,01	0,03
677TT	8 (13,11)	7,32	35 (8,75)	8,56	1,57	0,69-3,58	0,19
<i>Suma</i>	61 (100,00)	100,00	400 (100,00)	100,00			
<i>Allele</i>							
677C	89 (72,95)	—	566 (70,75)	—	1,12	0,73-1,71	0,35
677T	33 (27,05)	—	234 (29,25)	—	0,90	0,58-1,38	0,35
<i>Suma</i>	122 (100,00)	—	800 (100,00)	—			

p – test Fishera jednostronny

POLIMORFIZM *1298A>C* GENU *MTHFR*

Fotografia 2 przedstawia trzy genotypy kolejnego analizowanego polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR*. Genotypy uzyskiwano po hydrolizie produktu PCR enzymem restrykcyjnym *MboII* (Eurx, Polska). Przy obecności prążków o długości 179, 30, 28, 22 pz odczytywano obecność genotypu homozygotycznego niezmutowanego *1298AA*, obecność prążków 204, 179, 30, 28, 22 pz odczytywano jako genotyp heterozygotyczny *1298AC*, natomiast przy obecności prążków 204, 30, 22 pz odczytywano genotyp homozygotyczny zmutowany *1298CC* (fot. 6).



Fotografia 6. Analiza genotypów polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *MboII*. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tor 7 homozygota niezmutowane *1298AA*, tory 3,4,5,6 heterozygoty *1298AC*, tory 2 i 8 homozygoty zmutowane *1298CC*.

W zakresie polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR* rozkład genotypów i alleli we wszystkich grupach kobiet z RM, z IUFD oraz w grupie kontrolnej był zgodny z założeniami Hardy-Weinberga.

Analizując częstość występowania genotypów w grupie kobiet z RM oraz kontrolnej w zakresie polimorfizmu $1298A>C$ genu *MTHFR* stwierdzono zbliżoną częstość występowania zmutowanego genotypu *1298CC* w grupie badanej (12,26 vs. 12,25% w grupie kontrolnej, WR=1,00, ns) oraz podobną częstość występowania pozostałych badanych genotypów: heterozygotycznego *1298AC* (45,40 vs. 43,00% w grupie kontrolnej, WR=1,10, ns) oraz homozygotycznego *1298AA* (42,34 vs. 44,75% w grupie kontrolnej, WR=0,91, ns).

Zaobserwowano również podobną częstość występowania obydwu alleli dla analizowanego polimorfizmu: allele typu dzikiego *1298A* (65,04 vs. 66,25% w grupie kontrolnej, WR=0,95, ns) oraz zmutowanego allele *1298C* w grupie badanej (34,96%) w porównaniu z grupą kontrolną (33,75%) (WR=1,06, ns) (tab. 22).

Tabela. 22. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $1298A>C$ genu *MTHFR* w grupie RM oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> <i>1298A>C</i>	<i>Grupa RM</i> (<i>n</i> =359)		<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i> =400)		<i>WR</i>	<i>95%PU</i>	<i>P</i>
	<i>wartość obserwowana</i> <i>n</i> (%)	<i>wartość oczekiwana</i> (%)	<i>wartość obserwowana</i> <i>n</i> (%)	<i>wartość oczekiwana</i> (%)			
<i>1298AA</i>	152 (42,34)	42,30	179 (44,75)	43,89	0,91	0,68-1,21	0,28
<i>1298AC</i>	163 (45,40)	45,48	172 (43,00)	44,72	1,10	0,83-1,47	0,28
<i>1298CC</i>	44 (12,26)	12,22	49 (12,25)	11,39	1,00	0,65-1,55	0,54
<i>Suma</i>	359 (100,00)	100,00	400 (100,00)	100,00			
<i>Allele</i>							
<i>1298A</i>	467 (65,04)	—	530 (66,25)	—	0,95	0,77-1,17	0,33
<i>1298C</i>	251 (34,96)	—	270 (33,75)	—	1,06	0,85-1,30	0,33
<i>Suma</i>	718 (100,00)	—	800 (100,00)	—			

p – test Fishera jednostronny

Następnie analizowano częstość występowania genotypów i alleli dla tego polimorfizmu w grupie kobiet z IUFD oraz kontrolnej. Zaobserwowano tutaj statystycznie istotnie częstsze występowanie genotypu homozygotycznego typu dzikiego *1298AA* w grupie kontrolnej (44,75% vs. 29,51% w grupie badanej, WR=0,52, p=0,01). Częstość występowania genotypu heterozygotycznego *1298AC* w badanej grupie IUFD była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu z grupą kontrolną (55,74% vs. 43,00%, WR=1,66, p=0,04). Genotyp homozygotyczny zmutowany *1298CC* również występował z podobną częstością w obydwu grupach (14,75% vs. 12,25%, WR=1,24, ns).

Różnice te uwidoczniły się również podczas analizy częstości występowania alleli dla tego polimorfizmu. Zmutowany allel *1298C* występował w 42,62% w grupie IUFD oraz w 33,75% w grupie kontrolnej. Różnica ta również była statystycznie istotna (WR=1,46, p=0,04) (tab. 23).

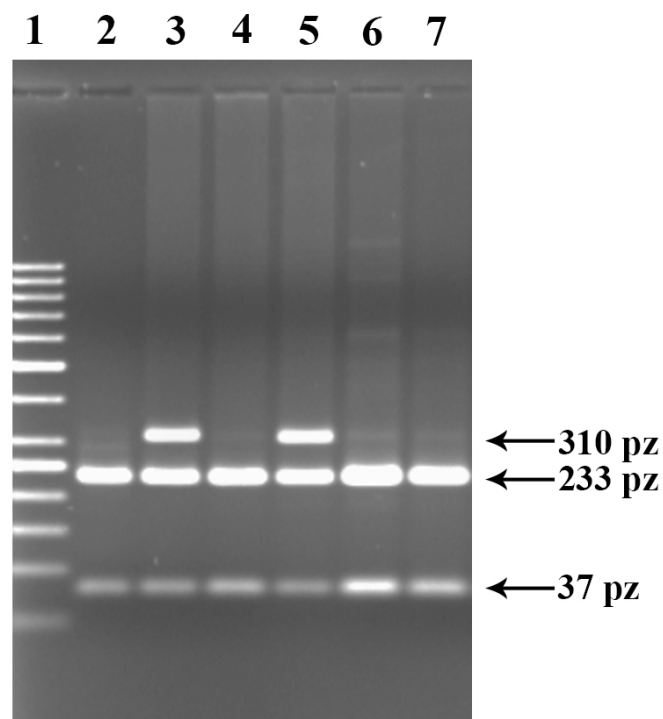
Tabela. 23. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR* w grupie IUFD oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> <i>1298A>C</i>	<i>Grupa IUFD</i> (n=61)		<i>Grupa kontrolna</i> (n=400)		<i>WR</i>	<i>95%PU</i>	<i>P</i>
	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> (%)	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> (%)			
<i>1298AA</i>	18 (29,51)	32,92	179 (44,75)	43,89	0,52	0,29-0,93	0,01
<i>1298AC</i>	34 (55,74)	48,91	172 (43,00)	44,72	1,66	0,97-2,87	0,04
<i>1298CC</i>	9 (14,75)	18,17	49 (12,25)	11,39	1,24	0,58-2,67	0,35
<i>Suma</i>	61 (100,00)	100,00	400 (100,00)	100,00			
<i>Allele</i>							
<i>1298A</i>	70 (57,38)	—	530 (66,25)	—	0,69	0,47-1,01	0,04
<i>1298C</i>	52 (42,62)	—	270 (33,75)	—	1,46	0,99-2,15	0,04
<i>Suma</i>	122 (100,00)	—	800 (100,00)	—			

p – test Fishera jednostronny

POLIMORFIZM *1793G>A* GENU *MTHFR*

Kolejnym badanym w pracy wariantem był polimorfizm *1793G>A* genu *MTHFR*. Na fotografii 3 przedstawiono trzy genotypy omawianego polimorfizmu uwidocznione na żelu agarozowym. Genotypy tego polimorfizmu odczytywano po hydrolizie produktu PCR enzymem restrykcyjnym *MbiI* (*BsrBI*). Genotyp homozygotyczny niezmutowany *1793GG* odczytywano przy obecności prążków o wielkości 233, 77 pz, genotyp heterozygotyczny *1793GA* 310, 233, 77 pz oraz genotyp homozygotyczny zmutowany *1793AA* przy obecności prążka 310 pz (fot. 7).



Fotografia 7. Analiza genotypów polimorfizmu *1793G>A* genu *MTHFR* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *MbiI*. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 2,4 6 7 homozygoty niezmutowane *1793GG*, tory 3,5 heterozygoty *1793GA*.

Rozkład genotypów i alleli polimorfizmu *1793G>A* genu *MTHFR* we wszystkich badanych grupach RM, IUFD oraz w grupie kontrolnej był zgodne z prawem Hardy-Weinberga.

Analizując polimorfizm 1793G>A genu *MTHFR* w grupie kobiet z RM odnotowano statystycznie istotnie wyższą częstość występowania genotypu homozygotycznego typu dzikiego 1793GG w grupie kontrolnej (92,00% vs. 87,74 w grupie RM, WR=0,62, p=0,03). Interesującym faktem było również odnotowanie statystycznie istotnie wyższej frekwencji genotypu heterozygotycznego 1793GA w grupie RM (11,98 vs. 7,75% w grupie kontrolnej, WR=1,62, p=0,03).

Podobne obserwacje odnotowano w stosunku do alleli polimorfizmu 1793G>A *MTHFR*. Allel typu dzikiego 1793G występował statystycznie istotnie częściej w grupie kontrolnej (93,73 vs. 95,87% w grupie kontrolnej, WR=0,64, p=0,04. Natomiast zmutowany allel 1793A występował istotnie częściej w grupie RM (6,27 vs. 4,13%, WR=1,55, p=0,04) (tab. 24).

Tabela. 24. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR* w grupie RM oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> 1793G>A	<i>Grupa RM</i> (n=359)		<i>Grupa kontrolna</i> (n=400)		WR	95%PU	P
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)			
1793GG	315 (87,74)	87,86	368 (92,00)	91,92	0,62	0,39-1,01	0,03
1793GA	43 (11,98)	11,75	31 (7,75)	7,91	1,62	1,00-2,63	0,03
1793AA	1 (0,28)	0,39	1 (0,25)	0,17	1,11	0,07-17,88	0,72
<i>Suma</i>	359 (100,00)	100,00	400 (100,00)	100,00			
<i>Allele</i>							
1793G	673 (93,73)	—	767 (95,87)	—	0,64	0,41-1,02	0,04
1793A	45 (6,27)	—	33 (4,13)	—	1,55	0,98-2,46	0,04
<i>Suma</i>	718 (100,00)	—	800 (100,00)	—			

p – test Fishera jednostronny

Analiza przeprowadzona w grupie IUFD dla polimorfizmu *1793G>A MTHFR* nie pokazała różnic statystycznie istotnych. W grupie IUFD rozkład genotypów przedstawiał się następująco: *1793GG : 1793GA : 1793AA = 88,52 : 11,48 : 0,00* (ns), natomiast w grupie kontrolnej: *1793GG : 1793GA : 1793AA = 92,00 : 7,75 : 0,25* (ns).

Również w częstości występowania alleli polimorfizmu *1793G>A MTHFR* nie odnotowano różnic statystycznie istotnych. Allel *1793G* występował z częstością 94,26% w grupie IUFD oraz z częstością 95,87% w grupie kontrolnej (WR=0,71, ns). Natomiast frekwencja allela zmutowanego *1793A* w grupie IUFD wynosiła 5,74% oraz w grupie kontrolnej 4,13% (WR=1,41, ns) (tab. 25).

Tabela. 25. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1793G>A* genu *MTHFR* w grupie IUFD oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> <i>1793G>A</i>	<i>Grupa IUFD</i> <i>(n=61)</i>		<i>Grupa kontrolna</i> <i>(n=400)</i>		<i>WR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>(%)</i>	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>(%)</i>			
<i>1793GG</i>	54 (88,52)	88,85	368 (92,00)	91,92	0,67	0,28-1,60	0,25
<i>1793GA</i>	7 (11,48)	10,82	31 (7,75)	7,91	1,54	0,65-3,68	0,22
<i>1793AA</i>	0 (0,00)	0,33	1 (0,25)	0,17	--	--	--
<i>Suma</i>	61 (100,00)	100,00	400 (100,00)	100,00			
<i>Allele</i>							
<i>1793G</i>	115 (94,26)	—	767 (95,87)	—	0,71	0,31-1,64	0,27
<i>1793A</i>	7 (5,74)	—	33 (4,13)	—	1,41	0,61-3,27	0,27
<i>Suma</i>	122 (100,00)	—	800 (100,00)	—			

p – test Fishera jednostronny

ANALIZA PORÓWNAWCZA GENOTYPÓW I ALLELI BADANYCH POLIMORFIZMÓW W ZALEŻNOŚCI OD LICZBY PORONIEŃ W WYWIADZIE

W celu dokładnej analizy wyników w pracy przeprowadzono podział grupy badanej 359 kobiet z poronieniami w wywiadzie, ze względu na liczbę przeżytych poronień. Kobiety podzielono na dwie podgrupy:

Podgrupa kobiet, u których wystąpiły dwa poronienia (282 kobiety)

Podgrupa kobiet, u których wystąpiły trzy lub więcej poronienia (77 kobiet)

Analizując polimorfizm *1691G>A* genu czynnika V krzepnięcia pokazano podobną częstość występowania analizowanych genotypów i alleli. Genotyp heterozygotyczny *1691GA* występował z porównywalną częstością we obydwu analizowanych podgrupach - w podgrupie kobiet ≥ 3 RM wystąpił u 7,79% kobiet, u 7,09% pacjentek w podgrupie z 2 poronieniami, a w grupie z nieobciążonym wywiadem położniczym występował u 5,25% kobiet (ns). Genotyp homozygotyczny zmutowany *1691AA* wystąpił tylko u jednej kobiety z grupy kontrolnej. Częstość występowania zmutowanego allela *1691A* przedstawiała się następująco: w podgrupie z ≥ 3 poronieniami 3,90%, w podgrupie z 2 poronieniami 3,55%, natomiast w grupie kontrolnej 2,88% (ns) (tab. 26).

Analiza polimorfizmu *1328T>C* genu czynnika V krzepnięcia również nie pokazała różnic statystycznie istotnych pomiędzy analizowanymi podgrupami oraz grupą kontrolną. Częstość występowania zmutowanego genotypu homozygotycznego *1328CC* wynosiła w podgrupie kobiet ≥ 3 RM 1,30, w podgrupie kobiet z 2 poronieniami 1,77% oraz w grupie kontrolnej 1,25% (ns). Natomiast rozkład występowania zmutowanego allela *1328C* był następujący: 12,99 vs. 12,94 vs. 12,38, odpowiednio w podgrupie ≥ 3 RM, z 2 poronieniami oraz w grupie kontrolnej (tab. 27).

W przypadku polimorfizmu *20210G>A* genu czynnika II krzepnięcia ciekawą obserwacją było odnotowanie faktu wyższej częstości występowania heterozygotycznego genotypu *20210GA* w grupie z 2 poronieniami w porównaniu do grupy kontrolnej (3,55 vs. 1,50%, WR=2,41, p=0,07). Częstość występowania genotypu *20210GA* w grupie ≥ 3 RM

również była wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej (2,60 vs. 1,50%, WR=1,75, ns). Podobną zależność obserwowano w przypadku alleli polimorfizmu *20210G>A*. Zmutowany allel *20210A* występował z większą częstością w grupie z 2 RM (1,77%, WR=2,39, p=0,07) oraz w grupie z 2 RM (1,3%, WR=1,74, ns) w porównaniu do grupy kontrolnej (0,75%) (tab. 28).

Dla polimorfizmu *R353Q (11496G>A)* genu czynnika VII krzepnięcia stwierdzono podobny rozkład wariantów genetycznych we obydwu analizowanych podgrupach oraz w grupie kontrolnej. W podgrupie ≥ 3 RM dystrybucja genotypów była następująca *GG :GA : AA = 75,32 : 24,68 : 0,00*. W podgrupie z 2 RM rozkład ten przedstawiał się następująco: *GG :GA : AA = 79,79 : 19,50 : 0,71%*. Natomiast w grupie kontrolnej rozkład genotypów był następujący: *GG :GA : AA = 75,50 : 23,00 : 1,50%*. Nie odnotowano istotnych różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów pomiędzy badanymi podgrupami kobiet z RM oraz grupą kontrolną (tab. 26). Częstość występowania zmutowanego allela *11496A* była porównywalna w analizowanych podgrupach kobiet w wynosiła 12,34% w podgrupie ≥ 3 RM, 10,46% w podgrupie z 2 RM oraz 13,00% w grupie kontrolnej (tab. 29).

W zakresie analizy polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR* zaobserwowano podobną częstość występowania genotypu homozygotycznego niezmutowanego *677CC* w podgrupie ≥ 3 RM (44,16%) (ns), podgrupie z 2 RM (46,45%) (ns) oraz w grupie kontrolnej (50,25%). Podobną frekwencję odnotowano analizując genotypy zawierające co najmniej jeden zmutowany allel – heterozygotyczny *677CT* oraz homozygotyczny zmutowany *677TT*. Genotyp *677TT* występował w podgrupie ≥ 3 RM z częstością 11,68%, w podgrupie 2 RM z częstością 11,35% oraz w grupie kontrolnej z częstością 8,75%. Porównywalna była również frekwencja zmutowanego allela *677T* we wszystkich analizowanych grupach pacjentek (33,77% w podgrupie ≥ 3 RM vs. 32,45% w podgrupie 2 RM vs. 29,25% w grupie kontrolnej, ns). Żadna z obserwowanych różnic nie była statystycznie istotna (tab. 30).

Analizując drugi z omawianych w pracy polimorfizmów genu *MTHFR* – wariant *1298A>C* również odnotowano porównywalną częstość występowania poszczególnych genotypów tego polimorfizmu. Częstość występowania genotypu zmutowanego *1298CC* wynosiła w podgrupie ≥ 3 RM 15,58%, w podgrupie z 2 RM 11,35% oraz w grupie kontrolnej 12,25%. Allel typu dzikiego *1298A* występował z podobną częstością w podgrupie kobiet z ≥ 3 RM (64,94%) oraz z 2 RM (65,07%) w porównaniu do grupy kontrolnej (66,25%) (ns).

Natomiast allel zmutowany *1298C* występował z częstością 35,06 w podgrupie z ≥ 3 RM, z częstością 34,93% w podgrupie z 2 RM oraz z częstością 33,75 w grupie kontrolnej (ns). Żadna z obserwowanych różnic pomiędzy analizowanymi podgrupami oraz grupą kontrolną nie była statystycznie istotna (tab. 31).

Ciekawych obserwacji dostarczyła analiza polimorfizmu *1793G>A* genu *MTHFR*. Obserwowano tutaj statystycznie istotnie wyższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego *1793GA* w podgrupie z 2 RM w porównaniu do grupy kontrolnej (12,77 vs. 7,75% w grupie kontrolnej, WR=1,74, p=0,02). Odnotowano natomiast podobną częstość występowania tego genotypu w podgrupie z ≥ 3 RM w porównaniu do grupy kontrolnej (9,09 vs. 7,75% w grupie kontrolnej, WR=1,19, ns). Podobna obserwacja dotyczyła zmutowanego allela *1793A* genu *MTHFR*. Częstość występowania tego allela była istotnie wyższa w grupie kobiet z 2 RM 6,74 vs. 4,13% w grupie kontrolnej, WR=1,68, p=0,02), oraz porównywalna w podgrupie ≥ 3 RM oraz kontrolnej (4,55 vs. 4,13%, WR=1,11, ns) (tab. 32).

Tabela 26. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 1691G>A genu czynnika V krzepnięcia w podgrupach kobiet z 2 oraz ≥ 3 RM w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>Grupa badana RM</i> <i>(n=359)</i>								<i>Grupa kontrolna</i> <i>(n=400)</i>	
	<i>Grupa z 2 RM</i> <i>(n=282)</i>				<i>Grupa z ≥ 3 RM</i> <i>(n=77)</i>				<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> <i>(%)</i>
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> <i>(%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> <i>(%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> <i>(%)</i>
<i>1691GG</i>	262 (92,91)	93,03	0,76	0,24	71 (92,21)	92,36	0,69	0,29	378 (94,50)	94,33
<i>1691GA</i>	20 (7,09)	6,84	1,38	0,20	6 (7,79)	7,49	1,52	0,26	21 (5,25)	5,59
<i>1691AA</i>	0 (0,00)	0,13	—	—	0 (0,00)	0,15	—	—	1 (0,25)	0,08
<i>Suma</i>	282 (100,00)	100,00			77 (100,00)	100,00			400 (100,00)	100,00
<i>Allele</i>										
<i>1691G</i>	544 (96,45)	—	0,81	0,29	148 (96,10)	—	0,73	0,32	777 (97,12)	—
<i>1691A</i>	20 (3,55)	—	1,24	0,29	6 (3,90)	—	1,37	0,32	23 (2,88)	—
<i>Suma</i>	564 (100,00)	—			154 (100,00)	—			800 (100,00)	—

podgrupy porównywano do grupy kontrolnej, *p* – test dokładny Fishera jednostronny

Tabela 27. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1328T>C* (*M385T*) genu czynnika V krzepnięcia w podgrupach kobiet z 2 oraz ≥ 3 RM w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

<i>FV</i> <i>1328T>C</i> <i>M385T</i>	<i>Grupa badana RM</i> <i>(n=359)</i>								<i>Grupa kontrolna</i> <i>(n=400)</i>	
	<i>Grupa z 2 RM</i> <i>(n=282)</i>				<i>Grupa z ≥ 3 RM</i> <i>(n=77)</i>					
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>
<i>1328TT</i>	214 (75,89)	75,79	0,97	0,46	58 (75,32)	75,71	0,94	0,46	306 (76,50)	76,78
<i>1328TC</i>	63 (22,34)	22,54	1,01	0,52	18 (23,38)	22,60	1,07	0,47	89 (22,25)	21,69
<i>1328CC</i>	5 (1,77)	1,67	1,43	0,40	1 (1,30)	1,69	1,04	0,65	5 (1,25)	1,53
<i>Suma</i>	282 (100,00)	100,00			77 (100,00)	100,00			400 (100,00)	100,00
<i>Allele</i>										
<i>1328T</i>	491 (87,06)	—	0,95	0,41	134 (87,01)	—	0,95	0,46	701 (87,62)	—
<i>1328C</i>	73 (12,94)	—	1,05	0,41	20 (12,99)	—	1,06	0,46	99 (12,38)	—
<i>Suma</i>	564 (100,00)	—			154 (100,00)	—			800 (100,00)	—

podgrupy porównywano do grupy kontrolnej, p – test dokładny Fishera jednostronny

Tabela 28. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 20210G>A genu czynnika II krzepnięcia w podgrupach kobiet z 2 oraz ≥ 3 RM w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

<i>FII</i> 20210G>A	<i>Grupa badana RM</i> (n=359)								<i>Grupa kontrolna</i> (n=400)	
	<i>Grupa z 2 RM</i> (n=282)				<i>Grupa z ≥ 3 RM</i> (n=77)					
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>
20210GG	272 (96,45)	96,49	0,41	0,07	75 (97,40)	97,42	0,57	0,38	394 (98,50)	98,51
20210GA	10 (3,55)	3,48	2,41	0,07	2 (2,60)	2,56	1,75	0,38	6 (1,50)	1,49
20210AA	0 (0,00)	0,03	—	—	0 (0,00)	0,02	—	—	0 (0,00)	0,00
<i>Suma</i>	282 (100,00)	100,00			77 (100,00)	100,00			400 (100,0)	100,00
<i>Allele</i>										
20210G	554 (98,23)	—	0,42	0,07	152 (98,70)	—	0,57	0,38	794 (99,25)	—
20210A	10 (1,77)	—	2,39	0,07	2 (1,30)	—	1,74	0,38	6 (0,75)	—
<i>Suma</i>	564 (100,00)	—			154 (100,00)	—			800 (100,00)	—

podgrupy porównywano do grupy kontrolnej, p – test dokładny Fishera jednostronny

Tabela 29. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *R353Q (10916G>A)* genu czynnika *VII* krzepnięcia w podgrupach kobiet z 2 oraz ≥ 3 RM w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

<i>FVII R353Q (10916G>A)</i>	<i>Grupa badana RM (n=359)</i>								<i>Grupa kontrolna (n=400)</i>	
	<i>Grupa z 2 RM (n=282)</i>				<i>Grupa z ≥ 3 RM (n=77)</i>					
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>
<i>11496GG</i>	225 (79,79)	80,17	1,28	0,11	58 (75,32)	76,85	0,99	0,54	302 (75,50)	75,69
<i>11496GA</i>	55 (19,50)	18,73	0,81	0,16	19 (24,68)	21,63	1,10	0,43	92 (23,00)	22,62
<i>11496AA</i>	2 (0,71)	1,09	0,47	0,29	0 (0,00)	1,52	—	—	6 (1,50)	1,69
<i>Suma</i>	282 (100,00)	100,00			77 (100,00)	100,00			400 (100,00)	100,00
<i>Allele</i>										
<i>11496G</i>	505 (89,54)	—	1,28	0,09	135 (87,66)	—	1,06	0,47	696 (87,00)	—
<i>11496A</i>	59 (10,46)	—	0,78	0,09	19 (12,34)	—	0,94	0,47	104 (13,00)	—
<i>Suma</i>	564 (100,00)	—			154 (100,00)	—			800 (100,00)	—

podgrupy porównywano do grupy kontrolnej, *p* – test dokładny Fishera jednostronny

Tabela 30. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* w podgrupach kobiet z 2 oraz ≥ 3 RM w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> 677C>T	<i>Grupa badana RM</i> (n=359)								<i>Grupa kontrolna</i> (n=400)	
	<i>Grupa z 2 RM</i> (n=282)				<i>Grupa z ≥ 3 RM</i> (n=77)					
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>
677CC	131 (46,45)	45,63	0,86	0,18	34 (44,16)	43,87	0,78	0,20	201 (50,25)	50,05
677CT	119 (42,20)	43,84	1,05	0,41	34 (44,16)	44,73	1,14	0,35	164 (41,00)	41,39
677TT	32 (11,35)	10,53	1,33	0,16	9 (11,68)	11,40	1,38	0,27	35 (8,75)	8,56
Suma	282 (100,00)	100,00			77 (100,00)	100,00			400 (100,00)	100,00
Allele										
677C	381 (67,55)	—	0,86	0,11	102 (66,23)	—	0,81	0,15	566 (70,75)	—
677T	183 (32,45)	—	1,16	0,11	52 (33,77)	—	1,23	0,15	234 (29,25)	—
Suma	564 (100,00)	—			154 (100,00)	—			800 (100,00)	—

podgrupy porównywano do grupy kontrolnej, p – test dokładny Fishera jednostronny

Tabela 31. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 1298A>C genu *MTHFR* w podgrupach kobiet z 2 oraz ≥ 3 RM w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> 1298A>C	<i>Grupa badana RM</i> (<i>n</i> =359)								<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i> =400)	
	<i>Grupa z 2 RM</i> (<i>n</i> =282)				<i>Grupa z ≥ 3 RM</i> (<i>n</i> =77)					
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>
<i>1298AA</i>	117 (41,49)	42,34	0,88	0,22	35 (45,46)	42,16	1,03	0,50	179 (44,75)	43,89
<i>1298AC</i>	133 (47,16)	45,46	1,18	0,16	30 (38,96)	45,54	0,85	0,30	172 (43,00)	44,72
<i>1298CC</i>	32 (11,35)	12,20	0,92	0,41	12 (15,58)	12,30	1,32	0,26	49 (12,25)	11,39
<i>Suma</i>	282 (100,00)	100,00			77 (100,00)	100,00			400 (100,00)	100,00
<i>Allele</i>										
<i>1298A</i>	367 (65,07)	—	0,95	0,35	100 (64,94)	—	0,94	0,41	530 (66,25)	—
<i>1298C</i>	197 (34,93)	—	1,05	0,35	54 (35,06)	—	1,06	0,41	270 (33,75)	—
<i>Suma</i>	564 (100,00)	—			154 (100,00)	—			800 (100,00)	—

podgrupy porównywano do grupy kontrolnej, *p* – test dokładny Fishera jednostronny

Tabela 32. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR* w podgrupach kobiet z 2 oraz ≥ 3 RM w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> 1793G>A	<i>Grupa badana RM</i> (n=359)								<i>Grupa kontrolna</i> (n=400)	
	<i>Grupa z 2 RM</i> (n=282)				<i>Grupa z ≥ 3 RM</i> (n=77)					
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>
<i>1793GG</i>	245 (86,88)	86,98	0,58	0,02	70 (90,91)	91,11	0,87	0,45	368 (92,00)	91,92
<i>1793GA</i>	36 (12,77)	12,57	1,74	0,02	7 (9,09)	8,68	1,19	0,42	31 (7,75)	7,91
<i>1793AA</i>	1 (0,35)	0,45	1,42	0,66	0 (0,00)	0,21	—	—	1 (0,25)	0,17
<i>Suma</i>	282 (100,00)	100,00			77 (100,00)	100,00			400 (100,00)	100,00
<i>Allele</i>										
<i>1793G</i>	526 (93,26)	—	0,60	0,02	147 (95,45)	—	0,90	0,47	767 (95,87)	—
<i>1793A</i>	38 (6,74)	—	1,68	0,02	7 (4,55)	—	1,11	0,47	33 (4,13)	—
<i>Suma</i>	564 (100,00)	—			154 (100,00)	—			800 (100,00)	—

podgrupy porównywano do grupy kontrolnej, p – test dokładny Fishera jednostronny

ANALIZA PORÓWNAWCZA GENOTYPÓW I ALLELI BADANYCH POLIMORFIZMÓW W PODGRUPACH WYODRĘBNIONYCH W ZALEŻNOŚCI OD CZASU WYSTĄPIENIA PORONIEŃ NAWRACAJĄCYCH

W kolejnym etapie pracy przeprowadzono podział grupy badanej 359 kobiet z poronieniami w wywiadzie, ze względu na czas wystąpienia poronień. Kobiety podzielono na dwie podgrupy:

Podgrupa kobiet, u których wystąpiły poronienia przed 13 tygodniem ciąży (303 kobiety)

Podgrupa kobiet, u których poronienia wystąpiły pomiędzy 13 a 22 tc. (56 kobiet)

Analiza polimorfizmu *1691G>A* genu czynnika V krzepnięcia nie pokazała statystycznie istotnych różnic pomiędzy analizowanymi podgrupami kobiet z RM<13 tc., RM 13-22 tc. oraz grupą kontrolną. Częstość występowania genotypu heterozygotycznego *1691GA* była porównywalna w analizowanych podgrupach (7,59% w podgrupie RM<13 tc., 5,36% w podgrupie 13-22 tc. oraz 5,25% w grupie kontrolnej, ns). Również częstość występowania zmutowanego allela *1691A* była podobna we wszystkich podgrupach (3,80% w podgrupie RM<13 tc, 2,68% w podgrupie RM 13-22 tc., oraz 2,88% w grupie kontrolnej, ns) (tab. 33).

Analiza polimorfizmu *1328T>C* genu czynnika V krzepnięcia wskazała na porównywalną częstość występowania wariantów tego polimorfizmu. Zaobserwowano podobną częstość występowania genotypu heterozygotycznego *1328TC* oraz homozygotycznego *1328CC* w podgrupie RM<13 tc. (odpowiednio 23,76% oraz 1,65%), w podgrupie RM 13-22 tc. (odpowiednio 16,07% oraz 1,79%) oraz w grupie kontrolnej (odpowiednio 22,25% oraz 1,25%). Różnice te nie były statystycznie istotne. Również porównywalna frekwencja została odnotowana w stosunku do zmutowanego allela *1328C*: 13,53% w podgrupie <13 tc., 9,82% w podgrupie RM 13-22 tc. oraz 12,38% w grupie kontrolnej. Również w tym wypadku różnice nie były statystycznie istotne (tab. 34).

W przypadku analizy polimorfizmu *20210G>A* genu czynnika II krzepnięcia zaobserwowano wyższą częstość występowania heterozygotycznego genotypu *20210GA* w podgrupie RM<13 tc. (2,97 vs. 1,50% w grupie kontrolnej, WR=2,01, ns) oraz w podgrupie

RM 13-22 tc. (5,36 vs. 1,50% w grupie kontrolnej, WR=3,72, p=0,09). Te same obserwacje odnotowano w stosunku do frekwencji zmutowanego allelela 20210A. Częstość występowania zmutowanego allelela 20210A była wyższa w w podgrupie RM<13 tc. (1,49 vs. 0,75% w grupie kontrolnej, WR=1,99, ns) oraz w podgrupie RM 13-22 tc. (2,68 vs. 0,75% w grupie kontrolnej, WR=3,72, p=0,09) (tab. 35).

W pracy analizowano również polimorfizm *R353Q* (11496G>A) genu czynnika VII krzepnięcia w grupie poronień nawracających. Ciekawym faktem było tutaj odnotowanie statystycznie istotnie wyższej częstości występowania genotypu heterozygotycznego 11496GA w grupie kontrolnej w porównaniu do podgrupy RM 13-22 tc. (10,71 vs. 23,00% w grupie kontrolnej, WR=0,40, p=0,02). Podobnie różnice statystycznie istotne odnotowano porównując częstości występowania genotypów zawierających zmutowany allel 11496A (GA + AA) w podgrupie RM<13 tc. oraz w grupie kontrolnej (12,50 vs. 24,50%, WR=0,44, p=0,029). Również częstość występowania zmutowanego allelela 11496A była wyższa w grupie kontrolnej w do podgrupy RM 13-22 tc. (7,14 vs. 13,00% w grupie kontrolnej, WR=0,51, p=0,05). Natomiast porównując podgrupę RM<13 tc. i grupę kontrolną nie odnotowano różnic statystycznie istotnych pomiędzy tymi grupami kobiet (tab. 36).

W przypadku polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* częstości występowania poszczególnych genotypów i alleleli były porównywalne w badanych podgrupach kobiet z RM oraz w grupie kontrolnej. Frekwencja genotypu heterozygotycznego 677CT była porównywalna w obydwu podgrupach (42,24% w podgrupie RM<13 tc. oraz 44,64% w podgrupie RM 13-22 tc.) w porównaniu do grupy kontrolnej (41,00%) (ns). Częstość zmutowanego genotypu 677TT w podgrupie RM<13 tc. wynosiła 11,88%, w podgrupie RM 13-22 tc. częstość ta wynosiła 8,93%, natomiast w grupie kontrolnej 8,75% (ns). Frekwencja allelela typu dzikiego 677C nie różniła się w badanych podgrupach (67,00% w podgrupie RM<13 tc. vs. 68,75% w podgrupie RM 13-22 tc. vs. 70,75% w grupie kontrolnej, ns). Podobnie częstość zmutowanego allelela 677T była podobna i wynosiła w podgrupie RM<13 tc. 33,00%, w podgrupie RM 13-22 tc. wynosiła 31,25% oraz w grupie kontrolnej 29,25% (ns) (tab. 37).

Dla polimorfizmu 1298A>C genu *MTHFR* odnotowano następujący rozkład genotypów: w podgrupie RM<13 tc. 1298AA : 1298AC : 1298CC = 40,59 : 47,20 : 12,21%, w

podgrupie RM 13-22 tc. $1298AA : 1298AC : 1298CC = 51,79 : 35,71 : 12,50\%$, natomiast w grupie kontrolnej $1298AA : 1298AC : 1298CC = 44,75 : 43,00 : 12,25\%$. Nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych pomiędzy badanymi podgrupami z RM oraz grupą kontrolną zdrowych kobiet. Częstość alleli polimorfizmu $1298A>C$ *MTHFR* przedstawiała się następująco: w podgrupie RM<13 tc. $1298A : 1298C = 64,19 : 35,81\%$, w podgrupie RM 13-22 tc. $1298A : 1298C = 69,64 : 30,36\%$ oraz w grupie kontrolnej $1298A : 1298C = 66,25 : 33,75\%$. Również w tym wypadku obserwowane różnice nie były statystycznie istotne (tab. 38).

Ciekawe obserwacje odnotowano w przypadku analizy polimorfizmu $1793G>A$ genu *MTHFR*. Odnotowano tutaj statystycznie istotnie wyższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego 1793GA w podgrupie RM<13 tc. w stosunku do grupy kontrolnej (12,21 vs. 7,75% w grupie kontrolnej, WR=1,66, p=0,03) oraz genotypów zawierających zmutowany allel 1793A ($1793GA + 1793AA$) (12,54 vs. 8,00%, WR=1,65, p=0,03). Również częstość zmutowanego allela 1793A była statystycznie istotnie wyższa w podgrupie RM<13 tc. w porównaniu do grupy kontrolnej (6,44 vs. 4,13%, WR=1,60, p=0,03). Natomiast częstości występowania poszczególnych genotypów oraz alleli polimorfizmu $1793G>A$ *MTHFR* w podgrupach RM 13-22 tc. oraz w grupie kontrolnej były porównywalne i nie różniły się statystycznie istotnie (tab. 39).

Tabela 33. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1691G>A* genu czynnika V krzepnięcia w podgrupach kobiet z poronieniami wczesnymi i późnymi w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>Grupa badana RM</i> <i>(n=359)</i>								<i>Grupa kontrolna</i> <i>(n=400)</i>	
	<i>RM <13 tc.</i> <i>(n=303)</i>				<i>RM 13-22 tc.</i> <i>(n=56)</i>				<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>		
<i>1691GG</i>	280 (92,41)	92,55	0,71	0,17	53 (94,64)	94,72	1,03	0,63	378 (94,50)	94,33
<i>1691GA</i>	23 (7,59)	7,30	1,48	0,13	3 (5,36)	5,21	1,02	0,58	21 (5,25)	5,59
<i>1691AA</i>	0 (0,00)	0,15	—	—	0 (0,00)	0,07	—	—	1 (0,25)	0,08
<i>Suma</i>	303 (100,00)	100,00			56 (100,00)	100,00			400 (100,00)	100,00
<i>Allele</i>										
<i>1691G</i>	583 (96,20)	—	0,75	0,21	109 (97,32)	—	1,08	0,60	777 (97,12)	—
<i>1691A</i>	23 (3,80)	—	1,33	0,21	3 (2,68)	—	0,93	0,60	23 (2,88)	—
<i>Suma</i>	606 (100,00)	—			112 (100,00)	—			800 (100,00)	—

podgrupy porównywano do grupy kontrolnej, *p* – test dokładny Fishera jednostronny

Tabela 34. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1328T>C* (*M385T*) genu czynnika V krzepnięcia w podgrupach kobiet z poronieniami wczesnymi i późnymi w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

<i>FV</i> <i>1328T>C</i> <i>(M385T)</i>	<i>Grupa badana RM</i> <i>(n=359)</i>								<i>Grupa kontrolna</i> <i>(n=400)</i>	
	<i>RM <13 tc.</i> <i>(n=303)</i>				<i>RM 13-22 tc.</i> <i>(n=56)</i>				<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>		
<i>1328TT</i>	226 (74,59)	74,77	0,90	0,31	46 (82,14)	81,32	1,41	0,22	306 (76,50)	76,78
<i>1328TC</i>	72 (23,76)	23,40	1,09	0,35	9 (16,07)	17,71	0,67	0,19	89 (22,25)	21,69
<i>1328CC</i>	5 (1,65)	1,83	1,33	0,45	1 (1,79)	0,97	1,44	0,54	5 (1,25)	1,53
<i>Suma</i>	303 (100,00)	100,00			56 (100,00)	100,00			400 (100,00)	100,00
<i>Allele</i>										
<i>1328T</i>	524 (86,47)	—	0,90	0,29	101 (90,18)	—	1,30	0,27	701 (87,62)	—
<i>1328C</i>	82 (13,53)	—	1,11	0,29	11 (9,82)	—	0,77	0,27	99 (12,38)	—
<i>Suma</i>	606 (100,00)	—			112 (100,00)	—			800 (100,00)	—

podgrupy porównywano do grupy kontrolnej, p – test dokładny Fishera jednostronny

Tabela 35. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 20210G>A genu czynnika II krzepnięcia w podgrupach kobiet z poronieniami wczesnymi i późnymi w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

<i>FII</i> 20210G>A	<i>Grupa badana RM</i> (<i>n</i> =359)								<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i> =400)	
	<i>RM <13 tc.</i> (<i>n</i> =303)				<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n</i> =56)				<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>		
20210GG	294 (97,03)	97,05	0,50	0,14	53 (94,64)	94,72	0,27	0,09	394 (98,50)	98,51
20210GA	9 (2,97)	2,93	2,01	0,14	3 (5,36)	5,21	3,72	0,09	6 (1,50)	1,49
20210AA	0 (0,00)	0,02	—	—	0 (0,00)	0,07	—	—	0 (0,00)	0,00
<i>Suma</i>	303 (100,00)	100,00			56 (100,00)				400 (100,0)	100,00
<i>Allele</i>										
20210G	597 (98,51)	—	0,50	0,14	109 (97,32)	—	0,27	0,09	794 (99,25)	—
20210A	9 (1,49)	—	1,99	0,14	3 (2,68)	—	3,72	0,09	6 (0,75)	—
<i>Suma</i>	606 (100,00)	—			112 (100,00)	—			800 (100,00)	—

podgrupy porównywano do grupy kontrolnej, *p* – test dokładny Fishera jednostronny

Tabela 36. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *R353Q (10916G>A)* genu czynnika *VII* krzepnięcia w podgrupach kobiet z poronieniami wczesnymi i późnymi w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

<i>FVII</i> <i>R353Q</i> <i>(11496G>A)</i>	<i>Grupa badana RM</i> <i>(n=359)</i>								<i>Grupa kontrolna</i> <i>(n=400)</i>	
	<i>RM <13 tc.</i> <i>(n=303)</i>				<i>RM 13-22 tc.</i> <i>(n=56)</i>				<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>		
<i>11496GG</i>	234 (77,23)	78,23	1,10	0,33	49 (87,50)	86,22	2,27	0,03	302 (75,50)	75,69
<i>11496GA</i>	68 (22,44)	20,43	0,97	0,47	6 (10,71)	13,27	0,40	0,02	92 (23,00)	22,62
<i>11496AA</i>	1 (0,33)	1,34	0,22	0,12	1 (1,79)	0,51	1,19	0,60	6 (1,50)	1,69
<i>Suma</i>	303 (100,00)	100,00			56 (100,00)	100,00			400 (100,00)	100,00
<i>Allele</i>										
<i>11496G</i>	536 (88,45)	—	1,14	0,23	104 (92,86)	—	1,94	0,05	696 (87,00)	—
<i>11496A</i>	70 (11,55)	—	0,87	0,23	8 (7,14)	—	0,51	0,05	104 (13,00)	—
<i>Suma</i>	606 (100,00)	—			112 (100,00)	—			800 (100,00)	—

podgrupy porównywano do grupy kontrolnej, p – test dokładny Fishera jednostronny

Tabela 37. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* w podgrupach kobiet z poronieniami wczesnymi i późnymi w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> 677C>T	<i>Grupa badana RM</i> (<i>n</i> =359)								<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i> =400)	
	<i>RM <13 tc.</i> (<i>n</i> =303)				<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n</i> =56)				<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>		
677CC	139 (45,88)	44,89	0,84	0,14	26 (46,43)	47,26	0,86	0,35	201 (50,25)	50,05
677CT	128 (42,24)	44,22	1,05	0,40	25 (44,64)	42,97	1,16	0,35	164 (41,00)	41,39
677TT	36 (11,88)	10,89	1,41	0,11	5 (8,93)	9,77	1,02	0,56	35 (8,75)	8,56
Suma	303 (100,00)	100,00			56 (100,00)	100,00			400 (100,00)	100,00
Allele										
677C	406 (67,00)	—	0,84	0,07	77 (68,75)	—	0,91	0,37	566 (70,75)	—
677T	200 (33,00)	—	1,19	0,07	35 (31,25)	—	1,10	0,37	234 (29,25)	—
Suma	606 (100,00)	—			112 (100,00)	—			800 (100,00)	—

podgrupy porównywano do grupy kontrolnej, *p* – test dokładny Fishera jednostronny

Tabela 38. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *I298A>C* genu *MTHFR* w podgrupach kobiet z poronieniami wczesnymi i późnymi w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> <i>I298A>C</i>	<i>Grupa badana RM</i> (<i>n=359</i>)								<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=400</i>)	
	<i>RM <13 tc.</i> (<i>n=303</i>)				<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n=56</i>)				<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>		
<i>I298AA</i>	123 (40,59)	41,21	0,84	0,15	29 (51,79)	48,50	1,33	0,20	179 (44,75)	43,89
<i>I298AC</i>	143 (47,20)	45,97	1,18	0,15	20 (35,71)	42,28	0,74	0,19	172 (43,00)	44,72
<i>I298CC</i>	37 (12,21)	12,82	0,99	0,54	7 (12,50)	9,22	1,02	0,55	49 (12,25)	11,39
<i>Suma</i>	303 (100,00)	100,00			56 (100,00)	100,00			400 (100,00)	100,00
<i>Allele</i>										
<i>I298A</i>	389 (64,19)	—	0,91	0,23	78 (69,64)	—	1,17	0,27	530 (66,25)	—
<i>I298C</i>	217 (35,81)	—	1,10	0,23	34 (30,36)	—	0,86	0,27	270 (33,75)	—
<i>Suma</i>	606 (100,00)	—			112 (100,00)	—			800 (100,00)	—

podgrupy porównywano do grupy kontrolnej, *p* – test dokładny Fishera jednostronny

Tabela 39. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 1793G>A genu MTHFR w podgrupach kobiet z poronieniami wczesnymi i późnymi w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> 1793G>A	<i>Grupa badana RM</i> (n=359)								<i>Grupa kontrolna</i> (n=400)	
	<i>RM <13 tc.</i> (n=303)				<i>RM 13-22 tc.</i> (n=56)				<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>		
<i>1793GG</i>	265 (87,46)	87,54	0,61	0,03	50 (89,29)	89,57	0,72	0,32	368 (92,00)	91,92
<i>1793GA</i>	37 (12,21)	12,04	1,66	0,03	6 (10,71)	10,14	1,43	0,29	31 (7,75)	7,91
<i>1793AA</i>	1 (0,33)	0,42	1,32	0,68	0 (0,00)	0,29	—	—	1 (0,25)	0,17
<i>Suma</i>	303 (100,00)	100,00			56 (100,00)	100,00			400 (100,00)	100,00
<i>Allele</i>										
<i>1793G</i>	567 (93,56)	—	0,63	0,03	106 (94,64)	—	0,76	0,34	767 (95,87)	—
<i>1793A</i>	39 (6,44)	—	1,60	0,03	6 (5,36)	—	1,32	0,34	33 (4,13)	—
<i>Suma</i>	606 (100,00)	—			112 (100,00)	—			800 (100,00)	—

podgrupy porównywano do grupy kontrolnej, p – test dokładny Fishera jednostronny

WSPÓŁWYSTĘPOWANIE GENOTYPÓW ANALIZOWANYCH W PRACY POLIMORFIZMÓW

W pracy analizowano również współwystępowanie poszczególnych genotypów wszystkich badanych polimorfizmów genów czynnika II, V, VII krzepnięcia oraz trzech polimorfizmów genu MTHFR. Wszystkie podgrupy porównywano do całej grupy kontrolnej zdrowych kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym.

Analizując polimorfizmy *1691G>A* oraz *1328T>C* (*M385T*) genu czynnika V krzepnięcia zaobserwowano wyższą frekwencją współwystępowania genotypów *1691GA* / *1328TT* w całej grupie RM (6,41 vs. 4,50%, WR=1,45, p=0,16) w grupie IUFD (8,20 vs. 4,50%, WR=1,90, p=0,17, ns) oraz w grupie poronień wczesnych RM<13 tc. (6,60 vs. 4,50%, WR=1,50, p=0,15) w porównaniu do grupy kontrolnej (tab. 40).

Tabela 40. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu *1691G>A* oraz polimorfizmu *1328T>C* (*M385T*) genu czynnika V krzepnięcia.

		<i>FV 1691G>A</i>			<i>Suma</i>	
		<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>		
<i>RM</i> (<i>n</i> =359)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	249 (69,36)	23 (6,41)*	0 (0,00)	272 (75,77)
		<i>TC</i>	78 (21,73)	3 (0,84)	0 (0,00)	81 (22,56)
		<i>CC</i>	6 (1,67)	0 (0,00)	0 (0,00)	6 (1,67)
		<i>Suma</i>	333 (92,76)	26 (7,24)	0 (0,00)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> (<i>n</i> =61)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	44 (72,13)	5 (8,20)**	0 (0,00)	49 (80,33)
		<i>TC</i>	10 (16,39)	1 (1,64)	0 (0,00)	11 (18,03)
		<i>CC</i>	1 (1,64)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,64)
		<i>Suma</i>	55 (90,16)	6 (9,84)	0 (0,00)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> (<i>n</i> =282)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	196 (69,50)	18 (6,38)	0 (0,00)	214 (75,89)
		<i>TC</i>	61 (21,63)	2 (0,71)	0 (0,00)	63 (22,34)
		<i>CC</i>	5 (1,77)	0 (0,00)	0 (0,00)	5 (1,77)
		<i>Suma</i>	262 (92,91)	20 (7,09)	0 (0,00)	282 (100,00)
<i>≥3 RM</i> (<i>n</i> =77)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	53 (68,83)	5 (6,49)	0 (0,00)	58 (75,32)
		<i>TC</i>	17 (22,08)	1 (1,30)	0 (0,00)	18 (23,38)
		<i>CC</i>	1 (1,30)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,30)
		<i>Suma</i>	71 (92,21)	6 (7,79)	0 (0,00)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n</i> =56)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	43 (76,79)	3 (5,36)	0 (0,00)	46 (82,14)
		<i>TC</i>	9 (16,07)	0 (0,00)	0 (0,00)	9 (16,07)
		<i>CC</i>	1 (1,79)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,79)
		<i>Suma</i>	53 (94,64)	3 (5,36)	0 (0,00)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> (<i>n</i> =303)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	206 (67,99)	20 (6,60)***	0 (0,00)	226 (74,59)
		<i>TC</i>	69 (22,77)	3 (0,99)	0 (0,00)	72 (23,76)
		<i>CC</i>	5 (1,65)	0 (0,00)	0 (0,00)	5 (1,65)
		<i>Suma</i>	280 (92,41)	23 (7,59)	0 (0,00)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i> =400)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	287 (71,75)	18 (4,50)	1 (0,25)	306 (76,50)
		<i>TC</i>	86 (21,50)	3 (0,75)	0 (0,00)	89 (22,25)
		<i>CC</i>	5 (1,25)	0 (0,00)	0 (0,00)	5 (1,25)
		<i>Suma</i>	378 (94,5)	21 (5,25)	1 (0,25)	400 (100,00)

*WR=1,45, p=0,16, **WR=1,90, p=0,17, ***WR=1,50, p=0,15

Ważną obserwacją w zakresie współwystępowania polimorfizmu *1691G>A* czynnika V krzepnięcia oraz polimorfizmu *20210G>A* genu czynnika II krzepnięcia było odnotowanie wyższej częstości współwystępowania genotypów *1691GG / 20201GA* w całej grupie RM w porównaniu do grupy kontrolnej (3,06% w całej grupie RM vs. 1,50% w grupie kontrolnej, WR=2,07, p=0,11, ns). Odnotowano również wyższą częstość współwystępowania genotypów *1691GA / 20210GG* w grupie IUFD w porównaniu do kontroli (9,84 vs. 5,25%, WR=1,96, p=0,13) (tab. 38). Inna interesującą obserwacją było odnotowanie wyższej częstości współwystępowania genotypów *1691GG / 20210GG* w grupie kontrolnej w porównaniu do całej grupy RM (93,00 vs. 89,69%, WR=0,66, p=0,07) oraz podgrupy 2 RM (93,00 vs. 89,72%, WR=0,67, p=0,08) (tab. 41).

Tabela 41. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 1691G>A czynnika V krzepnięcia oraz polimorfizmu 20210G>A genu czynnika II krzepnięcia.

			<i>FV 1691G>A</i>			<i>Suma</i>
			<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	
<i>RM</i> (<i>n=359</i>)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	322 (89,69)***	25 (6,96)	0 (0,00)	347 (96,66)
		<i>GA</i>	11 (3,06)*	1 (0,28)	0 (0,00)	12 (3,34)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	333 (92,76)	26 (7,24)	0 (0,00)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> (<i>n=61</i>)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	54 (88,52)	6 (9,84)**	0 (0,00)	60 (98,36)
		<i>GA</i>	1 (1,64)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,64)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	55 (90,16)	6 (9,84)	0 (0,00)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> (<i>n=282</i>)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	253 (89,72)*4	19 (6,74)	0 (0,00)	272 (96,45)
		<i>GA</i>	9 (3,19)	1 (0,35)	0 (0,00)	10 (3,55)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	262 (92,91)	20 (7,09)	0 (0,00)	282 (100,00)
<i>≥3 RM</i> (<i>n=77</i>)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	69 (89,61)	6 (7,79)	0 (0,00)	75 (97,40)
		<i>GA</i>	2 (2,60)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (2,60)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	71 (92,21)	6 (7,79)	0 (0,00)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n=56</i>)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	50 (89,29)	3 (5,36)	0 (0,00)	53 (94,64)
		<i>GA</i>	3 (5,36)	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (5,36)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	53 (94,64)	3 (5,36)	0 (0,00)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> (<i>n=303</i>)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	272 (89,77)	22 (7,26)	0 (0,00)	294 (97,03)
		<i>GA</i>	8 (2,64)	1 (0,33)	0 (0,00)	9 (2,97)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	280 (92,41)	23 (7,59)	0 (0,00)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=400</i>)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	372 (93,00)	21 (5,25)	1 (0,25)	394 (98,50)
		<i>GA</i>	6 (1,50)	0 (0,00)	0 (0,00)	6 (1,50)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	378 (94,50)	21 (5,25)	1 (0,25)	400 (100,00)

*WR=2,07, p=0,11, **WR=1,96, p=0,13, ***WR=0,66, p=0,07, *4 WR=0,67, p=0,08

W zakresie współwystępowania polimorfizmu *1691G>A* czynnika V krzepnięcia oraz polimorfizmu *R353Q (11496G>A)* genu czynnika VII krzepnięcia obserwowano wyższą frekwencję współwystępowania genotypów *1691GG / 353RR (11496GG)* w podgrupie późnych poronień RM 13-22 tc. w porównaniu do kontroli (82,14 vs. 71,25%, WR=1,85, p=0,06). Interesującą obserwacją było również odnotowanie niższej częstości współwystępowania genotypów *1691GG / 353RQ (11496GA)* w podgrupie późnych poronień RM 13-22 tc. (10,71 vs. 21,75%, WR=0,43, p=0,03). Zaobserwowano również wyższą frekwencję współwystępowania genotypów czynnika V oraz VII krzepnięcia *1691GA / R353Q (11496GG)* w grupie kobiet z IUFD w porównaniu do grupy kontrolnej (9,84% w grupie IUFD vs. 4,00% w grupie kontrolnej, WR=2,61, p=0,06) (tab. 42).

Tabela 42. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu *1691G>A* czynnika V krzepnięcia oraz polimorfizmu *R353Q* (*11496G>A*) genu czynnika VII krzepnięcia.

		<i>FV 1691G>A</i>			<i>Suma</i>	
		<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>		
<i>RM</i> (<i>n=359</i>)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	261 (72,70)	22 (6,13)	0 (0,00)	283 (78,83)
		<i>GA</i>	70 (19,50)	4 (1,11)	0 (0,00)	74 (20,61)
		<i>AA</i>	2 (0,56)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,56)
		<i>Suma</i>	333 (92,76)	26 (7,24)	0 (0,00)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> (<i>n=61</i>)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	42 (68,85)	6 (9,84)***	0 (0,00)	48 (78,69)
		<i>GA</i>	12 (19,67)	0 (0,00)	0 (0,00)	12 (19,67)
		<i>AA</i>	1 (1,64)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,64)
		<i>Suma</i>	55 (90,16)	6 (9,84)	0 (0,00)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> (<i>n=282</i>)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	208 (73,76)	17 (6,03)	0 (0,00)	225 (79,79)
		<i>GA</i>	52 (18,44)	3 (1,06)	0 (0,00)	55 (19,5)
		<i>AA</i>	2 (0,71)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,71)
		<i>Suma</i>	262 (92,91)	20 (7,09)	0 (0,00)	282 (100,00)
≥ 3 <i>RM</i> (<i>n=77</i>)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	53 (68,83)	5 (6,49)	0 (0,00)	58 (75,32)
		<i>GA</i>	18 (23,38)	1 (1,3)	0 (0,00)	19 (24,68)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	71 (92,21)	6 (7,79)	0 (0,00)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n=56</i>)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	46 (82,14)*	3 (5,36)	0 (0,00)	49 (87,50)
		<i>GA</i>	6 (10,71)**	0 (0,00)	0 (0,00)	6 (10,71)
		<i>AA</i>	1 (1,79)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,79)
		<i>Suma</i>	53 (94,64)	3 (5,36)	0 (0,00)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> (<i>n=303</i>)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	215 (70,96)	19 (6,27)	0 (0,00)	234 (77,23)
		<i>GA</i>	64 (21,12)	4 (1,32)	0 (0,00)	68 (22,44)
		<i>AA</i>	1 (0,33)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,33)
		<i>Suma</i>	280 (92,41)	23 (7,59)	0 (0,00)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=400</i>)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	285 (71,25)	16 (4,00)	1 (0,25)	302 (75,50)
		<i>GA</i>	87 (21,75)	5 (1,25)	0 (0,00)	92 (23,00)
		<i>AA</i>	6 (1,50)	0 (0,00)	0 (0,00)	6 (1,50)
		<i>Suma</i>	378 (94,50)	21 (5,25)	1 (0,25)	400 (100,00)

*WR=1,85, p=0,06, **WR=0,43, p=0,03, ***WR=2,61, p=0,06

W zakresie współwystępowania polimorfizmu $1328T>C$ ($M385T$) czynnika V krzepnięcia oraz polimorfizmu $20210G>A$ genu czynnika II krzepnięcia zaobserwowano przewagę współwystępowania genotypów $1328TT / 20210GA$ w całej grupie RM (2,79 vs. 1,25%, $WR=2,26$, $p=0,10$), w podgrupie 2 RM (2,84 vs. 1,25%, $WR=2,31$, $p=0,11$) oraz w podgrupie późnych poronień RM 13-22 tc. (5,36 vs. 1,25%, $WR=4,47$, $p=0,06$) w porównaniu do grupy kontrolnej (tab. 43).

Tabela 43. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu $1328T>C$ ($M385T$) czynnika V krzepnięcia oraz polimorfizmu $20210G>A$ genu czynnika II krzepnięcia.

			<i>FV M385T</i>			<i>Suma</i>
			<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>CC</i>	
<i>RM</i> (<i>n=359</i>)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	262 (72,98)	79 (22,01)	6 (1,67)	347 (96,66)
		<i>GA</i>	10 (2,79)*	2 (0,56)	0 (0,00)	12 (3,34)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	272 (75,77)	81 (22,56)	6 (1,67)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> (<i>n=61</i>)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	48 (78,69)	11 (18,03)	1 (1,64)	60 (98,36)
		<i>GA</i>	1 (1,64)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,64)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	49 (80,33)	11 (18,03)	1 (1,64)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> (<i>n=282</i>)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	206 (73,05)	61 (21,63)	5 (1,77)	272 (96,45)
		<i>GA</i>	8 (2,84)**	2 (0,71)	0 (0,00)	10 (3,55)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	214 (75,89)	63 (22,34)	5 (1,77)	282 (100,00)
<i>≥3 RM</i> (<i>n=77</i>)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	56 (72,73)	18 (23,38)	1 (1,3)	75 (97,40)
		<i>GA</i>	2 (2,60)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (2,60)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	58 (75,32)	18 (23,38)	1 (1,3)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n=56</i>)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	43 (76,79)	9 (16,07)	1 (1,79)	53 (94,64)
		<i>GA</i>	3 (5,36)***	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (5,36)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	46 (82,14)	9 (16,07)	1 (1,79)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> (<i>n=303</i>)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	219 (72,28)	70 (23,10)	5 (1,65)	294 (97,03)
		<i>GA</i>	7 (2,31)	2 (0,66)	0 (0,00)	9 (2,97)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	226 (74,59)	72 (23,76)	5 (1,65)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=400</i>)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	301 (75,25)	88 (22,00)	5 (1,25)	394 (98,50)
		<i>GA</i>	5 (1,25)	1 (0,25)	0 (0,00)	6 (1,50)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	306 (76,50)	89 (22,25)	5 (1,25)	400 (100,00)

* $WR=2,26$, $p=0,10$, ** $WR=2,31$, $p=0,11$, *** $WR=4,47$, $p=0,06$

W zakresie współwystępowania polimorfizmu $1328T>C$ ($M385T$) czynnika V krzepnięcia oraz polimorfizmu $R353Q$ ($11496G>A$) genu czynnika VII krzepnięcia nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy badanymi podgrupami kobiet z RPL oraz grupą kontrolną (tab. 44).

Tabela 44. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu $1328T>C$ ($M385T$) czynnika V krzepnięcia oraz polimorfizmu $R353Q$ ($11496G>A$) genu czynnika VII krzepnięcia.

		<i>FV M385T</i>			<i>Suma</i>	
		<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>CC</i>		
<i>RM</i> <i>(n=359)</i>	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	221 (61,56)	57 (15,88)	5 (1,39)	283 (78,83)
		<i>GA</i>	50 (13,93)	23 (6,41)	1 (0,28)	74 (20,61)
		<i>AA</i>	1 (0,28)	1 (0,28)	0 (0,00)	2 (0,56)
		<i>Suma</i>	272 (75,77)	81 (22,56)	6 (1,67)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> <i>(n=61)</i>	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	40 (65,57)	7 (11,48)	1 (1,64)	48 (78,69)
		<i>GA</i>	8 (13,11)	4 (6,56)	0 (0,00)	12 (19,67)
		<i>AA</i>	1 (1,64)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,64)
		<i>Suma</i>	49 (80,33)	11 (18,03)	1 (1,64)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> <i>(n=282)</i>	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	175 (62,06)	46 (16,31)	4 (1,42)	225 (79,79)
		<i>GA</i>	38 (13,48)	16 (5,67)	1 (0,35)	55 (19,5)
		<i>AA</i>	1 (0,35)	1 (0,35)	0 (0,00)	2 (0,71)
		<i>Suma</i>	214 (75,89)	63 (22,34)	5 (1,77)	282 (100,00)
≥ 3 RM <i>(n=77)</i>	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	46 (59,74)	11 (14,29)	1 (1,30)	58 (75,32)
		<i>GA</i>	12 (15,58)	7 (9,09)	0 (0,00)	19 (24,68)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	58 (75,32)	18 (23,38)	1 (1,3)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> <i>(n=56)</i>	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	39 (69,64)	9 (16,07)	1 (1,79)	49 (87,50)
		<i>GA</i>	6 (10,71)	0 (0,00)	0 (0,00)	6 (10,71)
		<i>AA</i>	1 (1,79)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,79)
		<i>Suma</i>	46 (82,14)	9 (16,07)	1 (1,79)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> <i>(n=303)</i>	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	182 (60,07)	48 (15,84)	4 (1,32)	234 (77,23)
		<i>GA</i>	44 (14,52)	23 (7,59)	1 (0,33)	68 (22,44)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	1 (0,33)	0 (0,00)	1 (0,33)
		<i>Suma</i>	226 (74,59)	72 (23,76)	5 (1,65)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> <i>(n=400)</i>	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	232 (58,00)	67 (16,75)	3 (0,75)	302 (75,50)
		<i>GA</i>	69 (17,25)	21 (5,25)	2 (0,50)	92 (23,00)
		<i>AA</i>	5 (1,25)	1 (0,25)	0 (0,00)	6 (1,50)
		<i>Suma</i>	306 (76,50)	89 (22,25)	5 (1,25)	400 (100,00)

Analiza polimorfizmu *20210G>A* czynnika II krzepnięcia oraz *R353Q (11496G>A)* genu czynnika VII krzepnięcia pokazała wyższą częstość współwystępowania genotypów *20210GA / 353RR (11496GG)* w grupie późnych poronień RM 13-22 tc. w porównaniu do grupy kontrolnej (3,57 vs. 1,50%, WR=2,43, p=0,25, ns). Interesującym było odnotowanie przewagi współwystępowania genotypów *20210GG / 353RR (11496GG)* w grupie późnych poronień RM 13-22 tc. (83,93 vs.74,00%, WR=1,83, p=0,07, ns). Przewagę istotnie statystyczną odnotowano natomiast przy współwystępowaniu genotypów *20210GG / 353RQ (11496GA)* w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy późnych poronień RM 13-22 tc. (23,00 w grupie kontrolnej vs. 8,93%, WR=3,04, p=0,009) (tab. 45).

Tabela 45. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 20210G>A czynnika II krzepnięcia oraz polimorfizmu R353Q (11496G>A) genu czynnika VII krzepnięcia.

		<i>FII 20210G>A</i>				<i>Suma</i>
		<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>		
<i>RM</i> (<i>n=359</i>)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	274 (76,32)	9 (2,51)	0 (0,00)	83 (78,83)
		<i>GA</i>	71 (19,78)	3 (0,84)	0 (0,00)	74 (20,61)
		<i>AA</i>	2 (0,56)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,56)
		<i>Suma</i>	347 (96,66)	12 (3,34)	0 (0,00)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> (<i>n=61</i>)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	48 (78,69)	0 (0,00)	0 (0,00)	48 (78,69)
		<i>GA</i>	11 (18,03)	1 (1,64)	0 (0,00)	12 (19,67)
		<i>AA</i>	1 (1,64)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,64)
		<i>Suma</i>	60 (98,36)	1 (1,64)	0 (0,00)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> (<i>n=282</i>)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	217 (76,95)	8 (2,84)	0 (0,00)	225 (79,79)
		<i>GA</i>	53 (18,79)	2 (0,71)	0 (0,00)	55 (19,5)
		<i>AA</i>	2 (0,71)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,71)
		<i>Suma</i>	272 (96,45)	10 (3,55)	0 (0,00)	282 (100,00)
<i>≥3 RM</i> (<i>n=77</i>)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	57 (74,03)	1 (1,30)	0 (0,00)	58 (75,32)
		<i>GA</i>	18 (23,38)	1 (1,30)	0 (0,00)	19 (24,68)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	75 (97,40)	2 (2,60)	0 (0,00)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n=56</i>)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	47 (83,93)**	2 (3,57)*	0 (0,00)	49 (87,50)
		<i>GA</i>	5 (8,93)***	1 (1,79)	0 (0,00)	6 (10,71)
		<i>AA</i>	1 (1,79)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,79)
		<i>Suma</i>	53 (94,64)	3 (5,36)	0 (0,00)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> (<i>n=303</i>)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	227 (74,92)	7 (2,31)	0 (0,00)	234 (77,23)
		<i>GA</i>	66 (21,78)	2 (0,66)	0 (0,00)	68 (22,44)
		<i>AA</i>	1 (0,33)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,33)
		<i>Suma</i>	294 (97,03)	9 (2,97)	0 (0,00)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=400</i>)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	296 (74,00)	6 (1,50)	0 (0,00)	302 (75,50)
		<i>GA</i>	92 (23,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	92 (23,00)
		<i>AA</i>	6 (1,50)	0 (0,00)	0 (0,00)	6 (1,50)
		<i>Suma</i>	394 (98,50)	6 (1,50)	0 (0,00)	400 (100,00)

*WR=2,43, p=0,25, ns, **WR=1,83, p=0,07, ns, ***WR=3,04, p=0,009

Analiza polimorfizmu *677C>T* oraz *1298A>C* genu *MTHFR* pokazała wyższą częstość współwystępowania genotypów *677CT / 1298AC* w całej grupie RM w porównaniu do kontroli (23,12 vs. 18,25%, WR=1,35, p=0,06) oraz wyższą częstość współwystępowania genotypów *677CT / 1298AC* w grupie kobiet z 2 RM w porównaniu do kontroli (23,41 vs. 18,25%, WR=1,37, p=0,06) (tab. 46).

Następnie obserwacje pokazały istotną przewagę współwystępowania genotypów *677CC / 1298AC* w podgrupie IUFD (36,07 vs. 23,76%, WR=1,71, p=0,05) w porównaniu do grupy kontrolnej. Odnotowano również niższą częstość współwystępowania genotypów *677CC / 1298AC* w podgrupie >3 RM (16,88 vs. 24,75%, WR=0,61, p=0,09) oraz w podgrupie późnych poronień 13-22 tc. (14,29 vs. 24,75%, WR=0,51, p=0,05) w porównaniu do kontroli. W podgrupie wczesnych poronień < 13 tc. odnotowano natomiast przewagę współwystępowania genotypów *677CT / 1298AC* (23,43 vs. 18,25%, WR=1,37, p=0,06) (tab. 46).

W grupie kontrolnej natomiast częściej współwystępowały genotypy *677CT / 1298 AC* niż w podgrupie IUFD (18,25 vs. 8,20%, WR=0,30, p=0,005) (tab. 46).

Tabela 46. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 677C>T oraz polimorfizmu 1298A>C genu MTHFR.

			<i>MTHFR 677C>T</i>			<i>Suma</i>
			<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	
<i>RM</i> (<i>n=359</i>)	<i>MTHFR</i> <i>1298A>C</i>	<i>AA</i>	41 (11,42)	70 (19,5)	41 (11,42)	152 (42,34)
		<i>AC</i>	80 (22,28)	83 (23,12)*	0 (0,00)	163 (45,4)
		<i>CC</i>	44 (12,26)	0 (0,00)	0 (0,00)	44 (12,26)
		<i>Suma</i>	165 (45,96)	153 (42,62)	41 (11,42)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> (<i>n=61</i>)	<i>MTHFR</i> <i>1298A>C</i>	<i>AA</i>	5 (8,2)	5 (8,20)***	8 (13,11)	18 (29,51)
		<i>AC</i>	22 (36,07)*4	12 (19,67)	0 (0,00)	34 (55,74)
		<i>CC</i>	9 (14,75)	0 (0,00)	0 (0,00)	9 (14,75)
		<i>Suma</i>	36 (59,02)	17 (27,87)	8 (13,11)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> (<i>n=282</i>)	<i>MTHFR</i> <i>1298A>C</i>	<i>AA</i>	32 (11,35)	53 (18,79)	32 (11,35)	117 (41,49)
		<i>AC</i>	67 (23,76)	66 (23,41)**	0 (0,00)	133 (47,16)
		<i>CC</i>	32 (11,35)	0 (0,00)	0 (0,00)	32 (11,35)
		<i>Suma</i>	131 (46,45)	119 (42,20)	32 (11,35)	282 (100,00)
<i>≥3 RM</i> (<i>n=77</i>)	<i>MTHFR</i> <i>1298A>C</i>	<i>AA</i>	9 (11,69)	17 (22,08)	9 (11,69)	35 (45,45)
		<i>AC</i>	13 (16,88)*5	17 (22,08)	0 (0,00)	30 (38,96)
		<i>CC</i>	12 (15,58)	0 (0,00)	0 (0,00)	12 (15,58)
		<i>Suma</i>	34 (44,16)	34 (44,16)	9 (11,69)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n=56</i>)	<i>MTHFR</i> <i>1298A>C</i>	<i>AA</i>	11 (19,64)	13 (23,21)	5 (8,93)	29 (51,79)
		<i>AC</i>	8 (14,29)*6	12 (21,43)	0 (0,00)	20 (35,71)
		<i>CC</i>	7 (12,50)	0 (0,00)	0 (0,00)	7 (12,50)
		<i>Suma</i>	26 (46,43)	25 (44,64)	5 (8,93)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> (<i>n=303</i>)	<i>MTHFR</i> <i>1298A>C</i>	<i>AA</i>	30 (9,90)	57 (18,81)	36 (11,88)	123 (40,59)
		<i>AC</i>	72 (23,76)	71 (23,43)*7	0 (0,00)	143 (47,19)
		<i>CC</i>	37 (12,21)	0 (0,00)	0 (0,00)	37 (12,21)
		<i>Suma</i>	139 (45,87)	128 (42,24)	36 (11,88)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=400</i>)	<i>MTHFR</i> <i>1298A>C</i>	<i>AA</i>	53 (13,25)	91 (22,75)	35 (8,75)	179 (44,75)
		<i>AC</i>	99 (24,75)	73 (18,25)	0 (0,00)	172 (43,00)
		<i>CC</i>	49 (12,25)	0 (0,00)	0 (0,00)	49 (12,25)
		<i>Suma</i>	201 (50,25)	164 (41,00)	35 (8,75)	400 (100,00)

*WR=1,35, p=0,06, **WR=1,37, p=0,06, ***WR=0,30, p=0,005

*4 WR=1,71, p=0,05, *5 WR=0,61, p=0,09, *6 WR=0,51, p=0,05, *7 WR=1,37, p=0,06

Przy analizie polimorfizmów *677C>T* oraz *1793G>A* genu *MTHFR* odnotowano statystycznie istotnie wyższą częstość współwystępowania genotypów *677CT / 1793GA* w całej grupie RM (6,41 vs. 3,00%, WR=2,21, p=0,02), w grupie kobiet z 2 RM (7,09 vs. 3,00%, WR=2,47, p=0,01) oraz w grupie wczesnych poronień RM < 13 tc. (6,93 vs. 3,00, WR=2,41, p=0,01) (tab. 47).

Analiza współwystępowania tych dwóch polimorfizmów pokazała również wyższą częstość współwystępowania genotypów *677CC / 1793GG* w grupie kontrolnej w porównaniu do całej grupy poronień RM (45,25% w grupie kontrolnej vs. 40,11% w grupie RM, WR=0,81, p=0,09) oraz istotnie statystycznie wyższą częstość współwystępowania genotypów *677CC / 1793GA* w podgrupie IUFD (11,48 vs. 4,75%, WR=2,60, p=0,04) (tab. 47).

Tabela 47. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 677C>T oraz polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR*.

			<i>MTHFR</i> 677C>T			<i>Suma</i>
			<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	
<i>RM</i> (<i>n</i> =359)	<i>MTHFR</i> <i>1793G>A</i>	<i>GG</i>	144 (40,11)*4	130 (36,21)	41 (11,42)	315 (87,74)
		<i>GA</i>	20 (5,57)	23 (6,41)*	0 (0,00)	43 (11,98)
		<i>AA</i>	1 (0,28)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,28)
		<i>Suma</i>	165 (45,96)	153 (42,62)	41 (11,42)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> (<i>n</i> =61)	<i>MTHFR</i> <i>1793G>A</i>	<i>GG</i>	29 (47,54)	17 (27,87)	8 (13,11)	54 (88,52)
		<i>GA</i>	7 (11,48)*5	0 (0,00)	0 (0,00)	7 (11,48)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	36 (59,02)	17 (27,87)	8 (13,11)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> (<i>n</i> =282)	<i>MTHFR</i> <i>1793G>A</i>	<i>GG</i>	114 (40,43)	99 (35,11)	32 (11,35)	245 (86,88)
		<i>GA</i>	16 (5,67)	20 (7,09)**	0 (0,00)	36 (12,77)
		<i>AA</i>	1 (0,35)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,35)
		<i>Suma</i>	131 (46,45)	119 (42,2)	32 (11,35)	282 (100,00)
≥ 3 <i>RM</i> (<i>n</i> =77)	<i>MTHFR</i> <i>1793G>A</i>	<i>GG</i>	30 (38,96)	31 (40,26)	9 (11,69)	70 (90,91)
		<i>GA</i>	4 (5,19)	3 (3,9)	0 (0,00)	7 (9,09)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	34 (44,16)	34 (44,16)	9 (11,69)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n</i> =56)	<i>MTHFR</i> <i>1793G>A</i>	<i>GG</i>	22 (39,29)	23 (41,07)	5 (8,93)	50 (89,29)
		<i>GA</i>	4 (7,14)	2 (3,57)	0 (0,00)	6 (10,71)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	26 (46,43)	25 (44,64)	5 (8,93)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> (<i>n</i> =303)	<i>MTHFR</i> <i>1793G>A</i>	<i>GG</i>	122 (40,26)	107 (35,31)	36 (11,88)	265 (87,46)
		<i>GA</i>	16 (5,28)	21 (6,93)***	0 (0,00)	37 (12,21)
		<i>AA</i>	1 (0,33)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,33)
		<i>Suma</i>	139 (45,87)	128 (42,24)	36 (11,88)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i> =400)	<i>MTHFR</i> <i>1793G>A</i>	<i>GG</i>	181 (45,25)	152 (38,00)	35 (8,75)	368 (92,00)
		<i>GA</i>	19 (4,75)	12 (3,00)	0 (0,00)	31 (7,75)
		<i>AA</i>	1 (0,25)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,25)
		<i>Suma</i>	201 (50,25)	164 (41,00)	35 (8,75)	400 (100,00)

*WR=2,21, p=0,02, **WR=2,47, p=0,01, ***WR=2,41, p=0,01

*4 WR=0,81, p=0,09, *5 WR=2,60, p=0,04

W trakcie analizy polimorfizmów *677C>T* genu *MTHFR* oraz *1691G>A* genu czynnika V krzepnięcia odnotowano statystycznie istotnie wyższą częstość współwystępowania genotypów *677CT / 1691GG* w grupie kontrolnej w porównaniu do podgrupy kobiet z IUFD (39,25 vs. 24,59%, WR=1,98, p=0,02). Zaobserwowano również wyższą częstość współwystępowania genotypów *677TT / 1691GA* w podgrupie IUFD (3,28 vs. 0,25%, WR=13,53, p=0,05) w porównaniu do kontroli (tab. 48).

Tabela 48. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* oraz polimorfizmu 1691G>A genu czynnika V krzepnięcia.

			<i>MTHFR 677C>T</i>			<i>Suma</i>
			<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	
<i>RM</i> (<i>n</i> =359)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	150 (41,78)	144 (40,11)	39 (10,86)	333 (92,76)
		<i>GA</i>	15 (4,18)	9 (2,51)	2 (0,56)	26 (7,24)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	165 (45,96)	153 (42,62)	41 (11,42)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> (<i>n</i> =61)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	34 (55,74)	15 (24,59)*	6 (9,84)	55 (90,16)
		<i>GA</i>	2 (3,28)	2 (3,28)	2 (3,28)**	6 (9,84)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	36 (59,02)	17 (27,87)	8 (13,11)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> (<i>n</i> =282)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	119 (42,2)	112 (39,72)	31 (10,99)	262 (92,91)
		<i>GA</i>	12 (4,26)	7 (2,48)	1 (0,35)	20 (7,09)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	131 (46,45)	119 (42,20)	32 (11,35)	282 (100,00)
<i>≥3 RM</i> (<i>n</i> =77)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	31 (40,26)	32 (41,56)	8 (10,39)	71 (92,21)
		<i>GA</i>	3 (3,90)	2 (2,60)	1 (1,30)	6 (7,79)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	34 (44,16)	34 (44,16)	9 (11,69)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n</i> =56)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	24 (42,86)	24 (42,86)	5 (8,93)	53 (94,64)
		<i>GA</i>	2 (3,57)	1 (1,79)	0 (0,00)	3 (5,36)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	26 (46,43)	25 (44,64)	5 (8,93)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> (<i>n</i> =303)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	126 (41,58)	120 (39,6)	34 (11,22)	280 (92,41)
		<i>GA</i>	13 (4,29)	8 (2,64)	2 (0,66)	23 (7,59)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	139 (45,87)	128 (42,24)	36 (11,88)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i> =400)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	187 (46,75)	157 (39,25)	34 (8,50)	378 (94,50)
		<i>GA</i>	13 (3,25)	7 (1,75)	1 (0,25)	21 (5,25)
		<i>AA</i>	1 (0,25)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,25)
		<i>Suma</i>	201 (50,25)	164 (41,00)	35 (8,75)	400 (100,00)

*WR=1,98, p=0,02, **WR=13,53, p=0,05

Analiza polimorfizmów 677C>T genu *MTHFR* oraz 1328T>C (*M385T*) genu czynnika V krzepnięcia pokazała istotnie statystycznie wyższą częstość współwystępowania genotypów 677CC / 1328TT w podgrupie IUFD (50,82 vs. 38,25%, WR=1,67, p=0,04) w porównaniu do grupy kontrolnej zdrowych kobiet (tab. 49).

Tabela 49. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* oraz polimorfizmu 1328T>C (*M385T*) genu czynnika V krzepnięcia.

			<i>MTHFR 677C>T</i>			<i>Suma</i>
			<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	
<i>RM</i> (<i>n</i> =359)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	125 (34,82)	117 (32,59)	30 (8,36)	272 (75,77)
		<i>TC</i>	37 (10,31)	35 (9,75)	9 (2,51)	81 (22,56)
		<i>CC</i>	3 (0,84)	1 (0,28)	2 (0,56)	6 (1,67)
		<i>Suma</i>	165 (45,96)	153 (42,62)	41 (11,42)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> (<i>n</i> =61)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	31 (50,82)*	12 (19,67)	6 (9,84)	49 (80,33)
		<i>TC</i>	4 (6,56)	5 (8,2)	2 (3,28)	11 (18,03)
		<i>CC</i>	1 (1,64)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,64)
		<i>Suma</i>	36 (59,02)	17 (27,87)	8 (13,11)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> (<i>n</i> =282)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	101 (35,82)	90 (31,91)	23 (8,16)	214 (75,89)
		<i>TC</i>	28 (9,93)	28 (9,93)	7 (2,48)	63 (22,34)
		<i>CC</i>	2 (0,71)	1 (0,35)	2 (0,71)	5 (1,77)
		<i>Suma</i>	131 (46,45)	119 (42,2)	32 (11,35)	282 (100,00)
<i>≥3 RM</i> (<i>n</i> =77)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	24 (31,17)	27 (35,06)	7 (9,09)	58 (75,32)
		<i>TC</i>	9 (11,69)	7 (9,09)	2 (2,60)	18 (23,38)
		<i>CC</i>	1 (1,30)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,30)
		<i>Suma</i>	34 (44,16)	34 (44,16)	9 (11,69)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n</i> =56)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	21 (37,50)	22 (39,29)	3 (5,36)	46 (82,14)
		<i>TC</i>	4 (7,14)	3 (5,36)	2 (3,57)	9 (16,07)
		<i>CC</i>	1 (1,79)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,79)
		<i>Suma</i>	26 (46,43)	25 (44,64)	5 (8,93)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> (<i>n</i> =303)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	104 (34,32)	95 (31,35)	27 (8,91)	226 (74,59)
		<i>TC</i>	33 (10,89)	32 (10,56)	7 (2,31)	72 (23,76)
		<i>CC</i>	2 (0,66)	1 (0,33)	2 (0,66)	5 (1,65)
		<i>Suma</i>	139 (45,87)	128 (42,24)	36 (11,88)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i> =400)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	153 (38,25)	125 (31,25)	28 (7,00)	306 (76,50)
		<i>TC</i>	46 (11,50)	36 (9,00)	7 (1,75)	89 (22,25)
		<i>CC</i>	2 (0,50)	3 (0,75)	0 (0,00)	5 (1,25)
		<i>Suma</i>	201 (50,25)	164 (41,00)	35 (8,75)	400 (100,00)

*WR=1,67, p=0,04

Analiza polimorfizmów *677C>T* genu *MTHFR* oraz *20210G>A* genu czynnika II krzepnięcia pokazała statystycznie istotnie niższą częstość współwystępowania genotypów *677CT / 20210GG* w podgrupie IUFD w porównaniu do grupy kontrolnej (27,87 vs. 40,50%, WR=0,56, p=0,04) (tab. 50).

Ponadto analiza ta pokazała przewagę genotypów *677CC / 20210GG* w grupie kontrolnej w porównaniu do całej grupy RM (49,50 vs. 43,45%, WR=0,78, p=0,06). Ciekawą obserwacją była odnotowanie przewagi współwystępowania genotypów *677CC / 20210GA* w całej grupie RM (2,51%), w podgrupie 2 RM (2,48%) oraz w podgrupie późnych poronień RM 13-22 tc. (5,36%) w porównaniu do grupy kontrolnej (0,75%) (tab. 50).

Tabela 50. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* oraz polimorfizmu 20210G>A genu czynnika II krzepnięcia.

		<i>MTHFR 677C>T</i>			<i>Suma</i>	
		<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>		
<i>RM</i> (<i>n</i> =359)	<i>FII</i> 20210G>A	<i>GG</i>	156 (43,45)**	150 (41,78)	41 (11,42)	346 (96,66)
		<i>GA</i>	9 (2,51)***	3 (0,84)	0 (0,00)	12 (3,34)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	165 (45,96)	153 (42,62)	41 (11,42)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> (<i>n</i> =61)	<i>FII</i> 20210G>A	<i>GG</i>	35 (57,38)	17 (27,87)*	8 (13,11)	60 (98,36)
		<i>GA</i>	1 (1,64)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,64)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	36 (59,02)	17 (27,87)	8 (13,11)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> (<i>n</i> =282)	<i>FII</i> 20210G>A	<i>GG</i>	124 (43,97)	116 (41,13)	32 (11,35)	272 (96,45)
		<i>GA</i>	7 (2,48)*4	3 (1,06)	0 (0,00)	10 (3,55)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	131 (46,45)	119 (42,20)	32 (11,35)	282 (100,00)
≥ 3 <i>RM</i> (<i>n</i> =77)	<i>FII</i> 20210G>A	<i>GG</i>	32 (41,56)	34 (44,16)	9 (11,69)	75 (97,40)
		<i>GA</i>	2 (2,60)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (2,60)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	34 (44,16)	34 (44,16)	9 (11,69)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n</i> =56)	<i>FII</i> 20210G>A	<i>GG</i>	23 (41,07)	25 (44,64)	5 (8,93)	53 (94,64)
		<i>GA</i>	3 (5,36)*5	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (5,36)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	26 (46,43)	25 (44,64)	5 (8,93)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> (<i>n</i> =303)	<i>FII</i> 20210G>A	<i>GG</i>	133 (43,89)	125 (41,25)	36 (11,88)	294 (97,03)
		<i>GA</i>	6 (1,98)	3 (0,99)	0 (0,00)	9 (2,97)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	139 (45,87)	128 (42,24)	36 (11,88)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i> =400)	<i>FII</i> 20210G>A	<i>GG</i>	198 (49,50)	162 (40,50)*	34 (8,50)	394 (98,50)
		<i>GA</i>	3 (0,75)	2 (0,50)	1 (0,25)	6 (1,50)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	201 (50,25)	164 (41,00)	35 (8,75)	400 (100,00)

*WR=0,56, p=0,04, **WR=0,78, p=0,06, ***WR=3,40, p=0,05,

*4 WR=3,37, p=0,06, *5 WR=7,49, p=0,03

Analizując polimorfizmy 677C>T genu *MTHFR* oraz R353Q (11496G>A) genu czynnika VII krzepnięcia odnotowano statystycznie istotną przewagę współwystępowania genotypów 677CT / 353RR (11496GG) (42,86 vs. 30,00%, WR=1,75, p=0,04) oraz statystycznie istotnie niższą częstość współwystępowania genotypów 677CT / 353RQ (11496GA) (1,79 vs. 10,75% w grupie kontrolnej, WR=6,62, p=0,02) w podgrupie późnych poronień (RM 13-22 tc. w porównaniu do grupy kontrolnej (tab. 51).

Tabela 51. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* oraz polimorfizmu R353Q (11496G>A) genu czynnika VII krzepnięcia.

			<i>MTHFR 677C>T</i>			<i>Suma</i>
			<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	
RM (n=359)	FVII R353Q	GG	128 (35,65)	123 (34,26)	32 (8,91)	283 (78,83)
		GA	35 (9,75)	30 (8,36)	9 (2,51)	74 (20,61)
		AA	2 (0,56)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,56)
		Suma	165 (45,96)	153 (42,62)	41 (11,42)	359 (100,00)
IUFD (n=61)	FVII R353Q	GG	28 (45,9)	13 (21,31)	7 (11,48)	48 (78,69)
		GA	7 (11,48)	4 (6,56)	1 (1,64)	12 (19,67)
		AA	1 (1,64)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,64)
		Suma	36 (59,02)	17 (27,87)	8 (13,11)	61 (100,00)
2 RM (n=282)	FVII R353Q	GG	103 (36,52)	97 (34,40)	25 (8,87)	225 (79,79)
		GA	26 (9,22)	22 (7,80)	7 (2,48)	55 (19,50)
		AA	2 (0,71)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,71)
		Suma	131 (46,45)	119 (42,20)	32 (11,35)	282 (100,00)
≥3 RM (n=77)	FVII R353Q	GG	25 (32,47)	26 (33,77)	7 (9,09)	58 (75,32)
		GA	9 (11,69)	8 (10,39)	2 (2,60)	19 (24,68)
		AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		Suma	34 (44,16)	34 (44,16)	9 (11,69)	77 (100,00)
RM 13-22 tc. (n=56)	FVII R353Q	GG	21 (37,50)	24 (42,86)*	4 (7,14)	49 (87,50)
		GA	4 (7,14)	1 (1,79)**	1 (1,79)	6 (10,71)
		AA	1 (1,79)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,79)
		Suma	26 (46,43)	25 (44,64)	5 (8,93)	56 (100,00)
RM <13 tc. (n=303)	FVII R353Q	GG	107 (35,31)	99 (32,67)	28 (9,24)	234 (77,23)
		GA	31 (10,23)	29 (9,57)	8 (2,64)	68 (22,44)
		AA	1 (0,33)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,33)
		Suma	139 (45,87)	128 (42,24)	36 (11,88)	303 (100,00)
Grupa kontrolna (n=400)	FVII R353Q	GG	151 (37,75)	120 (30,00)	31 (7,75)	302 (75,50)
		GA	45 (11,25)	43 (10,75)	4 (1,00)	92 (23,00)
		AA	5 (1,25)	1 (0,25)	0 (0,00)	6 (1,50)
		Suma	201 (50,25)	164 (41,00)	35 (8,75)	400 (100,00)

*WR=1,75, p=0,04, **WR=6,62, p=0,02

Analiza polimorfizmów *1298A>C* oraz *1793G>A* genu *MTHFR* pokazała statystycznie istotnie wyższą częstość współwystępowania genotypów *1298AC / 1793GA* w całej grupie RM (8,36 vs. 5,50%, WR=1,567, p=0,0791), w podgrupie 2 RM (9,57 vs. 5,50%, WR=1,82, p=0,03), oraz w podgrupie wczesnych poronień RM <13 tc. (8,58 vs. 5,50%, WR=1,61, p=0,07) w porównaniu do grupy kontrolnej (tab. 52).

Inną ciekawą obserwacją było odnotowanie istotnie statystycznej przewagi występowania genotypów *1298AA / 1793GG* w grupie kontrolnej w porównaniu do podgrupy IUFD (44,75 vs. 29,51%, WR=0,52, p=0,02). Obserwowano ponadto przewagę współwystępowania genotypów *1298CC / 1793GA* w podgrupie IUFD (6,56 vs. 2,25%, WR=3,06, p=0,08) w porównaniu do kontroli (tab. 52).

Tabela 52. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 1298A>C oraz polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR*.

			<i>MTHFR</i> 1298A>C			<i>Suma</i>
			<i>AA</i>	<i>AC</i>	<i>CC</i>	
<i>RM</i> (<i>n</i>=359)	<i>MTHFR</i> <i>1793G>A</i>	<i>GG</i>	150 (41,78)	133 (37,05)	32 (8,91)	315 (87,74)
		<i>GA</i>	2 (0,56)	30 (8,36)***	11 (3,06)	43 (11,98)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,28)	1 (0,28)
		<i>Suma</i>	152 (42,34)	163 (45,40)	44 (12,26)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> (<i>n</i>=61)	<i>MTHFR</i> <i>1793G>A</i>	<i>GG</i>	18 (29,51)**	31 (50,82)	5 (8,20)	54 (88,52)
		<i>GA</i>	0 (0,00)	3 (4,92)	4 (6,56)*4	7 (11,48)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	18 (29,51)	34 (55,74)	9 (14,75)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> (<i>n</i>=282)	<i>MTHFR</i> <i>1793G>A</i>	<i>GG</i>	116 (41,13)	106 (37,59)	23 (8,16)	245 (86,88)
		<i>GA</i>	1 (0,35)	27 (9,57)*	8 (2,84)	36 (12,77)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,35)	1 (0,35)
		<i>Suma</i>	117 (41,49)	133 (47,16)	32 (11,35)	282 (100,00)
≥ 3 <i>RM</i> (<i>n</i>=77)	<i>MTHFR</i> <i>1793G>A</i>	<i>GG</i>	34 (44,16)	27 (35,06)	9 (11,69)	70 (90,91)
		<i>GA</i>	1 (1,30)	3 (3,90)	3 (3,90)	7 (9,09)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	35 (45,45)	30 (38,96)	12 (15,58)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n</i>=56)	<i>MTHFR</i> <i>1793G>A</i>	<i>GG</i>	28 (50,00)	16 (28,57)	6 (10,71)	50 (89,29)
		<i>GA</i>	1 (1,79)	4 (7,14)	1 (1,79)	6 (10,71)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	29 (51,79)	20 (35,71)	7 (12,5)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> (<i>n</i>=303)	<i>MTHFR</i> <i>1793G>A</i>	<i>GG</i>	122 (40,26)	117 (38,61)	26 (8,58)	265 (87,46)
		<i>GA</i>	1 (0,33)	26 (8,58)*5	10 (3,30)	37 (12,21)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,33)	1 (0,33)
		<i>Suma</i>	123 (40,59)	143 (47,19)	37 (12,21)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i>=400)	<i>MTHFR</i> <i>1793G>A</i>	<i>GG</i>	179 (44,75)	150 (37,50)	39 (9,75)	368 (92,00)
		<i>GA</i>	0 (0,00)	22 (5,50)	9 (2,25)	31 (7,75)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,25)	1 (0,25)
		<i>Suma</i>	179 (44,75)	172 (43)	49 (12,25)	400 (100,00)

*WR=1,82, p=0,03, **WR=0,52, p=0,02, ***WR=1,567, p=0,08,

*4 WR=3,06, p=0,08, *5 WR=1,61, p=0,07

Analiza polimorfizmów 1298A>C genu *MTHFR* oraz 1691G>A genu czynnika V krzepnięcia pokazała statystycznie istotną przewagę współwystępowania genotypów niezmutowanych 1298AA / 1691GG w grupie kontrolnej kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym w porównaniu do podgrupy IUFD (42,25 vs. 26,23%, WR=0,49, p=0,01) (tab. 53).

Tabela 53. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 1298A>C genu *MTHFR* oraz polimorfizmu 1691G>A genu czynnika V krzepnięcia.

			<i>MTHFR 1298A>C</i>			<i>Suma</i>
			<i>AA</i>	<i>AC</i>	<i>CC</i>	
<i>RM</i> (<i>n=359</i>)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	144 (40,11)	150 (41,78)	39 (10,86)	333 (92,76)
		<i>GA</i>	8 (2,23)	13 (3,62)	5 (1,39)	26 (7,24)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	152 (42,34)	163 (45,40)	44 (12,26)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> (<i>n=61</i>)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	16 (26,23)*	31 (50,82)	8 (13,11)	55 (90,16)
		<i>GA</i>	2 (3,28)	3 (4,92)	1 (1,64)	6 (9,84)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	18 (29,51)	34 (55,74)	9 (14,75)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> (<i>n=282</i>)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	112 (39,72)	122 (43,26)	28 (9,93)	262 (92,91)
		<i>GA</i>	5 (1,77)	11 (3,90)	4 (1,42)	20 (7,09)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	117 (41,49)	133 (47,16)	32 (11,35)	282 (100,00)
<i>≥3 RM</i> (<i>n=77</i>)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	32 (41,56)	28 (36,36)	11 (14,29)	71 (92,21)
		<i>GA</i>	3 (3,90)	2 (2,60)	1 (1,30)	6 (7,79)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	35 (45,45)	30 (38,96)	12 (15,58)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n=56</i>)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	29 (51,79)	19 (33,93)	5 (8,93)	53 (94,64)
		<i>GA</i>	0 (0,00)	1 (1,79)	2 (3,57)	3 (5,36)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	29 (51,79)	20 (35,71)	7 (12,50)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> (<i>n=303</i>)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	115 (37,95)	131 (43,23)	34 (11,22)	280 (92,41)
		<i>GA</i>	8 (2,64)	12 (3,96)	3 (0,99)	23 (7,59)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	123 (40,59)	143 (47,19)	37 (12,21)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=400</i>)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	169 (42,25)	164 (41,00)	45 (11,25)	378 (94,50)
		<i>GA</i>	9 (2,25)	8 (2,00)	4 (1,00)	21 (5,25)
		<i>AA</i>	1 (0,25)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,25)
		<i>Suma</i>	179 (44,75)	172 (43)	49 (12,25)	400 (100,00)

*WR=0,49, p=0,01

W trakcie analizy polimorfizmów $1298A>C$ genu *MTHFR* oraz $1328T>C$ (*M385T*) genu czynnika V krzepnięcia odnotowano statystycznie istotną przewagę współwystępowania genotypów niezmutowanych $1298AA / 1328TT$ w grupie kontrolnej w porównaniu do podgrupy IUFD (35,00 vs. 21,31%, WR=0,50, p=0,02) (tab. 54).

Tabela 54. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu $1298A>C$ genu *MTHFR* oraz polimorfizmu $1328T>C$ (*M385T*) genu czynnika V krzepnięcia.

			<i>MTHFR 1298A>C</i>			<i>Suma</i>
			<i>AA</i>	<i>AC</i>	<i>CC</i>	
<i>RM</i> <i>(n=359)</i>	<i>FV M385T</i>	<i>TT</i>	111 (30,92)	126 (35,1)	35 (9,75)	272 (75,77)
		<i>TC</i>	38 (10,58)	34 (9,47)	9 (2,51)	81 (22,56)
		<i>CC</i>	3 (0,84)	3 (0,84)	0 (0,00)	6 (1,67)
		<i>Suma</i>	152 (42,34)	163 (45,4)	44 (12,26)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> <i>(n=61)</i>	<i>FV M385T</i>	<i>TT</i>	13 (21,31)*	28 (45,90)	8 (13,11)	49 (80,33)
		<i>TC</i>	5 (8,20)	5 (8,20)	1 (1,64)	11 (18,03)
		<i>CC</i>	0 (0,00)	1 (1,64)	0 (0,00)	1 (1,64)
		<i>Suma</i>	18 (29,51)	34 (55,74)	9 (14,75)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> <i>(n=282)</i>	<i>FV M385T</i>	<i>TT</i>	86 (30,50)	102 (36,17)	26 (9,22)	214 (75,89)
		<i>TC</i>	28 (9,93)	29 (10,28)	6 (2,13)	63 (22,34)
		<i>CC</i>	3 (1,06)	2 (0,71)	0 (0,00)	5 (1,77)
		<i>Suma</i>	117 (41,49)	133 (47,16)	32 (11,35)	282 (100,00)
≥ 3 <i>RM</i> <i>(n=77)</i>	<i>FV M385T</i>	<i>TT</i>	25 (32,47)	24 (31,17)	9 (11,69)	58 (75,32)
		<i>TC</i>	10 (12,99)	5 (6,49)	3 (3,9)	18 (23,38)
		<i>CC</i>	0 (0,00)	1 (1,3)	0 (0,00)	1 (1,3)
		<i>Suma</i>	35 (45,45)	30 (38,96)	12 (15,58)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> <i>(n=56)</i>	<i>FV M385T</i>	<i>TT</i>	24 (42,86)	16 (28,57)	6 (10,71)	46 (82,14)
		<i>TC</i>	5 (8,93)	3 (5,36)	1 (1,79)	9 (16,07)
		<i>CC</i>	0 (0,00)	1 (1,79)	0 (0,00)	1 (1,79)
		<i>Suma</i>	29 (51,79)	20 (35,71)	7 (12,50)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> <i>(n=303)</i>	<i>FV M385T</i>	<i>TT</i>	87 (28,71)	110 (36,30)	29 (9,57)	226 (74,59)
		<i>TC</i>	33 (10,89)	31 (10,23)	8 (2,64)	72 (23,76)
		<i>CC</i>	3 (0,99)	2 (0,66)	0 (0,00)	5 (1,65)
		<i>Suma</i>	123 (40,59)	143 (47,19)	37 (12,21)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> <i>(n=400)</i>	<i>FV M385T</i>	<i>TT</i>	140 (35,00)	128 (32,00)	38 (9,50)	306 (76,50)
		<i>TC</i>	37 (9,25)	41 (10,25)	11 (2,75)	89 (22,25)
		<i>CC</i>	2 (0,50)	3 (0,75)	0 (0,00)	5 (1,25)
		<i>Suma</i>	179 (44,75)	172 (43,00)	49 (12,25)	400 (100,00)

*WR=0,50, p=0,02

W przypadku analizy polimorfizmów 1298A>C genu *MTHFR* oraz 20210G>A genu czynnika II krzepnięcia obserwowano statystycznie istotnie wyższą częstość współwystępowania genotypów 1298AC / 20210GG w podgrupie IUFD w porównaniu do grupy kobiet zdrowych (55,74 vs. 42,25%, WR=1,72, p=0,03) (tab. 55).

Tabela 55. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 1298A>C genu *MTHFR* oraz polimorfizmu 20210G>A genu czynnika II krzepnięcia.

			<i>MTHFR</i> 1298A>C			<i>Suma</i>
			<i>AA</i>	<i>AC</i>	<i>CC</i>	
<i>RM</i> (n=359)	<i>FII</i> 20210G>A	<i>GG</i>	148 (41,23)	157 (43,73)	42 (11,70)	347 (96,66)
		<i>GA</i>	4 (1,11)	6 (1,67)	2 (0,56)	12 (3,34)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	152 (42,34)	163 (45,40)	44 (12,26)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> (n=61)	<i>FII</i> 20210G>A	<i>GG</i>	18 (29,51)	34 (55,74)*	8 (13,11)	60 (98,36)
		<i>GA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,64)	1 (1,64)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	18 (29,51)	34 (55,74)	9 (14,75)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> (n=282)	<i>FII</i> 20210G>A	<i>GG</i>	113 (40,07)	129 (45,74)	30 (10,64)	272 (96,45)
		<i>GA</i>	4 (1,42)	4 (1,42)	2 (0,71)	10 (3,55)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	117 (41,49)	133 (47,16)	32 (11,35)	282 (100,00)
≥ 3 <i>RM</i> (n=77)	<i>FII</i> 20210G>A	<i>GG</i>	35 (45,45)	28 (36,36)	12 (15,58)	75 (97,40)
		<i>GA</i>	0 (0,00)	2 (2,6)	0 (0,00)	2 (2,60)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	35 (45,45)	30 (38,96)	12 (15,58)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> (n=56)	<i>FII</i> 20210G>A	<i>GG</i>	29 (51,79)	18 (32,14)	6 (10,71)	53 (94,64)
		<i>GA</i>	0 (0,00)	2 (3,57)	1 (1,79)	3 (5,36)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	29 (51,79)	20 (35,71)	7 (12,50)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> (n=303)	<i>FII</i> 20210G>A	<i>GG</i>	119 (39,27)	139 (45,87)	36 (11,88)	294 (97,03)
		<i>GA</i>	4 (1,32)	4 (1,32)	1 (0,33)	9 (2,97)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	123 (40,59)	143 (47,19)	37 (12,21)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> (n=400)	<i>FII</i> 20210G>A	<i>GG</i>	177 (44,25)	169 (42,25)	48 (12,00)	394 (98,50)
		<i>GA</i>	2 (0,50)	3 (0,75)	1 (0,25)	6 (1,50)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	179 (44,75)	172 (43,00)	49 (12,25)	400 (100,00)

*WR=1,72, p=0,03

Analiza polimorfizmów *1298A>C* genu *MTHFR* oraz *R353Q (11496G>A)* genu czynnika VII krzepnięcia wskazała na niższą częstość współwystępowania genotypów *1298AC / 353RQ (11496GA)* w podgrupie późnych poronień 13-22 tc. (1,79 vs. 9,75%, WR=0,17, p=0,03) oraz niższą częstość współwystępowania genotypów *1298AA / 353RQ (11496GA)* w podgrupie IUFD (3,28 vs. 9,50%, WR=0,32, p=0,08) w porównaniu do grupy kontrolnej. Ciekawą obserwacją było również odnotowanie wyższej częstości koegzystencji genotypów *1298AC / 353RR (11496GG)* w podgrupie IUFD w porównaniu do kontroli (42,62 vs. 32,25%, WR=1,56, p=0,07) (tab. 56).

Tabela 56. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 1298A>C genu *MTHFR* oraz polimorfizmu R353Q (11496G>A) genu czynnika VII krzepnięcia.

		<i>MTHFR 1298A>C</i>			<i>Suma</i>	
		<i>AA</i>	<i>AC</i>	<i>CC</i>		
<i>RM</i> (<i>n</i> =359)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	123 (34,26)	125 (34,82)	35 (9,75)	283 (78,83)
		<i>GA</i>	29 (8,08)	37 (10,31)	8 (2,23)	74 (20,61)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	1 (0,28)	1 (0,28)	2 (0,56)
		<i>Suma</i>	152 (42,34)	163 (45,40)	44 (12,26)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> (<i>n</i> =61)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	16 (26,23)	26 (42,62)***	6 (9,84)	48 (78,69)
		<i>GA</i>	2 (3,28)**	8 (13,11)	2 (3,28)	12 (19,67)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,64)	1 (1,64)
		<i>Suma</i>	18 (29,51)	34 (55,74)	9 (14,75)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> (<i>n</i> =282)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	98 (34,75)	102 (36,17)	25 (8,87)	225 (79,79)
		<i>GA</i>	19 (6,74)	30 (10,64)	6 (2,13)	55 (19,5)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	1 (0,35)	1 (0,35)	2 (0,71)
		<i>Suma</i>	117 (41,49)	133 (47,16)	32 (11,35)	282 (100,00)
≥ 3 <i>RM</i> (<i>n</i> =77)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	25 (32,47)	23 (29,87)	10 (12,99)	58 (75,32)
		<i>GA</i>	10 (12,99)	7 (9,09)	2 (2,6)	19 (24,68)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	35 (45,45)	30 (38,96)	12 (15,58)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n</i> =56)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	25 (44,64)	18 (32,14)	6 (10,71)	49 (87,50)
		<i>GA</i>	4 (7,14)	1 (1,79)*	1 (1,79)	6 (10,71)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	1 (1,79)	0 (0,00)	1 (1,79)
		<i>Suma</i>	29 (51,79)	20 (35,71)	7 (12,50)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> (<i>n</i> =303)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	98 (32,34)	107 (35,31)	29 (9,57)	234 (77,23)
		<i>GA</i>	25 (8,25)	36 (11,88)	7 (2,31)	68 (22,44)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,33)	1 (0,33)
		<i>Suma</i>	123 (40,59)	143 (47,19)	37 (12,21)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i> =400)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	140 (35,00)	129 (32,25)	33 (8,25)	302 (75,50)
		<i>GA</i>	38 (9,50)	39 (9,75)	15 (3,75)	92 (23,00)
		<i>AA</i>	1 (0,25)	4 (1,00)	1 (0,25)	6 (1,50)
		<i>Suma</i>	179 (44,75)	172 (43,00)	49 (12,25)	400 (100,00)

*WR=0,17, p=0,03, **WR=0,32, p=0,08, ***WR=1,56, p=0,07

Analiza polimorfizmów *1793G>A* genu *MTHFR* oraz *1691G>A* genu czynnika V krzepnięcia wskazała na różnice statystycznie istotne we współwystępowaniu genotypów niezmutowanych *1793GG / 1691GG* pomiędzy grupą kontrolną (86,75%) a całą grupą RM (81,89%), podgrupami IUFD (78,69%), 2 RM (81,21%) i podgrupą RM <13 tc. (81,52%). Odnotowano również przewagę współwystępowania genotypów *1793GA / 1691GA* w podgrupach całej RM (1,39%), 2 RM (1,42%), RM <13 tc. (1,65%) w porównaniu do grupy kontrolnej (0,00%) (tab. 57).

Tabela 57. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR* oraz polimorfizmu 1691G>A genu czynnika V krzepnięcia.

			<i>MTHFR 1793G>A</i>			<i>Suma</i>
			<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	
<i>RM</i> (<i>n=359</i>)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	294 (81,89)*	38 (10,58)	1 (0,28)	333 (92,76)
		<i>GA</i>	21 (5,85)	5 (1,39)	0 (0,00)	26 (7,24)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	315 (0,00)	43 (11,98)	1 (0,28)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> (<i>n=61</i>)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	48 (78,69)**	7 (11,48)	0 (0,00)	55 (90,16)
		<i>GA</i>	6 (9,84)	0 (0,00)	0 (0,00)	6 (9,84)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	54 (88,52)	7 (11,48)	0 (0,00)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> (<i>n=282</i>)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	229 (81,21)***	32 (11,35)	1 (0,35)	262 (92,91)
		<i>GA</i>	16 (5,67)	4 (1,42)	0 (0,00)	20 (7,09)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	245 (86,88)	36 (12,77)	1 (0,35)	282 (100,00)
≥ 3 <i>RM</i> (<i>n=77</i>)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	65 (84,42)	6 (7,79)	0 (0,00)	71 (92,21)
		<i>GA</i>	5 (6,49)	1 (1,30)	0 (0,00)	6 (7,79)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	70 (90,91)	7 (9,09)	0 (0,00)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n=56</i>)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	47 (83,93)	6 (10,71)	0 (0,00)	53 (94,64)
		<i>GA</i>	3 (5,36)	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (5,36)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	50 (89,29)	6 (10,71)	0 (0,00)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> (<i>n=303</i>)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	247 (81,52)*4	32 (10,56)	1 (0,33)	280 (92,41)
		<i>GA</i>	18 (5,94)	5 (1,65)	0 (0,00)	23 (7,59)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	265 (87,46)	37 (12,21)	1 (0,33)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=400</i>)	<i>FV</i> <i>1691G>A</i>	<i>GG</i>	347 (86,75)	31 (7,75)	0 (0,00)	378 (94,50)
		<i>GA</i>	20 (5,00)	0 (0,00)	1 (0,25)	21 (5,25)
		<i>AA</i>	1 (0,25)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,25)
		<i>Suma</i>	368 (92,00)	31 (7,75)	1 (0,25)	400 (100,00)

*WR=0,69, p=0,04, **WR=0,56, p=0,07, ***WR=0,66, p=0,03, *4 WR=0,67, p=0,03

Również analiza polimorfizmów *1793G>A* genu *MTHFR* oraz *1328T>C* (*M385T*) genu czynnika V krzepnięcia pokazała statystycznie istotną przewagę we współwystępowaniu genotypów *1793GA / 1328TT* w całej grupie RM (9,75 vs. 5,25%, WR=1,95, p=0,01), w podgrupie 2 RM (10,99 vs. 5,25%, WR=2,22, p=0,005), w podgrupie RM <13 tc. (9,57 vs. 5,25%, WR=1,91, p=0,02). Odnotowano również przewagę koegzystencji genotypów *1793GG / 1328TT* w grupie kontrolnej w porównaniu do podgrupy RM <13 tc. (71,00 vs. 65,02%, WR=0,75, p=0,05) (tab. 58).

Tabela 58. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR* oraz polimorfizmu 1328T>C (*M385T*) genu czynnika V krzepnięcia.

			<i>MTHFR 1793G>A</i>			<i>Suma</i>
			<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	
<i>RM</i> (<i>n=359</i>)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	237 (66,02)	35 (9,75)*	0 (0,00)	272 (75,77)
		<i>TC</i>	72 (20,06)	8 (2,23)	1 (0,28)	81 (22,56)
		<i>CC</i>	6 (1,67)	0 (0,00)	0 (0,00)	6 (1,67)
		<i>Suma</i>	315 (87,74)	43 (11,98)	1 (0,28)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> (<i>n=61</i>)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	43 (70,49)	6 (9,84)	0 (0,00)	49 (80,33)
		<i>TC</i>	10 (16,39)	1 (1,64)	0 (0,00)	11 (18,03)
		<i>CC</i>	1 (1,64)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,64)
		<i>Suma</i>	54 (88,52)	7 (11,48)	0 (0,00)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> (<i>n=282</i>)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	183 (64,89)	31 (10,99)**	0 (0,00)	214 (75,89)
		<i>TC</i>	57 (20,21)	5 (1,77)	1 (0,35)	63 (22,34)
		<i>CC</i>	5 (1,77)	0 (0,00)	0 (0,00)	5 (1,77)
		<i>Suma</i>	245 (86,88)	36 (12,77)	1 (0,35)	282 (100,00)
<i>≥3 RM</i> (<i>n=77</i>)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	54 (70,13)	4 (5,19)	0 (0,00)	58 (75,32)
		<i>TC</i>	15 (19,48)	3 (3,90)	0 (0,00)	18 (23,38)
		<i>CC</i>	1 (1,30)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,30)
		<i>Suma</i>	70 (90,91)	7 (9,09)	0 (0,00)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n=56</i>)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	40 (71,43)	6 (10,71)	0 (0,00)	46 (82,14)
		<i>TC</i>	9 (16,07)	0 (0,00)	0 (0,00)	9 (16,07)
		<i>CC</i>	1 (1,79)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,79)
		<i>Suma</i>	50 (89,29)	6 (10,71)	0 (0,00)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> (<i>n=303</i>)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	197 (65,02)*4	29 (9,57)***	0 (0,00)	226 (74,59)
		<i>TC</i>	63 (20,79)	8 (2,64)	1 (0,33)	72 (23,76)
		<i>CC</i>	5 (1,65)	0 (0,00)	0 (0,00)	5 (1,65)
		<i>Suma</i>	265 (87,46)	37 (12,21)	1 (0,33)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=400</i>)	<i>FV</i> <i>M385T</i>	<i>TT</i>	284 (71,00)	21 (5,25)	1 (0,25)	306 (76,50)
		<i>TC</i>	80 (20,00)	9 (2,25)	0 (0,00)	89 (22,25)
		<i>CC</i>	4 (1,00)	1 (0,25)	0 (0,00)	5 (1,25)
		<i>Suma</i>	368 (92,00)	31 (7,75)	1 (0,25)	400 (100,00)

*WR=1,95, p=0,01, **WR=2,22, p=0,005, ***WR=1,91, p=0,02, *4 WR=0,75, p=0,05

Analiza polimorfizmów *1793G>A* genu *MTHFR* oraz polimorfizmu *20210G>A* genu czynnika II krzepnięcia pokazała wyższą częstość współwystępowania genotypów niezmutowanych *1793GG / 20210GG* w grupie kontrolnej zdrowych kobiet (90,50%) w porównaniu do całej grupy RM (84,96%), podgrupy 2 RM (84,04%), oraz podgrupy z wczesnymi poronieniami (84,49%) (tab. 59).

Obserwowano również różnicę statystycznie istotną we współwystępowaniu genotypów *1793GA / 20210GG* pomiędzy całą grupą poronień RM (11,42 vs. 7,75%, WR=1,53, p=0,0550), podgrupą 2 RM (12,06 vs. 7,75%, WR=1,63, p=0,0405), oraz podgrupą kobiet z wczesnymi poronieniami RM <13 tc. (12,21 vs. 7,75%, WR=1,65, p=0,0325) a grupą kontrolną. W podgrupie późnych poronień RM 13-22 tc. obserwowano przewagę współwystępowania genotypów heterozygotycznych *1793GA / 20210GA* (3,57 vs. 0,00%, p=0,01) w porównaniu do grupy kontrolnej (tab. 59).

Tabela 59. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR* oraz polimorfizmu 20210G>A genu czynnika II krzepnięcia.

			<i>MTHFR 1793G>A</i>			<i>Suma</i>
			<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	
<i>RM</i> (<i>n</i> =359)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	305 (84,96)*	41 (11,42)*4	1 (0,28)	347 (96,66)
		<i>GA</i>	10 (2,79)	2 (0,56)	0 (0,00)	12 (3,34)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	315 (87,74)	43 (11,98)	1 (0,28)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> (<i>n</i> =61)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	53 (86,89)	7 (11,48)	0 (0,00)	60 (98,36)
		<i>GA</i>	1 (1,64)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,64)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	54 (88,52)	7 (11,48)	0 (0,00)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> (<i>n</i> =282)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	237 (84,04)**	34 (12,06)*5	1 (0,35)	272 (96,45)
		<i>GA</i>	8 (2,84)	2 (0,71)	0 (0,00)	10 (3,55)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	245 (86,88)	36 (12,77)	1 (0,35)	282 (100,00)
≥ 3 <i>RM</i> (<i>n</i> =77)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	68 (88,31)	7 (9,09)	0 (0,00)	75 (97,40)
		<i>GA</i>	2 (2,60)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (2,60)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	70 (90,91)	7 (9,09)	0 (0,00)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n</i> =56)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	49 (87,50)	4 (7,14)	0 (0,00)	53 (94,64)
		<i>GA</i>	1 (1,79)	2 (3,57)*7	0 (0,00)	3 (5,36)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	50 (89,29)	6 (10,71)	0 (0,00)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> (<i>n</i> =303)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	256 (84,49)***	37 (12,21)*6	1 (0,33)	294 (97,03)
		<i>GA</i>	9 (2,97)	0 (0,00)	0 (0,00)	9 (2,97)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	265 (87,46)	37 (12,21)	1 (0,33)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i> =400)	<i>FII</i> <i>20210G>A</i>	<i>GG</i>	362 (90,50)	31 (7,75)	1 (0,25)	394 (98,50)
		<i>GA</i>	6 (1,50)	0 (0,00)	0 (0,00)	6 (1,50)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	368 (92,00)	31 (7,75)	1 (0,25)	400 (100,00)

*WR=0,59, p=0,0131, **WR=0,55, p=0,0081, ***WR=0,57, p=0,0109

*4 WR=1,53, p=0,0550, *5 WR=1,63, p=0,0405 *6 WR=1,65, p=0,0325, *7 p=0,01

Analiza polimorfizmów *1793G>A* genu *MTHFR* oraz *R353Q (11496G>A)* genu czynnika VII krzepnięcia pokazała przewagę współwystępowania genotypów *1793GA / 353RR (11496GG)* w całej grupie RM (10,03 vs. 6,50%, WR=1,60, p=0,05), statystycznie istotnie wyższą częstość współwystępowania tych genotypów w podgrupie kobiet z 2 RM (10,64 vs. 6,50%, WR=1,71, p=0,04) oraz w podgrupie wczesnych poronień <13 tc. (10,23 vs. 6,50%, WR=1,64, p=0,05) w porównaniu do kontroli. Z drugiej strony zaobserwowano statystycznie istotnie niższą częstość współwystępowania genotypów *1793GG / 353RQ (11496GA)* w podgrupie późnych poronień 13-22 tc. (8,93 vs. 21,75%, WR=0,35, p=0,01) (tab. 60).

W analizie obserwowano również przewagę współwystępowania genotypów *1793GG / 353RR (11496GG)* w podgrupie późnych poronien RM 13-22 tc. (78,57 vs. 68,75%, WR=1,67, p=0,09) (tab. 60).

Tabela 60. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR* oraz polimorfizmu R353Q (11496G>A) genu czynnika VII krzepnięcia.

		<i>MTHFR 1793G>A</i>			<i>Suma</i>	
		<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>		
<i>RM</i> (<i>n</i> =359)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	246 (68,52)	36 (10,03)*	1 (0,28)	283 (78,83)
		<i>GA</i>	67 (18,66)	7 (1,95)	0 (0,00)	74 (20,61)
		<i>AA</i>	2 (0,56)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,56)
		<i>Suma</i>	315 (87,74)	43 (11,98)	1 (0,28)	359 (100,00)
<i>IUFD</i> (<i>n</i> =61)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	43 (70,49)	5 (8,20)	0 (0,00)	48 (78,69)
		<i>GA</i>	11 (18,03)	1 (1,64)	0 (0,00)	12 (19,67)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	1 (1,64)	0 (0,00)	1 (1,64)
		<i>Suma</i>	54 (88,52)	7 (11,48)	0 (0,00)	61 (100,00)
<i>2 RM</i> (<i>n</i> =282)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	194 (68,79)	30 (10,64)**	1 (0,35)	225 (79,79)
		<i>GA</i>	49 (17,38)	6 (2,13)	0 (0,00)	55 (19,5)
		<i>AA</i>	2 (0,71)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,71)
		<i>Suma</i>	245 (86,88)	36 (12,77)	1 (0,35)	282 (100,00)
<i>≥3 RM</i> (<i>n</i> =77)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	52 (67,53)	6 (7,79)	0 (0,00)	58 (75,32)
		<i>GA</i>	18 (23,38)	1 (1,3)	0 (0,00)	19 (24,68)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>Suma</i>	70 (90,91)	7 (9,09)	0 (0,00)	77 (100,00)
<i>RM 13-22 tc.</i> (<i>n</i> =56)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	44 (78,57)*5	5 (8,93)	0 (0,00)	49 (87,50)
		<i>GA</i>	5 (8,93)*4	1 (1,79)	0 (0,00)	6 (10,71)
		<i>AA</i>	1 (1,79)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (1,79)
		<i>Suma</i>	50 (89,29)	6 (10,71)	0 (0,00)	56 (100,00)
<i>RM <13 tc.</i> (<i>n</i> =303)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	202 (66,67)	31 (10,23)***	1 (0,33)	234 (77,23)
		<i>GA</i>	62 (20,46)	6 (1,98)	0 (0,00)	68 (22,44)
		<i>AA</i>	1 (0,33)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,33)
		<i>Suma</i>	265 (87,46)	37 (12,21)	1 (0,33)	303 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i> =400)	<i>FVII</i> <i>R353Q</i>	<i>GG</i>	275 (68,75)	26 (6,50)	1 (0,25)	302 (75,50)
		<i>GA</i>	87 (21,75)	5 (1,25)	0 (0,00)	92 (23,00)
		<i>AA</i>	6 (1,50)	0 (0,00)	0 (0,00)	6 (1,50)
		<i>Suma</i>	368 (92,00)	31 (7,75)	1 (0,25)	400 (100,00)

*WR=1,60, p=0,05, **WR=1,71, p=0,04, ***WR=1,64, p=0,05

*4 WR=0,35, p=0,01, *5 WR=1,67, p=0,09

ANALIZA HAPLOTYPÓW GENU CZYNNIKA V KRZEPNIĘCIA *FV* ORAZ GENU *MTHFR*

W poprzednich rozdziałach analizowane były każde z polimorficznych loci oddzielnie. Ponieważ jednak geny leżące w jednym chromosomie są sprzężone ze sobą i dziedziczą się zwykle razem, w dalszej analizie dla trzech zbadanych polimorfizmów genu *MTHFR* (677C>T, 1298A>C i 1793G>A) oraz dwóch genu *FV* (1691G>A i 1328T>C) przeprowadzono analizę nierównowagi sprzężeń. Nierównowaga sprzężeń (LD ang. *linkage disequilibrium*), zachodzi kiedy genotypy w dwóch loci występują zależnie od siebie. Miarą nierównowagi sprzężeń czyli odchylenia od równowagi gametycznej jest współczynnik nierównowagi sprzężeń oznaczany jako D (ang. *deviation*) po raz pierwszy zaproponowany w 1960 roku przez Lewontin i Kojima. Nierównowaga sprzężeń określa czy położone w pobliskich loci polimorfizmy są ze sobą sprzężone (tworzą dziedziczony wspólnie haplotyp). W analizie statystycznej nierównowagi sprzężeń najczęściej opisywanymi parametrami są parametrami D' , r^2 oraz współczynnik LOD. Parametr D' jest ujednocnieniem wartości D zaproponowana po raz pierwszy przez Lewontina w 1964 roku. Może przyjmować on wartości od -1 do 1. Kiedy $|D'|=1$ mówimy o całkowitej nierównowadze sprzężeń i występuje tylko kiedy częstość występowania niektórych haplotypów równa się zero, natomiast $D'=0$ oznacza równowagę sprzężeń. Kolejnym parametrem jest współczynnik korelacji dwóch alleli w loci oznaczany jako r^2 . Zakres przyjmowanych przez niego wartości wynosi od 0 do 1. Wartość $r^2=1$ oznacza całkowitą nierównowagę sprzężeń i występuje gdy istnieją dokładnie dwa z czterech możliwych haplotypów. R^2 zależy silnie od częstości występowania alleli.

Trzecim często wykorzystywanym parametrem opisującym nierównowagę sprzężeń jest współczynnik LOD (ang. *logarithm of the likelihood odds ratio*), czyli logarytm dziesiętny stosunku prawdopodobieństwa dwu loci segregujących razem do prawdopodobieństwa, że takie sprzężenie nie zachodzi i jest on miarą ufności do wartości D' . Przyjmuje się, że jeżeli $LOD>2$ to istnieje dowód obecności sprzężenia. W tabelach xx i xx przedstawiono obliczone w programie Haploview wartości D' , LOD, r^2 badanych polimorfizmów genów *MTHFR* i *FV*.

ANALIZA HAPLOTYPÓW GENU CZYNNIKA V KRZEPNIĘCIA

Analizując asocjacje badanych wariantów genu czynnika V nie stwierdzono istotnego związku tych wariantów z niepowodzeniami położniczymi będącymi przedmiotem prezentowanej pracy. Allel C wariantu polimorficznego $1328T>C$ genu czynnika V występował w obu badanych grupach kobiet z podobną częstością (0,126% vs. 0,0124%, $p=0,8813$). Dla wariantu czynnika V typu Leiden (rs6025) zaobserwowano częstsze występowanie zmutowanego allele A w grupie badanej kobiet z poronieniami nawracającymi i IUFD (0,038% vs. 0,029 w grupie kontrolnej, $p=0,2934$). Wyniki przedstawiono w tabeli 61.

Tabela 61. Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu czynnika V krzepnięcia w obydwu grupach pacjentek.

	<i>Polimorfizm</i>	<i>Allele</i>	<i>n</i> <i>GB:GK</i>	<i>Częstość</i> <i>występowania</i> <i>(%)</i> <i>GB:GK</i>	<i>Chi</i> <i>kwadrat</i>	<i>P</i>
1	rs6033	C	106:734, 99:701	0.126, 0.124	0.022	0.8813
2	rs6025	A	32:808, 23:777	0.038, 0.029	1.104	0.2934

GB – grupa badana, GK – grupa kontrolna

Analizując dwa badane w pracy polimorfizmy genu *FV* wyznaczono obecność trzech najczęściej występujących haplotypów (*TG*, *CG*, *TA*) występujących pośród kobiet w badanych grupach. W kolumnie „haplotyp” litery oznaczają odpowiednio: pierwsza - allel polimorfizmu $1328T>C$, druga $1691G>A$. Analizując częstości występowania poszczególnych haplotypów w grupach kobiet z RM oraz IUFD porównywano je z grupą kontrolną stosując test Z dla dwóch niezależnych proporcji. Oznaczone haplotypy czynnika V krzepnięcia *TG* oraz *CG* występowały z podobną częstością we wszystkich badanych grupach (ns). Ciekawą obserwacją była fakt częstszego występowania haplotypu *TA* zawierającego niezmutowany allel $1328T$ oraz zmutowany allel $1691A$ w podgrupie IUFD (0,047) w porównaniu do pozostałych grup (0,036 w grupie RM, 0,029 w grupie kontrolnej, ns) (tab. 62).

Tabela 62. Częstość występowania poszczególnych haplotypów badanych polimorfizmów genu *FV* oszacowana za pomocą programu Haploview (wersja 4.2). Zapis haplotypów: pierwsza litera polimorfizm 1328T>C, druga 1691G>A.

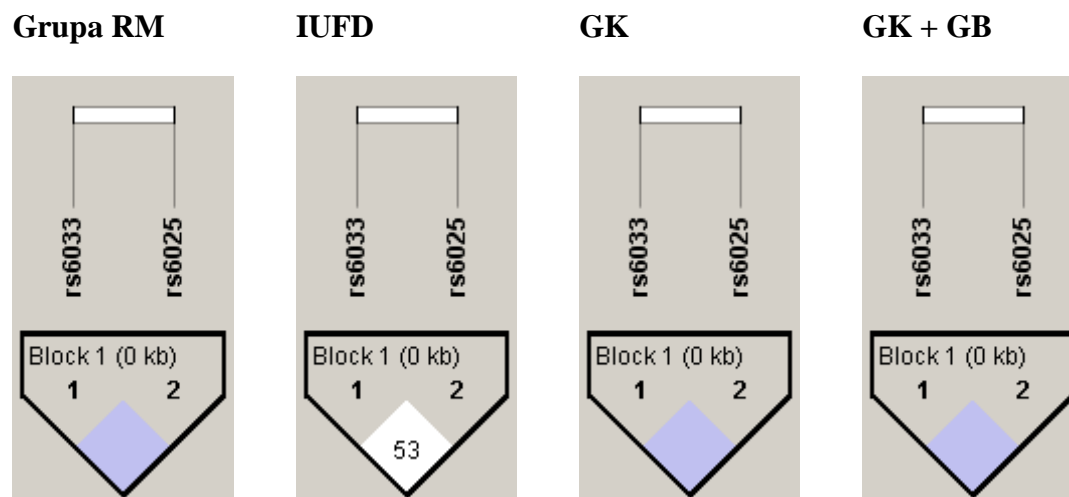
<i>FV</i>	<i>Grupa RM</i> (<i>n</i> =359)		<i>IUFD</i> (<i>n</i> =61)		<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i> =400)
	<i>Częstość występowania</i> (%)	<i>p</i>	<i>Częstość występowania</i> (%)	<i>p</i>	<i>Częstość występowania</i> (%)
TG	0,834	0,63	0,847	1,00	0,847
CG	0,130	0,80	0,104	0,66	0,124
TA	0,036	0,59	0,047	0,45	0,029

Wartości D' pomiędzy polimorfizmami wskazują na całkowitą nierównowagę sprzężeń w grupie z poronieniami, kontrolnej oraz gdy analizowano całą grupę badanych kobiet łącznie. W grupie kobiet IUFD wartość D' wynosiła 0,533, jednak ponieważ grupa ta była stosunkowo mała liczebnie, a parametr D' zależy silnie od wielkości grupy może następować tendencyjne odchylenie spowodowane małą liczebnością grupy (tab. 63).

Tabela 63. Przedstawienie wartości D' oraz LOD badanych polimorfizmów genu czynnika V krzepnięcia w obydwu grupach pacjentek.

rs6033/rs6025	<i>Cała grupa</i> (<i>n</i> =820)	<i>Grupa RM</i> (<i>n</i> =359)	<i>IUFD (n=61)</i>	<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i> =400)
D'	1,0	1,0	0,533	1,0
LOD	1,14	0,69	0,02	0,44
r^2	0,005	0,006	0,002	0,004
D' 95% P.U	0,19-0,99	0,11-0,99	0,04-0,96	0,08-0,98

Wystarczająco silna nierównowaga sprzężeń badanych wariantów genu *FV* pozwoliła utworzyć haplotypy, które graficznie przedstawia rycina 7 wyeksportowana z programu Haploview (ryc. 6).



Rycina 6. Graficzne przedstawienie haplotypów badanych polimorfizmów genu czynnika V krzepnięcia. *GB* – grupa badana, *GK* – grupa kontrolna

ANALIZA HAPLOTYPÓW GENU *MTHFR*

Badając częstość występowania wariantów genetycznych genu *MTHFR* w grupie badanej (łącznie kobiet z poronieniami i IUFD) oraz w grupie kontrolnej stwierdzono statystycznie istotną asocjację wariantu *1793G>A* (*rs2274976*) z omawianymi niepowodzeniami położniczymi. Allel *A* występował u 0,062% kobiet z grupy badanej i u 0,041% pacjentek z grupy kontrolnej ($p=0,0593$) (tab. 64).

Tabela 64. Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu *MTHFR* w obydwu grupach pacjentek.

	<i>Polimorfizm</i>	<i>Allele</i>	<i>n</i> <i>GB:GK</i>	<i>Częstość</i> <i>występowania</i> <i>(%)</i> <i>GB:GK</i>	<i>Chi</i> <i>kwadrat</i>	<i>p</i>
1	rs1801133	T	268:572, 234:566	0.319, 0.292	1.36	0.2436
2	rs1801131	C	303:537, 270:530	0.361, 0.338	0.971	0.3243
3	rs2274976	A	52:788, 33:767	0.062, 0.041	3.557	0.0593

GB – grupa badana, *GK* – grupa kontrolna

Na podstawie otrzymanych w badaniu genotypów polimorfizmów reduktazy metylenotetrahydrofolianowej uzyskano frekwencje najczęściej pojawiających się haplotypów w analizowanych grupach kobiet. Wyniki przedstawia rycina 8, a litery oznaczają odpowiednio: pierwsza - allel polimorfizmu *677C>T*, druga – polimorfizmu *1298A>C* i trzecia polimorfizmu *1793G>A*. W przeprowadzonych badaniach dla genu *MTHFR* odnotowano obecność następujących haplotypów: CAG, TAG, CCG, CCA. Zauważono częstsze występowanie haplotypu CAG (zawierającego wszystkie niezmutowane warianty) w grupie kontrolnej (0,370 vs. 0,323 w grupie RM, 0,303 w grupie IUFD, ns). W grupie IUFD najczęściej występował haplotyp CCG (zawierający zmutowany wariant polimorfizmu *1298A>C*) 0,369 vs. 0,292 w grupie RM i 0,296 w grupie kontrolnej (ns) (tab. 65).

Tabela 65. Częstość występowania poszczególnych haplotypów badanych polimorfizmów genu *MTHFR* oszacowana za pomocą programu Haploview (wersja 4.2). Zapis haplotypów: pierwsza litera polimorfizm 677C>T, druga 1298A>C, trzecia 1793G>A.

<i>MTHFR</i>	<i>Grupa RM</i> (<i>n</i> =359)		<i>IUFD</i> (<i>n</i> =61)		<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i> =400)
	<i>Częstość występowania</i> (%)	<i>p</i>	<i>Częstość występowania</i> (%)	<i>p</i>	
<i>CAG</i>	0,323	0,17	0,303	0,31	0,370
<i>TAG</i>	0,322	0,37	0,270	0,72	0,292
<i>CCG</i>	0,292	0,90	0,369	0,25	0,296
<i>CCA</i>	0,058	0,28	0,057	0,57	0,041

Wartości D' pomiędzy wszystkimi polimorfizmami wskazują na całkowitą nierównowagę sprzężeń we wszystkich analizowanych grupach. Jak wspomniano wcześniej przy $D'=1$ częstość występowania niektórych haplotypów równa się zero. W przypadku badanych polimorfizmów genu *MTHFR* poprzednio analizowane współwystępowanie genotypów ujawniło brak we wszystkich badanych grupach genotypów zawierających jednocześnie trzy lub cztery zmutowane allele dla polimorfizmów 677C>T i 1298A>C genu *MTHFR*.

Najwyższe wartości LOD odnotowano pomiędzy polimorfizmami 677C>T oraz 1298A>C. Wartości te wskazywały na obecność sprzężenia. Najniższe wartości LOD obserwowano natomiast pomiędzy polimorfizmami 1298A>C oraz 1793G>A genu *MTHFR* (tab. 66).

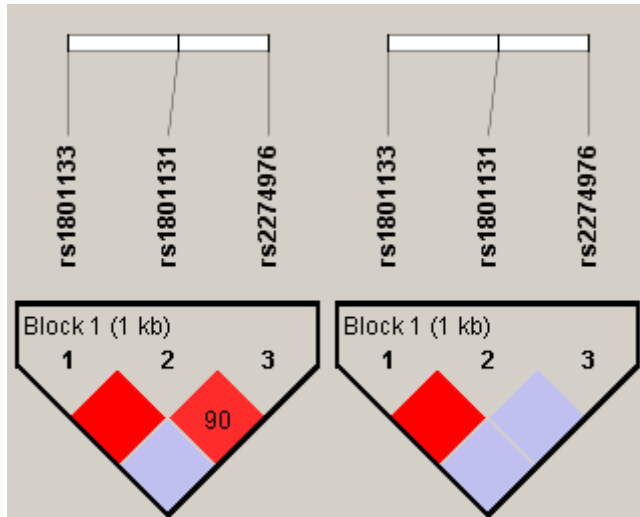
Tabela 66. Przedstawienie wartości D' oraz LOD badanych polimorfizmów genu *MTHFR* w grupach pacjentek.

rs1801133/ rs1801131	<i>Cała grupa (n=820)</i>	<i>Grupa RM (n=359)</i>	<i>IUFD (n=61)</i>	<i>Grupa kontrolna (n=400)</i>
D'	1,0	1,0	1,0	1,0
LOD	67,74	31,59	6,29	30,04
r²	0,237	0,262	0,275	0,211
D' 95% P.U	0,97-1,0	0,94-1,0	0,75-1,0	0,94-1,0
rs1801133/ rs2274976	<i>Cała grupa (n=820)</i>	<i>Grupa RM (n=359)</i>	<i>IUFD (n=61)</i>	<i>Grupa kontrolna (n=400)</i>
D'	1,0	1,0	1,0	1,0
LOD	3,39	1,14	0,99	1,47
r²	0,024	0,033	0,023	0,018
D' 95% P.U	0,53-1,0	0,19-0,99	0,15-0,99	0,26-1,0
rs1801131/ rs2274976	<i>Cała grupa (n=820)</i>	<i>Grupa RM (n=359)</i>	<i>IUFD (n=61)</i>	<i>Grupa kontrolna (n=400)</i>
D'	0,948	0,901	1,0	1,0
LOD	19,7	8,82	1,81	9,56
r²	0,091	0,101	0,082	0,084
D' 95% P.U	0,83-0,99	0,7-0,97	0,32-1,0	0,82-1,0

Analizowane polimorfizmy genu *MTHFR* były w wystarczająco silnej nierównowadze sprzężeń ($D' > 0,8$) by utworzyć haplotypy, który graficznie przedstawia rycina 7 wyeksportowana z programu Haploview. Jasnoczerwony w standardowych kolorach używanych w tym programie oznacza ($LOD \geq 2$ i $D' = 1$), niebieski ($D' = 1$ i $LOD < 2$) odcienie różu/czerwieni ($D' < 1$ i $LOD \leq 2$) a biały ($D' < 1$ i $LOD < 2$). W kwadratach podano wartość D' .

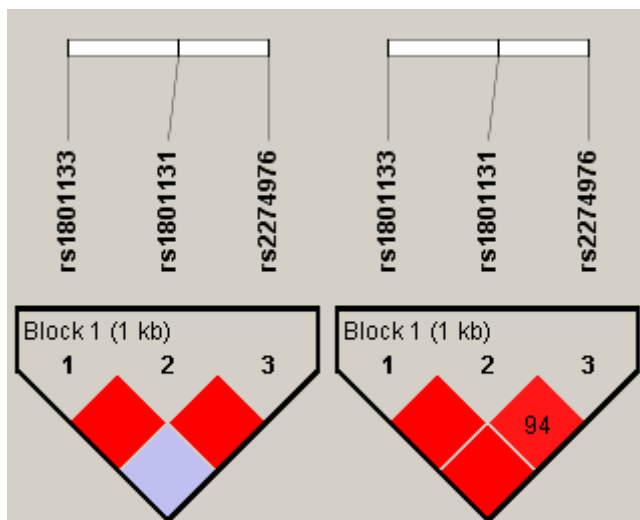
Grupa RM

IUFD



Grupa kontrolna

GK + GB



Rycina 7. Graficzne przedstawienie haplotypów badanych polimorfizmów genu *MTHFR*. *GB* – grupa badana, *GK* – grupa kontrolna

SUMARYCZNA ANALIZA WYSTĘPOWANIA CZYNNIKÓW RYZYKA TROMBOFILII WRODZONEJ W BADANYCH GRUPACH KOBIEŃ Z RPL

W ostatnim etapie we wszystkich grupach kobiet z RPL analizowano łączną liczbę występowania czynników ryzyka trombofilii wrodzonej. Badane w pracy czynniki to: *FV 1691 GA+AA*, *FII 20210 GA+AA*, *MTHFR 677 TT*, *MTHFR 1298 CC*, *MTHFR 677/1298 CT/AC*, *MTHFR 1793 AA*. Sumaryczna analiza występowania wybranych czynników ryzyka trombofilii wrodzonej w badanych grupach kobiet z RPL pokazała istotnie statystycznie większą liczbę czynników ryzyka w całej grupie kobiet z RM ($p=0,0013$) oraz w grupie IUFD ($p=0,005$) w porównaniu do grupy zdrowych kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (tab. 65).

Następnie wydzielono grupy pacjentek z 1, 2 lub trzema czynnikami ryzyka dla trombofilii wrodzonej w każdej z badanych grup RPL. Tutaj ciekawe obserwacje przeprowadzono w odniesieniu do grupy IUFD. Zaobserwowano statystycznie istotnie wyższą liczbę osób już z 1 czynnikiem ($p=0,04$) lub 2 czynnikami ($p=0,03$) ryzyka w grupie IUFD w porównaniu do grupy kontrolnej zdrowych kobiet (tab. 67).

Następnym etapem była łączna analiza liczby występowania czynników ryzyka trombofilii wrodzonej z uwzględnieniem wariantów *FVII 11496GG* oraz *FV 1328CC*. Osobną analizę uwzględniającą dodatkowo te warianty przeprowadzono ze względu na małą jeszcze liczbę doniesień w pełni wykazujących udział tych wariantów w etiologii nawracających niepowodzeń położniczych. Pokazano tutaj różnicę w częstości niepowodzeń pomiędzy całą grupą RM w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,06$) oraz różnicę w częstości niepowodzeń przy obecności 3 i więcej czynników ryzyka pomiędzy grupą IUFD a kontrolną ($p=0,07$) (tab. 68).

Tabela 67. Sumaryczna analiza występowania czynników ryzyka trombofilii wrodzonej w badanych grupach kobiet z RPL.

	<i>Cała grupa RM (n=359)</i>	<i>p</i>	<i>IUFD (n=61)</i>	<i>p</i>	<i>Grupa kontrolna (n=400)</i>
<i>Czynniki ryzyka trombofilii wrodzonej:</i>					
<i>FV 169I GA+AA</i>	26 (12,56%)	0,47	6 (16,67%)	0,29	22 (11,83%)
<i>FII 20210 GA+AA</i>	12 (5,80%)	0,16	1 (2,78%)	0,68	6 (3,22%)
<i>MTHFR 677 TT</i>	41 (19,80%)	0,45	8 (22,22%)	0,39	35 (18,82%)
<i>MTHFR 1298 CC</i>	44 (21,26%)	0,14	9 (25,00%)	0,52	49 (26,34%)
<i>MTHFR 677/1298 CT/AC</i>	83 (40,10%)	0,47	12 (33,33%)	0,32	73 (39,25%)
<i>MTHFR 1793 AA</i>	1 (0,48%)	0,72	0 (0,00%)	—	1 (0,54%)
<i>SUMA CZYNNIKÓW RYZYKA % W CAŁEJ GRUPIE</i>	207 (100,00%) (57,66%)	0,0013	36 (100,00%) (59,02%)	0,005	186 (100,00%) (46,50%)
<i>Ilość czynników ryzyka u pacjentek:</i>					
<i>1</i>	171 (90,48%)	0,32	24 (80,00%)	0,04	159 (92,44%)
<i>2</i>	18 (9,52%)	0,25	6 (20,00%)	0,03	12 (6,98%)
<i>3 i więcej</i>	0 (0,00%)	—	0 (0,00%)	—	1 (0,58%)
<i>LICZBA OSÓB Z CZYNNIKAMI RYZYKA % W CAŁEJ GRUPIE</i>	189 (100,00%) (52,56%)	0,005	30 (100,00%) (49,18%)	0,22	172 (100,00%) (43,00%)

Tabela 68. Sumaryczna analiza występowania czynników ryzyka trombofilii wrodzonej w badanych grupach kobiet z RPL z uwzględnieniem wariantów *FVII 11496 GG* oraz *FV 1328 CC*.

	<i>Cała grupa RM (n=359)</i>	<i>p</i>	<i>IUFD (n=61)</i>	<i>p</i>	<i>Grupa kontrolna (n=400)</i>
<i>Czynniki ryzyka trombofilii:</i>					
<i>FV 169I GA+AA</i>	26 (5,24%)	0,34	6 (7,06%)	0,22	22 (4,46%)
<i>FII 20210 GA</i>	12 (2,42%)	0,12	1 (1,18%)	0,73	6 (1,22%)
<i>MTHFR 677 TT</i>	41 (8,27%)	0,28	8 (9,41%)	0,29	35 (7,10%)
<i>MTHFR 1298 CC</i>	44 (8,87%)	0,32	9 (10,59%)	0,50	49 (9,94%)
<i>MTHFR 677/1298 CT/AC</i>	83 (16,73%)	0,23	12 (14,11%)	0,51	73 (14,81%)
<i>MTHFR 1793 AA</i>	1 (0,20%)	0,75	0 (0,00%)	—	1 (0,20%)
<i>FVII 11496 GG</i>	283 (57,06%)	0,10	48 (56,47%)	0,24	302 (61,26%)
<i>FV 1328 CC</i>	6 (1,21%)	0,50	1 (1,18%)	0,62	5 (1,01%)
<i>SUMA CZYNNIKÓW RYZYKA W GRUPIE</i>	496 (100,00%)		85 (100,00%)		493 (100,00%)
<i>% W CAŁEJ GRUPIE</i>	(138,16%)		(139,34%)		(123,25%)
<i>Ilość czynników ryzyka u pacjentek:</i>					
<i>1</i>	170 (52,47%)	0,02	30 (54,55%)	0,23	210 (60,87%)
<i>2</i>	136 (41,97%)	0,05	20 (36,36%)	0,52	123 (35,65%)
<i>3 i więcej</i>	18 (5,56%)	0,13	5 (9,09%)	0,07	12 (3,48%)
<i>LICZBA OSÓB Z CZYNNIKAMI RYZYKA</i>	324 (100,00%)	0,06	55 (100,00%)	0,27	345 (100,00%)
<i>% W CAŁEJ GRUPIE</i>	(90,25%)		(90,16%)		(86,25%)

ANALIZA DANYCH KLINICZNYCH PACJENTEK W ZALEŻNOŚCI OD POSZCZEGÓLNYCH GENOTYPÓW BADANYCH W PRACY POLIMORFIZMÓW

W kolejnym etapie pracy przeprowadzono korelacje wartości wybranych parametrów klinicznych z poszczególnymi genotypami badanych polimorfizmów odpowiednio dla podgrupy RM, IUFD oraz grupy kontrolnej. Dane przedstawiono w tabelach 69-75.

Przeprowadzona analiza wariancji ANOVA dla polimorfizmów $677C>T$ i $1298A>C$ genu *MTHFR* nie wykazała obecności żadnej istotności statystycznej w zakresie analizowanych zmiennych, zarówno w badanych podgrupach jak i w grupie kontrolnej. Ciekawą obserwacją było odnotowanie najniższych wartości skurczowego ciśnienia tętniczego w podgrupie RM z genotypem $677CC$, natomiast najwyższe ciśnienie skurczowe występowało u nosicielek genotypu $677TT$ (odpowiednio 108,39 mmHg oraz 112,44 mmHg, $p=0,10$) (tab. 73). Dla trzeciego z analizowanych wariantów – polimorfizmu $1793G>A$ genu *MTHFR* odnotowano znaczącą statystycznie różnicę pomiędzy wartościami średniego ciśnienia rozkurczowego ($1793GG$ 68,46 vs. $1793GA$ 65,47 vs. $1793AA$ 50,00 mmHg, $p=0,04$) w podgrupie kobiet z RM (tab. 75).

Dla polimorfizmu $11496G>A$ genu czynnika VII odnotowano różnice statystycznie istotne dla średnich wartości ciśnienia skurczowego jak i rozkurczowego w podgrupie IUFD (odpowiednio: $p=0,002$ i $p=0,02$), oraz dla masy ciała i wskaźnika BMI pacjentek z grupy kontrolnej. U pacjentek nosicielek genotypu $11496AA$ obserwowano masę ciała średnio 69,67 kg, natomiast u nosicielek genotypu $11496GG$ masę średnio 59,77 kg ($p=0,04$) (tab. 72).

Tabela 69. Dane kliniczne kobiet z badanych grup w zależności od genotypów polimorfizmu 1691G>A genu FV.

<i>Analizowana zmienna</i>	<i>FV 1691G>A</i>	<i>Grupa</i>	<i>Średnia ± SD</i>	<i>Mediana</i>	<i>min - max</i>	<i>p</i>
<i>wiek (lata)</i>	<i>GG</i>	<i>RM n=359</i>	31,09 ± 4,52	31,00	20,00 - 45,00	0,11
	<i>GA</i>		29,65 ± 3,97	30,00	20,00 - 39,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>IUFD n=61</i>	30,65 ± 3,87	31,00	22,00 - 41,00	0,01
	<i>GA</i>		26,17 ± 2,85	26,00	22,00 - 31,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	30,01 ± 3,53	29,00	22,00 - 44,00	0,39
	<i>GA</i>		30,62 ± 3,00	30,00	27,00 - 38,00	
	<i>AA</i>		34,00 ± 0,00	34,00	34,00 - 34,00	
<i>RR skurczowe (mmHg)</i>	<i>GG</i>	<i>RM n=359</i>	110,18 ± 12,28	110,00	80,00 - 140,00	0,09
	<i>GA</i>		105,77 ± 15,85	105,00	80,00 - 135,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>IUFD n=61</i>	107,59 ± 9,94	102,50	90,00 - 140,00	0,87
	<i>GA</i>		108,33 ± 12,13	110,00	90,00 - 120,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	111,43 ± 10,65	110,00	80,00 - 150,00	0,57
	<i>GA</i>		109,76 ± 11,18	110,00	90,00 - 140,00	
	<i>AA</i>		120,00 ± 0,00	120,00	120,00 - 120,00	
<i>RR rozkurczowe (mmHg)</i>	<i>GG</i>	<i>RM n=359</i>	68,33 ± 10,07	70,00	50,00 - 100,00	0,06
	<i>GA</i>		64,42 ± 9,84	65,00	50,00 - 80,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>IUFD n=61</i>	67,31 ± 12,31	60,00	60,00 - 120,00	0,85
	<i>GA</i>		68,33 ± 8,98	65,00	60,00 - 80,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	70,71 ± 9,17	70,00	50,00 - 95,00	0,008
	<i>GA</i>		65,95 ± 8,40	60,00	50,00 - 85,00	
	<i>AA</i>		90,00 ± 0,00	90,00	90,00 - 90,00	
<i>Wzrost (cm)</i>	<i>GG</i>	<i>RM n=359</i>	165,96 ± 5,66	165,00	150,00 - 179,00	0,5786
	<i>GA</i>		165,21 ± 4,56	165,00	155,00 - 173,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>IUFD n=61</i>	164,73 ± 7,28	165,00	150,00 - 183,00	0,30
	<i>GA</i>		169,33 ± 4,99	168,00	164,00 - 176,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	166,37 ± 5,42	166,00	150,00 - 180,00	0,54
	<i>GA</i>		166,90 ± 5,78	167,00	156,00 - 177,00	
	<i>AA</i>		172,00 ± 0,00	172,00	172,00 - 172,00	

Masa (kg)	GG	RM n=359	62,36 ± 9,30	62,00	43,00 - 92,00	0,66
	GA		63,39 ± 8,72	63,50	50,00 - 81,00	
	AA		—	—	—	
	GG	IUFD n=61	62,45 ± 11,87	61,00	44,00 - 99,00	0,29
	GA		70,67 ± 15,08	60,00	60,00 - 92,00	
	AA		—	—	—	
	GG	Grupa kontrolna n=400	59,94 ± 9,93	58,00	39,00 - 110,00	0,47
	GA		57,37 ± 7,12	57,00	49,00 - 76,00	
	AA		65,00 ± 0,00	65,00	65,00 - 65,00	
BMI (kg/m²)	GG	RM n=359	22,61 ± 3,29	21,97	17,19 - 36,85	0,66
	GA		22,98 ± 2,83	21,97	18,59 - 27,38	
	AA		—	—	—	
	GG	IUFD n=61	23,10 ± 4,47	21,48	18,03 - 38,67	0,53
	GA		24,95 ± 6,60	21,26	19,37 - 34,21	
	AA		—	—	—	
	GG	Grupa kontrolna n=400	21,62 ± 3,29	20,76	16,02 - 38,57	0,42
	GA		20,62 ± 2,50	19,53	16,90 - 25,82	
	AA		21,97 ± 0,00	21,97	21,97 - 21,97	

Tabela 70. Dane kliniczne kobiet z badanych grup w zależności od genotypów polimorfizmu 1328T>C genu *FV*.

<i>Analizowana zmienna</i>	<i>FV 1328T>C</i>	<i>Grupa</i>	<i>Średnia ± SD</i>	<i>Mediana</i>	<i>min - max</i>	<i>p</i>	
<i>wiek (lata)</i>	<i>TT</i>	<i>RM n=359</i>	30,98 ± 4,65	31,00	20,00 - 45,00	0,85	
	<i>TC</i>		31,09 ± 4,03	31,00	22,00 - 41,00		
	<i>CC</i>		30,00 ± 3,32	30,00	26,00 - 34,00		
	<i>TT</i>	<i>IUFD n=61</i>	30,41 ± 4,13	31,00	22,00 - 41,00	0,50	
	<i>TC</i>		29,09 ± 3,37	30,00	22,00 - 33,00		
	<i>CC</i>		33,00 ± 0,00	33,00	33,00 - 33,00		
		<i>TT</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	30,10 ± 3,44	30,00	22,00 - 44,00	0,76
		<i>TC</i>		29,96 ± 3,76	29,00	24,00 - 43,00	
		<i>CC</i>		29,00 ± 2,28	29,00	26,00 - 32,00	
<i>RR skurczowe (mmHg)</i>	<i>TT</i>	<i>RM n=359</i>	109,74 ± 12,60	110,00	80,00 - 140,00	0,86	
	<i>TC</i>		110,06 ± 12,92	110,00	80,00 - 140,00		
	<i>CC</i>		112,50 ± 9,01	110,00	100,00 - 130,00		
	<i>TT</i>	<i>IUFD n=61</i>	107,60 ± 10,26	105,00	90,00 - 140,00	0,95	
	<i>TC</i>		108,18 ± 10,29	100,00	100,00 - 130,00		
	<i>CC</i>		105,00 ± 0,00	105,00	105,00 - 105,00		
		<i>TT</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	111,64 ± 10,79	110,00	80,00 - 150,00	0,08
		<i>TC</i>		109,89 ± 10,00	110,00	85,00 - 130,00	
		<i>CC</i>		120,00 ± 10,49	115,00	110,00 - 135,00	
<i>RR rozkurczowe (mmHg)</i>	<i>TT</i>	<i>RM n=359</i>	68,01 ± 9,88	70,00	50,00 - 90,00	0,10	
	<i>TC</i>		67,53 ± 10,40	70,00	50,00 - 90,00		
	<i>CC</i>		76,67 ± 12,47	75,00	60,00 - 100,00		
	<i>TT</i>	<i>IUFD n=61</i>	67,81 ± 12,70	60,00	60,00 - 120,00	0,83	
	<i>TC</i>		65,45 ± 8,91	60,00	60,00 - 80,00		
	<i>CC</i>		70,00 ± 0,00	70,00	70,00 - 70,00		
		<i>TT</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	70,50 ± 8,97	70,00	50,00 - 90,00	0,94
		<i>TC</i>		70,45 ± 10,16	70,00	50,00 - 95,00	
		<i>CC</i>		72,00 ± 7,48	70,00	60,00 - 80,00	
<i>Wzrost (cm)</i>	<i>TT</i>	<i>RM n=359</i>	165,38 ± 5,75	165,00	150,00 - 179,00	0,03	
	<i>TC</i>		167,69 ± 4,82	168,00	156,00 - 178,00		
	<i>CC</i>		164,67 ± 2,92	164,50	160,00 - 170,00		
	<i>TT</i>	<i>IUFD n=61</i>	165,19 ± 6,98	164,50	150,00 - 183,00	0,33	
	<i>TC</i>		161,33 ± 8,18	165,00	150,00 - 169,00		
	<i>CC</i>		174,00 ± 0,00	174,00	174,00 - 174,00		
		<i>TT</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	166,45 ± 5,53	166,00	150,00 - 180,00	0,66
		<i>TC</i>		166,44 ± 5,12	167,00	152,00 - 180,00	
		<i>CC</i>		164,20 ± 4,40	165,00	156,00 - 168,00	

<i>Masa (kg)</i>	<i>TT</i>	<i>RM</i> <i>n=359</i>	$62,51 \pm 9,65$	62,00	43,00 - 92,00	0,92
	<i>TC</i>		$62,11 \pm 7,65$	62,50	49,00 - 75,00	
	<i>CC</i>		$63,67 \pm 10,24$	66,00	47,00 - 76,00	
	<i>TT</i>	<i>IUFD</i> <i>n=61</i>	$63,57 \pm 12,33$	62,25	44,00 - 99,00	0,13
	<i>TC</i>		$53,17 \pm 3,79$	54,50	48,00 - 57,00	
	<i>CC</i>		$81,40 \pm 0,00$	81,40	81,40 - 81,40	
	<i>TT</i>	<i>Grupa kontrolna</i> <i>n=400</i>	$60,14 \pm 9,55$	58,00	39,00 - 105,00	0,29
	<i>TC</i>		$59,13 \pm 10,74$	57,00	40,00 - 110,00	
	<i>CC</i>		$54,00 \pm 4,20$	55,00	47,00 - 60,00	
<i>BMI (kg/m²)</i>	<i>TT</i>	<i>RM</i> <i>n=359</i>	$22,78 \pm 3,38$	21,97	17,19 - 36,85	0,40
	<i>TC</i>		$22,10 \pm 2,69$	21,55	18,00 - 27,94	
	<i>CC</i>		$23,42 \pm 3,36$	24,39	17,47 - 27,92	
	<i>TT</i>	<i>IUFD</i> <i>n=61</i>	$23,42 \pm 4,89$	21,48	18,03 - 38,67	0,45
	<i>TC</i>		$20,45 \pm 0,98$	20,94	19,08 - 21,33	
	<i>CC</i>		$26,89 \pm 0,00$	26,89	26,89 - 26,89	
	<i>TT</i>	<i>Grupa kontrolna</i> <i>n=400</i>	$21,68 \pm 3,23$	20,82	16,53 - 38,57	0,37
	<i>TC</i>		$21,30 \pm 3,37$	20,45	16,02 - 35,11	
	<i>CC</i>		$20,08 \pm 1,95$	19,49	17,47 - 22,60	

Tabela 71. Dane kliniczne kobiet z badanych grup w zależności od genotypów polimorfizmu 20210G>A genu *FII*.

<i>Analizowana zmienna</i>	<i>FII 20210G>A</i>	<i>Grupa</i>	<i>Średnia ± SD</i>	<i>Mediana</i>	<i>min - max</i>	<i>p</i>
<i>wiek (lata)</i>	<i>GG</i>	<i>RM n=359</i>	31,07 ± 4,51	31,00	20,00 - 45,00	0,08
	<i>GA</i>		28,75 ± 3,39	28,00	23,00 - 36,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>IUFD n=61</i>	30,33 ± 3,94	31,00	22,00 - 41,00	0,07
	<i>GA</i>		23,00 ± 0,00	23,00	23,00 - 23,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	30,06 ± 3,50	30,00	22,00 - 44,00	0,97
	<i>GA</i>		30,00 ± 3,70	30,00	24,00 - 36,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
<i>RR skurczowe (mmHg)</i>	<i>GG</i>	<i>RM n=359</i>	109,90 ± 12,50	110,00	80,00 - 140,00	0,76
	<i>GA</i>		108,75 ± 15,83	100,00	90,00 - 140,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>IUFD n=61</i>	107,63 ± 10,27	100,00	90,00 - 140,00	0,82
	<i>GA</i>		110,00 ± 0,00	110,00	110,00 - 110,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	111,39 ± 10,69	110,00	80,00 - 150,00	0,61
	<i>GA</i>		109,17 ± 10,17	105,00	100,00 - 125,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
<i>RR rozkurczowe (mmHg)</i>	<i>GG</i>	<i>RM n=359</i>	68,07 ± 10,11	70,00	50,00 - 100,00	0,85
	<i>GA</i>		67,50 ± 10,10	60,00	60,00 - 90,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>IUFD n=61</i>	67,37 ± 12,12	60,00	60,00 - 120,00	0,83
	<i>GA</i>		70,00 ± 0,00	70,00	70,00 - 70,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	70,44 ± 9,21	70,00	50,00 - 95,00	0,23
	<i>GA</i>		75,00 ± 9,57	75,00	60,00 - 90,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
<i>Wzrost (cm)</i>	<i>GG</i>	<i>RM n=359</i>	165,83 ± 5,55	165,00	150,00 - 179,00	0,35
	<i>GA</i>		167,86 ± 5,87	170,00	158,00 - 175,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>IUFD n=61</i>	165,11 ± 7,23	165,00	150,00 - 183,00	0,52
	<i>GA</i>		170,00 ± 0,00	170,00	170,00 - 170,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	166,42 ± 5,47	166,50	150,00 - 180,00	0,97
	<i>GA</i>		166,33 ± 2,98	164,50	164,00 - 171,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	

<i>Masa (kg)</i>	<i>GG</i>	<i>RM</i> <i>n=359</i>	$62,40 \pm 9,28$	62,00	43,00 - 92,00	0,62
	<i>GA</i>		$64,33 \pm 8,36$	64,00	56,00 - 81,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>IUFD</i> <i>n=61</i>	$63,17 \pm 12,41$	60,50	44,00 - 99,00	0,77
	<i>GA</i>		$67,00 \pm 0,00$	67,00	67,00 - 67,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna</i> <i>n=400</i>	$59,86 \pm 9,88$	58,00	39,00 - 110,00	0,68
	<i>GA</i>		$58,17 \pm 3,44$	59,00	51,00 - 62,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
<i>BMI (kg/m²)</i>	<i>GG</i>	<i>RM</i> <i>n=359</i>	$22,64 \pm 3,28$	21,97	17,19 - 36,85	0,87
	<i>GA</i>		$22,87 \pm 2,06$	22,16	21,22 - 27,38	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>IUFD</i> <i>n=61</i>	$23,26 \pm 4,72$	21,41	18,03 - 38,67	0,99
	<i>GA</i>		$23,18 \pm 0,00$	23,18	23,18 - 23,18	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna</i> <i>n=400</i>	$21,58 \pm 3,28$	20,72	16,02 - 38,57	0,69
	<i>GA</i>		$21,04 \pm 1,41$	21,06	18,96 - 23,05	
	<i>AA</i>		—	—	—	

Tabela 72. Dane kliniczne kobiet z badanych grup w zależności od genotypów polimorfizmu R353Q 11496G>A genu FVII.

<i>Analizowana zmienna</i>	<i>FVII R353Q 11496G>A</i>	<i>Grupa</i>	<i>Średnia ± SD</i>	<i>Mediana</i>	<i>min - max</i>	<i>p</i>
<i>wiek (lata)</i>	<i>GG</i>	<i>RM n=359</i>	30,99 ± 4,56	31,00	20,00 - 45,00	0,95
	<i>GA</i>		31,00 ± 4,29	30,50	22,00 - 43,00	
	<i>AA</i>		30,00 ± 1,00	30,00	29,00 - 31,00	
	<i>GG</i>	<i>IUFD n=61</i>	30,13 ± 3,72	31,00	22,00 - 39,00	0,88
	<i>GA</i>		30,67 ± 5,10	31,50	23,00 - 41,00	
	<i>AA</i>		29,00 ± 0,00	29,00	29,00 - 29,00	
	<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	30,07 ± 3,54	30,00	22,00 - 44,00	0,77
	<i>GA</i>		29,95 ± 3,43	29,00	23,00 - 41,00	
	<i>AA</i>		31,00 ± 2,71	30,50	27,00 - 36,00	
<i>RR skurczowe (mmHg)</i>	<i>GG</i>	<i>RM n=359</i>	109,77 ± 12,90	110,00	80,00 - 140,00	0,50
	<i>GA</i>		110,47 ± 11,57	110,00	80,00 - 140,00	
	<i>AA</i>		100,00 ± 0,00	100,00	100,00 - 100,00	
	<i>GG</i>	<i>IUFD n=61</i>	106,38 ± 9,27	100,00	90,00 - 130,00	0,002
	<i>GA</i>		110,00 ± 9,13	110,00	100,00 - 130,00	
	<i>AA</i>		140,00 ± 0,00	140,00	140,00 - 140,00	
	<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	111,76 ± 10,75	110,00	80,00 - 150,00	0,43
	<i>GA</i>		110,11 ± 9,97	110,00	90,00 - 130,00	
	<i>AA</i>		110,83 ± 15,39	110,00	90,00 - 140,00	
<i>RR rozkurczowe (mmHg)</i>	<i>GG</i>	<i>RM n=359</i>	68,00 ± 10,42	70,00	50,00 - 100,00	0,50
	<i>GA</i>		68,45 ± 8,85	70,00	50,00 - 85,00	
	<i>AA</i>		60,00 ± 0,00	60,00	60,00 - 60,00	
	<i>GG</i>	<i>IUFD n=61</i>	67,55 ± 12,02	60,00	60,00 - 120,00	0,02
	<i>GA</i>		64,17 ± 7,59	60,00	60,00 - 80,00	
	<i>AA</i>		100,00 ± 0,00	100,00	100,00 - 100,00	
	<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	70,81 ± 9,20	70,00	50,00 - 90,00	0,49
	<i>GA</i>		69,65 ± 9,14	70,00	50,00 - 95,00	
	<i>AA</i>		68,33 ± 10,67	70,00	50,00 - 80,00	
<i>Wzrost (cm)</i>	<i>GG</i>	<i>RM n=359</i>	165,67 ± 5,71	165,00	150,00 - 179,00	0,39
	<i>GA</i>		166,73 ± 5,02	167,00	156,00 - 176,00	
	<i>AA</i>		163,00 ± 5,00	163,00	158,00 - 168,00	
	<i>GG</i>	<i>IUFD n=61</i>	165,19 ± 7,68	165,00	150,00 - 183,00	0,78
	<i>GA</i>		165,75 ± 2,49	164,50	164,00 - 170,00	
	<i>AA</i>		160,00 ± 0,00	160,00	160,00 - 160,00	
	<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna</i>	166,33 ± 5,34	166,00	150,00 - 180,00	0,87
	<i>GA</i>		166,67 ± 5,81	166,00	150,00 - 180,00	

	<i>AA</i>	<i>n=400</i>	166,67 ± 3,99	168,50	159,00 - 170,00	
<i>Masa (kg)</i>	<i>GG</i>	<i>RM n=359</i>	62,46 ± 9,54	62,00	43,00 - 92,00	0,74
	<i>GA</i>		62,68 ± 8,29	63,00	50,00 - 85,00	
	<i>AA</i>		57,50 ± 5,50	57,50	52,00 - 63,00	
	<i>GG</i>	<i>IUFD n=61</i>	63,46 ± 13,20	60,00	44,00 - 99,00	0,77
	<i>GA</i>		63,38 ± 4,97	63,75	56,00 - 70,00	
	<i>AA</i>		54,00 ± 0,00	54,00	54,00 - 54,00	
	<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	59,77 ± 9,44	58,00	39,00 - 110,00	0,04
	<i>GA</i>		59,38 ± 10,27	56,00	40,00 - 105,00	
	<i>AA</i>		69,67 ± 14,29	66,50	53,00 - 98,00	
<i>BMI (kg/m²)</i>	<i>GG</i>	<i>RM n=359</i>	22,73 ± 3,39	22,01	17,19 - 36,85	0,77
	<i>GA</i>		22,42 ± 2,79	21,84	17,65 - 30,12	
	<i>AA</i>		21,57 ± 0,74	21,57	20,83 - 22,30	
	<i>GG</i>	<i>IUFD n=61</i>	23,36 ± 5,05	21,33	18,03 - 38,67	0,90
	<i>GA</i>		23,08 ± 1,95	22,74	20,82 - 26,03	
	<i>AA</i>		21,09 ± 0,00	21,09	21,09 - 21,09	
	<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	21,57 ± 3,15	20,76	16,53 - 38,57	0,02
	<i>GA</i>		21,37 ± 3,29	20,37	16,02 - 37,65	
	<i>AA</i>		25,17 ± 5,38	24,72	18,56 - 34,72	

Tabela 73. Dane kliniczne kobiet z badanych grup w zależności od genotypów polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR*.

<i>Analizowana zmienna</i>	<i>MTHFR 677C>T</i>	<i>Grupa</i>	<i>Średnia ± SD</i>	<i>Mediana</i>	<i>min - max</i>	<i>p</i>	
<i>wiek (lata)</i>	<i>CC</i>	<i>RM n=359</i>	30,74 ± 4,71	30,00	20,00 - 43,00	0,37	
	<i>CT</i>		31,05 ± 4,33	31,00	20,00 - 45,00		
	<i>TT</i>		31,83 ± 4,07	33,00	20,00 - 40,00		
	<i>CC</i>	<i>IUFD n=61</i>	30,75 ± 4,35	31,50	22,00 - 41,00	0,46	
	<i>CT</i>		29,35 ± 3,45	30,00	23,00 - 35,00		
	<i>TT</i>		29,63 ± 3,04	30,50	24,00 - 34,00		
		<i>CC</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	30,32 ± 3,82	30,00	22,00 - 44,00	0,22
		<i>CT</i>		29,69 ± 3,07	29,00	23,00 - 40,00	
		<i>TT</i>		30,17 ± 3,33	30,00	24,00 - 39,00	
<i>RR skurczowe (mmHg)</i>	<i>CC</i>	<i>RM n=359</i>	108,39 ± 12,84	110,00	80,00 - 140,00	0,10	
	<i>CT</i>		110,75 ± 12,47	110,00	80,00 - 135,00		
	<i>TT</i>		112,44 ± 11,59	110,00	90,00 - 140,00		
	<i>CC</i>	<i>IUFD n=61</i>	107,00 ± 10,30	100,00	90,00 - 140,00	0,83	
	<i>CT</i>		108,82 ± 10,22	110,00	100,00 - 130,00		
	<i>TT</i>		108,13 ± 9,33	105,00	100,00 - 125,00		
		<i>CC</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	111,42 ± 10,97	110,00	85,00 - 150,00	0,99
		<i>CT</i>		111,26 ± 10,35	110,00	90,00 - 140,00	
		<i>TT</i>		111,52 ± 10,55	110,00	80,00 - 130,00	
<i>RR rozkurczowe (mmHg)</i>	<i>CC</i>	<i>RM n=359</i>	67,27 ± 10,54	70,00	50,00 - 100,00	0,39	
	<i>CT</i>		68,59 ± 9,89	70,00	50,00 - 90,00		
	<i>TT</i>		69,15 ± 8,83	70,00	60,00 - 90,00		
	<i>CC</i>	<i>IUFD n=61</i>	66,71 ± 10,07	60,00	60,00 - 100,00	0,37	
	<i>CT</i>		70,59 ± 16,17	60,00	60,00 - 120,00		
	<i>TT</i>		63,75 ± 6,96	60,00	60,00 - 80,00		
		<i>CC</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	70,81 ± 9,62	70,00	50,00 - 95,00	0,80
		<i>CT</i>		70,17 ± 8,67	70,00	50,00 - 90,00	
		<i>TT</i>		70,30 ± 9,45	70,00	50,00 - 90,00	
<i>Wzrost (cm)</i>	<i>CC</i>	<i>RM n=359</i>	166,37 ± 5,36	166,00	152,00 - 179,00	0,49	
	<i>CT</i>		165,49 ± 5,66	165,00	150,00 - 177,00		
	<i>TT</i>		165,34 ± 5,90	165,00	156,00 - 178,00		
	<i>CC</i>	<i>IUFD n=61</i>	166,86 ± 6,79	166,50	156,00 - 183,00	0,06	
	<i>CT</i>		160,22 ± 6,58	160,00	150,00 - 170,00		
	<i>TT</i>		166,20 ± 6,14	165,00	160,00 - 176,00		
		<i>CC</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	166,56 ± 5,78	167,00	150,00 - 180,00	0,07
		<i>CT</i>		165,86 ± 5,12	165,00	152,00 - 178,00	
		<i>TT</i>		168,11 ± 4,32	167,00	161,00 - 178,00	

<i>Masa (kg)</i>	<i>CC</i>	<i>RM</i> <i>n=359</i>	$62,23 \pm 8,97$	62,00	44,00 - 85,00	0,89
	<i>CT</i>		$62,87 \pm 9,49$	61,00	47,00 - 92,00	
	<i>TT</i>		$62,08 \pm 9,51$	61,50	43,00 - 85,00	
	<i>CC</i>	<i>IUFD</i> <i>n=61</i>	$64,82 \pm 11,60$	64,00	44,00 - 92,00	0,63
	<i>CT</i>		$60,13 \pm 16,17$	54,00	48,00 - 99,00	
	<i>TT</i>		$61,14 \pm 5,82$	60,00	55,00 - 69,00	
	<i>CC</i>	<i>Grupa kontrolna</i> <i>n=400</i>	$60,65 \pm 10,94$	58,00	39,00 - 105,00	0,15
	<i>CT</i>		$58,66 \pm 8,13$	58,00	40,00 - 110,00	
	<i>TT</i>		$60,71 \pm 9,85$	58,00	49,00 - 92,00	
<i>BMI (kg/m²)</i>	<i>CC</i>	<i>RM</i> <i>n=359</i>	$22,44 \pm 2,92$	21,88	17,19 - 31,23	0,68
	<i>CT</i>		$22,90 \pm 3,54$	22,33	17,47 - 36,85	
	<i>TT</i>		$22,62 \pm 3,45$	21,63	17,22 - 29,76	
	<i>CC</i>	<i>IUFD</i> <i>n=61</i>	$23,32 \pm 4,46$	21,26	18,03 - 34,21	0,84
	<i>CT</i>		$23,79 \pm 6,26$	21,33	18,65 - 38,67	
	<i>TT</i>		$22,15 \pm 1,98$	21,48	19,37 - 25,34	
	<i>CC</i>	<i>Grupa kontrolna</i> <i>n=400</i>	$21,80 \pm 3,61$	20,76	16,53 - 38,57	0,40
	<i>CT</i>		$21,33 \pm 2,71$	20,76	16,02 - 35,11	
	<i>TT</i>		$21,49 \pm 3,44$	20,48	17,51 - 32,60	

Tabela 74. Dane kliniczne kobiet z badanych grup w zależności od genotypów polimorfizmu 1298A>C genu *MTHFR*.

<i>Analizowana zmienna</i>	<i>MTHFR 1298A>C</i>	<i>Grupa</i>	<i>Średnia ± SD</i>	<i>Mediana</i>	<i>min - max</i>	<i>p</i>
<i>wiek (lata)</i>	AA	RM <i>n=359</i>	31,64 ± 4,37	32,00	20,00 - 45,00	0,05
	AC		30,38 ± 4,51	30,00	20,00 - 41,00	
	CC		31,02 ± 4,52	30,50	20,00 - 40,00	
	AA	IUFD <i>n=61</i>	29,72 ± 3,46	30,50	23,00 - 35,00	0,11
	AC		31,06 ± 4,04	32,00	22,00 - 41,00	
	CC		28,00 ± 3,92	29,00	22,00 - 33,00	
	AA	Grupa kontrolna <i>n=400</i>	29,96 ± 3,24	30,00	23,00 - 41,00	0,39
	AC		29,97 ± 3,73	29,00	22,00 - 43,00	
	CC		30,69 ± 3,56	30,00	26,00 - 44,00	
<i>RR skurczowe (mmHg)</i>	AA	RM <i>n=359</i>	111,22 ± 12,27	110,00	80,00 - 140,00	0,15
	AC		109,26 ± 12,72	110,00	80,00 - 140,00	
	CC		107,39 ± 12,95	100,00	80,00 - 140,00	
	AA	IUFD <i>n=61</i>	106,39 ± 8,13	100,00	100,00 - 125,00	0,70
	AC		107,73 ± 9,78	105,00	90,00 - 130,00	
	CC		110,00 ± 14,14	110,00	90,00 - 140,00	
	AA	Grupa kontrolna <i>n=400</i>	111,67 ± 10,33	110,00	80,00 - 140,00	0,79
	AC		111,29 ± 11,14	110,00	90,00 - 150,00	
	CC		110,51 ± 10,26	110,00	90,00 - 130,00	
<i>RR rozkurczowe (mmHg)</i>	AA	RM <i>n=359</i>	69,34 ± 9,86	70,00	50,00 - 90,00	0,12
	AC		67,12 ± 9,81	70,00	50,00 - 100,00	
	CC		67,05 ± 11,45	60,00	50,00 - 90,00	
	AA	IUFD <i>n=61</i>	63,33 ± 6,67	60,00	60,00 - 80,00	0,16
	AC		68,33 ± 13,01	60,00	60,00 - 120,00	
	CC		72,22 ± 13,97	70,00	60,00 - 100,00	
	AA	Grupa kontrolna <i>n=400</i>	70,48 ± 9,08	70,00	50,00 - 90,00	0,80
	AC		70,75 ± 9,42	70,00	50,00 - 95,00	
	CC		69,76 ± 9,09	70,00	50,00 - 90,00	
<i>Wzrost (cm)</i>	AA	RM <i>n=359</i>	165,49 ± 5,70	165,00	150,00 - 179,00	0,63
	AC		166,29 ± 5,48	165,00	153,00 - 178,00	
	CC		165,87 ± 5,39	166,50	154,00 - 174,00	
	AA	IUFD <i>n=61</i>	164,62 ± 9,38	164,00	150,00 - 183,00	0,18
	AC		167,25 ± 5,02	167,00	157,00 - 178,00	
	CC		161,14 ± 4,61	160,00	156,00 - 169,00	
	AA	Grupa kontrolna <i>n=400</i>	166,80 ± 5,17	167,00	150,00 - 178,00	0,13
	AC		165,78 ± 5,62	165,00	150,00 - 180,00	
	CC		167,15 ± 5,55	168,00	152,00 - 178,00	

<i>Masa (kg)</i>	AA	RM <i>n=359</i>	$62,42 \pm 9,80$	62,00	43,00 - 92,00	0,84
	AC		$62,78 \pm 9,14$	61,00	49,00 - 90,00	
	CC		$61,56 \pm 7,76$	64,00	46,00 - 74,00	
	AA	IUFD <i>n=61</i>	$65,65 \pm 13,12$	67,80	48,00 - 99,00	0,68
	AC		$61,49 \pm 8,05$	60,00	50,00 - 81,40	
	CC		$61,93 \pm 16,74$	54,50	44,00 - 92,00	
	AA	Grupa kontrolna <i>n=400</i>	$59,96 \pm 9,35$	58,00	39,00 - 110,00	0,96
	AC		$59,67 \pm 10,16$	58,00	45,00 - 105,00	
	CC		$59,91 \pm 10,30$	57,50	45,00 - 105,00	
<i>BMI (kg/m²)</i>	AA	RM <i>n=359</i>	$22,78 \pm 3,64$	22,21	17,19 - 36,85	0,87
	AC		$22,56 \pm 3,10$	21,63	17,65 - 31,89	
	CC		$22,47 \pm 2,34$	22,72	18,37 - 26,67	
	AA	IUFD <i>n=61</i>	$24,28 \pm 4,99$	23,05	19,37 - 38,67	0,46
	AC		$22,02 \pm 2,82$	21,05	18,65 - 28,40	
	CC		$23,84 \pm 6,40$	21,09	18,03 - 34,21	
	AA	Grupa kontrolna <i>n=400</i>	$21,52 \pm 3,04$	20,71	16,02 - 35,11	0,84
	AC		$21,69 \pm 3,46$	20,76	16,53 - 38,57	
	CC		$21,42 \pm 3,36$	20,67	17,58 - 37,65	

Tabela 75. Dane kliniczne kobiet z badanych grup w zależności od genotypów polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR*.

<i>Analizowana zmienna</i>	<i>MTHFR 1793G>A</i>	<i>Grupa</i>	<i>Średnia ± SD</i>	<i>Mediana</i>	<i>min - max</i>	<i>p</i>	
<i>wiek (lata)</i>	<i>GG</i>	<i>RM n=359</i>	30,97 ± 4,43	31,00	20,00 - 45,00	0,98	
	<i>GA</i>		31,14 ± 4,99	31,00	20,00 - 41,00		
	<i>AA</i>		31,00 ± 0,00	31,00	31,00 - 31,00		
	<i>GG</i>	<i>IUFD n=61</i>	30,17 ± 4,06	31,00	22,00 - 41,00	0,97	
	<i>GA</i>		30,57 ± 3,62	32,00	24,00 - 36,00		
	<i>AA</i>		—	—	—		
		<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	30,08 ± 3,52	30,00	22,00 - 44,00	0,66
		<i>GA</i>		29,90 ± 3,30	30,00	23,00 - 37,00	
		<i>AA</i>		27,00 ± 0,00	27,00	27,00 - 27,00	
<i>RR skurczowe (mmHg)</i>	<i>GG</i>	<i>RM n=359</i>	110,25 ± 12,56	110,00	80,00 - 140,00	0,25	
	<i>GA</i>		107,21 ± 12,86	110,00	80,00 - 130,00		
	<i>AA</i>		100,00 ± 0,00	100,00	100,00 - 100,00		
	<i>GG</i>	<i>IUFD n=61</i>	107,22 ± 9,46	102,50	90,00 - 130,00	0,61	
	<i>GA</i>		111,67 ± 14,62	105,00	100,00 - 140,00		
	<i>AA</i>		—	—	—		
		<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	111,45 ± 10,72	110,00	80,00 - 150,00	0,56
		<i>GA</i>		110,00 ± 10,17	110,00	90,00 - 135,00	
		<i>AA</i>		120,00 ± 0,00	120,00	120,00 - 120,00	
<i>RR rozkurczowe (mmHg)</i>	<i>GG</i>	<i>RM n=359</i>	68,46 ± 10,20	70,00	50,00 - 100,00	0,04	
	<i>GA</i>		65,47 ± 8,68	60,00	50,00 - 85,00		
	<i>AA</i>		50,00 ± 0,00	50,00	50,00 - 50,00		
	<i>GG</i>	<i>IUFD n=61</i>	67,13 ± 11,57	60,00	60,00 - 120,00	0,86	
	<i>GA</i>		70,00 ± 15,28	60,00	60,00 - 100,00		
	<i>AA</i>		—	—	—		
		<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	70,54 ± 9,26	70,00	50,00 - 95,00	0,52
		<i>GA</i>		70,50 ± 8,88	70,00	60,00 - 90,00	
		<i>AA</i>		60,00 ± 0,00	60,00	60,00 - 60,00	
<i>Wzrost (cm)</i>	<i>GG</i>	<i>RM n=359</i>	165,93 ± 5,59	165,00	150,00 - 179,00	0,95	
	<i>GA</i>		165,57 ± 5,41	166,00	157,00 - 174,00		
	<i>AA</i>		165,00 ± 0,00	165,00	165,00 - 165,00		
	<i>GG</i>	<i>IUFD n=61</i>	165,47 ± 7,40	165,00	150,00 - 183,00	0,72	
	<i>GA</i>		162,25 ± 4,82	162,00	156,00 - 169,00		
	<i>AA</i>		—	—	—		
		<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna n=400</i>	166,49 ± 5,45	166,00	150,00 - 180,00	0,61
		<i>GA</i>		165,48 ± 5,28	167,00	155,00 - 175,00	
		<i>AA</i>		168,00 ± 0,00	168,00	168,00 - 168,00	

<i>Masa (kg)</i>	<i>GG</i>	<i>RM</i> <i>n=359</i>	$62,56 \pm 9,04$	62,00	43,00 - 92,00	0,67
	<i>GA</i>		$61,67 \pm 10,80$	56,00	50,00 - 85,00	
	<i>AA</i>		$55,00 \pm 0,00$	55,00	55,00 - 55,00	
	<i>GG</i>	<i>IUFD</i> <i>n=61</i>	$62,98 \pm 12,58$	60,50	44,00 - 99,00	0,97
	<i>GA</i>		$64,63 \pm 10,96$	62,25	54,00 - 80,00	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna</i> <i>n=400</i>	$59,76 \pm 9,52$	58,00	39,00 - 110,00	0,88
	<i>GA</i>		$60,69 \pm 13,03$	57,00	48,00 - 105,00	
	<i>AA</i>		$61,00 \pm 0,00$	61,00	61,00 - 61,00	
<i>BMI (kg/m²)</i>	<i>GG</i>	<i>RM</i> <i>n=359</i>	$22,67 \pm 3,25$	22,01	17,19 - 36,85	0,72
	<i>GA</i>		$22,43 \pm 3,26$	21,88	17,72 - 28,08	
	<i>AA</i>		$20,00 \pm 0,00$	20,20	20,20 - 20,20	
	<i>GG</i>	<i>IUFD</i> <i>n=61</i>	$23,06 \pm 4,60$	21,41	18,03 - 38,67	0,81
	<i>GA</i>		$24,77 \pm 5,32$	23,56	19,08 - 32,87	
	<i>AA</i>		—	—	—	
	<i>GG</i>	<i>Grupa kontrolna</i> <i>n=400</i>	$21,53 \pm 3,16$	20,70	16,02 - 38,57	0,64
	<i>GA</i>		$22,12 \pm 4,34$	20,80	17,99 - 37,65	
	<i>AA</i>		$21,61 \pm 0,00$	21,61	21,61 - 21,61	

DYSKUSJA

Od dawna trombofilia wrodzona i nabyta wskazywana jest jako możliwa przyczyna nawracających niepowodzeń położniczych. Wiele badań sugeruje, że ryzyko wstąpienia poronień nawracających, stanu przedrzucawkowego, zgonu wewnątrzmacicznego, przedwczesnego oddzielenia łożyska, hipotrofii płodu jest zwiększone w grupie kobiet nosicielek zmutowanych wariantów predysponujących do trombofilii wrodzonej [Onderoglu i wsp., 2006, Robertson i wsp., 2006]. Etiopatogeneza wymienionych powikłań związana jest z niedostateczną inwazją trofoblastu do ścian naczyń spiralnych we wczesnych stadiach rozwoju ciąży, co klinicznie manifestuje się w II połowie ciąży. Powikłania szczególnie nasilają się wraz z niedostatecznym przepływem maciczno-łożyskowym na tle wzmożonego procesu prozakrzepowego w przestrzeni międzykosmkowej oraz w naczyniach spiralnych. W ten sposób nakładające się na dysfunkcję śródbłonna naczyń nieprawidłowości w zakresie układu krzepnięcia i fibrynolizy spowodowane obecnością trombofilii wrodzonej i nabytej dodatkowo nasilają zmiany w krążeniu maciczno-łożyskowym [Rambaldi i wsp., 2014]. Skutkuje wystąpieniem powikłań w przebiegu ciąży o niejednokrotnie ciężkim przebiegu [Younis i wsp., 2003, Wintermark i wsp., 2010, Demirel i wsp., 2012, Magnetti i wsp., 2014].

Zarówno obecność czynnika V Leiden, polimorfizmu *20210G>A* protrombiny, hiperhomocysteinemii związanej z obecnością polimorfizmów genu *MTHFR* prowadzą do stanu wzmożonego wykrzepiania i gotowości prozakrzepowej w naczyniach. Dodatkowo również niedobór białka C, białka S i antytrombiny III kojarzony jest z nadkrzepliwością. Prawdopodobnie więc wystąpienie wielu powikłań w ciąży jest wynikiem nałożenia się stanu nadkrzepliwości u ciężarnych, obecności mutacji prozakrzepowych oraz niekorzystnego działania niektórych czynników środowiskowych, jak palenie papierosów, otyłość [Kutteh i wsp., 2006].

Dyskusyjnym problemem pozostaje obserwacja, dlaczego niektóre kobiety nosicielki mutacji prozakrzepowych prezentują powikłania naczyniowe w krążeniu maciczno-łożyskowym i niekorzystny przebieg ciąży, a u niektórych przebieg ciąży pozostaje prawidłowy. W pracach dotyczących tej tematyki wskazuje się niejednokrotnie na możliwy sumaryczny i jednocześnie potencjalizujący efekt współwystępowania polimorfizmów zwiększających aktywność układu krzepnięcia [Coulam i wsp., 2006, Torabi i wsp., 2012]. Może to być również wynikiem współwystępowania nakładających się efektów trombofilii

wrodzonej i nabytej [Martinelli i wsp., 1998, Couto i wsp., 2005, Kumar i wsp., 2015]. Należy również pamiętać o możliwym dodatkowym wpływie czynników środowiskowych. Manifestacja niekorzystnego fenotypu i wystąpienie powikłań prozakrzepowych w ciąży może być również efektem oddziaływania gen-białko hemostazy [Simonidesova i wsp., 2014]. Obecność takich nakładających się mechanizmów w procesie hemostazy powoduje niekorzystne lokalne efekty w krążeniu maciczno-łożyskowym w postaci zwiększonej skłonności do wykrzepiania [Silver i wsp., 2006, Vora i wsp., 2008]. Hemostaza jest kompleksowym procesem, którego patomechanizm nie jest do końca wyjaśniony. Szereg białek hemostazy we krwi matczynej kooperuje z komponentami kaskady krzepnięcia pochodzącymi z trofoblastu zarodka. Udowodniono, że takie współdziałanie jest konieczne dla prawidłowej embriogenezy. Prawdopodobnie białka układu krzepnięcia działają także jako czynniki sygnalizacyjne i regulatorowe w reakcjach immunologicznych, proliferacji komórek, co sugeruje ich działanie nie tylko w obrębie układu krzepnięcia [Kim i wsp., 2003, Johnson i wsp., 2005]. Obecnie brak jest pełnego wyjaśnienia tych złożonych mechanizmów i ich wielokierunkowego działania [Ament i wsp., 2003, McName i wsp., 2012]. Nieprawidłowości układu hemostazy wskazane zostały u części kobiet z nawracającymi niepowodzeniami położniczymi [Said i wsp., 2010, Sottilotta i wsp., 2006, Mitic i wsp., 2010]. Założenia te pozostają w zgodzie z badaniami histopatologicznymi łożysk kobiet nosicielek trombofilii wrodzonych i nabytych, u których zaistniały powyższe powikłania w ciąży. W tej grupie kobiet obserwuje się przede wszystkim ogniska zapalne w łożysku, arterosklerozę naczyń i lokalne zawały łożyska [Tan i wsp., 2002, Ariel i wsp., 2004, Brenner i wsp., 2003, Many i wsp., 2001].

Stąd tak wiele badań ogniskuje się na mechanizmach łączących obecność zmutowanych wariantów genów układu krzepnięcia i fibrynolizy, aktywacji procesów prozakrzepowych w łożysku, wpływie czynników środowiskowych i reakcji gen-białko na proces hemostazy i możliwym wspólnym oddziaływaniu tych wszystkich czynników na przebieg i wynik ciąży.

UDZIAŁ POLIMORFIZMÓW PROZAKRZEPOWYCH W ETIOLOGII PORONIEŃ NAWRACAJĄCYCH POLIMORFIZM *1691G>A* ORAZ POLIMORFIZMU *1328T>C* GENU CZYNNIKA V KRZEPNIĘCIA

Najczęściej badany czynnikiem włączonym w etiologię poronień nawracających jest niewątpliwie mutacja Leiden. Związek pomiędzy czynnikiem Leiden i niekorzystnym przebiegiem ciąży jest przedmiotem wielu badań, jednak ich rezultaty pozostają dyskusyjne. Sugeruje się, że mutacja Leiden jest dominującą przyczyną poronień w I oraz II trymestrze

ciąży, przyczyną utraty płodu u pierwiastek oraz czynnikiem w etiologii poronień niezależnym od innych współistniejących patologii predysponujących do wystąpienia RM. W większości badań dotyczących mutacji Leiden obserwowano ścisły związek tego wariantu genu *FV* z występowaniem poronień, natomiast niektóre analizy nie wskazują na taką korelację.

Foka i wsp. pokazał większą częstość występowania mutacji Leiden wśród kobiet greckich z poronieniami nawracającymi. W badaniu analizowano mutację Leiden, polimorfizm *20210G>A PTM* oraz polimorfizm *677C>T MTHFR*. W grupie badanej RM znalazło się 80 kobiet, natomiast w grupie kontrolnej 100 zdrowych kobiet. Częstość występowania mutacji Leiden wynosiła 19% w grupie RM w porównaniu do 4% w grupie kontrolnej ($p=0,003$). Badanie to ściśle wskazało na możliwy udział mutacji Leiden w etiologii poronień nawracających [Foka i wsp., 2000].

Celem analizy przeprowadzonej przez Krabbendam i wsp. była ocena związku pomiędzy trombofilią a poronieniami nawracającymi. Analizie poddano 11 badań z lat 1995-2005. Wskazano na możliwy związek pomiędzy czynnikiem V Leiden i opornością na aktywowane białko C (APCR) a poronieniami nawracającymi w II trymestrze ciąży. Ponadto wskazano istotnie wyższy poziom homocysteiny u kobiet z wywiadem w kierunku poronień nawracających. Nie wskazano jednak związku pomiędzy polimorfizmem *677C>T MTHFR*, poziomem białka C, białka S oraz antytrombiny III a występowaniem RM. Podobna obserwacja odnosiła się do obecności przeciwciał APL. W badaniu zasugerowano znaczenie podwyższonego poziomu homocysteiny, obecności przeciwciała APL oraz nosicielstwa mutacji Leiden w etiologii poronień nawracających [Krabbendam i wsp., 2005].

Wieloośrodkowa analiza przeprowadzona przez Skrzypczak i wsp., w roku 2012 w grupie 396 pacjentek z co najmniej jedną niewyjaśnioną utratą ciąży w wywiadzie (122 kobiet z 3 i więcej poronieniami wczesnymi, 87 pacjentek z poronieniami późnymi, 46 pacjentek z IUFD) oraz 50 pacjentek z nieobciążonym wywiadem pokazała możliwe znaczenie mutacji Leiden w etiologii niepowodzeń położniczych, szczególnie w etiologii wczesnych i późnych poronień nawracających. Dodatkowo autorzy na podstawie przeprowadzonych badań wskazali na potrzebę skrinningu w kierunku obecności mutacji Leiden w grupie pacjentek z niepowodzeniami położniczymi [Skrzypczak i wsp., 2012].

W publikacji z 2015 roku analizą objęto 9 badań dotyczących znaczenia mutacji Leiden w poronieniach nawracających w I trymestrze ciąży. Analizie poddano 2147 pacjentek (1305 z RM oraz 842 bez powikłań w ciąży). W grupie kobiet z RM wskazano na wyższą częstość występowania mutacji Leiden w porównaniu do grupy kontrolnej ($WR=1,68$).

Autorzy pokazali, że nosicielstwo mutacji Leiden może podwyższać ryzyko wystąpienia niepowodzenia we wczesnej ciąży. Stąd przeprowadzenie testu na obecność mutacji Leiden powinno być rozważone u kobiet z niewyjaśnionymi RM. Ponadto Autorzy sugerują zastosowanie profilaktyki u kobiet z niewyjaśnionymi RM będących jednocześnie nosicielkami mutacji Leiden we wczesnym okresie ciąży [Sergi i wsp., 2015].

W badaniu przeprowadzonym również w 2015 roku w populacji 101 kobiet z Chorwacji z zakrzepicą żył głębokich oraz poronieniami nawracającymi wskazano, że współwystępowanie zmutowanych wariantów mutacji Leiden i polimorfizmu $677C>T$ *MTHFR* związane jest ze zwiększonym ryzykiem poronień oraz zgonu wewnątrzmacicznego. Ponadto czynniki powodujące trombofilię wrodzoną i nabytą występowały 10 razy częściej w grupie kobiet badanych z VTE oraz RM [Lenz i wsp., 2015]. Również w populacji tureckiej kobiet z poronieniami nawracającymi (95 kobiet badanych z RM) pokazano pozytywny związek pomiędzy wystąpieniem tego powikłania a częstością występowania mutacji Leiden oraz polimorfizmu $20210G>A$ *PTM* [Isaoglu i wsp., 2014].

W grupie 84 pacjentek z 3 lub więcej poronieniami nawracającymi analizowano mutację Leiden, polimorfizm $20210G>A$ genu protrombiny oraz mutację $677C>T$ *MTHFR*. Grupę kontrolną stanowiło 69 zdrowych kobiet. Częstość występowania mutacji Leiden wynosiła aż 27,8% w grupie kobiet z RM, co sugeruje, że ten wariant polimorficzny może odgrywać istotną rolę w etiologii RM [Wramsby i wsp., 2000].

W badaniu pochodzącym z populacji kobiet hinduskich z nawracającymi poronieniami wskazano na ścisły związek pomiędzy mutacją Leiden, poziomem przeciwciał APL oraz zwiększonym poziomem czynnika VIII krzepnięcia (FVIII) z opornością na aktywowane białko C (APCR) i poronieniami nawracającymi [Sharma i wsp., 2015]. Czynniki V Leiden występował z częstością 40% u kobiet ze zwiększoną opornością APCR w porównaniu do 18,33% u kobiet z negatywną odpowiedzią w kierunku zwiększonej oporności APCR ($p=0,001$). Średni poziom FVIII różnił się pomiędzy grupą kontrolną i badaną z RM ($p=0,009$). Przeciwciała APL wykazywały statystycznie istotny związek z fenotypem APCR ($p=0,028$). Obserwacji takich nie odnotowano w stosunku do białka C, białka S, poziomu czynnika V krzepnięcia oraz haplotypu HR2 [Sharma i wsp., 2015].

Interesującym zagadnieniem pozostaje udział czynnika ojcowskiego w etiologii nawracających utrat ciąży. Na ten temat na razie niewiele wiadomo, chociaż teoretycznie jasnym jest, że udział obydwu genotypów matczynego i ojcowskiego może być istotnym czynnikiem rozwoju tych powikłań. W badaniu w grupie 200 mężczyzn będących partnerami

kobiet z RM z populacji argentyńskiej oznaczano nosicielstwo mutacji Leiden oraz polimorfizm $20210G>A$ protrombiny. W badaniu zaobserwowano statystycznie istotną przewagę w częstości występowania czynnika V Leiden pomiędzy mężczyznami z par z obciążonym wywiadem położniczym a mężczyznami z par bez obciążenia (16,7% vs. 3,0%, OR=6,47). Związku takiego nie pokazano dla mutacji PTM (2,4% vs. 2,0%). Analiza ta wskazuje, że w etiopatogenezie nawracających utrat ciąż należy brać pod uwagę również wpływ czynnika ojcowskiego [Udry i wsp., 2014].

Inne badania nie sugerują związku trombofilii wrodzonej w zakresie czynnika V Leiden a poronieniami nawracającymi. W badaniu Baumann i wsp. analizowano występowanie trombofilii dziedzicznej (mutacja Leiden, mutacja PTM oraz $677C>T$ *MTHFR*) w grupie kobiet kaukaskich z dwoma lub więcej poronieniami w wywiadzie. Przeprowadzono analizę multicentryczną w grupie 641 pacjentek. Nie obserwowano znaczących różnic pomiędzy grupą badaną (240 pacjentek z dwoma RM oraz 401 pacjentek z 3 i więcej poronieniami) i kontrolną (157 pacjentek). Na podstawie tych badań autorzy wnioskują, że w grupie kobiet kaukaskich mutacja Leiden i mutacja PTM nie korelują z wystąpieniem RM niezależnie od ilości poronień [Baumann i wsp., 2013].

W badaniu populacji kobiet niemieckich z dwoma lub więcej poronieniami nawracającymi analizowano czynnik V Leiden, polimorfizm $20210G>A$ *PTM* oraz polimorfizm $677C>T$ *MTHFR*. Częstość występowania zmutowanych wariantów badanych polimorfizmów była porównywalna pomiędzy badanymi grupami, stąd w badanej grupie kobiet niemieckich nie zaobserwowano korelacji pomiędzy dziedziczną trombofiliją w zakresie badanych wariantów a poronieniami nawracającymi [Pauer i wsp., 2003].

Analizowano również związek pomiędzy czynnikiem Leiden, mutacją *PTM*, polimorfizmami $677C>T$ oraz $1298A>C$ *MTHFR*, polimorfizmem $12548C>T$ antygenu płytkowego (HPA) 1, polimorfizmem $R3500Q$ apolipoproteiny APOB a poronieniami nawracającymi o niewyjaśnionej przyczynie. Grupę badaną kobiet z RM stanowiło 145 kobiet z 3 i więcej następującymi po sobie poronieniami przed 20 tc. Grupę kontrolną stanowiło 101 kobiet po menopauzie z co najmniej dwoma żywymi urodzeniami i bez obciążonego wywiadu w kierunku poronień nawracających. Nie zaobserwowano różnic pomiędzy częstością występowania genotypów i alleli w badanych grupach kobiet, co sugeruje brak istotnego znaczenia badanych wariantów polimorficznych w etiologii poronień [Hohlgeschwandtner i wsp., 2003].

Również autorzy Carp i wsp. nie odnotowali żadnego związku pomiędzy badanymi wariantami polimorfizmów czynnik V Leiden, protrombiny, $677C>T$ *MTHFR* a poronieniami nawracającymi. Analizowano grupę 108 kobiet z RM z 3 i więcej poronieniami (wyodrębniono kobiety z poronieniami w I trym., z poronieniami w I i II trym. w II trym. oraz 82 kobiet bez poronień w wywiadzie położniczym. Ta dokładna analiza nie wykazała korelacji istotnej pomiędzy trombofilią wrodzoną a poronieniami zarówno w I jak i w II trym. ciąży [Carp i wsp., 2002].

Stosunkowo niewiele badań dotyczy polimorfizmu $1328T>C$ genu czynnika V krzepnięcia, który również prawdopodobnie wiąże się z występowaniem powikłań położniczych. W pracy Jaaskelainen i wsp. wykazano związek powyższego wariantu genetycznego ze zwiększonym ryzykiem przedwczesnego oddzielenia łożyska [Jaaskelainen i wsp., 2004]. Z kolei wyniki badanie Watanbae i wsp. sugerują korelację polimorfizmu $1328T>C$ genu czynnika V krzepnięcia z rozwojem ciężkiego stanu przedrzucawkowego [Watanbae i wsp., 2002].

Interesujące badanie przeprowadzono również w populacji kobiet polskich z regionu Małopolski. Grupę badaną stanowiło 136 kobiet z dwoma lub więcej poronieniami, grupę kontrolną natomiast 106 zdrowych kobiet, które urodziły co najmniej jedno zdrowe dziecko. U każdej kobiety oznaczano mutację $1691G>A$ Leiden oraz mutację $1328T>C$ genu V czynnika krzepnięcia. Genotyp heterozygotyczny $1328TC$ występował z większą częstością u kobiet z poronieniami wczesnymi przed 7 tc. Na podstawie badań Autorzy rekomendują skrining w kierunku trombofilii wrodzonej w badanej populacji kobiet [Bałajewicz-Nowak i wsp., 2015].

Również w analizie przeprowadzonej w powyższej dysertacji nie wskazano na bezpośrednie znaczenie polimorfizmów $1691G>A$, jak również badanego polimorfizmu $1328T>C$ genu czynnika V krzepnięcia w etiologii RM. Podziały całej grupy RM na podgrupy względem liczby poronień w wywiadzie oraz tygodnia dokonania poronienia nie pokazały istotnych różnic pomiędzy badanymi podgrupami a grupą kontrolną. Obserwacja ta pozostaje w przeciwieństwie do wyników otrzymanych przez Bałajewicz-Nowak i wsp w populacji kobiet polskich., gdzie Autorzy sugerują znaczenie polimorfizmu $1328T>C$ w etiologii wczesnych poronień do 7 tc. [Bałajewicz-Nowak i wsp., 2015].

POLIMORFIZM *20210G>A* GENU II CZYNNIKA KRZEPNIĘCIA

Dotychczasowe badania dotyczące udziału polimorfizmu *20210G>A* *PTM* w etiologii poronień nawracających nie pokazały jednoznacznych rezultatów [Prat i wsp., 2014]. Foka i wsp. zakwalifikowali do badań 80 pacjentek z wywiadem położniczym obciążonym występowaniem co najmniej dwóch następujących po sobie poronień. Grupę kontrolną stanowiło 100 zdrowych kobiet z brakiem utrat ciąż w wywiadzie. Nosicielkami mutacji *PTM* było 7 kobiet z grupy badanej i 2 z grupy kontrolnej (9,0 vs. 2,0%, $p=0,038$). W podgrupie z poronieniami tylko w I trymestrze obecność mutacji *PTM* odnotowano u 8,1% pacjentek, natomiast w podgrupie z utratami ciąż zarówno w I, jak i II trymestrze – u 10,5% pacjentek, ns [Foka i wsp., 2000].

Kolejnych dowodów na związek polimorfizmu *20210G>A* ze zwiększonym ryzykiem poronień dostarcza analiza Pihusch i wsp. Autorzy badania zaobserwowali występowanie genotypu heterozygotycznego *20210GA* u 6,7% pacjentek należących do grupy badanej 75 kobiet z dwoma lub więcej RM (w porównaniu do 0,8% w grupie kontrolnej) [Pihusch i wsp., 2001]. Również w opracowaniu Reznikoff-Etievan i wsp. dotyczącym populacji francuskiej potwierdzono korelację omawianego polimorfizmu ze zwiększonym ryzykiem nawracających utrat ciąż [Reznikoff-Etievan i wsp., 2001]. W pracy Pietropolli i wsp. pokazano znacząco wyższą częstość występowania czynnika Leiden (10 vs. 3%) oraz mutacji *PTM* (8,0 vs. 2,0%) u kobiet z poronieniami nawracającymi [Pietropolli i wsp., 2014].

Badania dotyczące związku polimorfizmu *20210G>A* genu protrombiny z poronieniami nawracającymi przeprowadzono również w populacji kobiet polskich. W badaniu analizowano częstość wariantów polimorfizmów *20210G>A* oraz *19911A>G* protrombiny w grupie 150 kobiet z 2 i więcej RM w pierwszym trymestrze ciąży (grupa kontrolna to 180 zdrowych kobiet). W grupie RM obserwowano przewagę występowania genotypu heterozygotycznego *20210GA* (2,7 vs. 1,1% w grupie kontrolnej, $WR=2,44$, ns), jak również przewagę allele *20210A* (1,3% vs. 0,6% w kontroli, $WR=2,42$, ns). W przypadku polimorfizmu *19911A>G* obserwowano podobną częstość występowania genotypów i alleli w obydwu badanych grupach kobiet. Badanie sugeruje możliwy związek polimorfizmu *20210G>A* z patomechanizmem RM (ns) [Barlik i wsp., 2013].

Na szczególną uwagę zasługuje metaanaliza obejmująca 37 badań przeprowadzona przez Gao i wsp. w roku 2015. Analiza ta dotyczyła dużej grupy 5400 kobiet z dwoma i więcej

utrata ciąży oraz 4640 kobiet z grupy kontrolnej. Metaanaliza ta pokazała, że obecność polimorfizmu *20210G>A PTM* podwyższa ryzyko wystąpienia utraty ciąży (WR=1,81). (poronień w I oraz w II trymestrze ciąży). Obserwacja ta dotyczy Europejki (1,80) oraz kobiet powyżej 29 roku życia (WR=1,91) [Gao i wsp., 2015].

Również w przedstawianej pracy analiza polimorfizmu *20210G>A* genu czynnika II krzepnięcia zasugerowała możliwe znaczenie genotypu heterozygotycznego *20210GA PTM* w grupie kobiet z poronieniami nawracającymi RM (genotyp *20210GA*: 3,34 vs. 1,50% w grupie kontrolnej, WR=1,50, p=0,08). Ponadto analiza grupy RM z podziałem na podgrupy pod względem liczby poronień wskazała na znaczenie tego polimorfizmu u kobiet z 2 i więcej poronieniami (genotyp *20210GA* w grupie 2 RM: 3,55 vs. 1,50% w grupie kontrolnej, WR=2,41, p=0,07) oraz w podgrupie ≥ 3 RM: 2,60 vs. 1,50% w grupie kontrolnej, WR=1,75, ns). Dodatkowo w czasie analizy grupy RM z podziałem pod względem czasu wystąpienia poronienia odnotowano możliwą rolę tego polimorfizmu w etiologii poronień wczesnych (genotyp *20210GA* w podgrupie RM<13 tc.: 2,97 vs. 1,50% w grupie kontrolnej, WR=2,01, ns oraz poronień późnych (w podgrupie RM 13-22 tc.: 5,36 vs. 1,50% w grupie kontrolnej, WR=3,72, p=0,09).

Nieco innych wniosków dostarcza analiza przeprowadzona przez Kutteh i wsp. Grupa ta nie odnotowała istotnie częstszego występowania mutacji *PTM* u 50 pacjentek z wczesnymi poronieniami nawracającymi w porównaniu do grupy kontrolnej [Kutteh i wsp., 1999]. Natomiast w badaniu Carp i wsp. odnotowano niższą częstość występowania polimorfizmu *20210G>A* w grupie pacjentek z trzema i więcej poronieniami w porównaniu do grupy kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym. Jednak po dokonaniu podziału całej grupy badanej na dwie podgrupy – z poronieniami tylko w I trymestrze oraz z poronieniami w I oraz II trymestrze zaobserwowano wyższą częstość badanego polimorfizmu w drugiej wyodrębnionej podgrupie [Carp i wsp., 2002].

W analizie Pickering i wsp. do grupy badanej włączono 122 pacjentki z 3 i więcej następującymi po sobie poronieniami oraz 66 kobiet stanowiących grupę kontrolną. Również w tym badaniu nie odnotowano istotnie zwiększonego odsetka występowania mutacji *PTM* u kobiet z obciążonym wywiadem położniczym [Pickering i wsp., 2001].

Badania dotyczące grupy kobiet irańskich (90 kobiet z 3 i więcej poronieniami następującymi po sobie <20 tc., pozostające w związku z tym samym partnerem) nie pokazały związku mutacji Leiden i mutacji *PTM* z poronieniami nawracającymi. Pokazały natomiast znaczenie niedoboru białka S w etiologii poronień nawracających [Parand i wsp., 2013]. Również w badaniu populacji kobiet brazylijskich (145 kobiet z dwoma i więcej poronieniami oraz 135 kobiet z dwoma i więcej urodzeniami zdrowego dziecka) nie wskazano związku pomiędzy polimorfizmami *1691G>A* genu *FVL* oraz *20210G>A* genu *FII* [Dutra i wsp., 2014].

POLIMORFIZM *R353Q* GENU CZYNNIKA VII KRZEPNIĘCIA

Stężenie i aktywność osoczowa czynnika VII krzepnięcia są potencjalnymi czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych o etiologii zakrzepowej. U osób będących nosicielami zmutowanego allela *Gln353* obserwuje się spadek stężenia i aktywności czynnika VII w osoczu, co wiąże się ze spadkiem ryzyka rozwoju chorób o podłożu zakrzepowym [Mrozikiewicz 2000]. W związku z tym doniesienia z zakresu kardiologii dotyczące związku polimorfizmów genu czynnika VII krzepnięcia z ryzykiem wystąpienia zawału serca i innych incydentów naczyniowych stały się podstawą licznych hipotez badawczych z dziedziny położnictwa. Genetycznie uwarunkowane zaburzenia w aktywności czynnika VII krzepnięcia prawdopodobnie mogą być zaangażowane w niektóre powikłania w przebiegu ciąży. Badania dotyczą głównie związku tych wariantów genetycznych czynnika FVII z trombofilią wrodzoną i występowaniem poronień nawracających. Niestety liczba badań dotyczących możliwego znaczenia różnic w aktywności czynnika VII krzepnięcia w etiologii poronień nawracających jest stosunkowo mała.

Analiza Seremak-Mrozikiewicz i wsp. dotyczy związku polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia z ryzykiem występowania poronień nawracających (104 kobiety z RM pomiędzy 6-13 tc. oraz 163 zdrowe kobiety). Otrzymane przez autorów wyniki wskazują na związek powyższego polimorfizmu z ryzykiem nawracających utrat ciąży. Zaproponowano prawdopodobną ochronną rolę zmutowanego allela *Gln353* w stosunku do występowania poronień [Seremak-Mrozikiewicz i wsp., 2009].

Badania dotyczące polimorfizmu *-323P0/P10* genu czynnika VII krzepnięcia dotyczą głównie jego udziału w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. Wyniki niektórych badań sugerują protekcyjną rolę zmutowanego allela *-323P10* w stosunku do rozwoju choroby

niedokrwiennej serca, inne, przeciwnie – dowodzą jego udziału w zwiększeniu ryzyka wystąpienia m.in. zawału serca [Sakowicz i wsp., 2010, Mo i wsp., 2011]. Analiza dostępnej ogólnościowej literatury pozwala stwierdzić, że jedyną próbę oceny związku polimorfizmu $-323P0/P10$ genu czynnika VII krzepnięcia z ryzykiem występowania poronień nawracających podjęto w pracy Barlik i wsp. [Barlik i wsp., 2014]. W pracy tej do grupy badanej włączono 152 kobiety z wywiadem obciążonym wystąpieniem co najmniej dwóch poronień. Grupę kontrolną stanowiło natomiast 180 kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym. Zaobserwowano wyższą częstość genotypu $P0/P0$ oraz niższą $P0/P10$ w grupie badanej w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej. Obserwowano niższą częstość genotypu $P0/P10$ w grupie badanej RM w porównaniu do kontroli ($P0/P10$: 18,42 vs. 22,78% w kontroli, $p=0,20$). Odnotowano również niższą częstość występowania genotypu $P0/P10$ oraz allele $P10$ w podgrupie kobiet z 3 i więcej RM w porównaniu do kontroli ($P0/P10$: 13,16 vs. 22,78%, $p=0,13$; $P10$: 11,94 vs. 6,58%, $p=0,12$). Analiza otrzymanych wyników pozwoliła na założenie, że zmutowany insercyjny allel $-323P10$ być może odgrywa ochronną rolę w stosunku do występowania poronień nawracających u kobiet z 3 i więcej niepowodzeniami w przebiegu ciąży [Barlik i wsp., 2014].

W powyższej dysertacji nie wskazano na bezpośrednie znaczenie polimorfizmu $R353Q$ ($11496G>A$) genu czynnika VII krzepnięcia w całej grupie RM kobiet z populacji polskiej. W przypadku podziału grupy RM pod względem liczby poronień stwierdzono podobny rozkład wariantów genetycznych we obydwu analizowanych podgrupach oraz w grupie kontrolnej. Jednak interesującym faktem pozostaje odnotowanie istotnego znaczenia genotypu niezmutowanego $353RR$ ($11496GG$) w przypadku późnych poronień 13-22 tc. (87,50 vs. 75,50% w grupie kontrolnej, $WR=2,27$, $p=0,03$).

W pracy van't Hooft i wsp. wykazano, że polimorfizmy $-402G>A$ oraz $-401G>T$ genu czynnika VII są związane z poziomem transkrypcji genu oraz wpływają na zmianę osoczonego stężenia czynnika VII. Zaobserwowano związek pomiędzy powyższymi polimorfizmami a całkowitym stężeniem oraz stężeniem aktywowanego czynnika VII w osoczu [van't Hooft i wsp., 1999]. Nasuwa się więc sugestia udziału tych wariantów genetycznych w zwiększaniu ryzyka występowania poronień nawracających na tle zmian zakrzepowych. Obecność allele $-401T$ wiąże się ze znacznym zmniejszeniem nasilenia transkrypcji genu czynnika VII i obniżeniem stężenia czynnika VII. Z kolei nasilający transkrypcję wpływ allele $-402A$ jest stosunkowo słaby. Na poziomie populacyjnym

ostateczny skutek obecności polimorfizmów $-402G>A$ oraz $-401G>T$ jest porównywalny z uwagi na 3-krotnie częstsze występowanie allela $-402A$. Sugeruje się, że te warianty genetyczne modulują wiązanie białek jądrowych do promotora genu czynnika VII w hepatocytach, zmieniając tym samym jego ekspresję. Skutkuje to zmniejszonym (allel $-401T$) lub zwiększonym (allel $-402A$) stężeniem czynnika VII w osoczu [van't Hooft i wsp., 1999].

Problem związku zwiększonego stężenia i aktywności czynnika VII z występowaniem powikłań położniczych został przedstawiony m.in. w analizie Miller i wsp. Badacze ocenili aktywność czynnika VII (FVII:C) u 65 kobiet z 3 i więcej poronieniami (grupa RM), 31 kobiet z jedną utratą ciąży w II lub III trymestrze ciąży oraz 81 kobiet z żywym urodzeniem (grupa kontrolna). Jest to jedno z pierwszych badań wskazujące na znaczenie podwyższonego poziomu FVII w etiologii poronień nawracających i utrat w późnej ciąży. Aktywność czynnika VII - FVII:C była większa niż w całej grupie badanej (13,8 vs. 2,5%, WR=6,35, $p=0,012$). W przypadku poronień nawracających średni poziom FVII:C był znacząco wyższy w porównaniu do kontroli ($p=0,003$), FVII antygen ($p=0,024$) oraz FVIIa ($p=0,001$). W grupie kobiet z utratami ciąż w II oraz III trymestrze WR=4,23, chociaż różnice nie były statystycznie istotne pomiędzy grupą badaną a kontrolną dla FVII:C, FVII antygen oraz FVIIa. W przypadku polimorfizmu $-402G>A$ FVII nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych w częstości występowania genotypów i alleli pomiędzy grupami badanymi a grupą kontrolną. Jednakże badany polimorfizm $-402G>A$ FVII obserwowano u 11/14 osób z podwyższonym poziomem FVII:C (79%) oraz u 43% kobiet z prawidłowym poziomem FVII:C ($p=0,029$). Poziom FVII:C, FVII antygen oraz aktywność FVIIa pozostawała w związku z nosicielstwem poszczególnych genotypów czynnika FVII. Otrzymane wyniki wyraźnie wskazywały na wyższą aktywność osoczną czynnika VII u pacjentek z obciążonym wywiadem położniczym [Miller i wsp., 2005].

POLIMORFIZM $677C>T$, $1298A>C$ ORAZ $1793G>A$ GENU *MTHFR* W ETIOLOGII RM

Wiele badań wskazuje na możliwy udział polimorfizmów $677C>T$, $1298A>C$ oraz $1793G>A$ genu *MTHFR* w etiologii RM.

W badaniu wielośrodkowym analizowano znaczenie trombofilii wrodzonej w grupie 641 pacjentek z RM (2 lub więcej następujących po sobie poronień). – 240 pacjentek z 2 poronieniami oraz 401 z 3 i więcej poronieniami. Grupę kontrolną stanowiło 157 zdrowych kobiet bez obciążonego wywiadu położniczego. Analiza pokazała, że genotyp homozygotyczny $677TT$ występował z większą częstością w grupie z 3 i więcej poronieniami

w porównaniu do grupy kontrolnej (13,9 vs. 7,9%, $p=0,02$). Analiza ta sugeruje, że w rasie kaukaskiej polimorfizm *MTHFR* może odgrywać rolę w etiologii poronień [Baumann i wsp., 2013].

W badaniu Parveeni i wsp., analizowano udział polimorfizmów $677C>T$, $1298A>C$ genu *MTHFR* oraz $1958G>A$ genu *MTHFD* w etiologii RM. Do badania włączono 200 pacjentek (2 i więcej poronień) oraz 300 zdrowych pacjentek z grupy kontrolnej. Badanie wskazało na wpływ polimorfizmu $677C>T$ *MTHFR* ($WR=2,54$, $p=0,014$), $1298A>C$ *MTHFR* ($WR=2,23$, $p=0,028$) oraz $1958G>A$ *MTHFD* ($WR=2,36$, $p=0,002$) na występowanie poronień. Jednocześnie badanie to sugeruje wieloczynnikowe uwarunkowanie występowania poronień nawracających [Parveeni i wsp., 2013].

Metaanaliza (1080 kobiet) dotycząca polimorfizmu $1298A>C$ genu *MTHFR* obejmowała 4 badania w grupie kobiet z RM i 3 badania obejmujące grupy kobiet z poronieniami samoistnymi. Jednocześnie autorzy analizowali własne grupy 129 pacjentek z RM oraz 202 zdrowych kobiet z ciążami zakończonymi o czasie w wywiadzie. W badaniu obserwowano znacząco wyższą częstość występowania zmutowanego allele $1298C$, heterozygotycznego genotypu $1298AC$ oraz zmutowanego genotypu $1298CC$ w grupie kobiet z RM. Metaanaliza w grupach z RM oraz w grupach z poronieniami samoistnymi pokazała większe ryzyko poronienia u nosicielek genotypów $1298AC$ oraz $1298CC$. Dane te sugerują istotną rolę polimorfizmu $1298A>C$ *MTHFR* w etiologii RM [Nair i wsp., 2013].

W badaniu w populacji kobiet hinduskich podjęto próbę oceny roli polimorfizmu $677C>T$ *MTHFR* w powiązaniu z rolą witaminy B12 oraz metabolizmu folianów w etiologii poronień nawracających. Do badania włączono 107 kobiet z 3 i więcej RM o niewyjaśnionej etiologii, następującymi po sobie oraz 343 kobiet z 2 i więcej zdrowymi donoszonymi ciążami w wywiadzie. Dodatkowo oznaczano poziom homocysteiny, folianów oraz witaminy B12 w surowicy. Rozkład genotypów polimorfizmu $677C>T$ *MTHFR* nie pokazał różnic pomiędzy badanymi grupami. Jednakże polimorfizm $677C>T$ *MTHFR* znacząco korelował z wzrostem stężenia homocysteiny w grupie z RM ($p=0,031$). Hiperhomocysteinemia ($WR=7,2$) oraz niedobór witaminy B12 znacząco korelowały z występowaniem RM ($WR=16,39$). Ta analiza wyraźnie pokazuje związek niedoboru witaminy B12, hiperhomocysteinemii z występowaniem RM, szczególnie u matek nosicielek zmutowanego allele $677T$ [Puri i wsp., 2013].

W 2012 roku przeprowadzono metaanalizę obejmującą 2427 kobiet z RM oraz 3118 kobiet zdrowych z grupy kontrolnej. Metaanaliza ta, uwzględniająca także pochodzenie etniczne, wykazała w odniesieniu do całej badanej grupy, że nosiciele genotypu

homozygotycznego zmutowanego *677TT* mają zwiększone ryzyko wystąpienia RM (WR=1,574, p=0,003). Również u Azjatów ryzyko to pozostawało zwiększone (WR=1,663, p=0,045). Natomiast wśród populacji kaukaskiej nie zasugerowano takiego związku (WR=1,269, p=0,155). Analiza w podgrupie z 3 i więcej poronieniami pokazała istotny wpływ genotypu homozygotycznego *677TT* vs. *677CT* + *677CT* (WR=1,792, p=0,005) na występowanie poronień. Podtrzymuje to pogląd, że udział polimorfizmu *677C>T MTHFR* w etiologii poronień nawracających jest znaczący, szczególnie w populacjach rasy azjatyckiej [Wu i wsp., 2012].

W innym jeszcze badaniu włączono 106 kobiet z 3 i więcej poronieniami oraz 140 kobiet zdrowych. W tych grupach kobiet analizowano polimorfizm *677C>T* genu *MTHFR*. Częstość występowania zmutowanego allela *677T* (WR=2,20, p=0,003) oraz genotypu homozygotycznego zmutowanego *677TT* (WR=6,30, p=0,02) w grupie RM była znacząco wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej. W badaniu pokazano na znaczenie nosicielstwa zmutowanych alleli i genotypów genu *MTHFR* w etiologii RM [Nair i wsp., 2012].

Ciekawe badanie przeprowadzono w populacji kobiet polskich (104 kobiety z 3 i więcej RM w I trymestrze ciąży oraz 169 zdrowych kobiet bez powikłań położniczych, z urodzeniem co najmniej jednego zdrowego noworodka w wywiadzie). W badaniu tym analizowano polimorfizm *677C>T*, *1298A>C* oraz *1793G>A* genu *MTHFR*. Obserwowano wyższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego *1793GA* w grupie kobiet z RM (15,38% vs. 4,14% w grupie kontrolnej, WR=4,21, p=0,003). Nie obserwowano różnic statystycznie istotnych pomiędzy grupami w przypadku polimorfizmu *677C>T* oraz *1298A>C MTHFR*. Badanie to pokazuje istotną rolę polimorfizmu *1793G>A MTHFR* w etiologii RM [Seremak-Mrozikiewicz i wsp., 2010].

Niektóre interesujące badania analizują także udział nosicielstwa zmutowanych wariantów *677C>T MTHFR* u ojców i ich możliwy wpływ na występowanie RM u tej samej pary rodzicielskiej. W badaniu obejmującym pary z niepowodzeniami położniczymi zamieszkujące południowo-zachodni region Indii oceniano 15 par z 2 i poronieniami nawracającymi. W grupie kontrolnej znalazło się 15 par z niepowikłaną historią położniczą, które miały dwoje lub więcej dzieci i bez wywiadu obciążonego w kierunku poronień. W przypadku par z obciążonym wywiadem częstość występowania genotypu homozygotycznego zmutowanego *677TT* wynosiła 6,67% vs. 0.0% w grupie kontrolnej. Odnotowano wysoką częstość występowania zmutowanego allela *677T* u partnerów par z RM, co wskazuje na możliwy wpływ polimorfizmu *677C>T* także u mężczyzn oraz na

potrzebę skrinningu zarówno kobiet, jak i mężczyzn z par obciążonych RM w kierunku polimorfizmu $677C>T$ genu *MTHFR* [Vanilla i wsp., 2015].

W niektórych analizach pokazano, że wysoki poziom homocysteiny w surowicy koreluje z występowaniem poronień. Jednocześnie poziom ten jest związany z polimorfizmem genu *MTHFR*, enzymu uczestniczącego w przemianie folianów i cyklu metionina-homocysteina. Znaczenie polimorfizmu $677C>T$ *MTHFR* badano w metaanalizie obejmującej 3559 kobiet z niewyjaśnionymi RM oraz 5097 zdrowych kobiet. Współczynnik ryzyka wynosił $WR=1,68$, dla $677TT$ vs. $677CC + 677CT$ ($p<0,0001$), $WR=1,35$ dla porównania genotypów $677TT + 677CT$ vs. $677CC$ ($p=0,0224$) oraz $WR=1,34$ dla alleli $677T$ vs. $677C$ ($p<0,0001$). Szczególnie silny związek polimorfizmu *MTHFR* $677C>T$ z występowaniem RM pokazano dla populacji wschodnio-azjatyckiej ($WR=2,11$ dla $677TT$ vs. $677CC + 677CT$, $p=0,0004$ oraz $WR=1,53$ dla $677T$ vs. $677C$, $p<0,0001$), Związku takiego nie wykazano dla populacji rasy kaukaskiej [Cao i wsp., 2013a].

Jednocześnie ci sami autorzy podjęli analizę znaczenia polimorfizmu $1298A>C$ *MTHFR* w etiologii RM. Metaanaliza objęła 1163 kobiet z RM oraz 1061 zdrowych kobiet. Przy porównaniu genotypów $1298CC$ vs. $1298AA + 1298AC$ współczynnik ryzyka wynosił $WR=1,37$ ($p=0,3456$), przy porównaniu genotypów $1298CC + 1298AC$ vs. $1298AA$ współczynnik ryzyka wynosił $WR=1,16$ ($p=0,0833$) oraz dla porównania alleli $1298C$ vs. $1298A$ wartość ta wynosiła $WR=1,04$ ($p=0,7112$). Wyniki te nie pokazują znaczącego związku polimorfizmu $1298A>C$ *MTHFR* z występowaniem RM [Cao i wsp., 2013b].

Odmienne od większości badań niektóre analizy sugerują brak związku polimorfizmów genu *MTHFR* z etiologią RM. Pietropolli i wsp. analizowali polimorfizm $677C>T$ w grupie 186 kobiet z RM oraz 129 zdrowych kobiet. Nie znaleziono różnic istotnych statystycznie pomiędzy częstością występowania wariantów polimorficznych $677C>T$ *MTHFR* pomiędzy badanymi grupami [Pietropolli i wsp., 2014]. Również w badaniu Poursadegh i wsp. nie odnotowano związku wariantów polimorficznych genu *MTHFR* z występowaniem RM. W badaniu analizowano 89 kobiet z 2 i więcej następującymi po sobie RM oraz 50 zdrowych kobiet. Nie zaobserwowano różnic w częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu $677C>T$ *MTHFR* ($p=0,285$), jak również polimorfizmu $1298A>C$ *MTHFR* ($p=0,175$) [Poursadegh i wsp., 2012].

W powyższej dysertacji nie odnotowano znaczenia polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR* w etiologii poronień RM w analizowanej populacji kobiet polskich. Analiza polimorfizmu *677C>T* po dokonanej podziale całej grupy RM pod względem liczby i czasu wystąpienia poronień także nie pokazała żadnych różnic statystycznie istotnych pomiędzy badanymi podgrupami z RPL i grupą kontrolną kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym. Również w trakcie analizy polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR* nie zaobserwowano znaczenia tego wariantu w patomechanizmie poronień nawracających RM, również po podziale na poronienia wczesne oraz późne, jak również po podziale pod względem liczby poronień.

W przedstawianej rozprawie wskazano natomiast na istotny udział polimorfizmu *1793G>A* genu *MTHFR* w etiologii poronień nawracających (genotyp heterozygotyczny *1793GA*: 11,98 vs. 7,75% w grupie kontrolnej, WR=1,62, p=0,03, allel *1793A*: 6,27 vs. 4,13%, WR=1,55, p=0,04). Analiza wskazała również na znaczenie tego wariantu u kobiet z 2 RM (genotyp heterozygotyczny *1793GA*: 12,77 vs. 7,75% w grupie kontrolnej, WR=1,74, p=0,02, allel *1793A*: 6,74 vs. 4,13% w grupie kontrolnej, WR=1,68, p=0,02) oraz w etiologii wczesnych poronień <13 tc. (genotyp heterozygotyczny *1793GA*: 12,21 vs. 7,75% w grupie kontrolnej, WR=1,66, p=0,03, allel *1793A*: 6,44 vs. 4,13%, WR=1,60, p=0,03).

Bardzo dużym wielośrodkowym badaniem obejmującym prawie wszystkie omawiane powyżej polimorfizmy jest metaanaliza przeprowadzona w 2006 roku przez Robertsona i wsp. Obejmuje ona 25 badań dotyczących poronień we wczesnym okresie ciąży, poronień nawracających w I trymestrze ciąży oraz późnych utrat ciąży. W badaniu tym wskazano na istotne znaczenie obecności zmutowanych wariantów polimorfizmu *1691G>A FV* oraz *20210G>A FII* w etiologii poronień nawracających w I trymestrze ciąży oraz późnych utrat ciąży. Zwrócono również uwagę na znaczenie hiperhomocysteinemii nabytej w etiologii utrat ciąży w I trymestrze ciąży. Dodatkowo ciekawym spostrzeżeniem jest związek obecności przeciwciała kardiolipinowych z występowaniem poronień w I trymestrze ciąży oraz późnych utrat ciąży. Warto również zwrócić uwagę na możliwe znaczenie niedoboru białka S w etiologii późnych utrat ciąży w tej metaanalizie (tab. 76) [Robertson i wsp., 2006].

Tabela. 76. Analiza udziału trombofilii wrodzonej w RPL [Robertson i wsp. 2006].

	<i>Powikłania</i>	<i>Badania</i>		<i>OR</i>	<i>95% PU</i>
<i>Robertson et al., Br J Haematol 2006</i>	Poronienia we wczesnej ciąży	25	<i>1691AA Leiden</i>	2,71	1,32-5,58
			<i>1691GA Leiden</i>	1,68	1,09-2,58
			<i>20210GA PTM</i>	2,49	1,24-5,00
			<i>aCL</i>	3,40	1,33-8,68
			<i>Nabyta HHcy</i>	6,25	1,37-28,42
	Nawracające utraty ciąży w I trym.	21	<i>1691GA Leiden</i>	1,91	1,37-5,34
			<i>20210GA PTM</i>	2,70	0,44-1,69
			<i>677TT MTHFR</i>	0,86	1,28-13,87
			<i>Nabyta HHcy</i>	4,21	1,10-3,86
	Późne utraty ciąży	15	<i>1691GA Leiden</i>	2,06	1,10-3,86
			<i>20210GA PTM</i>	2,66	1,28-5,53
			<i>Niedobór białka S</i>	20,09	3,70-109,15
			<i>aCL</i>	3,30	1,62-6,70

INNE POLIMORFIZMY KASKADY KRZEPNIĘCIA I FIBRYNOLIZY A ETIOLOGIA PORONIEŃ NAWRACAJĄCYCH

W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań dotyczących udziału polimorfizmów genetycznych w etiologii RPL. Badania te dotyczą najczęściej polimorfizmów genów związanych z układem krzepnięcia i fibrynolizy, i oprócz badanych najczęściej genów czynnika V oraz II, obejmują również warianty innych genów czynników krzepnięcia i fibrynolizy [Simonisedova i wsp., 2014].

Stosunkowo dużo badań dotyczy czynnika XII, XII oraz inhibitora aktywatora plazminogenu - 1 (PAI-1 - *plasminogen activator inhibitor-1*), które to czynniki pełnią ważną rolę w kaskadzie krzepnięcia i fibrynolizy. Inhibitor aktywatora plazminogenu - 1 jest głównym fizjologicznym inhibitorem tkankowego aktywatora plasminogenu (tPA - *tissue plasminogen activator*) i aktywatora plazminogenu typu urokinazy (uPA - *urokinase plasminogen activator*). Pełni kluczową rolę w procesie fibrynolizy, a jego zwiększone stężenie może skutkować rozwojem trombofilii. Gen kodujący PAI-1 leży na krótkim ramieniu chromosomu 7 (7q21,3-22, długość 12,5 kpz), zbudowany jest z 9 eksonów oraz 8 intronów, eksony mają długość od 84 do 1871 pz. Polimorfizm -675 4G/5G genu PAI-1 jest polimorfizmem typu insercja/delecja nukleotydu guaninowego (G) w odcinku promotorowym genu. Homozygotyczność -675 4G/-675 4G) koreluje ze zwiększonym stężeniem PAI-1 w surowicy i z obniżeniem nasilenia fibrynolizy. Sugeruje się bezpośredni wpływ tego polimorfizmu na kontrolę ekspresji genu *PAI-1*. Obecność powyższego wariantu genetycznego analizuje się pod kątem zwiększonego ryzyka występowania stanu przedrzucawkowego, nadciśnienia ciążowego, wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu, obumarcia wewnątrzmacicznego czy poronień nawracających [Glueck i wsp., 2001, Yamada i wsp., 2000, Morgan i wsp., 2013].

W pracy Asano i wsp. analizowano możliwy związek polimorfizmu 46C>T genu czynnika XII krzepnięcia z wstępowaniem nawracających utrat ciąż. Do badania włączono 279 pacjentek z dwoma lub więcej następującymi po sobie, niewyjaśnionymi poronieniami oraz 100 zdrowych kobiet stanowiących grupę kontrolną. Wszystkie pacjentki poddano genotypowaniu pod kątem powyższego wariantu genetycznego oraz dodatkowo u każdej z kobiet oceniono stężenie i aktywność czynnika XII. Otrzymane wyniki wskazywały na brak związku osoczowej aktywności czynnika XII ze zwiększonym ryzykiem nawracających utrat ciąż. Jednak zwrócono uwagę na porównywalny do czynnika V Leiden efekt obecności

polimorfizmu $46C>T$ genu czynnika XII krzepnięcia w aspekcie występowania poronień [Asano i wsp., 2014].

Celem pracy Elmahqoub i wsp. była ocena możliwego związku pomiędzy występowaniem polimorfizmów $Val34Leu$ genu czynnika XIII krzepnięcia oraz $4G/5G$ genu $PAI-1$ a poronieniami nawracającymi w populacji kobiet z Egiptu. Do badania zakwalifikowano 120 pacjentek z wywiadem obciążonym poronieniami nawracającymi oraz 130 kobiet stanowiących grupę kontrolną. Wśród kobiet z grupy badanej 67,5% było nosicielkami genotypu typu dzikiego genu czynnika XII krzepnięcia, 21,7% było heterozygotami, natomiast 10,8% stanowiły homozygoty. Z kolei w grupie kontrolnej wartości te przedstawiały się następująco: 89,2%, 8,5% oraz 2,3%. Dodatkowo porównanie pod kątem częstości występowania alleli $34Leu$ oraz $4G$ pomiędzy obiema badanymi grupami wykazało statystycznie istotne różnice. Poronienia nawracające obserwowano częściej u kobiet będących nosicielkami obydwu zmutowanych wariantów genetycznych. Sugeruje się, że powyższy polimorfizm genu czynnika XIII krzepnięcia pośrednio modyfikuje strukturę fibryny, która w efekcie staje się oporna na fibrylizację [Elmahqoub i wsp., 2014].

W badaniu obejmującym kobiety z populacji irańskiej pokazano związek polimorfizmu $4G/5G$ genu $PAI-1$ oraz polimorfizmu I/D genu ACE z występowaniem poronień nawracających [Shakarami i wsp., 2015]. W innym natomiast badaniu przeprowadzonym w populacji 227 kobiet koreańskich nie wskazano na udział tych samych polimorfizmów w etiologii RM [Kim i wsp., 2014].

Polimorfizm $-844G>A$ jest zlokalizowany w odcinku promotorowym genu inhibitora aktywatora plazminogenu-1 i dotyczy substytucji guaniny na adeninę. Również ten wariant genetyczny rozpatruje się w aspekcie zwiększonego ryzyka występowania nawracających utrat ciąży. Co więcej sugeruje się, że hipofibrynolityczny genotyp $-844AA$ jest związany ze zwiększonym ryzykiem rozwoju stanu przedrzucawkowego [Fabbro i wsp., 2003].

Polimorfizm $HindIII C>G$ znajduje się w odcinku 3' UTR (*untranslated region*) genu $PAI-1$. Polimorfizm ten polega na substytucji cytozyny na guaninę. Obecność allela $HindIII G$ wpływa na regulację translacji genu $PAI-1$, czego efektem może być zwiększenie stężenia $PAI-1$ w surowicy krwi, a tym samym rozwój stanu prozakrzepowego [De la Cruz-Mosso i wsp., 2012].

ZNACZENIE TROMBOFILII WRODZONEJ W ETIOLOGII IUFD

Zgon wewnątrzmaciczny płodu w II połowie ciąży jest bardzo traumatycznym doświadczeniem dla obydwójga rodziców. Powikłanie to wymaga wyjaśnienia przyczyny, jak również wdrożenia właściwego postępowania w celu poprawy przebiegu przyszłych ciąż. W większości przypadków trudno zdefiniować bezpośrednią przyczynę zgonu płodu. Najczęściej przyczyna jest złożona i dochodzi do nakładania się działania kilku niekorzystnych czynników w ciąży. Liczne badania skupiają się na określeniu udziału czynników prozakrzepowych w etiologii zgonu wewnątrzmacicznego w II połowie ciąży [Werner i wsp., 2010, Lamont i wsp., 2015].

W badaniu przeprowadzonym w populacji islandzkiej analizą objęto 105 kobiet z wywiadem obciążonym w kierunku IUFD po 22 tc. oraz 262 kobiety, które urodziły co najmniej jedno zdrowe donoszone dziecko. W badaniu tym określano obecność mutacji Leiden oraz *20210G>A PTM*, niedoboru białka C, białka S oraz antytrombiny III. U 18,4% pacjentek z IUFD oznaczono obecność co najmniej jednego czynnika będącego przyczyną trombofilii wrodzonej (18,4 vs. 11,8% w grupie kontrolnej, WR=1,7). Najciekawszą obserwacją była silna korelacja polimorfizmu *20210G>A* z wystąpieniem IUFD (WR=4,0). Obserwacji takiej nie potwierdzono w przypadku mutacji Leiden, niedoboru ATIII, białka S oraz białka C [Helgadottir i wsp., 2011].

W prospektywnym, wieloośrodkowym badaniu analizowano 171 matek z IUFD oraz 326 zdrowych kobiet z co najmniej jedną ciążą ukończoną urodzeniem zdrowego noworodka. W przypadku 64 kobiet z IUFD obserwowano zaburzenia naczyniowe w łożysku, co związane było z następującymi powikłaniami: stan przedrzucawkowy, hipotrofia płodu oraz przedwczesne oddzielenie łożyska. W pozostałych przypadkach nie wskazano bezpośredniej przyczyny wystąpienia IUFD. U wszystkich kobiet analizowano nosicielstwo mutacji Leiden, mutacji *PTM*, niedoboru ATIII oraz trombofilii nabytej. Częstość występowania defektów trombotycznych była wyższa w grupie z IUFD w porównaniu do grupy kontrolnej. Ścisły związek z IUFD zaobserwowano w przypadku mutacji *PTM* (WR=3,2, p=0,01). Mutacja ta szczególnie silnie korelowała z występowaniem IUFD u kobiet, u których już w poprzednich ciążach odnotowano IUFD (WR=8,9). Badanie to sugeruje, że mutacja *PTM* jest szczególnie związana z występowaniem IUFD, jak również z nawracającymi utratami ciąż w późnym jej okresie trwania [Monari i wsp., 2012].

W prospektywnym kohortowym badaniu podjęto próbą charakterystyki czynników łożyskowych mających wpływ na wystąpienie IUFD oraz znaczenia trombofilii w

mechanizmie powikłań naczyniowych związanych z IUFD. Do badania włączano kobiety w ciąży pojedynczej, u których epizod IUFD wystąpił po 20 tc. (67 kobiet). Przeprowadzono skrinning w kierunku trombofilii wrodzonej oraz nabytej. Zgon wewnątrzmaciczny związany bezpośrednio z łożyskowymi zaburzeniami naczyniowymi obserwowano u 33 kobiet (49,3%). Wiek ciążowy, w którym doszło do epizodu IUFD z przyczyn łożyskowych był niższy w porównaniu do wieku ciążowego w IUFD z przyczyn niełożyskowych ($p=0,04$). Znacząco więcej kobiet z IUFD z przyczyn łożyskowych było pierwiastkami w porównaniu do podgrupy kobiet z IUFD z przyczyn niełożyskowych ($p=0,002$). Co więcej 36 kobiet (53,7%) kobiet z IUFD było nosicielkami co najmniej jednej trombofilii wrodzonej lub nabytej. Częstość występowania trombofilii u matek była wyższa w IUFD z przyczyn łożyskowych (63,6%). Częstość występowania mutacji Leiden oraz mutacji *PTM* była wyższa w podgrupie IUFD z przyczyn łożyskowych w porównaniu do podgrupy kobiet z IUFD z przyczyn niełożyskowych ($WR=3,06$). Wyniki te dobitnie pokazują potrzebę włączenia leczenia przeciwzakrzepowego w następnych ciążach u kobiet z wcześniejszym epizodem IUFD [Simchen i wsp., 2010].

W badaniu Dekker i wsp. analizowano krew pępowinową pobraną od 139 pacjentek z IUFD. Wyższą częstość występowania zmutowanych wariantów u płodów znaleziono u grupie badanej z IUFD (9,8% vs. 2% w grupie kontrolnej, $WR=4,8$). Zgon wewnątrzmaciczny w II trymestrze obserwowano częściej u płodów nosicieli mutacji Leiden (8/64 vs. 0/92). W badaniu wskazano na ważną rolę nieprawidłowego procesu wykrzepiania w łożysku w powiązaniu z wyższym ryzykiem zakrzepicy w ciążach powikłanych IUFD [Dekker i wsp., 2004].

W badaniu Many i wsp. analizowano 40 kobiet z IUFD o niewyjaśnionej przyczynie powyżej 27 tc. oraz 80 kobiet z urodzeniem co najmniej jednego zdrowego donoszonego noworodka. Analizie poddano czynnik V Leiden, mutację *PTM*, polimorfizm genu *MTHFR*, niedobór białka S, białka C oraz antytrombiny III. Częstość występowania trombofilii wrodzonej w grupie z IUFD była znacząco wyższa (42,5% vs. 15% w grupie kontrolnej, $WR=2,8$, $p=0,001$). Szczególnie częstość występowania mutacji *PTM* ($WR=2,3$) oraz niedoboru białka S ($WR=3,2$) była znacząco wyższa w grupie badanej kobiet z IUFD. Autorzy sugerują, że zgon wewnątrzmaciczny w III trymestrze ciąży istotnie koreluje z trombofilią wrodzoną, co może mieć znaczenie przy wdrażaniu terapii w następnych ciążach u pacjentek z IUFD w wywiadzie [Many i wsp., 2002].

W badaniu Nurk i wsp. analizowano związek mutacji Leiden z powikłaniami u ciężarnych w dużym badaniu populacyjnym w Norwegii (5874 kobiet, 40-42 lat, 14 474 ciąż). Badano polimorfizm *1691G>A* genu czynnika V, polimorfizm *677C>T* oraz *1298A>G* genu *MTHFR*, oraz poziom Hcy, folianów i witaminy B12 w osoczu. Obecność mutacji Leiden u matki korelowała z wystąpieniem stanu przedrzucawkowego (WR=1,63), stanu przedrzucawkowego pojawiającego się przed 37 tc. (WR=2,76), małej masy urodzeniowej (WR=1,34) oraz zgonu wewnątrzmacicznego (WR=2,20). Obecność zmutowanych wariantów (*677CT/677TT*) polimorfizmu *677C>T MTHFR* silnie korelowała z wystąpieniem IUFD (WR=3,34). Stąd wniosek, że obecność mutacji Leiden jest czynnikiem ryzyka dla szeregu komplikacji u ciężarnych, natomiast obecność zmutowanego allele *677T MTHFR* silnie koreluje z wystąpieniem IUFD [Nurk i wsp., 2006].

Celem badania Murakami i wsp. była ocena wpływu polimorfizmu genu *MTHFR* na poziom Hcy w osoczu we wczesnej ciąży. Stężenie homocysteiny oraz polimorfizm genu *MTHFR* było analizowane w grupie 816 kobiet pomiędzy 6 a 12 tc. Rozkład genotypów polimorfizm *677C>T MTHFR* przedstawiał się następująco: *677CC* : *677CT* : *677TT* = 280 (34.3%): 400 (49.0%): 136 (16.7%). Stężenie osoczowe Hcy było statystycznie istotnie wyższe u nosicielek genotypu homozygotycznego *677TT* ($p<0,0001$) w porównaniu do innych genotypów [*677CC* : *677CT* : *677TT* = 5,67 : 5,80 : 6,91 nmol/ml]. U kobiet z hiperhomocysteinemią statystycznie istotnie częściej w dalszym przebiegu ciąży występował stan przedrzucawkowy ($p<0,01$) oraz IUFD ($p<0,05$) w porównaniu do kobiet z normohomocysteinemią [Murakami i wsp., 2001].

Niektóre badania podejmujące próbę oceny związku polimorfizmów związanych z trombofilią oraz zaburzeniami naczyniowymi nie pokazują znaczenia tych wariantów w etiologii IUFD. Badanie Hefler i wsp. obejmowało dużą analizę 12 polimorfizmów (czynnik V Leiden, polimorfizm *H1299R* czynnika V, *20210G>A* genu protrombiny, polimorfizm *V34L* czynnika XIII, polimorfizmy *677C>T* oraz *1298A>C MTHFR*, polimorfizm *455G>A* beta-fibrinogenu, *4G/5G PAI-1*, *L33P GPIIIa*, *C282Y HFE*, *R3500Q* apolipoproteiny B oraz *E2/E3/E4* apolipoproteiny). Badanie przeprowadzono w grupie 94 kobiet z IUFD oraz 94 kobiet z urodzeniem co najmniej jednego zdrowego noworodka w donoszonej ciąży i bez wywiadu w kierunku IUFD. Analiza ta wskazała na brak korelacji pomiędzy powyższymi wariantami polimorficznymi a występowaniem IUFD [Hefler i wsp. 2004].

W wielośrodkowej analizie Tormene i wsp. w grupie 283 kobiet, które co najmniej raz były w ciąży obserwowali wystąpienie zakrzepicy oraz innych powikłań w ciąży. U wszystkich kobiet oznaczano polimorfizm *20210G>A PTM*, a następnie porównywano wystąpienie powikłań u nosicielek mutacji *PTM* i kobiet nie będących nosicielkami. U kobiet nosicielek zmutowanych wariantów polimorfizmu *20210G>A PTM* obserwowano 48 niewyjaśnionych utrat ciąż na 359 ciąż w tej podgrupie w porównaniu do grupy kobiet nie będących nosicielkami (50 utrat ciąż/357 ciąż w tej podgrupie) (WR=0,9). Co ciekawe obserwowano zwiększone ryzyko późnych utrat ciąż u kobiet nosicielek mutacji *PTM* w porównaniu do kobiet nie będących nosicielkami (RR=2,2). Wyniki tej analizy sugerują brak potrzeby wykonywania skrinningu w kierunku trombofilii wrodzonej w rodzinach obciążonych mutacją *PTM* [Tormene i wsp., 2007].

W powyższej dysertacji dokonana analiza nie pokazała bezpośredniego znaczenia polimorfizmu *20210G>A* genu czynnika II, *1691G>A* genu V czynnika oraz polimorfizmu *R353Q (11496G>A)* genu VII krzepnięcia w etiologii IUFD. Nie odnotowano również znaczenia polimorfizmu *677C>T* oraz *1793G>A* genu *MTHFR* w etiologii IUFD. Interesującym natomiast faktem było odnotowanie istotnego znaczenia polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR* w etiologii IUFD w badanej populacji kobiet polskich (genotyp *1298AC*: 55,74 vs. 43,00% w grupie kontrolnej, WR=1,66, $p=0,04$, zmutowany allel *1298C*: 42,62 vs. 33,75% w grupie kontrolnej, WR=1,46, $p=0,04$).

INNE POLIMORFIZMY A ETIOLOGIA IUFD

W etiologii zgonu wewnątrzmacicznego w II połowie ciąży mogą mieć udział również inne warianty polimorficzne genów związanych z funkcją śródbłonna naczyniowego, stresu oksydacyjnego, procesów oksydacji i acetylacji czy genów warunkujących odpowiedź w reakcji zapalnej [Neki i wsp., 2014].

Kofeina jest substancją, której metabolizm zależny jest m.in. od aktywności kilku enzymów: cytochromu P4501A2 (*CYP1A2* – *cytochrome 450 enzyme A2*), N-acetylotransferazy 2 (*NAT2* – *N-acetylotransferase 2*) oraz glutation-S-transferazy alfa 1 (*GSTA1* – *glutathione S-transferase*). Stąd w zależności od ich aktywności obserwuje się wariacje metabolizmu kofeiny. Różnorodność aktywności enzymów pozostaje w korelacji do polimorfizmów w ich genach, co może być przyczyną wzrostu lub obniżenia indukowalności enzymów. Analiza polimorfizmów genetycznych może ułatwić zrozumienie potencjalnych efektów kofeiny i jej metabolitów na wynik ciąży. Pomiar metabolitów kofeiny we krwi

matki, płodu oraz noworodka pozwala na precyzyjny pomiar ekspozycji płodu na kofeinę [Grosso i wsp. 2005].

Cytochrom P4501A2 (CYP1A2) oraz N-acetylotransferaza 2 (NAT2) są kluczowymi enzymami w metabolizmie kofeiny. Polimorfizm tych genów ułatwia wykrycie szybkich i wolnych metabolizerów. Nosiciele określonych wariantów polimorficznych mają wolniejszy metabolizm kofeiny, ale również niektórych leków oraz używek. Niektórzy autorzy wskazują, że wolni metabolizerzy mogą wykazywać większe prawdopodobieństwo wystąpienia IUFD. Z drugiej strony enzym GSTA1 wiążąc glutation z aminami aromatycznymi również wykazuje aktywność w metabolizmie kofeiny. W badaniu Bech i wsp. analizowano związek pomiędzy aktywnością GSTA1 a zgonem wewnątrzmacicznym w II połowie ciąży w populacji duńskiej (142 przypadki IUFD w ciąży pojedynczej oraz 157 zdrowych kobiet). W badaniu tym analizowane osobno: wolny status oksydacji (CYP1A2) (WR=1,06), wolny status acetylacji (NAT2) (WR=0,95) oraz niska aktywność enzymu GSTA1 (WR=1,42) nie korelowały z ryzykiem IUFD. Ale współwystępowanie genotypów warunkujących wolny status CYP1A2, wolny status NAT2 oraz niską aktywność GSTA1 podnosiło 2-krotnie ryzyko wystąpienia IUFD w porównaniu do obecności pojedynczych genotypów. W badaniu tym wskazano na związek pomiędzy kombinacją genotypów warunkujących wolny metabolizm kofeiny a wystąpieniem IUFD [Bech i wsp., 2006]. Analiza polimorfizmów genetycznych modulujących metabolizm kofeiny może w przyszłości określić potencjalny wpływ kofeiny i jej metabolitów na przebieg i wynik ciąży.

Z kolei w badaniu Ferrari i wsp. poddawano ocenie udział kilku polimorfizmów genetycznych związanych z funkcją łożyska w etiologii niewyjaśnionych IUFD (fragmenty łożyska od 50 kobiet z IUFD o niewyjaśnionej przyczynie oraz 46 zdrowych kobiet ciężarnych z grupy kontrolnej, które urodziły zdrowe donoszone dzieci). Analizie poddano znaczenie polimorfizmu *rs1800783* genu endotelialnej syntazy NO (eNOS – endothelial nitric oxide synthase). Nie znaleziono związku pomiędzy badanym polimorfizmem genu *eNOS* a występowaniem IUFD. Ciekawą obserwacją natomiast było odnotowanie, że allel A polimorfizmu *rs1800783 eNOS* występował z większą częstością w przypadku IUFD, z adekwatną masą do wieku ciążowego (AGA-IUFD) w porównaniu do IUFD z masą za małą do wieku ciążowego (SGA-IUFD) ($p=0,001$) oraz grupy kontrolnej ($p=0,03$). Na podstawie badań autorzy wnioskują, że IUFD o niejasnej przyczynie w przypadku płodów AGA mogą być związane z nosicielstwem allela A polimorfizmu *rs1800783 eNOS* [Ferrari i wsp., 2012].

Wielonarządowa odpowiedź immunologiczna płodu z udziałem siatki cytokin prozapalnych, jest niezależnym czynnikiem ryzyka w przypadku ciężkich zachorowań

noworodków, jak również zgonów wewnątrzmacicznych. Główną cytokiną przeciwzapalną jest cytokina interleukina 1, a antagonistą receptora interleukiny 1 (IL-1ra – *interleukin 1 receptor antagonist*) odgrywa prawdopodobnie ważną rolę w modulacji odpowiedzi zapalnej. W genie kodującym antagonistę receptora IL-1ra (IL1RN) opisano kilka polimorfizmów genetycznych. Polimorfizmy silnie związane z odpowiedzią zapalną jednocześnie mogą odgrywać rolę w podwyższeniu ryzyka IUFD. W badaniu Gerbera i wsp. zaobserwowano statystycznie istotną przewagę homozygot *IL-1RN*2/*2* (41,0%) w grupie niewyjaśnionych zgonów IUFD w porównaniu do grupy kontrolnej (8,6%) ($p < 0,001$). Wykonane w tym badaniu inne analizy (mikrobiologiczne, serologiczne, histologiczne) nie pokazały innych przyczyn IUFD. Stąd badanie to pokazuje związek pomiędzy niewyjaśnionymi IUFD a nosicielstwem u płodu genotypu homozygotycznego *IL1RN*2/*2* [Gerber i wsp., 2005].

Masywne odkładanie okołokosmkowe fibrynoideu oraz zawały łożyska są procesami charakterystycznymi dla występowania IUFD. Sugeruje to nadprodukcję lub defekt oczyszczania fibrynoideu w przestrzeni międzykosmkowej w IUFD. Jednocześnie w procesie zaburzonej fibrynolizy wskazywano na znaczenie polimorfizmu genu PAI-1. Stąd polimorfizm tego genu regulując proces fibrynolizy może mieć również znaczenie w występowaniu masywnego odkładania okołokosmkowego fibrynoideu oraz zawałów łożyska w przypadku wystąpienia IUFD. W pracy Uxa i wsp. w materiale pozyskiwanym z blozków parafinowych łożyska oznaczano polimorfizmy w genie PAI-1, inhibitora fibrynolizy aktywowanego trombiną (TAFI - *thrombin activated fibrinolysis inhibitor*), urokinazowego aktywatora plazminogenu (u-PA - *plasminogen activator urokinase*) oraz tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA - *plasminogen activator tissue*). W grupie badanej (20 łożysk) obserwowano IUFD (8), IUGR (6), stan przedzrutowy (4), oraz tylko w 3 przypadkach zakończenie ciąży porodem o czasie. W przypadku masywnego odkładania okołokosmkowego fibrynoideu oraz zawałów łożyska obserwuje się szereg zmian patologicznych w łożysku. Nie wykazano jednak związku pomiędzy występowaniem obserwowanych powikłań a badanymi polimorfizmami wpływającymi na zaburzenia fibrynolizy [Uxa i wsp., 2010].

Obecnie ocenia się, że w 6% do 12% przyczyną IUFD mogą być nieprawidłowości kariotypu. Liczne dowody wskazują, że warianty strukturalne genomu, szczególnie wariacje liczby powtórzeń (CNV - *copy number variations*), często występują u człowieka i mogą mieć konsekwencje fenotypowe u osobników będących nosicielami tych wariantów. W badaniu Harris i wsp. dotyczyło epizodów IUFD po 20 tc., które klasyfikowano zgodnie z kryteriami Wigglesworth oraz Aberdeen. Analizowano 29 przypadków IUFD (próbki pobrane

od płodu oraz fragmenty łożyska) o niewyjaśnionej etiologii. Nieprawidłowości kariotypu typu CNV zidentyfikowano w 24 przypadkach u płodu oraz w 18 przypadkach we fragmentach łożyska. W pracy wskazano na potencjalne znaczenie małych genomowych nieprawidłowości, które mogą brać udział w etiologii IUFD [Harris i wsp., 2011].

POLECANE TESTY W DIAGNOSTYCE TROMBOFILII

Organizacja *American College of Medical Genetics* (ACMG) oraz *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) rekomenduje przeprowadzenie badań w kierunku trombofilii wrodzonej i nabytej w następujących przypadkach [Grody i wsp., 2001, Rekomendacje *American College of Obstetricians and Gynecologists* 2013]:

1. Zakrzepica u osób poniżej 50 roku życia;
2. Nawracająca zakrzepica;
3. Zakrzepica w miejscach nietypowych (żyły wątrobowe, żyły mózgowe);
4. Zakrzepica u kobiet ciężarnych, przyjmujących hormonalną antykoncepcję, hormonalną terapię w okresie okołomenopauzalnym;
5. Silnie obciążony wywiad rodzinny w kierunku występowania zakrzepicy.

Dodatkowe rekomendacje dotyczą wykonania testu w kierunku trombofilii u następujących osób (decyzja indywidualna w każdym przypadku):

1. Kobiety ciężarne z ciężkim stanem przedrzucawkowym, hipotrofią płodu, przedwczesnym oddzieleniem łożyska, poronieniami nawracającymi oraz zgonem wewnątrzmacicznym w późniejszym okresie ciąży z niewyjaśnionych przyczyn.
2. Kobiety spokrewnione z osobami, u których potwierdzono nosicielstwo trombofilii, które chcą przyjmować antykoncepcję hormonalną lub terapię hormonalną.

Obecne rekomendacje wskazują na potrzebę wykonywania testów w kierunku trombofilii tylko u pacjentek z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową. Wytyczne nie rekomendują skriningu kobiet z obciążonym wywiadem położniczym w kierunku poronień nawracających, zgonów wewnątrzmacicznych, stanu przedrzucawkowego, czy hipotrofii płodu [Walker i wsp., 2003]. W każdym więc przypadku obciążonego wywiadu u pacjentki w kierunku poronień nawracających, zgonów wewnątrzmacicznych, hipotrofii płodu, czy stanu przedrzucawkowego należy dokładnie przyjrzeć się i zindywidualizować decyzję co do skriningu oraz włączenia profilaktyki przeciwzakrzepowej indywidualnie u każdej pacjentki

[Davenport i wsp., 2014]. Wydaje się, że na obecnym etapie wiedzy w indywidualnych przypadkach należy zastosować profilaktykę w celu zapobiegania wystąpieniu RM oraz IUFD następnej w ciąży. Należy również opracować wskazania do włączenia skrinningu dla wykrywania tego powikłania i odpowiednich opcji profilaktyki i leczenia kobiet ciężarnych [Rekomendacje *American College of Obstetricians and Gynecologists* 2013].

Testy te nie są proponowane jako skrinning w populacji ogólnej ze względu na wciąż wysokie koszty oznaczeń. Odstępuje się również od rutynowego oznaczania trombofilii u pacjentów po urazach, zabiegach operacyjnych oraz z chorobą nowotworową i niedowładami ze względu na konieczność zastosowania u nich profilaktyki przeciwzakrzepowej niezależnie od nosicielstwa czynnika Leiden [De Stefano i wsp., 2002, Hossain i wsp., 2013]. U pacjentów, u których wykryto obecność czynnika Leiden lub występowanie oporności na działanie aktywnego białka C powinno zostać rozważone wykonanie dalszych badań w kierunku występowania innych postaci dziedzicznej trombofilii. Natomiast nie zaleca się przeprowadzania badań w kierunku obecności innych mutacji genu czynnika V, będących przyczyną trombofilii (czynnik V Cambridge oraz czynnik V Hong Kong) [Chan i wsp., 1998]. Również Polskie Towarzystwo Ginekologiczne wydało w roku 2008 rekomendacje dotyczące postępowania w przypadku poronień nawracających, w których wskazano na potrzebę wykonywania badań w kierunku trombofilii nabytej i wrodzonej.

Diagnostyka trombofilii wrodzonej przeprowadzana jest na podstawie testów przeprowadzanych z pobranej próbki krwi. W przypadku badania mutacji Leiden FV testy laboratoryjne (funkcjonalne) wskazują na występowanie oporności na APC, natomiast testy molekularne na obecność zmutowanych wariantów czynnika Leiden. Ponieważ oporność na działanie APC spowodowana jest nie tylko obecnością czynnika Leiden zawsze w przypadku jej stwierdzenia dalszym krokiem powinna być przeprowadzona analiza DNA. Pacjenci, u których wykazano zaburzenia funkcjonalne powinni podlegać dalszej diagnostyce potwierdzającej obecność zmutowanych alleli czynnika V Leiden (także dla odróżnienia heterozygot od homozygot) [De Stefano i wsp., 2002]. Po dodaniu APC do surowicy zdrowego człowieka następuje wydłużenie czasu krzepnięcia. U niektórych pacjentów mimo dodania APC nie następuje wydłużenie czasu krzepnięcia lub czas ten ulega wydłużeniu tylko w niewielkim stopniu. Zjawisko to zostało opisane jako występowanie oporności na APC i wykorzystane jest do przeprowadzenia testu. Następnym etapem jest przeprowadzenie testu genetycznego potwierdzającego obecność genotypu homo- lub heterozygotycznego (*1691GA*, *1691AA*) pod względem mutacji Leiden.

Ocena przydatności testów wykonywanych w kierunku trombofilii wrodzonej u ciężarnych jest szeroko dyskutowana. Rozważa się tutaj przydatność testów funkcjonalnych i genetycznych w prewencji wystąpienia powikłań w przebiegu ciąży i identyfikację kobiet grupy ryzyka wystąpienia powikłań związanych trombofilią dziedziczną. Obecnie coraz więcej dyskusji skupia się na wyznaczeniu grup kobiet, u których przeprowadzenie testów w kierunku trombofilii wrodzonej jest w pełni zasadne [Lockwood i wsp., 2002, Lopes i wsp., 2015]. W tym kontekście należy również włączyć analizę kosztów poniesionych przy wdrażaniu testów w większych grupach kobiet z obciążonym wywiadem [Wu i wsp., 2006]. Należy również wyznaczyć odpowiednie standardy opieki przedciążowej w stosunku do kobiet nosicielek trombofilii [Silver i wsp., 2006, van den Boogaard i wsp., 2013].

Przeprowadzone badania wskazują, że około 40% lekarzy wykonuje testy poszerzając grupę osób badanych w zależności od indywidualnej oceny ryzyka wystąpienia następnego niepowodzenia u ciężarnej [Davenport i wsp., 2014].

Zasadność uniwersalnego skrinningu w kierunku trombofilii u kobiet przed przepisaniem terapii z estrogenami, kobiet w ciąży i kobiet poddawanych operacjom nie jest w tej chwili udokumentowana. Obecność trombofilii związana jest z wysokim ryzykiem wystąpienia choroby zakrzepowo-zatorowej u kobiet przyjmujących doustnie preparaty estrogenowe, poddanych dużym operacjom ortopedycznym oraz z niekorzystnym przebiegiem ciąży i wystąpieniem niektórych powikłań zakrzepowych w ciąży. Znaczące ryzyko zakrzepicy i niekorzystnych powikłań w przebiegu ciąży wiązało się z obecnością niektórych wariantów genetycznych [Wu i wsp., 2006]. W niektórych przeprowadzonych analizach pokazano, że selektywny skrinning w grupie pacjentek z wcześniejszym epizodem VTE jest bardziej efektywny i mniej kosztowny w porównaniu do skrinningu uniwersalnego. Stąd powinna zostać przeprowadzona ocena relatywnej przydatności programu skrinningowego w tym kierunku w grupach kobiet wysokiego ryzyka wystąpienia VTE [Wu i wsp., 2006].

PROFILAKTYKA PRZECIWKAKRZEPOWA U KOBIET Z NAWRACAJĄCYMI UTRATAMI CIĄŻY

Obecne koncepcje wskazują, że u kobiet z trombofilią wrodzoną podwyższona gotowość prozakrzepowa może powodować wystąpienie wielu powikłań w przebiegu ciąży, stąd zastosowanie leków przeciwzakrzepowych może potencjalnie podwyższać szanse urodzenia zdrowego donoszonego noworodka. W celu redukcji potencjalnego ryzyka ponownego wystąpienia powyższych powikłań często proponuje się podawanie profilaktyki

przeciwwązkrzepowej u pacjentek z wcześniejszym epizodem utraty ciąży. Według niektórych doniesień włączenie profilaktyki przeciwwązkrzepowej powoduje wzrost wskaźnika żywych urodzeń w następnych ciążach u kobiet z utratami ciąż będących jednocześnie nosicielkami trombofilii wrodzonej oraz u kobiet z niewyjaśnioną przyczyną poronień [Magriples i wsp., 2006, Laskin i wsp., 2009, Aracic i wsp., 2015, Leaf i wsp., 2015].

Coraz więcej dowodów wskazuje na fizjologiczną i terapeutyczną rolę heparyny w utrzymaniu zarówno prawidłowo rozwijającej się ciąży, jak również w zapobieganiu niektórym powikłaniom występującym w poprzednich ciążach u pacjentki [Quaranta i wsp., 2015]. Heparyny drobnocząsteczkowe (LMWH – *low molecular weight heparin*) są obecnie głównymi lekami przeciwwązkrzepowymi stosowanymi u ciężarnych. LMWH są bardziej korzystne w porównaniu do heparyn niefrakcjonowanych i powinny być preferowane u ciężarnych. Leki należące do grupy antagonistów witaminy K nie są rekomendowane z uwagi na możliwość rozwoju embropatii i krwawień dokomorowych u płodów, wyjątek może stanowić grupa pacjentek ze sztucznymi zastawkami serca [Montavon i wsp., 2008].

Drugim lekiem szeroko stosowanym u kobiet z RPL jest kwas acetylosalicylowy (ASA – *acetylosalicylic acid*). Równoczesne zastosowanie heparyn drobnocząsteczkowych i kwasu acetylosalicylowego w dawkach profilaktycznych od dawna jest „złotym standardem” w profilaktyce występowania poronień nawracających u kobiet z zespołem antyfosfolipidowym. Takie samo postępowanie rekomendowane jest u kobiet z APS w przypadku powikłań występujących w późniejszym okresie czasu trwania ciąży. Obecność przeciwciał antyfosfolipidowych koreluje ze zwiększonym ryzykiem poronień nawracających oraz utraty ciąży w II i III trymestrze. W niektórych badaniach sugeruje się, że tylko wysokie miano przeciwciał antyfosfolipidowych koreluje z poronieniami nawracającymi oraz zgonem wewnątrzmacicznym [Werner i wsp., 2010]. Istnieją dowody, że włączenie profilaktyki przeciwwązkrzepowej podwyższa prawdopodobieństwo uzyskania korzystnego przebiegu ciąży i wykluczenia powikłań związanych z zespołem antyfosfolipidowym [Bates i wsp., 2010].

Podczas kiedy wprowadzenie zastosowania LMWH i ASA w profilaktyce powikłań w ciąży w zespole APS było kamieniem milowym w prowadzeniu ciąż u kobiet z tym powikłaniem, dobrze zaplanowane, randomizowane, badania z placebo nie wskazały korzyści profilaktyki przeciwwązkrzepowej u kobiet z RM i trombofilią wrodzoną [Rambaldi i wsp., 2014]. Czy profilaktyka przeciwwązkrzepowa stosowana u kobiet z wrodzoną trombofilią zapobiega wystąpieniu RM oraz innych powikłań w późniejszym okresie ciąży jest dyskusyjne i niejasne. Niektórzy wskazują, że u kobiet z niewyjaśnionymi RM zarówno ASA,

jak i LMWH nie przynoszą korzyści i nie powinny być przepisywane. Wskazano, że ASA umiarkowanie obniża ryzyko wystąpienia ciężkiego stanu przedrzucawkowego u kobiet z grupy wysokiego ryzyka [Middeldrop i wsp., 2014].

W wieloośrodkowym badaniu przeprowadzonym we Włoszech zasugerowano, że profilaktyka LMWH może zredukować ryzyko poronień nawracających u nosicielek mutacji Leiden i polimorfizmu *20210G>A* genu protrombiny [Tormene i wsp., 2012]. Pokazano również, że powikłania ciążowe są mniej częste u kobiet leczonych heparyną LMWH w porównaniu do nieleczonych pacjentek [Bouvier i wsp., 2014]. Carp i wsp. zasugerowali, że leczenie przeciwzakrzepowe podwyższa wskaźnik żywych urodzeń u nosicielek trombofilii wrodzonej w granicach 25% u leczonych pacjentek. Stąd leczenie takie może być zastosowane w zespole APS oraz w uzasadnionych przypadkach dziedzicznej trombofilii wrodzonej i współwystępowania powikłań położniczych [Carp i wsp., 2006]. W przypadku nieskuteczności leczenia należy zbadać zarodek na obecność nieprawidłowego kariotypu i wykluczyć obecność aberracji chromosomalnych [Carp i wsp., 2006].

Ocena efektywności, skuteczności i bezpieczeństwa stosowania leczenia przeciwkrzepliwego, jak kwasu acetylosalicylowego (ASA), heparyny drobnocząsteczkowej (LMWH) u kobiet z 2 i więcej RM była przedmiotem wielu badań. Analizy wskazały na wysokie bezpieczeństwo w stosunku do matki i płodu stosowania LMWH w ciąży. Analizowano 648 ciężarnych, u których włączono profilaktykę LMWH oraz 626 ciężarnych bez profilaktyki. Analizowano wskazania do włączenia profilaktyki oraz powikłania jakie wystąpiły u matki i płodu. Wskaźnik powikłań nie różnił się istotnie statystycznie pomiędzy badany i grupami. Obserwowano porównywalne częstości wystąpienia trombocytopenii (grupa LMWH vs. grupa kontrolna): 1,56% vs. 1,1%, porodu przedwczesnego 8,7% vs. 6,5%, IUFD 0,7% vs. 0,3%, ciężkiego stanu przedrzucawkowego 1,4% vs. 1,0%, IUGR 2,7% vs. 2,2% oraz krwawień przedporodowych 10,7% vs. 7,8%. Wskaźnik cięć cesarskich (21% vs. 19%), jak również krwawienia poporodowego (500 vs. 450 ml, odpowiednio) był porównywalny w obydwu grupach. Ryzyko wystąpienia dużych krwotoków poporodowych (>1000 ml) nie było wyższe w grupie LMWH. W grupie LMWH częstość skórnych reakcji alergicznych wynosiła 0,3%. Nie obserwowano trombocytopenii poheparynowej oraz złamań osteoporotycznych. Częstość nawracającej VTE wynosiła 2,5% w grupie LMWH [Galambosi i wsp., 2012].

W pracy Lewandowskiego i wsp. przedstawiono przypadek 25-letniej ciężarnej z obciążonym wywiadem położniczym (jedno poronienie w 8 tc. oraz trzy zgony

wewnątrzmaciczne w 35, 25, 21 tc. Wywiad osobisty i rodzinny nie pokazywał żadnych odchyleń. W 25 tc. rutynowe badanie ultrasonograficzne pokazało nieprawidłowe przepływy dopplerowskie (nieprawidłowy indeks pulsacji w tętnicy pępowinowej, oraz w prawej i lewej tętnicy macicznej. W obydwu tętnicach macicznych potwierdzono „notch”. Ze względu na wywiad położniczy przeprowadzono badanie w kierunku trombofilii. Odnotowano obecność genotypu heterozygotycznego czynnika V Leiden oraz zmutowanych wariantów polimorfizmu $677C>T$ *MTHFR*. Włączono LMWH (nadroparyna podskórnie) oraz ASA (150 mg/24 h doustnie). Ciążę zakończono w 35 tc. cięciem cesarskim ze względu na objawy zagrożenia życia płodu (*intrauterine asphyxia*). Urodzono płód płci męskiej (1180 g, Apgar w 1 min 6 pkt, Apgar w 5 min 9 pkt). Nie obserwowano powikłań u matki i noworodka w 3-miesięcznym okresie obserwacji. Przypadek ten wskazuje na zasadność zastosowania przeprowadzania testów w kierunku trombofilii oraz włączania profilaktyki przeciwzakrzepowej u kobiet z trombofilią i powtarzającymi się utratami ciąży [Lewandowski i wsp. 2003].

Na podstawie przeprowadzonych badań sugeruje się, że nosicielstwo trombofilii wrodzonej oraz wywiad obciążony w kierunku RPL podnosi ryzyko nieprawidłowego przebiegu następnej ciąży nawet do 6 razy. Wyniki niektórych badań dotyczące zastosowania profilaktyki LMWH potwierdzają słuszność zastosowania profilaktyki przeciwzakrzepowej u kobiet z trombofilią i ciężkimi powikłaniami [Dudding i wsp., 2012]. Dodatkowo w analizie kosztów efektywności profilaktyki stosowanie ASA w małych dawkach oraz LMWH wskazano jako najbardziej efektywne w zapobieganiu utrat ciąży u kobiet nosicielek trombofilii dziedzicznej [Wu i wsp., 2006].

Niektóre badania pokazują, że włączenie profilaktyki przeciwzakrzepowej podwyższa wskaźnik żywych urodzeń u kobiet nosicielek trombofilii wrodzonej. Jednocześnie coraz więcej lekarzy praktyków przeprowadza testy na obecność trombofilii wrodzonej u kobiet z wywiadem w kierunku RM. Co więcej kobiety z poronieniami nawracającymi, obecnością przeciwciał APL oraz nosicielki trombofilii wrodzonej wykazują wzrost ryzyka zaburzeń prozakrzepowych w późniejszym życiu. Obserwacje długoterminowe sugerują wzrost ryzyka choroby niedokrwiennej serca i zakrzepicy żyłnej. Szczególnie podwyższone ryzyko obserwowane jest u pacjentek z dodatkowymi, środowiskowymi czynnikami ryzyka wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych [Martinez-Zamora i wsp., 2013]. Dyskusyjnym pozostaje pytanie w jakich okolicznościach włączać profilaktykę przeciwzakrzepową w tej grupie kobiet w późniejszym okresie życia [Martinez-Zamora i wsp., 2013].

Z drugiej strony według niektórych autorów badania dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności zastosowania leków przeciwkrzepliwych u ciężarnych z RM bez trombofilii są nieliczne i brak tutaj wystarczających dowodów zasadności zastosowania takiej profilaktyki [Tan i wsp. 2012]. Faktycznie część badań nie pokazuje większej korzyści zastosowania określonego leku w profilaktyce przeciwzakrzepowej powikłań położniczych. Zastosowanie leków przeciwkrzepliwych nie jest również rekomendowane w profilaktyce RPL bez laboratoryjnego potwierdzenia trombofilii wrodzonej lub nabytej. Postępowanie takie może być włączane tylko w ściśle uzasadnionych indywidualnych przypadkach [Carp i wsp., 2006].

Bardzo ciekawa jest metaanaliza przeprowadzona przez Kaandorp i wsp. U 54 kobiet z RM (3 i więcej następujących po sobie poronień przed 22 tc.) (bez przeciwciał APL) zastosowano ASA w dawkach profilaktycznych oraz placebo. Podobny wskaźnik żywych urodzeń obserwowano po zastosowaniu ASA i placebo (81,0 vs. 81,0%, RR=1,00). W innym badaniu 107 kobiet z RM o niewyjaśnionej przyczynie (3 i więcej RM w I trym. oraz 2 i więcej RM w II trym.) (bez trombofilii wrodzonej) otrzymały enoksaparynę oraz ASA w dawkach profilaktycznych. Podobny wskaźnik żywych urodzeń obserwowano w obydwu grupach (82,0% vs. 84,0%, RR=0,97) [Kaandorp i wsp., 2009].

Uważa się, że obecnie istnieje niewystarczająca liczba dowodów dla wprowadzenia leczenia wszystkich kobiet z trombofilią wrodzoną i występowaniem powikłań położniczych z tym związanych. Wydaje się, że najrozsądniejsze podejście to indywidualna ocena każdej pacjentki z obciążonym wywiadem i indywidualne rozważenie wdrożenia profilaktyki przeciwzakrzepowej. Dla utworzenia solidnych podstaw dla praktyki klinicznej przyszłe badania o roli zaburzeń krzepnięcia w procesach reprodukcyjnych u ludzi jak również międzynarodowa współpraca w utworzeniu badań randomizowanych na temat wprowadzania leczenia i profilaktyki przeciwzakrzepowej u kobiet z RM oraz APS i trombofilią wrodzoną są konieczne i niezwłocznie potrzebne [de Jong i wsp., 2013].

Kilka badań i metaanaliz pokazało, że istnieje tylko słaba asocjacja trombofilii wrodzonej z patomechanizmem RM oraz IUFD. Jednakże włączone analizy miały różnorodne kryteria klasyfikacji do badań. Stąd dyskusyjne pozostają również korzyści zastosowania profilaktyki przeciwzakrzepowej w powyższych powikłaniach [Lopes i wsp., 2015]. Nie ma również dostatecznych dowodów, że włączenie profilaktyki przeciwzakrzepowej faktycznie poprawia wynik ciąży i pozwala na uzyskanie wyższego wskaźnika żywych urodzeń i urodzenia żywego donoszonego noworodka [de Jong i wsp., 2011]. Dobrze udokumentowane randomizowane badania z grupą placebo pokazały brak korzyści po zastosowaniu profilaktyki przeciwzakrzepowej u kobiet z nawracającymi utratami ciąż i trombofilią wrodzoną.

Zastosowanie profilaktyki przeciwzakrzepowej w przypadku innych powikłań naczyniowych w łożysku (PVS) u nosicielek trombofilii wrodzonej powinny być rozważone i włączone zgodnie z wynikami badań klinicznych dostępnych obecnie [Rambaldi i wsp., 2014, de Jong i wsp., 2014].

Dyskusyjne jest również włączanie profilaktyki u kobiet niewyjaśnioną przyczyną poronień, u których nie wykryto obecności mutacji trombofilii wrodzonej, ani obecności przeciwciał APL. Wydaje się, że obecnie nie ma wystarczających danych i badań klinicznych potwierdzających słusność włączenia bądź nie profilaktyki przeciwzakrzepowej w tych przypadkach [Bates i wsp., 2010]. Oczywiście największe korzyści dla potwierdzenia potrzeby stosowania LMWH i ASA w profilaktyce niepowodzeń położniczych przyniosłoby przeprowadzenie dobrze zaplanowanych randomizowanych badań z zastosowaniem grupy placebo [Middeldorp i wsp., 2015, Mousa i wsp., 2001, Montavon i wsp., 2008].

POSTĘPOWANIE W PRZYPADKU WYWIADU OBCIĄŻONEGO WYSTĘPOWANIEM NAWRACAJĄCYCH NIEPOWODZEŃ POŁOŻNICZYCH

Ze względów medycznych oraz psychologicznych niesłychanie istotne jest wypracowanie jednolitego schematu postępowania u kobiet z RPL w celu uniknięcia niekorzystnego przebiegu następnej ciąży. Najczęściej w tych grupach kobiet włącza się postępowanie w oparciu o wypracowane rekomendacje towarzystw naukowych.

W przypadku zidentyfikowania matczynego czynnika ryzyka niepowodzenia położniczego należy wdrożyć postępowanie terapeutyczne już w okresie przed następną koncepcją prowadzącą do zajścia w ciążę. Optymalne postępowanie u pacjentek z chorobami przewlekłymi jest niezwykle istotne dla prawidłowego przebiegu kolejnej ciąży. Dla przykładu, ścisłe monitorowanie poziomu glikemii u pacjentek z cukrzycą przedciążową znacznie redukuje ryzyko występowania wad wrodzonych u płodu. Regularne konsultacje endokrynologiczne i osiągnięcie eutyrozy u pacjentek z chorobami tarczycy zapobiega wystąpieniu następnego poronienia.

Poradnictwo prekonceptyjne jest niezwykle istotne w sytuacji stwierdzenia nieprawidłowości genetycznych lub wad wrodzonych w poprzednich ciążach. Genetyczne testy przesiewowe oraz szczegółowe badania ultrasonograficzne mogą być bardzo pomocne w ocenie szans powodzenia donoszenia przyszłej ciąży.

Niemniej ważne jest przeprowadzenie testów w kierunku chorób odzwierzęcych, bakteryjnych i wirusowych (akronim TORCH), jak również bakteryjnych i wirusowych zapaleń pochwy. Wyeliminowanie wad anatomicznych redukuje szczególnie poronienia późne w II trymestrze ciąży. Badania hormonalne mogą być pomocne w ustaleniu niewydolności II fazy cyklu i poronień nawykowych na tym tle.

Wyjątkową sytuacją jest zgon wewnątrzmaciczny w II połowie ciąży o nieustalonej etiologii. Z powodu dużej liczby możliwych przyczyn niezwykle trudno jest oszacować ryzyko powtórzenia się tego powikłania położniczego w kolejnej ciąży. Modele oparte na dowodach naukowych, jak *Active Management of Risk In Pregnancy At Term* (AMOR-IPAT) tworzone są celem lepszego oszacowania tego ryzyka [Nicholson i wsp., 2009]. W niektórych przypadkach, jak np. kolizja pępowinowa będąca przyczyną epizodu IUFD, należy poinformować pacjentkę że ryzyko wystąpienia tego powikłania w kolejnej ciąży jest bardzo niskie, równe z ryzykiem populacyjnym.

Jakkolwiek częstość występowania zgonu wewnątrzmacicznego w II połowie czasu jej trwania nie jest częsta, wywołuje u pacjentek i ich partnerów naturalny duży niepokój. Towarzystwo ACOG rekomenduje w tych przypadkach częstsze wizyty kontrolne począwszy od 32-34 tygodnia ciąży u zdrowych pacjentek z wywiadem obciążonym w kierunku późnej utraty ciąży. W III trymestrze zaleca się cotygodniową ocenę biometryczną płodu wraz z oceną częstości pracy serca, przepływów dopplerowskich i indeksu płynu owodniowego. Ważne jest również uczulenie ciężarnych na obserwację i ściśle notowanie odczuwanych ruchów płodu [Rekomendacje *American College of Obstetricians and Gynecologists* 2009].

ANALIZA WSPÓŁWYSTĘPOWANIA GENOTYPÓW ORAZ HAPLOTYPÓW BADANYCH POLIMORFIZMÓW

Coraz częściej sugeruje się, że przyczyną nawracającej zakrzepicy, jak również nawracających niepowodzeń położniczych może być jednoczesne współwystępowanie dwóch lub kilku defektów genetycznych w kaskadzie krzepnięcia i fibrynolizy. Wcześniejsze badania dotyczyły znaczenia pojedynczych polimorfizmów w etiologii poronień nawracających. Obecnie sugeruje się, że objawy kliniczne trombofilii wrodzonej mogą być spowodowane poprzez działanie prozakrzepowe dwóch lub więcej czynników genetycznych, co znacznie podwyższa ryzyko jej wystąpienia. Jednoczesna obecność kilku wariantów genetycznych o znanym wpływie prozakrzepowym może wyjaśniać również rodzinną

skłonność do zakrzepicy i nawracających utrat cięż [Laczika i wsp., 2002, Khaira i wsp., 2009].

W jednym z etapów prezentowanej powyżej dysertacji analizowano współwystępowanie genotypów 7 badanych polimorfizmów genetycznych genów czynnika II, V, VII krzepnięcia oraz polimorfizmów genu *MTHFR*. Analiza ta dostarczyła interesujących obserwacji. Wskazano tutaj na szczególne znaczenie współdziałania genotypów w etiologii powikłania, jakim są nawracające utraty cięż. Specyficzne znaczenie mogą mieć polimorfizmy genu czynnika V, II oraz VII, jak również polimorfizm *1793G>A* genu *MTHFR* w etiologii RM. Dodatkowo w pracy wskazano na możliwe znaczenie współdziałania polimorfizmów *1691G>A*, *1328T>C* genu czynnika V oraz *20210G>A* genu czynnika II krzepnięcia w etiologii IUFD. Ze względu na niewielką liczbę podobnych analiz w literaturze trudno znaleźć odniesienie do dyskusji powyższych wyników. Obserwacje te pozostają w zgodzie z wynikami innych badań.

Niektórzy autorzy przedstawiają w multilogistycznym modelu regresyjnym równoczesny efekt wielu polimorfizmów na ryzyko wystąpienia RPL [Torabi i wsp., 2012]. W badaniu przeprowadzonym w 2015 roku w populacji 101 kobiet z Chorwacji z zakrzepicą żył głębokich oraz poronieniami nawracającymi wskazano, że współwystępowanie zmutowanych wariantów mutacji Leiden i polimorfizmu *677C>T* *MTHFR* związane jest ze zwiększonym ryzykiem poronień oraz zgonu wewnątrzmacicznego. Ponadto czynniki powodujące trombofilię wrodzoną i nabytą występowały 10 razy częściej w grupie kobiet badanych z VTE oraz RM [Lenz i wsp., 2015]. Koren i wsp. przedstawiają możliwe wystąpienie objawów trombofilii w wieku dziecięcym przy jednoczesnym nosicielstwie czynnika V Leiden, zmutowanych wariantów polimorfizmu *20210G>A* genu protrombiny oraz zmutowanych alleli polimorfizmu genu *MTHFR*. W pracy analizowano 9 dzieci z objawami zakrzepicy oraz 80 dzieci bez objawów zakrzepicy jako grupę kontrolną. W grupie badanej siedmioro dzieci było nosicielami genotypu heterozygotycznego *1691GA FV*, natomiast jedno dziecko genotypu homozygotycznego *1691AA FV*. Nosicielstwo zmutowanych wariantów polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR* opisano u pięciorga dzieci. W grupie kontrolnej (9 osób) w 5 przypadkach opisano podwójne heterozygoty dla *1691GA FV* oraz *677CT MTHFR*, w 1 przypadku jednoczesne nosicielstwo dwóch genotypów heterozygotycznych *1691GA FV* oraz *20210GA FII* [Koren i wsp., 2003]. Z drugiej strony kilka doniesień wskazuje na istotną rolę jednoczesnego nosicielstwa polimorfizmów *677C>T* oraz *1298A>C* genu *MTHFR* w etiologii powikłań w przebiegu ciąży. W grupie 113 pacjentek z populacji tureckiej z niepowodzeniami położniczymi obserwowano w 46%

występowanie genotypów heterozygotycznych *677CT* oraz *1298AC MTHFR*. Spośród czego 60% kobiet było nosicielkami genotypów podwójnie heterozygotycznych *677CT-1298AC MTHFR* [Aytekin i wsp., 2014].

Coulam i wsp., przedstawili analizę, w której pokazują współdziałanie kilku polimorfizmów w etologii poronień nawracających. Badanie przeprowadzono w grupie 150 kobiet z RM analizując 10 polimorfizmów w 7 genach (*1691G>A FV*, *H1299R FV*, *Y1702C FV*, *20210G>A FII*, *V34L FXIII*, *-455G>A* beta-fibrynogen, *4G/5G PAI-1*, *a/b (L33P) HPA1*, *677C>T MTHFR*, *1298A>C MTHFR*). W pracy tej nie pokazano istotnych różnic w częstości występowania osobno analizowanych polimorfizmów pomiędzy grupą badaną a kontrolną. Pokazano jednak znacząco wyższą przewagę występowania homozygot oraz całkowitej liczby mutacji w grupie RM. Genotypy homozygotyczne obserwowane były w 59% w grupie RM, natomiast w grupie kontrolnej w 10%, dodatkowo więcej niż 3 zmutowane warianty obserwowano w wyższej częstości (68%) w grupie RM w porównaniu do grupy kontrolnej (21%). Badanie to pokazuje, że związek trombofilii wrodzonej z RM manifestuje się bardziej poprzez większą całkowitą liczbę wariantów zmutowanych w grupie kobiet z niepowodzeniami niż tylko poprzez włączenie w etiologię RM pojedynczych mutacji specyficznych dla RM [Coulam i wsp., 2006].

Badania dotyczące haplotypów w etiologii RPL nie są liczne. Jednym z ciekawszych jest analiza przeprowadzona przez Cao i wsp. W grupie 82 pacjentek z poronieniami nawracającymi przed 12 tc. w wywiadzie. W pracy wskazano znacząca statystycznie korelację pomiędzy obecnością haplotypu *MTHFR 677C-MTHFR 1298C* a występowaniem RPL ($p < 0,001$) [Cao i wsp., 2014].

W przedstawianej powyżej analizie wskazano podobną częstość występowania haplotypów *TG* oraz *CG* czynnika V krzepnięcia we wszystkich badanych grupach (ns). Wskazano natomiast częstsze występowanie haplotypu *TA* zawierającego jeden zmutowany allel *1691A* polimorfizmu *1691G>A* genu czynnika V w podgrupie IUFD (0,047) w porównaniu do pozostałych grup (0,036 w grupie RM, 0,029 w grupie kontrolnej, ns). W zakresie genu *MTHFR* zauważono częstsze występowanie haplotypu *CAG* (zawierającego wszystkie niezmutowane warianty) w grupie kontrolnej (0,370 vs. 0,323 w grupie RM, 0,303 w grupie IUFD, ns). Inną ciekawą obserwacją było odnotowanie częstszego występowania haplotypu *CCG* (zawierający zmutowany wariant polimorfizmu *1298A>C*) w grupie IUFD (0,369 vs. 0,292 w grupie RM i 0,296 w grupie kontrolnej (ns) (ryc. 8).

OGRANICZENIA WYNIKAJĄCE Z PRZEPROWADZANYCH BADAŃ

W powyższej pracy przedstawiono analizę częstości występowania i współwystępowania wariantów polimorfizmów genetycznych genów związanych z trombofilią wrodzoną oraz analizę haplotypów w grupie kobiet z nawracającymi niepowodzeniami położniczymi oraz w grupie kontrolnej. Przedstawione grupy pacjentek objęły stosunkowo dużą liczbę osób (420 w grupie badanej z RPL oraz 400 w grupie kontrolnej). Ze względu na liczbę pacjentek jest to jedno z największych tego typu opracowań w populacji kobiet polskich. Często w tego typu badaniach analizą zostają objęte małe liczebnie grupy pacjentek, przez co zastosowane testy mają zbyt małą siłę statystyczną.

Ponieważ pomiędzy częstościami występowania polimorfizmów warunkujących trombofilię wrodzoną zaznaczone są nieraz silnie różnice regionalne i etniczne, stąd kwalifikacja pacjentek do badań powinna odbywać się ze szczególnym uwzględnieniem ich przynależności etnicznej i kraju pochodzenia. Niewątpliwą zaletą we wszelkich tego typu badaniach jest porównywanie grupy poddawanej analizie do grup kobiet o tym samym pochodzeniu etnicznym i tej samej przynależności rasowej. W powyższym badaniu do analizowanych grup kobiet kwalifikowano tylko pacjentki narodowości polskiej. Przynależność do innej rasy lub narodowości była jednym z kryteriów wyłączenia z badania.

W analizie typu *association study*, porównującej grupy osób zdrowych i chorych niespokrewnionych ze sobą, bardzo ważnym momentem jest opracowanie właściwych kryteriów włączenia i wyłączenia pacjentek z badania. Niewłaściwie dobrane kryteria oraz zbyt mała liczba pacjentek są głównymi przyczynami rozbieżnych wyników otrzymywanych w analizach częstości występowania polimorfizmów genetycznych [Singer, 2009]. W badaniach dotyczących nawracających utrat cięż spotykana jest różna klasyfikacja pacjentek do grup badanych poronień nawracających (2 lub 3 poronienia, niekoniecznie następujące po sobie, różny wiek ciążowy występowania poronień nawracających w porównywanych grupach). Również w analizie pacjentek ze zgonem wewnątrzmacicznym w II połowie ciąży często obejmują małe liczebnie grupy osób. W powyższym badaniu grupa pacjentek z RM jest w pełni reprezentatywna dla tego typu analiz (359 osób). Niewątpliwie mniejszą liczebnie grupę pacjentek stanowi grupa kobiet z IUFD, aczkolwiek grupa ta jest porównywalna pod względem liczby analizowanych pacjentek z innymi badaniami prezentowanymi w literaturze światowej.

Dodatkowo w badaniach dotyczących znaczenia polimorfizmów genetycznych w etiologii trombofilii wrodzonej analizowane są często pojedyncze warianty lub, w przypadku trombofilii nabytej, obecność niektórych tylko rodzajów przeciwciał antyfosfolipidowych. Stąd badania te są tak trudne w przypadku analizy porównawczej. Najbardziej wartościowe analizy obejmują jednoczesną analizę wielu czynników wskazywanych jako potencjalne przyczyny powikłań ciążowych u nosicielek trombofilii. W pracy przeprowadzono również analizę współwystępowania genotypów w oparciu o założenie, że warianty polimorficzne niekiedy o charakterze małego fenotypu mogą powodować działanie o efekcie sumarycznym powodując fenotyp chorobowy. Nawracające utraty ciąży są bowiem grupą chorób klasyfikowanych niejednokrotnie jako choroby uwarunkowane wieloczynnikowo tzn. jednostki o sumarycznym wpływie współdziałania wielu genów oraz silnym wpływie czynników środowiskowych. Powyższe badanie obejmuje analizę aż 7 polimorfizmów w obrębie 4 genów układu krzepnięcia oraz metabolizmu folianów i homocysteiny. Dodatkowo w powyższej analizie przeprowadzone zostało wyznaczenie współwystępowania genotypów poszczególnych polimorfizmów (tab. 40-60) oraz w całej grupie badanej RPL i kontrolnej wyznaczony sumaryczny efekt wpływu zmutowanych wariantów badanych polimorfizmów na występowanie poronień (tab. 65).

PODSUMOWANIE PRZEPROWADZONYCH BADAŃ

Najczęstszymi, i jednocześnie najbardziej istotnymi, przyczynami trombofilii wrodzonej w rasie kaukaskiej jest obecność mutacji czynnika V Leiden, polimorfizmu *20210G>A* genu protrombiny, oraz niedobór naturalnych antykoagulantów – białka C oraz S, antytrombiny III. Jako przyczynę trombofilii wskazuje się również polimorfizm *677C>T* oraz *1298A>C* genu reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (*MTHFR*), który ma istotne znaczenie w nieprawidłowym przebiegu metabolizmu folianów i hiperhomocysteinemii uwarunkowanej szczególnie występowaniem genotypu *677TT* oraz współwystępowaniem genotypów *677CT* / *1298AC* genu *MTHFR*. Kobiety nosicielki zmutowanych wariantów powyższych polimorfizmów znajdują się w grupie zwiększonego ryzyka wystąpienia powikłań w ciąży, szczególnie nawracających niepowodzeń położniczych.

Udział trombofilii wrodzonej w etiologii nawracających utrat ciąży jest przedmiotem wielu badań w licznych ośrodkach na całym świecie. Około 1-5% kobiet doświadcza poronień nawracających, niestety u około 50% tych kobiet przyczyna poronień pozostaje nieznana. Również pomimo przeprowadzania badań klinicznych i badań sekcyjnych 25-60% przyczyn zgonów wewnątrzmacicznych pozostaje niejasna [Dekker i wsp., 2004, Hefler i

wsp., 2004]. Niektóre prace wskazują, że nieprawidłowości łożyska wynikające z zaburzeń krążenia maciczo-łożyskowego oraz zmian zakrzepowych będące przyczyną RM oraz IUFD sięgają nawet 60% [Ptacek i wsp., 2014]. Wydaje się więc, że prowadzenie testów w kierunku trombofilii wrodzonej u kobiet z niewyjaśnionymi epizodami RPL w indywidualnie określonych przypadkach jest jak najbardziej zasadne. Postępowanie takie może ponadto przyczynić się nie tylko do wyjaśnienia przyczyny niepowodzenia, ale również pozwoli na odpowiednie postępowanie terapeutyczne w następnej ciąży.

Obecnie wydaje się, że trombofilia wrodzona jest związana z etiologią nawracających utrat ciąż i może być przyczyną wystąpienia niepowodzeń w kolejnych ciążach. Związek nosicielstwa trombofilii wrodzonej i występowania niektórych powikłań w ciąży wydaje się być dość dobrze udokumentowany. Pytaniem pozostaje udział tzw. „drugiego przekaźnika”, czyli mechanizmu spustowego koniecznego niekiedy do manifestacji trombofilii. Pytanie to dotyczy szczególnie przypadków kobiet, u których po niepowikłanym przebiegu pierwszej ciąży występują np. dwa następujące po sobie poronienia. Najprawdopodobniej RPL są powikłaniem o złożonej etiologii z silnym wpływem współistniejących czynników genetycznych i środowiskowych. Istnieje również potrzeba dokładnego wyjaśnienia procesu prozakrzepowego, właściwego dla zmian naczyniowych w łożysku u nosicielek trombofilii wrodzonej [Davenport i wsp., 2014].

Następnym problemem u kobiet z RPL jest zakres przeprowadzanej diagnostyki w oparciu o badania molekularne. Wydaje się, że na obecnym etapie wiedzy właściwym jest oznaczanie najczęstszych polimorfizmów dla trombofilii wrodzonej – mutacji Leiden, polimorfizmu 20210G>A genu protrombiny oraz polimorfizmów 677C>T i 1298A>C genu *MTHFR*. Pytaniem pozostaje postępowanie diagnostyczne z pacjentkami, u których nie wykazano obecność zmutowanych wariantów w zakresie tych dwóch polimorfizmów [Davenport i wsp., 2014].

Jednocześnie dużo dyskusji w chwili obecnej związane jest z włączaniem profilaktyki przeciwzakrzepowej u kobiet nosicielek trombofilii wrodzonej z obciążonym wywiadem położniczym [Saravolos i wsp., 2012]. Dużo badań wskazuje na korzystne efekty takiego działania, jednocześnie w ostatnich latach kilka prospektywnych badań nie wykazało znaczącej roli takiego postępowania profilaktycznego. Inna sytuacja istnieje w przypadku jednoczesnego występowania nosicielstwa trombofilii wrodzonej oraz współwystępowania zespołu APS. Tutaj wskazuje się na korzystne efekty włączenia profilaktyki złożonej z LMWH oraz ASA. Jednocześnie najnowsze badania wskazują na zadowalające efekty zastosowania profilaktyki LMWH i ASA zarówno w zespole APS, jak również u kobiet z

poronieniami nawracającymi i zgonami wewnątrzmacicznymi w profilaktyce wystąpienia powikłań w następnej ciąży [Connors i wsp., 2014]. Co więcej wydaje się, że stosowana profilaktyka z LMWH i ASA u kobiet z nawracającymi utratami ciąży może jeszcze inny wpływ na krążenie maczyno-łożyskowe oprócz jej działania antykoagulacyjnego [Simcox i wsp., 2015]. Szczególne zastosowanie profilaktyka przeciwzakrzepowa może znaleźć u kobiet nosicielek trombofilii wrodzonej i nabytej w prewencji stanu przedrzucawkowego oraz hipotrofii płodu rozwijających się przed 34 tc. z wcześniejszymi utratami [Simcox i wsp., 2015]. Dylemat etyczny polega na pytaniu, czy można odmówić leczenia, które może być skuteczne pacjentce z wcześniejszym niepowodzeniem ciąży? Odmowa taka może nieść ze sobą prawne konsekwencje lekarza oraz być źródłem stresu dla pacjentki i jej partnera.

Niewątpliwie istnieje konieczność opracowania prewencyjnych strategii postępowania w grupach kobiet z RPL oraz trombofilią wrodzoną w celu redukcji ryzyka wystąpienia podobnych niepowodzeń w następnych ciążach. W takim aspekcie analiza obecności różnych wariantów genetycznych pierwotnie odpowiedzialnych za rozwój nawracających niepowodzeń położniczych pozwoli na zrozumienie rozwoju procesu chorobowego, znalezienie odpowiednich metod ich zapobiegania i leczenia. Różnorodność bowiem indywidualnej odpowiedzi organizmu na zastosowane leczenie może zależeć od występujących u każdego pacjenta uwarunkowań genetycznych. Identyfikacja większej liczby funkcjonalnych polimorfizmów umożliwi znalezienie użytecznych markerów genetycznych pozwalających na wyznaczenie predyspozycji do wystąpienia utrat ciąży. Z drugiej strony pozwoli na dalszy dynamiczny rozwój medycyny spersonalizowanej opartej na indywidualnej diagnostyce, profilaktyce i leczeniu nawracających niepowodzeń położniczych.

WNIOSKI

1. Statystycznie istotna wyższa częstość występowania zmutowanych wariantów polimorfizmu *1793G>A* genu *MTHFR* w całej grupie RM wskazuje na rolę tego polimorfizmu w etiologii powikłania, szczególnie we wczesnych poronieniach RM <13 tc.
2. W pracy wskazano na istotne znaczenie niezmutowanego genotypu *353RR (11496GG)* oraz niezmutowanego allela *353R (11496G)* genu czynnika VII krzepnięcia w etiologii późnych poronień RM 13-22 tc.
3. Obserwowana przewaga zmutowanego genotypu i allela polimorfizmu *20210G>A* genu czynnika II krzepnięcia w całej grupie kobiet z poronieniami nawracającymi może sugerować możliwą rolę tego wariantu w etiologii RM.
4. Statystycznie istotna przewaga zmutowanych alleli polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR* wskazuje na znaczenie tego wariantu w etiologii IUFD.
5. Sumaryczna analiza nakładania się czynników ryzyka trombofilii wrodzonej wskazuje na istotne znaczenie takiego efektu współdziałania czynników prozakrzepowych w etiologii IUFD.
6. Analiza współwystępowania genotypów pokazała na możliwą rolę potencjalizującego współdziałania polimorfizmów *1691G>A* czynnika V krzepnięcia, *20210G>A* genu czynnika II krzepnięcia, *R353Q (11496G>A)* czynnika VII krzepnięcia oraz polimorfizmów genu *MTHFR* w patomechanizmie RPL.

PIŚMIENNICTWO

1. Adelberg AM, Kuller JA. Thrombophilias and recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol Surv.* 2002, 57(10), 703-709.
2. Alfirevic Z, Roberts D, Martlew V. How strong is the association between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? A systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2002, 101(1), 6-14.
3. Afroze B, Jehan F. Pre-natal genetic counseling in a resource limited country - a single center geneticist's perspectives. *J Pak Med Assoc.* 2014, 64(9), 1008-1011.
4. Alonso A, Soto I, Urgellés MF, Corte JR, Rodríguez MJ, Pinto CR. Acquired and inherited thrombophilia in women with unexplained fetal losses. *Am J Obstet Gynecol.* 2002, 187(5), 1337-1342.
5. Altintas A, Pasa S, Akdeniz N, Cil T, Yurt M, Ayyildiz O, Batun S, Isi H. Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutations in patients with recurrent pregnancy loss: data from the southeast of Turkey. *Ann Hematol.* 2007, 86(10), 727-731.
6. Ament L. Factor V Leiden: a review of the literature. *J Perinat Neonatal Nurs.* 2003, 17(3), 190-195.
7. American College of Obstetricians and Gynecologists Women's Health Care Physicians. ACOG Practice Bulletin No. 138: Inherited thrombophilias in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2013, 122(3), 706-717. doi: 10.1097/01.AOG.0000433981.36184.4e.
8. Andersen AM, Andersen PK, Olsen J, Gronbaek M, Standberg-Larsen K. Moderate alcohol intake during pregnancy and risk of fetal death. *Int J Epidemiol* 2012, 41, 405-413.
9. Anteby EY, Musalam B, Milwidsky A et al. Fetal inherited thrombophilias influence the severity of preeclampsia, IUGR and placental abruption. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004, 113, 31-35.
10. Aracic N, Roje D, Drmic Hofman I, Capkun V, Stefanovic V. Low molecular weight heparin treatment and impact of inherited thrombophilia type in pregnancies with previous adverse outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015, 28(3), 306-310. doi: 10.3109/14767058.2014.916268.
11. Ariel I, Anteby E, Hamani Y, Redline RW. Placental pathology in fetal thrombophilia. *Hum Pathol.* 2004, 35(6), 729-733.
12. Arredondo F, Noble LS. Endocrinology of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med.* 2006, 24(1), 33-39.
13. Asano E, Ebara T, Yamada-Namikawa C, Kitaori T, Suzumori N, Katano K, Ozaki Y, Nakanishi M, Sugiura-Ogasawara M. Genotyping analysis for the 46 C/T polymorphism of coagulation factor XII and the involvement of factor XII activity in patients with recurrent pregnancy loss. *PLoS One.* 2014, 9(12):e114452. doi: 10.1371/journal.pone.0114452.
14. Aune D, Saugstad OD, Henriksen T, Tonstad S. Maternal body mass index and the risk of fetal death, stillbirth, and infant death: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2014, 311(15), 1536-1546.
15. Aytekin E, Ergun SG, Ergun MA, Percin FE. Evaluation of GenoFlow Thrombophilia Array Test Kit in its detection of mutations in Factor V Leiden (G1691A), prothrombin G20210A, MTHFR C677T and A1298C in blood samples from 113

- Turkish female patients. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2014, 18(11), 717-721. doi: 10.1089/gtmb.2014.0143.
16. Bałajewicz-Nowak M, Pityński K, Milewicz T. The 1691 G > A (factor V Leiden) and 1328 T > C V coagulation factor polymorphisms and recurrent miscarriages. *Ginekol Pol*. 2015, 86(1), 46-52.
 17. Barhoover MA, Kalafatis M. Cleavage at both Arg306 and Arg506 is required and sufficient for timely and efficient inactivation of factor Va by activated protein C. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2011, 22(4), 317-324. doi: 10.1097/MBC.0b013e3283456c4e.
 18. Barlik M, Seremak-Mrozikiewicz A, Kraśnik W, Drews K. The 20210G>A and 19911A>G polymorphisms of prothrombin gene and recurrent miscarriages. *Ginekol Pol*. 2013, 84(10), 830-834.
 19. Barlik M, Seremak-Mrozikiewicz A, Wolski H, Bogacz A, Mrozikiewicz PM, Czerny B, Drews K. The -323P0/P10 factor VII gene polymorphism and the risk of recurrent miscarriage. *Ginekol Pol*. 2014, 85(8) 594-599.
 20. Bartosh N, Tomlin T, Cable C, Halka K. Newly diagnosed congenital factor VII deficiency and utilization of activated recombinant factor VII (NovoSeven). *Clin Pharmacol* 2013, 5, 53-58.
 21. Bar-Shavit R, Benezra M, Sabbah V, Bode W, Vlodaysky I. Thrombin as a multifunctional protein: induction of cell adhesion and proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992, 6, 23-30.
 22. Bates SM. Consultative hematology: the pregnant patient pregnancy loss. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:166-72. doi: 10.1182/asheducation-2010.1.166.
 23. Baumann K, Beuter-Winkler P, Hackethal A, Strowitzki T, Toth B, Bohlmann MK. Maternal factor V Leiden and prothrombin mutations do not seem to contribute to the occurrence of two or more than two consecutive miscarriages in Caucasian patients. *Am J Reprod Immunol*. 2013, 70(6), 518-521. doi: 10.1111/aji.12144.
 24. Bech BH, Autrup H, Nohr EA, Henriksen TB, Olsen J. Stillbirth and slow metabolizers of caffeine: comparison by genotypes. *Int J Epidemiol*. 2006, 35(4), 948-953.
 25. Bech BH, Nohr EA, Vaeth M, Henriksen TB, Olsen J. Coffee and fetal health: a cohort study with prospective data. *Am J Epidemiol* 2005, 162, 983-990.
 26. Benedetto C, Marozio L, Salton L, Maula V, Chieppa G, Massobrio M. Factor V Leiden and factor II G20210A in preeclampsia and HELLP syndrome. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2002, 81, 1095-1100.
 27. Bennett SA, Bagot CN, Arya R. Pregnancy loss and thrombophilia: the elusive link. *Br J Haematol*. 2012, 157(5), 529-542. doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09112.x.
 28. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994, 369(6475), 64-67.
 29. Bonnar J, Green R, Norris L. Inherited thrombophilia and pregnancy: the obstetric perspective. *Semin Thromb Hemost*. 1998, 24(1), 49-53.
 30. Bonnar J, Green R, Norris L. Perinatal aspects of inherited thrombophilia. *Semin Thromb Hemost*. 1999, 25(5), 481-485.
 31. Bonney EA, Brown SA. To drive or be driven: the path of a mouse model of recurrent pregnancy loss. *Reproduction*. 2014, 147(5), 153-167. doi: 10.1530/REP-13-0583.
 32. Bouvier S, Cochery-Nouvellon E, Lavigne-Lissalde G, Mercier E, Fabbro-Peray P, Balducchi JP, Marès P, Gris JC. Comparative incidence of pregnancy outcomes in

- thrombophilia-positive women from the NOH-APS observational study. *Blood*. 2014, 123(3), 414-421. doi: 10.1182/blood-2013-09-525014.
33. Brenner B. Thrombophilia and pregnancy loss. *Thromb Res* 2002; 108: 197-202.
 34. Brenner B, Kupfermanc MJ. Inherited thrombophilia and poor pregnancy outcome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2003, 17(3), 427-439.
 35. Brenner B, Sarig G, Weiner Z, Younis J, Blumenfeld Z, Lanir N. Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause. *Thromb Haemost*. 1999, 82, 6-9.
 36. Calderwood CJ, Greer IA. The role of factor V Leiden in maternal health and the outcome of pregnancy. *Curr Drug Targets*. 2005, 6(5), 567-576.
 37. Canda MT, Demir N, Sezer O. Impact of Factor V Leiden, prothrombin and methylenetetrahydrofolate reductase gene mutations on infant birth weight in women with recurrent fetal loss and women with successful pregnancies. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2012, 39(3), 359-361.
 38. Cao Y, Xu J, Zhang Z, Huang X, Zhang A, Wang J, Zheng Q, Fu L, Du J. Association study between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Gene*. 2013a, 514(2):105-11. doi: 10.1016/j.gene.2012.10.091.
 39. Cao Y, Zhang Z, Xu J, Yuan W, Wang J, Huang X, Shen Y, Du J. The association of idiopathic recurrent pregnancy loss with polymorphisms in hemostasis-related genes. *Gene*. 2013b, 530(2), 248-252. doi: 10.1016/j.gene.2013.07.080.
 40. Cao Y, Zhang Z, Zheng Y, Yuan W, Wang J, Liang H, Chen J, Du J, Shen Y. The association of idiopathic recurrent early pregnancy loss with polymorphisms in folic acid metabolism-related genes. *Genes Nutr*. 2014, 9(3), 402. doi: 10.1007/s12263-014-0402-x.
 41. Carp HJ. Thrombophilia and recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2006, 33(3), 429-442.
 42. Carp HJ. Progestogens in the prevention of miscarriage. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2015 Dec 17. pii: /j/hmbci.ahead-of-print/hmbci-2015-0058/hmbci-2015-0058.xml. doi: 10.1515/hmbci-2015-0058.
 43. Carp H, Salomon O, Seidman D, Dardik R, Rosenberg N, Inbal A. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod*. 2002, 17(6), 1633-1637.
 44. Castoldi E, Simioni P, Kalafatis M, Lunghi B, Tormene D, Girelli D, Girolami A, Bernardi F. Combinations of 4 mutations (FV R506Q, FV H1299R, FV Y1702C, PT 20210G/A) affecting the prothrombinase complex in a thrombophilic family. *Blood*. 2000, 96, 1443-1448.
 45. Castoldi E, Simioni P, Tormene D, Thomassen MC, Spiezia L, Gavasso S et al. Differential effects of high prothrombin levels on thrombin generation depending on the cause of the hyperprothrombinemia. *J Thromb Haemost*. 2007, 5, 971-979.
 46. Ceelie H, Bertina RM, Hylckama-VliegA, Rosendaal FR, Vos HL. Polymorphisms in the prothrombin gene and their association with plasma prothrombin levels. *Thromb Haemost*. 2001, 85, 1066-1070.
 47. Chango A, Boisson F, Barbé F, Quilliot D, Drosch S, Pfister M, Fillon-Emery N, Lambert D, Fremont S, Rosenblatt DS, Nicolas JP. The effect of 677C>T and 1298A>C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. *Br J Nutr*. 2000, 83, 593-596.
 48. Chinthammitr Y, Vos HL, Rosendaal FR, Doggen CJ. The association of prothrombin A19911G polymorphism with plasma prothrombin activity and venous thrombosis:

- results of the MEGA study, a large population-based case-control study. *J Thromb Haemost.* 2006, 4, 2587-2592.
49. Chan WP, Lee CK, Kwong YL et al. A novel mutation of arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood.* 1998, 91, 1135-1139.
 50. Choudhary A, Gupta V. Epidemiology of intrauterine fetal deaths: a study in tertiary referral Centre in Uttarakhand. *IOSR-JDMS.* 2014, 13(3), 3-6.
 51. Christiansen OB, Nielsen HS, Kolte AM. Future directions of failed implantation and recurrent miscarriage research. *Reprod Biomed Online.* 2006, 13(1), 71-83.
 52. Clark DA. Popular myths in reproductive immunology. *J Reprod Immunol.* 2014, 104-105, 54-62. doi: 10.1016/j.jri.2014.06.002.
 53. Connors JM. Preventing pregnancy loss. *Blood.* 2014, 123(3), 308-310. doi: 10.1182/blood-2013-11-538314.
 54. Coriu L, Copaciu E, Tulbure D, Talmaci R, Secara D, Coriu D, Cirstoiu M. Inherited thrombophilia in pregnant women with intrauterine growth restriction. *Maedica (Buchar).* 2014, 9(4), 351-355.
 55. Coughlan C, Walters S, Ledger W, Li TC. A comparison of psychological stress among women with and without reproductive failure. *Int J Gynaecol Obstet.* 2014, 124(2), 143-147. doi: 10.1016/j.ijgo.2013.08.006.
 56. Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutations are risk factors for recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol.* 2006, 55(5), 360-368.
 57. Cousens S, Blencowe H, Stanton C, et al. National, regional, and worldwide estimates of stillbirth rates in 2009 with trends since 1995: a systematic analysis. *Lancet.* 2011, 377(9774), 1319-1330.
 58. Couto E, Barini R, Zaccaria R, Annicchino-Bizzacchi JM, Passini Junior R, Pereira BG, Silva JC, Pinto e Silva JL. Association of anticardiolipin antibody and C677T in methylenetetrahydrofolate reductase mutation in women with recurrent spontaneous abortions: a new path to thrombophilia? *Sao Paulo Med J.* 2005, 123(1), 15-20.
 59. Craig M. Stress and recurrent miscarriage. *Stress.* 2001, 4(3), 205-213.
 60. Currie L, Peek M, McNiven M et al. Is there an increased maternal-infant prevalence of Factor V Leiden in association with severe pre-eclampsia? *BJOG.* 2002, 109, 191-196.
 61. Dahlback B. Inherited resistance to activated protein C, a major cause of venous thrombosis, is due to a mutation in the factor V gene. *Haemostasis.* 1994, 24, 139-151.
 62. Dahlbäck B. Early days of APC resistance and FV Leiden. *Hamostaseologie.* 2008a, 28(3), 103-109.
 63. Dahlbäck B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood.* 2008b, 112(1), 19-27. doi: 10.1182/blood-2008-01-077909.
 64. Davenport WB, Kutteh WH. Inherited thrombophilias and adverse pregnancy outcomes: a review of screening patterns and recommendations. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2014, 41(1):133-44. doi: 10.1016/j.ogc.2013.10.005.
 65. De Carolis C, Greco E, Guarino MD, Perricone C, Dal Lago A, Giacomelli R, Fontana L, Perricone R. Anti-thyroid antibodies and antiphospholipid syndrome: evidence of reduced fecundity and of poor pregnancy outcome in recurrent spontaneous aborters. *Am J Reprod Immunol.* 2004, 52(4), 263-266.
 66. de Jesus GR, Agmon-Levin N, Andrade CA, Andreoli L, Chighizola CB, Porter TF, Salmon J, Silver RM, Tincani A, Branch DW. 14th International Congress on

- Antiphospholipid Antibodies Task Force report on obstetric antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev.* 2014, 13(8), 795-813.
67. de Jong PG, Goddijn M, Middeldorp S. Testing for inherited thrombophilia in recurrent miscarriage. *Semin Reprod Med.* 2011, 29(6), 540-547. doi: 10.1055/s-0031-1293207.
 68. de Jong PG, Goddijn M, Middeldorp S. Antithrombotic therapy for pregnancy loss. *Hum Reprod Update.* 2013, 19(6), 656-673. doi: 10.1093/humupd/dmt019.
 69. de Jong PG, Kaandorp S, Di Nisio M, Goddijn M, Middeldorp S. Aspirin and/or heparin for women with unexplained recurrent miscarriage with or without inherited thrombophilia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Jul 4; 7:CD004734.
 70. Dekker JW, Lind J, Bloemenkamp KW, Quint WG, Kuijpers JC, van Doorn LJ, de Groot CJ. Inherited risk of thrombosis of the fetus and intrauterine fetal death. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004, 117(1), 45-48.
 71. De la Cruz-Mosso U, Muñoz-Valle JF, Salgado-Goytia L, García-Carreón A, Illades-Aguiar B, Castañeda-Saucedo E, Parra-Rojas I. Relationship of metabolic syndrome and its components with -844 G/A and HindIII C/G PAI-1 gene polymorphisms in Mexican children. *BMC Pediatr.* 2012, 29, 12-41.
 72. Demirel G, Celik IH, Zergeroglu S, Erdeve O, Dilmen U. Neonatal outcome of the pregnancies associated with placental villous thrombosis - thrombophilic status of the mothers and the infants. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012, 25(11), 2225-2229. doi: 10.3109/14767058.2012.684169.
 73. De Stefano V, Rossi E, Paciaroni K, Leone G. Screening for inherited thrombophilia: indications and therapeutic implications. *Haematologica.* 2002, 87(10), 1095-1108. Review.
 74. Dizon-Townson DS, Nelson LM, Easton K, Ward K. The factor V Leiden mutation may predispose women to severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1996, 175, 902-905.
 75. Dudding TE, Attia J. The association between adverse pregnancy outcomes and maternal factor V Leiden genotype: a meta-analysis. *Thromb Haemost.* 2004, 91, 700-711.
 76. Dudding TE, Attia J. Maternal factor V Leiden and adverse pregnancy outcome: deciding whether or not to test. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012, 25(7), 889-894. doi: 10.3109/14767058.2011.608815.
 77. Dutra CG, Frega LR, Nacul AP, Passos EP, Cancalves RO, Nunes OL, De Godoy BA, Leistner-Segal S, Vianna FS, Schuler-Faccini L, Sanseverino MT. Lack of association between thrombophilic gene variants and recurrent pregnancy loss. *Hum Fertil (Camb).* 2014, 17(2), 99-105. doi: 10.3109/14647273.2014.882022.
 78. Eggert-Kruse W, Scholz S, Kirschfink M, Strowitzki T. Recurrent miscarriages, innate immunity, and autoimmune reaction to chlamydial 60-kDa heat shock protein--is there an association? *Fertil Steril.* 2014, 101(6), 1675-1680. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.02.048.
 79. Elmahgoub IR, Afify RA, Abdel Aal AA, El-Sherbiny WS. Prevalence of coagulation factor XIII and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms among Egyptian women suffering from unexplained primary recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol.* 2014, 103, 18-22. doi: 10.1016/j.jri.2014.02.007.
 80. Ernest JM, Marshburn PB, Kutteh WH. Obstetric antiphospholipid syndrome: an update on pathophysiology and management. *Semin Reprod Med.* 2011, 29(6), 522-539.

81. Esteve-Valverde E, Ferrer-Oliveras R, Alijotas-Reig J. Obstetric antiphospholipid syndrome. *Rev Clin Esp.* 2015Oct23.pii:S0014-2565(15)00228-3. doi: 10.1016/j.rce.2015.09.003.
82. Fabbro D, D'Elia AV, Spizzo R, Driul L, Barillari G, Di Loreto C, Marchesoni D, Damante G. Association between plasminogen activator inhibitor 1 gene polymorphisms and preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest.* 2003, 56, 17-22.
83. Faisel F, Romppanen EL, Hiltunen M et al. Susceptibility to pre-eclampsia in Finnish women is associated with R485K polymorphism in the factor V gene, not with Leiden mutation. *Europ J Hum Genet.* 2004, 12, 187-191.
84. Ferrari F, Facchinetti F, Yin H, Saade GR, Longo M. Single-nucleotide polymorphisms in genes involved in placental function and unexplained stillbirth. *Am J Obstet Gynecol.* 2012, 207(4), 316-324. doi: 10.1016/j.ajog.2012.06.030.
85. Finan RR, Tamim H, Ameen G et al. Prevalence of factor V G1691A (factor V-Leiden) and prothrombin G20210A gene mutations in a recurrent miscarriage population. *Am J Hematol.* 2002, 71, 300-305.
86. Flenady V, Koopmans L, Middleton P, et al. Major risk factors for stillbirth in high-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2011, 377(9774), 1331-1340.
87. Foka ZJ, Lambropoulos AF, Saravelos H, Karas GB, Karavida A, Agorastos T, Zournatzi V, Makris PE, Bontis J, Kotsis A. Factor V leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod.* 2000, 15(2), 458-462.
88. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis and therapy. *Rev Obstet Gynecol* 2009, 2(2), 76-83.
89. Franchini M, Lippi G. Factor V Leiden and hemophilia. *Thromb Res.* 2010, 125(2), 119-123.
90. Friso S, Girelli D, Trabetti E, Stranieri C, Olivieri O, Tinazzi E, Martinelli N, Faccini G, Pignatti PF, Corrocher R. A1298C methylenetetrahydrofolate reductase mutation and coronary artery disease: relationships with C677T polymorphism and homocysteine/folate metabolism. *Clin Exp Med.* 2002;2:7-12.
91. Frosst P; Blom, H.J; Milos R; Goyette P; Sheppard CA; Matthews RG; Boers GJH; den Heijer M; Kluijtmans LAJ; van den Heuvel LP; Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet.* 1995, 10, 111-113.
92. Fujimaki T, Kato K, Yoshida T, Oguri M, Watanabe S, Metoki N, Yoshida H, Satoh K, Aoyagi Y, Nishigaki Y, Tanaka M, Nozawa GK, Yamada Y. Association of genetic variants with myocardial infarction in Japanese individuals with chronic kidney disease. *Thromb Haemost* 2009, 101, 963-968.
93. Galambosi PJ, Kaaja RJ, Stefanovic V, Ulander VM. Safety of low-molecular-weight heparin during pregnancy: a retrospective controlled cohort study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012, 163(2), 154-159. doi: 10.1016/j.ejogrb.2012.05.010.
94. Gao H, Tao FB. Prothrombin G20210A mutation is associated with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis update. *Thromb Res* 2015, 135(2), 339-346. doi: 10.1016/j.thromres.2014.12.001.
95. Garcia JGN. Molecular mechanisms of thrombin-induced human and bovine endothelial cell activation. *J Lab Clin Med.* 1992, 120, 513-519.
96. Gardosi J, Madurasinghe V, Williams M, Malik A, Francis A. Maternal and fetal risk factors for stillbirth: population based study. *BMJ.* 2013 Jan 24. 346:f108.

97. Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Vetter B, Hentze MW, Kulozik AE. Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Genet.* 2001, 28, 389-392.
98. Gerber S, Vardhana S, Meagher-Villemure K, Vial Y, Hohlfeld P, Witkin SS. Association between fetal interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and unexplained fetal death. *Am J Obstet Gynecol.* 2005, 193(4), 1472-1477.
99. Ghosh K, Shetty S, Mohanty D. Milder clinical presentation of haemophilia A with severe deficiency of factor VIII as measured by one-stage assay. *Haemophilia.* 2001, 7, 9-12.
100. Glueck CJ, Kupferminc MJ, Fontaine RN, Wang P, Weksler BB, Eldor A. Genetic hypofibrinolysis in complicated pregnancies. *Obstet Gynecol.* 2001, 97, 44-48.
101. Goodman CS, Coulam CB, Jeyendran RS, Acosta VA, Roussev R. Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? *Am J Reprod Immunol.* 2006, 56, 230-236.
102. Gordijn SJ, Korteweg FJ, Erwich JJ, Holm JP, van Diem MT, Bergman KA, Timmer A. A multilayered approach for the analysis of perinatal mortality using different classification systems. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009, 144(2), 99-104.
103. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genet.* 1994, 7, 195-200.
104. Green F, Kelleher C, Wilkes H, Temple A, Meade T, Humphries S. 1991. A common genetic polymorphism associated with lower coagulation factor VII levels in healthy individuals. *Arterioscler Thromb.* 1991, 11, 540-546.
105. Greer IA. Thrombophilia: implications for pregnancy outcome. *Thromb Res.* 2003, 109(2-3), 73-81.
106. Grody WW, Griffin JH, Taylor AK et al. American College of Medical Genetics Consensus Statement on Factor V Leiden Mutation Testing. *Genet Med.* 2001, 3, 139-148.
107. Grosso LM, Bracken MB. Caffeine metabolism, genetics, and perinatal outcomes: a review of exposure assessment considerations during pregnancy. *Ann Epidemiol.* 2005, 15(6), 460-466.
108. Guimarães Filho HA, Mattar R, Pires CR, Araujo Júnior E, Moron AF, Nardoza LM. Prevalence of uterine defects in habitual abortion patients attended on at a university health service in Brazil. *Arch Gynecol Obstet.* 2006a, 274(6), 345-348.
109. Guimarães Filho HA, Mattar R, Pires CR, Araujo Júnior E, Moron AF, Nardoza LM. Comparison of hysterosalpingography, hysterosonography and hysteroscopy in evaluation of the uterine cavity in patients with recurrent pregnancy losses. *Arch Gynecol Obstet.* 2006b, 274(5), 284-288.
110. Hanson NQ, Aras O, Yang F, Tsai MY. C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease. *Clin Chem.* 2001, 47, 661-666.
111. Haram K, Mortensen JH, Nagy B. Genetic aspects of preeclampsia and the HELLP syndrome. *J Pregnancy.* 2014, 2014:910751. doi: 10.1155/2014/910751.

112. Harris RA, Ferrari F, Ben-Shachar S, Wang X, Saade G, Van Den Veyver I, Facchinetti F, Aagaard-Tillery K. Genome-wide array-based copy number profiling in human placentas from unexplained stillbirths. *Prenat Diagn.* 2011, 31(10), 932-944. doi: 10.1002/pd.2817.
113. Heazell AE, Clewlow J. Protecting families from recurrent stillbirth. *BMJ.* 2015, 350:h3262. doi: 10.1136/bmj.h3262.
114. Hefler L, Jirecek S, Heim K, Grimm C, Antensteiner G, Zeillinger R, Husslein P, Tempfer C. Genetic polymorphisms associated with thrombophilia and vascular disease in women with unexplained late intrauterine fetal death: a multicenter study. *J Soc Gynecol Investig.* 2004, 11(1), 42-44.
115. Helgadóttir LB, Skjeldestad FE, Jacobsen AF, Sandset PM, Jacobsen EM. The association of inherited thrombophilia and intrauterine fetal death: a case-control study. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2011, 22(8), 651-656. doi: 10.1097/MBC.0b013e32834a614c.
116. Heuser CC, McFadden M, Hammer A, Varner MW, Silver RM. Stillbirth gestational age as a predictor of recurrence risk. *Am J Perinatol.* 2014, 31(5), 393-400. doi: 10.1055/s-0033-1349344.
117. Hira B, Pegoraro RJ, Rom L et al. Absence of Factor V Leiden, thrombomodulin and prothrombin gene variants in Black South African women with pre-eclampsia and eclampsia. *BJOG.* 2003, 110, 327-328.
118. Hirbawi J, Vaughn JL, Bukys MA, Vos HL, Kalafatis M. Contribution of amino acid region 659-663 of Factor Va heavy chain to the activity of factor Xa within prothrombinase. *Biochemistry.* 2010, 49(39), 8520-8534. doi: 10.1021/bi101097t.
119. Hoffman CJ, Miller RH, Hultin MB. Correlation of factor VII activity and antigen with cholesterol and triglycerides in healthy young adults. *Arterioscler Thromb* 1992, 12, 267-270.
120. Hoffamn M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001, 85, 958-965.
121. Hohlagschwandtner M, Unfried G, Heinze G, Huber JC, Nagele F, Tempfer C. Combined thrombophilic polymorphisms in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Fertil Steril.* 2003, 79(5), 1141-1148
122. Homberger A, Linnebank M, Winter C, Willenbring H, Marquardt T, Harms E, Koch HG. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet.* 2000, 8, 725-729.
123. Hossain N, Shamsi T, Khan N, Naz A. Thrombophilia investigation in Pakistani women with recurrent pregnancy loss. *J Obstet Gynaecol Res.* 2013, 39(1), 121-125.
124. Humphries S, Temple A, Lane A, Green F, Cooper J, Miller G. Low plasma levels of factor VIIc and antigen are more strongly associated with the 10 base pair promoter (-323) insertion than the glutamine 353 variant. *Thromb Haemost.* 1996, 75, 567-572.
125. Hyde KJ, Schust DJ. Genetic considerations in recurrent pregnancy loss. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015, Feb 6;5(3):a023119. doi: 10.1101/cshperspect.a023119.
126. Isaoglu U, Ulug P, Delibas IB, Yilmaz M, Kumtepe Y, Dogan H, Tasdemir S. The association between inherited thrombophilia and recurrent pregnancy loss in Turkish women. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2014, 41(2), 177-181.
127. Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet.* 2000, 67, 986-990.

128. Jaaskelainen E, Toivonen S, Romppanen E, [et al.]. M385T polymorphism in the factor V gene, but not Leiden mutation, is associated with placental abruption in Finnish women. *Placenta*. 2004, 25, 730-734.
129. Jaleel R, Khan A. Paternal factors in spontaneous first trimester miscarriage. *Pak J Med Sci*. 2013, 29(3), 748-752.
130. Johnson CM, Mureebe L, Silver D. Hypercoagulable states: a review. *Vasc Endovascular Surg*. 2005, 39(2), 123-133.
131. Jevc YB, Davies W. Evidence-based management of recurrent miscarriages. *J Hum Reprod Sci*. 2014, 7(3), 159-169. doi: 10.4103/0974-1208.142475.
132. Kaandorp S, Di Nisio M, Goddijn M, Middeldorp S. Aspirin or anticoagulants for treating recurrent miscarriage in women without antiphospholipid syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Jan 21;(1):CD004734. doi: 10.1002/14651858.CD004734.pub3.
133. Kaandorp SP, van Mens TE, Middeldorp S, Hutten BA, Hof MH, van der Post JA, van der Veen F, Goddijn M. Time to conception and time to live birth in women with unexplained recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 2014, 29(6), 1146-1152. doi: 10.1093/humrep/deu052.
134. Kagami M, Maruyama T, Koizumi T, Miyazaki K, Nishikawa-Uchida S, Oda H, Uchida H, Fujisawa D, Ozawa N, Schmidt L, et al. Psychological adjustment and psychosocial stress among Japanese couples with a history of recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod*. 2012, 27(3), 787-794.
135. Kalafatis M, Mann KG. Factor V: Dr. Jeckyll and Mr. Hyde. *Adv Exp Med Biol*. 2001, 489, 31-43.
136. Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: A thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet*. 1988, 43, 414-421.
137. Kersting A, Wagner B. Complicated grief after perinatal loss. *Dialogues Clin Neurosci*. 2012, 14(2), 187-194.
138. Khaira A, Kalra OP, Gupta A, Khaira DD. Dual genetic abnormality in the coagulation pathway as a cause of familial thrombophilia. *J Assoc Physicians India*. 2009, 57, 529-530.
139. Kim RJ, Becker RC. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies. *Am Heart J*. 2003, 146(6), 948-957.
140. Kim JJ, Choi YM, Lee SK, Yang KM, Paik EC, Jeong HJ, Jun JK, Han AR, Hong MA. The PAI-1 4G/5G and ACE I/D polymorphisms and risk of recurrent pregnancy loss: a case-control study. *Am J Reprod Immunol*. 2014, 72(6), 571-576.
141. Kim YJ, Williamson RA, Murray JC et al. Genetic susceptibility to preeclampsia: Roles of cytosine-to-thymine substitution at nucleotide 677 of the gene for methylenetetrahydrofolate reductase, 68-base pair insertion at nucleotide 844 of the gene for cystathionine β -synthase, and factor V Leiden mutation. *Am J Obstet Gynecol*. 2001, 184, 1211-1217.
142. Kishore J, Agarwal J, Agrawal S, Ayyagari A. Seroanalysis of Chlamydia trachomatis and S-TORCH agents in women with recurrent spontaneous abortions. *Indian J Pathol Microbiol*. 2003, 46(4), 684-687.
143. Kishore J, Gupta I. Serological study of parvovirus B19 infection in women with recurrent spontaneous abortions. *Indian J Pathol Microbiol*. 2006, 49(4), 548-550.

144. Kist WJ, Janssen NG, Kalk JJ, Hague WM, Dekker GA, de Vries JJ. Thrombophilias and adverse pregnancy outcome - A confounded problem! *Thromb Haemost.* 2008, 99(1), 77-85.
145. Kolte AM, Olsen LR, Mikkelsen EM, Christiansen OB, Nielsen HS. Depression and emotional stress is highly prevalent among women with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod.* 2015, 30(4), 777-782. doi: 10.1093/humrep/dev014.
146. Koren A, Levin C, Hujirat Y, El-Hasid R, Kutai M, Lanir N, Shalev S, Brenner B. Thrombophilia in infancy: factor V Leiden and MTHFR or factor II double heterozygosity as a risk factor. *Pediatr Hematol Oncol.* 2003, 20(3), 219-227.
147. Kosmas IP, Tatsioni A, Ioannidis JP. Association of Leiden mutation in factor V gene with hypertension in pregnancy and pre-eclampsia: a meta-analysis. *J Hypertens.* 2003, 21, 1221-1228.
148. Korteweg FJ, Erwich JJ, Holm JP, Ravisé JM, van der Meer J, Veeger NJ. Diverse placental pathologies as the main causes of fetal death. *Obstet Gynecol.* 2009, 114(4), 809-817.
149. Korteweg FJ, Gordijn SJ, Timmer A, Erwich JJ, Bergman KA, Bouman K, Ravise JM, Heringa MP, Holm JP. The Tulip classification of perinatal mortality: introduction and multidisciplinary inter-rater agreement. *BJOG.* 2006, 113(4), 393-401.
150. Korteweg F, Gordijn SJ, Timmer A, Holm JP, Ravise JM, Erwich JJ. A placental cause of intra-uterine fetal death depends on the perinatal mortality classification system used. *Placenta* 2008, 29(1), 71-80.
151. Krabbendam I, Franx A, Bots ML, Fijnheer R, Bruinse HW. Thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a critical appraisal of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005, 118(2), 143-153. Review.
152. Krieg S, Westphal L. Immune Function and Recurrent Pregnancy Loss. *Semin Reprod Med.* 2015, 33(4), 305-312. doi: 10.1055/s-0035-1554917.
153. Kulkarni AA, Lee CA, Kadir RA. Pregnancy in women with congenital factor VII deficiency. *Haemophilia.* 2006, 12, 413-416.
154. Kumar N, Ahluwalia J, Das R, Rohilla M, Bose S, Kishan H, Varma N. Inherited thrombophilia profile in patients with recurrent miscarriages: Experience from a tertiary care center in north India. *Obstet Gynecol Sci.* 2015, 58(6), 514-517. doi: 10.5468/ogs.2015.58.6.514.
155. Kupfermanc JM. Management of thrombophilia in women with PVC. *Thromb Res.* 2005, 115, 46-50.
156. Kupfermanc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, Fait G, Lessing JB. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med.* 1999, 340(1), 9-13.
157. Kupfermanc MJ, Fait G, Many A, Gordon D, Eldor A, Lessing JB. Severe preeclampsia and high frequency of genetic thrombophilic mutations. *Obstet Gynecol.* 2000a, 96, 45-49.
158. Kupfermanc MJ, Peri H, Zwang E, Yaron Y, Wolman I, Eldor A. High prevalence of the prothrombin gene mutation in women with intrauterine growth retardation, abruptio placentae and second trimester loss. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2000b, 79, 963-967.
159. Kutteh WH. Novel strategies for the management of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med.* 2015, 33(3), 161-168. doi: 10.1055/s-0035-1552586.
160. Kutteh WH, Park VM, Deitcher SR. Hypercoagulable state mutation analysis in white patients with early first-trimester recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 1999, 71, 1048-1053.

161. Kutteh WH, Triplett DA. Thrombophilias and recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med.* 2006, 24(1), 54-66. Review.
162. Laczika K, Lang IM, Quehenberger P, Mannhalter C, Muhm M, Klepetko W, Kyrle PA. Unilateral chronic thromboembolic pulmonary disease associated with combined inherited thrombophilia. *Chest.* 2002, 121(1), 286-289.
163. Lamont K, Scott NW, Jones GT, Bhattacharya S. Risk of recurrent stillbirth: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2015 Jun 24;350:h3080. doi: 10.1136/bmj.h3080.
164. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood.* 2000, 95(5):1517-1532.
165. Larciprete G, Rossi F, Deaibess T, Brienza L, Barbati G, Romanini E, Gioia S, Cirese E. Double inherited thrombophilias and adverse pregnancy outcomes: fashion or science? *J Obstet Gynaecol Res.* 2010, 36(5), 996-1002.
166. Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM, Macklon N. New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Med.* 2013 Jun 26;11:154. doi: 10.1186/1741-7015-11-154.
167. Laskin CA, Spitzer KA, Clark CA, Crowther MR, Ginsberg JS, Hawker GA, Kingdom JC, Barrett J, Gent M. Low molecular weight heparin and aspirin for recurrent pregnancy loss: results from the randomized, controlled HepASA Trial. *J Rheumatol.* 2009, 36(2), 279-287.
168. Leaf RK, Connors JM. The role of anticoagulants in the prevention of pregnancy complications. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2015Nov12.pii: 1076029615615972.
169. Lee DH, Walker IR, Teitel et al., Effect of the factor V Leiden mutation on the clinical expression of severe hemophilia A. *Thromb Haemost.* 2000, 83, 387-391.
170. Le Marchand L, Donlon T, Hankin JH, Kolonel LN, Wilkens LR, Seifried A. B-vitamin intake, metabolic genes, and colorectal cancer risk (United States). *Cancer Causes Control.* 2002, 13, 239-248.
171. Lenz B, Samardzija M, Drenjancevic D, Zibar D, Samardzija M, Milostic-Srb A. The investigation of hereditary and acquired thrombophilia risk factors in the development of complications in pregnancy in Croatian women. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015, 14, 1-6.
172. Leroyer C, Mercier B, Oger E, Chenu E, Abgrall JF, Férec C, Mottier D. Prevalence of 20210 A allele of the prothrombin gene in venous thromboembolism patients. *Thromb Haemost.* 1998, 80, 49-51.
173. Lewandowski K, Balcerzak A, Kubiaczyk-Paluch B, Breborowicz GH. Successful pregnancy outcome in the woman with thrombophilia and multiple miscarriages. *Ginekol Pol.* 2003, 74(5), 387-394.
174. Lewandowski K. Wybrane problemy trombofilii. *Acta Haemost Pol.* 2010, 41(2), 201-207.
175. Li W, Newell-Price J, Jones GL, Ledger WL, Li TC. Relationship between psychological stress and recurrent miscarriage. *Reprod Biomed Online.* 2012, 25(2), 180-189. doi: 10.1016/j.rbmo.2012.03.012.
176. Lin J, August P. Genetic thrombophilias and preeclampsia: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2005, 105, 182-192.
177. Lindoff C, Ingemarsson I, Martinsson G et al. Pre-eclampsia is associated with a reduced response to activated protein C. *Am J Obstet Gynecol.* 1997, 176, 457-460.

178. Lindqvist PG. On the evolutionary advantage of coagulation factor V Leiden (FVL). *Curr Med Chem*. 2015, 22(32), 3676-3681.
179. Lindqvist PG, Dahlbäck B. Carriership of Factor V Leiden and evolutionary selection advantage. *Curr Med Chem*. 2008, 15(15), 1541-1544.
180. Liu Y, Heng CK, Saha N, Hong S, Low PS. Genotype associations of factor VII gene with plasma factor VII coagulant activity and antigen levels in healthy Chinese. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2002, 13, 217-224.
181. Lockwood CJ. Inherited thrombophilias in pregnant patients: detection and treatment paradigm. *Obstet Gynecol*. 2002, 99(2), 333-341.
182. Lopes L, Jacob GP. Thrombophilia testing in pregnancy: should we agree to disagree? *J Perinat Med*. 2015, 43(2), 269-272. doi: 10.1515/jpm-2014-0075.
183. Lu JR, McCowan L. A comparison of the Perinatal Society of Australia and New Zealand-Perinatal Death Classification system and relevant condition at death stillbirth classification systems. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2009, 49(5), 467-471.
184. MacDorman MF, Kirmeyer S, Wilson EC. Fetal and perinatal mortality, United States, 2006. *Natl Vital Stat Rep*. 2012, 60(8), 1-22.
185. Magnetti F, Bagna R, Botta G, Viano A, Dorati G, Raia M, Bertino E, Saracco P. Fetal thrombotic vasculopathy and perinatal thrombosis: should all placentas be examined? *Am J Perinatol*. 2014, 31(8), 695-700. doi: 10.1055/s-0033-1357267.
186. Magriples U, Ozcan T, Karne A, Copel JA. The effect of anticoagulation on antenatal ultrasound findings in pregnant women with thrombophilia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2006, 19(1), 27-30.
187. Many A, Elad R, Yaron Y, Eldor A, Lessing JB, Kupfermanc MJ. Third-trimester unexplained intrauterine fetal death is associated with inherited thrombophilia. *Obstet Gynecol*. 2002, 99, 684-687.
188. Many A, Schreiber L, Rosner S, Lessing JB, Eldor A, Kupfermanc MJ. Pathologic features of the placenta in women with severe pregnancy complications and thrombophilia. *Obstet Gynecol*. 2001, 98(6), 1041-1044.
189. Martinelli I, Battaglioli T, Tosetto A, Legnani C, Sottile L, Ghiotto R, et al. Prothrombin A19911G polymorphism and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*. 2006, 4, 2582-2586.
190. Martinelli I, De Stefano V, Taioli E, Paciaroni K, Rossi E, Mannucci PM. Inherited thrombophilia and first venous thromboembolism during pregnancy and puerperium. *Thromb Haemost*. 2002, 87(5), 791-795.
191. Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V, Taioli E, Rossi V, Crosti F, Paciaroni K, Leone G, Faioni EM. Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood*. 1998, 92(7), 2353-2358.
192. Martinelli I, Taioli E, Cetin I, Marinoni A, Gerosa S, Villa MV, Bozzo M, Mannucci PM. Mutations in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss. *N Engl J Med*. 2000, 343, 1015-1018.
193. Martínez-Zamora MÁ, Cervera R, Balasch J. Thromboembolism risk following recurrent miscarriage. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2013, 11(11), 1503-1513. doi: 10.1586/14779072.2013.839201.
194. Matthews RG, Vanoni MA, Hainfeld JF, Wall J. Methylene tetrahydrofolate reductase. Evidence for spatially distinct subunit domains obtained by scanning transmission electron microscopy and limited proteolysis. *J Biol Chem*. 1984, 259, 11647-11650.

195. McNamee K, Dawood F, Farquharson RG. Thrombophilia and early pregnancy loss. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2012, 26(1), 91-102.
196. McNamee KM, Dawood F, Farquharson RG. Mid-trimester pregnancy loss. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2014, 41(1), 87-102. doi: 10.1016/j.ogc.2013.10.007.
197. Metwally M, Ong KJ, Ledger WL, Li TC. Does high body mass index increase the risk of miscarriage after spontaneous and assisted conception? A meta-analysis of the evidence. *Fertil Steril.* 2008, 90(3), 714-726.
198. Mevorach-Zussman N, Bolotin A, Shalev H, Bilenko N, Mazor M, Bashiri A. Anxiety and deterioration of quality of life factors associated with recurrent miscarriage in an observational study. *J Perinat Med.* 2012, 40(5), 495-501.
199. Middeldorp S. Anticoagulation in pregnancy complications. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2014, 2014(1), 393-399. doi: 10.1182/asheducation-2014.1.393.
200. Middeldorp S. New studies of low-molecular-weight heparin in pregnancy. *Thromb Res.* 2015, 135(1), 26-29. doi: 10.1016/S0049-3848(15)50436-2.
201. Miller CH, De Staercke C, Benson J, Hooper WC, Dilley A, Evatt BL, Benito C, Patterson-Barnett A, Eller D, Philipp CS. Elevated factor VII as a risk factor for recurrent fetal loss. Relationship to factor VII gene polymorphisms. *Thromb Haemost.* 2005, 93(6), 1089-1094.
202. Mitic G, Kovac M, Povazan L, Magic Z, Djordjevic V, Salatic I, Mitic I, Novakov-Mikic A. Inherited thrombophilia is associated with pregnancy losses that occur after 12th gestational week in Serbian population. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2010, 16(4), 435-439. doi: 10.1177/1076029609335518.
203. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipidsyndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006, 4(2), 295-306.
204. Mo X, Hao Y, Yang X, Chen S, Lu X, Gu D. Association between polymorphisms in the coagulation factor VII gene and coronary heart disease risk in different ethnicities: a metaanalysis. *Medical Genetics.* 2011, 12, 107-202.
205. Monari F, Alberico S, Avagliano L, Cetin I, Cozzolino S, Gargano G, Marozio L, Mecacci F, Neri I, Tranquilli AL, Venturini P, Facchinetti F. Relation between maternal thrombophilia and stillbirth according to causes/associated conditions of death. *Early Hum Dev.* 2012, 88(4), 251-254. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2011.08.013.
206. Montavon C, Hoesli I, Holzgreve W, Tsakiris DA. Thrombophilia and anticoagulation in pregnancy: indications, risks and management. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008, 21(10), 685-696. doi: 10.1080/14767050802360791.
207. Morgan JA, Bombell S, McGuire W. Association of Plasminogen Activator Inhibitor-Type 1 (-675 4G/5G) Polymorphism with Pre-Eclampsia: Systematic Review. *PLoS One.* 2013, 8, e56907.
208. Morrison ER, Międzybrodzka ZH, Campbell DM et al. Prothrotic genotypes are not associated with pre-eclampsia and gestational hypertension: results from a large population-based study and systemic review. *Thromb Haemast.* 2002, 87, 779-785.
209. Mousa HA, Alfirević Z. Thrombophilia and adverse pregnancy outcome. *Croat Med J.* 2001, 42(2), 135-145.
210. Mrozikiewicz P, Cascorbi I, Ziemer S, Laule, M, Meisel C, Stangl V, Rutsch W, Wernecke K, Baumann G, Roots I, Stangl K. Reduced procedural risk for

- coronary catheter interventions in carriers of the coagulation factor VII-Gln353 gene. *J Am Coll Cardiol* 2000, 36, 1520-1525.
211. Mumusoglu S, Beksac MS, Ekiz A, Ozdemir P, Hascelik G. Does the presence of autoantibodies without autoimmune diseases and hereditary thrombophilia have an effect on recurrent pregnancy loss? *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015, 18, 1-6.
 212. Murakami S, Matsubara N, Saitoh M, Miyakaw S, Shoji M, Kubo T. The relation between plasma homocysteine concentration and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in pregnant women. *J Obstet Gynaecol Res.* 2001, 27(6), 349-352.
 213. Nair RR, Khanna A, Singh K. MTHFR C677T polymorphism and recurrent early pregnancy loss risk in north Indian population. *Reprod Sci.* 2012 Feb;19(2):210-215. doi: 10.1177/1933719111417888.
 214. Nair RR, Khanna A, Singh R, Singh K. Association of maternal and fetal MTHFR A1298C polymorphism with the risk of pregnancy loss: a study of an Indian population and a meta-analysis. *Fertil Steril.* 2013 Apr;99(5):1311-1318.e4. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.12.027.
 215. Nagy B, Toth T, Rigo J et al. Detection of factor V Leiden mutation in severe preeclamptic Hungarian women. *Clin Genet.* 1998, 53, 479-481.
 216. Negro R, Stagnaro-Green A. Clinical aspects of hyperthyroidism, hypothyroidism, and thyroid screening in pregnancy. *Endocr Pract.* 2014, 20(6), 597-607. doi: 10.4158/EP13350.RA.
 217. Neki R, Miyata T, Fujita T, Kokame K, Fujita D, Isaka S, Ikeda T, Yoshimatsu J. Nonsynonymous mutations in three anticoagulant genes in Japanese patients with adverse pregnancy outcomes. *Thromb Res.* 2014, 133(5), 914-918. doi: 10.1016/j.thromres.2014.02.012.
 218. Nelen WL, Steegers EA, Eskes TK, Blom HJ. Genetic risk factor for unexplained recurrent early pregnancy loss. *Lancet.* 1997;350:861.
 219. Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 2000, 74, 1196-1199.
 220. Nicholson JM, Caughey AB, Stenson MH, Cronholm P, Kellar L, Bennett I, et al. The active management of risk in multiparous pregnancy at term: association between a higher preventive labor induction rate and improved birth outcomes. *Am J Obstet Gynecol.* 2009 Mar. 200(3):250.e1-250.e13.
 221. Nigro G, Mazzocco M, Mattia E, Di Renzo GC, Carta G, Anceschi MM. Role of the infections in recurrent spontaneous abortion. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011, 24(8), 983-989. doi: 10.3109/14767058.2010.547963.
 222. Nijkamp JW, Korteweg FJ, Holm JP, Timmer A, Erwich JJ, van Pampus MG. Subsequent pregnancy outcome after previous foetal death. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013, 166(1), 37-42. doi: 10.1016/j.ejogrb.2012.10.008.
 223. Nowak-Gottl U, Escuriola C, Kurnik K et al. Haemophilia and thrombophilia. What do we learn about combined inheritance of both genetic variation? *Haemostaseologie.* 2003, 23, 36-40.
 224. Nurk E, Tell GS, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Factor V Leiden, pregnancy complications and adverse outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *QJM.* 2006, 99(5), 289-298.
 225. Onderoglu L, Baykal C, Al RA, Demirtas E, Deren O, Gurgey A. High frequency of thrombophilic disorders in women with recurrent fetal miscarriage. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2006, 33(1), 50-54.

226. Orban T, Kalafatis M, Gogonea V. Completed three-dimensional model of human coagulation factor Va. Molecular dynamics simulations and structural analyses. *Biochemistry*. 2005, 44(39), 13082-13090.
227. Parand A, Zolghadri J, Nezam M, Afrasiabi A, Haghpanah S, Karimi M. Inherited thrombophilia and recurrent pregnancy loss. *Iran Red Crescent Med J*. 2013, 15(12):e13708. doi: 10.5812/ircmj.13708.
228. Pariente G, Shoham-Vardi I, Kessous R, Sergienko R, Sheiner E. Is stillbirth associated with long-term atherosclerotic morbidity? *Am J Obstet Gynecol*. 2014, 211(4), 416.e1-12. doi: 10.1016/j.ajog.2014.07.032.
229. Parveen F, Tuteja M, Agrawal S. Polymorphisms in MTHFR, MTHFD, and PAI-1 and recurrent miscarriage among North Indian women. *Arch Gynecol Obstet*. 2013, 288(5), 1171-1177. doi: 10.1007/s00404-013-2877-x.
230. Patil R, Ghosh K, Vora S, Shetty S. Inherited and acquired thrombophilia in Indian women experiencing unexplained recurrent pregnancy loss. *Blood Cells Mol Dis*. 2015, 55(3), 200-205. doi: 10.1016/j.bcmd.2015.06.008.
231. Pauer HU, Voigt-Tschirschwitz T, Hinney B, Burfeind P, Wolf C, Emons G, Neesen J. Analyses of three common thrombophilic gene mutations in German women with recurrent abortions. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2003, 82(10), 942-947.
232. Pérez-Ceballos E, Corral J, Alberca I. Prothrombin A19911G and G20210A polymorphisms' role in thrombosis. *Br J Haematol*. 2002, 118, 610-614.
233. Pickering W, Marriott K, Regan L. G20210A prothrombin gene mutation: prevalence in a recurrent miscarriage population. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2001, 7, 25-28.
234. Pietropolli A, Giuliani E, Bruno V, Patrizi L, Piccione E, Ticconi C. Plasminogen activator inhibitor-1, factor V, factor II and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in women with recurrent miscarriage. *J Obstet Gynaecol* 2014, 34(3), 229-234. doi: 10.3109/01443615.2013.836476.
235. Pickering W, Marriott K, Regan L. G20210A prothrombin gene mutation: prevalence in a recurrent miscarriage population. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2001, 7, 25-28.
236. Pihusch R, Buchholz T, Lohse P, Rübsamen H, Rogenhofer N, Hasbargen U, Hiller E, Thaler CJ. Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin increases the risk in the first trimester. *Am J Reprod Immunol* 2001, 46, 124-131.
237. Pluchino N, Drakopoulos P, Wenger JM, Petignat P, Streuli I, Genazzani AR. Hormonal causes of recurrent pregnancy loss (RPL). *Hormones (Athens)*. 2014, 13(3), 314-322. doi: 10.14310/horm.2002.1505.
238. Pollak ES, Hung HL, Godin W, Overton GC, High KA. Functional characterization of the human factor VII 5'-flanking region. *J Biol Chem*. 1996, 271, 1738-1747.
239. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3-prime-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996, 88, 3698-3703.
240. Poursadegh Zonouzi A, Chaparzadeh N, Asghari Estiar M, Mehrzad Sadaghiani M, Farzadi L, Ghasemzadeh A, Sakhinia M, Sakhinia E. Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Mutations in Women with Recurrent Spontaneous Abortions in the Northwest of Iran. *ISRN Obstet Gynecol*. 2012;2012:945486. doi: 10.5402/2012/945486.

241. Prat M, Morales-Indiano C, Jimenez C, Mas V, Besses C, Checa MA, Carreras R. "20209C-T" a variant mutation of prothrombin gene mutation in a patient with recurrent pregnancy loss. *Ann Clin Lab Sci.* 2014, 44(3), 334-336.
242. Prasmusinto D, Skrablin S, Fimmers R et al. Ethnic differences in the association of factor V Leiden mutation and the C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism with preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004, 112, 162-169.
243. Ptacek I, Sebire NJ, Man JA, Brownbill P, Heazell AE. Systematic review of placental pathology reported in association with stillbirth. *Placenta.* 2014, 35(8), 552-562.
244. Puri M, Kaur L, Walia GK, Mukhopadhyay R, Sachdeva MP, Trivedi SS, Ghosh PK, Saraswathy KN. MTHFR C677T polymorphism, folate, vitamin B12 and homocysteine in recurrent pregnancy losses: a case control study among North Indian women. *J Perinat Med.* 2013, 41(5), 549-554. doi: 10.1515/jpm-2012-0252.
245. Quaranta M, Erez O, Mastrolia SA, Koifman A, Leron E, Eshkoli T, Mazor M, Holcberg G. The physiologic and therapeutic role of heparin in implantation and placentation. *PeerJ.* 2015 Jan 6;3:e691. doi: 10.7717/peerj.691. eCollection 2015.
246. Quenby S, Farquharson R. Uterine natural killer cells, implantation failure and recurrent miscarriage. *Reprod Biomed Online.* 2006, 13(1), 24-28.
247. Rady PL, Szucs S, Grady J, Hudnall SD, Kellner LH, Nitowsky H, Tyring SK, Matalon RK. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. *Am J Med Genet.* 2002, 107, 162-168.
248. Rambaldi MP, Mecacci F, Guaschino S, Paidas MJ. Inherited and acquired thrombophilias. *Reprod Sci.* 2014, 21(2), 167-182. doi: 10.1177/1933719113497282.
249. Rao AK, Kaplan R, Sheth S. Inherited thrombophilic states. *Semin Thromb Haemost* 1998, 24(1) 3-12.
250. Rath W. Pre-eclampsia and inherited thrombophilia: a reappraisal. *Semin Thromb Hemost.* 2011, 37(2), 118-124. doi: 10.1055/s-0030-1270337.
251. Rees DC, Chapman NH, Webster MT, Guerreiro JF, Rochette J, Clegg JB. Born to clot: the European burden. *Br J Haematol.* 1999, 105(2), 564-566.
252. Reiner AP, Carlson CS, Rieder MJ, Siscovick DS, Liu K, Chandler WL, Green D, Schwartz M, Nickerson DA. Coagulation factor VII gene haplotypes, obesity-related traits, and cardiovascular risk in young women. *Thromb Haemost* 2007, 5, 42-49.
253. Rekomendacje ACOG Practice Bulletin No. 102: management of stillbirth. *Obstet Gynecol.* 2009, 113(3), 748-761.
254. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego w zakresie wybranych patologii wczesnej ciąży oraz postępowania w ciąży po zapłodnieniu in vitro. *Ginekol Dypl. Wydanie specjalne.* Luty 2008, 208-212.
255. Rekomendacje Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2012, 98(5), 1103-1111. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.048.

256. Rekomendacje *Stillbirth Collaborative Research Network Writing Group*. Association between stillbirth and risk factors known at pregnancy confirmation. *JAMA*. 2011, 306(22), 2469-2479.
257. Ren A, Wang J. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2006, 86, 1716-1722.
258. Reznikoff-Etiévant M, Cayol V, Carbonne B, Robert A, Coulet F, Milliez J. Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutations are risk factors for very early recurrent miscarriage. *BJOG*. 2001, 108, 1251-1254.
259. Ridker PM, Miletich JP, Hennekens CH, Buring JE. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening. *JAMA*. 1997, 277(16):1305-1307.
260. Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, Clark P, Lowe GD, Walker ID, Greaves M, Brenkel I, Regan L, Greer IA. Thrombophilia in pregnancy: a systemic review. *Br J Haematol* 2006, 132(2), 171-196.
261. Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, Hillarp A, Watzke HH, Bernardi F, Cumming AM, Preston FE, Reitsma PH. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost*. 1998, 79, 706-708.
262. Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Psaty BM, Raghunathan TE, Vos HL: A common prothrombin variant (20210 G to A) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood*. 1997, 90, 1747-1750.
263. Sabater-Lleal M, Chill'on M, Howard TE, Gil E, Almasye L, Blangero J, Fontcuberta J, Soria J. Functional analysis of the genetic variability in the F7 gene promoter. *Atherosclerosis* 2007, 195, 262-268.
264. Said JM, Higgins JR, Moses EK, Walker SP, Borg AJ, Monagle PT, Brennecke SP. Inherited thrombophilia polymorphisms and pregnancy outcomes in nulliparous women. *Obstet Gynecol*. 2010, 115(1), 5-13. doi: 10.1097/AOG.0b013e3181c68907.
265. Saito S. The causes and treatment of recurrent pregnancy loss. *JMAJ* 2009, 52(2), 97-102.
266. Sakowicz A, Fendler W, Lelonek M, Gluba A, Pietrucha T. Two polymorphisms of the FVII gene and their impact on the risk of myocardial infarction in poles under 45 years of age. *Mol Biol (Mosk)*. 2010, 44, 229-234.
267. Salimi S, Saravani M, Yaghmaei M, Fazlali Z, Mokhtari M, Naghavi A, Farajian-Mashhadi F. The early-onset preeclampsia is associated with MTHFR and FVL polymorphisms. *Arch Gynecol Obstet*. 2015, 291(6), 1303-1312. doi: 10.1007/s00404-014-3561-5.
268. Saravelos SH, Li TC. Unexplained recurrent miscarriage: how can we explain it? *Hum Reprod*. 2012, 27(7), 1882-1886. doi: 10.1093/humrep/des102.
269. Saravelos SH, Regan L. The importance of preconception counseling and early pregnancy monitoring. *Semin Reprod Med*. 2011, 29(6), 557-568. doi: 10.1055/s-0031-1293209.

270. Saravelos SH, Regan L. Unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2014, 41(1), 157-66. doi: 10.1016/j.ogc.2013.10.008.
271. Sarkar D. Recurrent pregnancy loss in patients with thyroid dysfunction. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012, 16(2), 350-351. doi: 10.4103/2230-8210.104088.
272. Sauer MV. Reproduction at an advanced maternal age and maternal health. *Fertil Steril.* 2015, 103(5), 1136-1143. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.03.004.
273. Segers K, Dahlbäck B, Nicolaes GA. Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms. *Thromb Haemost.* 2007, 98(3), 530-542. Review.
274. Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med.* 2001, 344, 1222-1231.
275. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Kurzawinska G, Bogacz A, Grzeskowiak E, Mrozikiewicz PM. The significance of 1793G>A polymorphism in MTHFR gene in women with first trimester recurrent miscarriages. *Neuro Endocrinol Lett.* 2010, 31(5), 717-723.
276. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Kurzawińska G, Barlik M, Mrozikiewicz PM. Związek polimorfizmu *Arg353Gln* czynnika VII krzepnięcia z poronieniami nawracającymi. *Ginekol Pol.* 2009, 80(1), 8-13.
277. Seremak-Mrozikiewicz A, Mrozikiewicz PM, Drews K. Does coagulation factor V Leiden mutation predispose to PIH? *Arch Perinat Med.* 2002a, 8, 34-35.
278. Seremak-Mrozikiewicz A, Perlik M, Drews K. Rola mutacji punktowej V czynnika krzepnięcia (1691G A, Leiden) w grupie kobiet z nadciśnieniem indukowanym ciążą. *Klin Perinat Ginekol.* 2002b, 36, 412-414.
279. Sergi C, Al Jishi T, Walker M. Factor V Leiden mutation in women with early recurrent pregnancy loss: a meta-analysis and systematic review of the causal association. *Arch Gynecol Obstet.* 2015, 291(3), 671-679. doi: 10.1007/s00404-014-3443-x.
280. Shahine L, Lathi R. Recurrent pregnancy loss: evaluation and treatment. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2015, 42(1), 117-134. doi: 10.1016/j.ogc.2014.10.002.
281. Shakarami F, Akbari MT, Zare Karizi S. Association of plasminogen activator inhibitor-1 and angiotensin converting enzyme polymorphisms with recurrent pregnancy loss in Iranian women. *Iran J Reprod Med.* 2015, 13(10), 627-632.
282. Sharma A, Singh N, Mahapatra M, Ranjan R, Kishor K, Saxena R. Factors contributing to APC-resistance in women with recurrent spontaneous miscarriages: Indian perspective. *Blood Cells Mol Dis.* 2015, 55(3), 213-215. doi: 10.1016/j.bcmd.2015.06.011.
283. Silver RM. Previous stillbirth, late preterm, and early-term birth. *Semin Perinatol.* 2011, 35(5), 302-308. doi: 10.1053/j.semperi.2011.05.006.
284. Silver RM, Warren JE. Preconception counseling for women with thrombophilia. *Clin Obstet Gynecol.* 2006, 49(4), 906-919.
285. Simchen MJ, Ofir K, Moran O, Kedem A, Sivan E, Schiff E. Thrombophilic risk factors for placental stillbirth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010, 153(2), 160-164. doi: 10.1016/j.ejogrb.2010.07.031.
286. Simcox LE, Ormesher L, Tower C, Greer IA. Thrombophilia and pregnancy complications. *Int J Mol Sci.* 2015, 16(12), 28418-28428. doi: 10.3390/ijms161226104.
287. Simonidesova M, Simko J, Holoman K. Defects of genes encoding inhibitors of coagulation and their application in early miscarriage aetiology. *Bratisl Lek Listy.* 2014, 115(11), 730-735.

288. Singer JB. Candidate gene association analysis. *Methos Mol Biol.* 2009, 573, 223-230.
289. Skrzypczak J, Rajewski M, Wirstlein P, Goździewicz T, Breborowicz G, Leszczyńska-Gorzela B, Ludwikowski G, Preis K, Wołczyński S, Zimmer M. Incidence of hereditary thrombophilia in women with pregnancy loss in multi-center studies in Poland. *Ginekol Pol.* 2012, 83(5), 330-336.
290. Sottilotta G, Oriana V, Latella C, Luise F, Piromalli A, Ramirez F, Mammì C, Santoro R, Iannaccaro P, Muleo G, Lombardo VT. Genetic prothrombotic risk factors in women with unexplained pregnancy loss. *Thromb Res.* 2006, 117(6), 681-684.
291. 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, 193-200.
292. Tan JY. Thrombophilia in pregnancy. *Ann Acad Med Singapore.* 2002, 31(3), 328-334.
293. Tan WK, Lim SK, Tan LK, Baupista D. Does low-molecular-weight heparin improve live birth rates in pregnant women with thrombophilic disorders? A systematic review. *Singapore Med J.* 2012, 53(10), 659-663.
294. Ticconi C, Giuliani E, Sorge R, Patrizi L, Piccione E, Pietropolli A. Gestational age of pregnancy loss in women with unexplained recurrent miscarriage. *J Obstet Gynaecol Res.* 2015 Dec 10. doi: 10.1111/jog.12903.
295. Ticconi C, Pietropolli A, Fabbri G, Capogna MV, Perno CF, Piccione E. Recurrent miscarriage and cervical human papillomavirus infection. *Am J Reprod Immunol.* 2013, 70(5), 343-346. doi: 10.1111/aji.12156.
296. Tomassetti C, Meuleman C, Pexsters A, Mihalyi A, Kyama C, Simsa P, D'Hooghe TM. Endometriosis, recurrent miscarriage and implantation failure: is there an immunological link? *Reprod Biomed Online.* 2006, 13(1), 58-64.
297. Torabi R, Zarei S, Zeraati H, Zarnani AH, Akhondi MM, Hadavi R, Shiraz ES, Jeddi-Tehrani M. Combination of thrombophilic gene polymorphisms as a cause of increased the risk of recurrent pregnancy loss. *J Reprod Infertil.* 2012, 13(2), 89-94.
298. Tormene D, De Stefano V, Grandone E, Za T, Perlati M, Rossi E, Margaglione M, Simioni P. The G20210A prothrombin variant and the risk of venous thromboembolism or fetal loss in pregnant women: a family study. *J Thromb Haemost.* 2007, 5(11), 2193-2196.
299. Tormene D, Grandone E, De Stefano V, Tosetto A, Palareti G, Margaglione M, Castaman G, Rossi E, Ciminello A, Valdrè L, Legnani C, Tiscia GL, Bafunno V, Carraro S, Rodeghiero F, Simioni P. Obstetric complications and pregnancy-related venous thromboembolism: the effect of low-molecular-weight heparin on their prevention in carriers of factor V Leiden or prothrombin G20210A mutation. *Thromb Haemost.* 2012, 107(3), 477-484. doi: 10.1160/TH11-07-0470.
300. Twig G, Shina A, Amital H, Shoenfeld Y. Pathogenesis of infertility and recurrent pregnancy loss in thyroid autoimmunity. *J Autoimmun.* 2012, 38(2-3), 275-281. doi: 10.1016/j.jaut.2011.11.014.
301. Udry S, Aranda FM, Latino JO, de Larrañaga GF. Paternal factor V Leiden and recurrent pregnancy loss: a new concept behind fetal genetics? *J Thromb Haemost.* 2014, 12(5), 666-669.
302. Uxa R, Baczyk D, Kingdom JC, Viero S, Casper R, Keating S. Genetic polymorphisms in the fibrinolytic system of placentas with massive perivillous fibrin deposition. *Placenta.* 2010, 31(6), 499-505. doi: 10.1016/j.placenta.2010.03.013.

303. Walker MC, Ferguson SE, Allen VM. Heparin for pregnant women with acquired or inherited thrombophilias. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003, (2):CD003580.
304. Wang X, Ma Z, Lin Q. Inherited thrombophilia in recurrent spontaneous abortion among Chinese women. *Int J Gynaecol Obstet.* 2006, 92(3), 264-265.
305. Ward K, Nelson L, Knowlton S, et al. Factor V Leiden and the T235 variant of angiotensinogen as risk factors for pre-eclampsia: a prospective study. *J Soc Gynecol. Invest* 1998, 5, 40-42.
306. Watanbae H, Hamada H, Yamada N, Sohda S, Yamakawa-Kobayashi K, Yoshikawa H, Arinami T. Association analysis of nine missense polymorphisms in the coagulation factor V gene with severe preeclampsia in pregnant Japanese women. *J Hum Genet.* 2002, 47, 131-135.
307. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Curtis Ellison R, Eckfeldt JH, Rozen R. The 1298A>C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis.* 2001, 156, 409-415.
308. Werner EF, Lockwood CJ. Thrombophilias and stillbirth. *Clin Obstet Gynecol.* 2010, 53(3), 617-627. doi: 10.1097/GRF.0b013e3181eb658c.
309. Wintermark P, Boyd T, Parast MM, Van Marter LJ, Warfield SK, Robertson RL, Ringer SA. Fetal placental thrombosis and neonatal implications. *Am J Perinatol.* 2010, 27(3), 251-256.
310. Wisborg K, Kesmodel U, Henriksen TB, Hedegaard M, Secher NJ. A prospective study of maternal smoking and spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003, 82(10), 936-941.
311. Wong LF, Porter TF, de Jesús GR. Recurrent early pregnancy loss and antiphospholipid antibodies: where do we stand? *Lupus.* 2014, 23(12), 1226-1228. doi: 10.1177/0961203314529170.
312. Wouters MG, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Thomas CM, Borm GF, Steegers-Theunissen RP, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril.* 1993, 60, 820-825.
313. Wramsby ML, Sten-Linder M, Bremme K. Primary habitual abortions are associated with high frequency of factor V Leiden mutation. *Fertil Steril.* 2000, 74(5), 987-991.
314. Wu O, Robertson L, Twaddle S, Lowe GD, Clark P, Greaves M, Walker ID, Langhorne P, Brenkel I, Regan L, et al. Screening for thrombophilia in high-risk situations: systematic review and cost-effectiveness analysis. The Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) study. *Health Technol Assess.* 2006, 10(11), 1-110.
315. Wu X, Zhao L, Zhu H, He D, Tang W, Luo Y. Association between the MTHFR C677T polymorphism and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012, 16(7), 806-811. doi: 10.1089/gtmb.2011.0318.
316. Vaiman D. Genetic regulation of recurrent spontaneous abortion in humans. *Biomed J.* 2015, 38(1), 11-24. doi: 10.4103/2319-4170.133777.
317. van den Boogaard E, Hermens RP, Franssen AM, Doornbos JP, Kremer JA, van der Veen F, Goddijn M. Recurrent miscarriage: do professionals adhere to their guidelines. *Hum Reprod.* 2013, 28(11), 2898-2904. doi: 10.1093/humrep/det329.
318. van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet.* 1998, 62, 1044-1051.

319. Vanilla S, Dayanand CD, Kotur PF, Kutty MA, Vegi PK. Evidence of Paternal N5, N10 - Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T Gene Polymorphism in Couples with Recurrent Spontaneous Abortions (RSAs) in Kolar District- A South West of India. *J Clin Diagn Res.* 2015, 9(2), 15-18. doi: 10.7860/JCDR/2015/10856.5579.
320. van 't Hooft FM, Silveira A, Tornvall P, Iliadou A, Ehrenborg E, Eriksson P, Hamsten A. Two common functional polymorphisms in the promoter region of the coagulation factor VII gene determining plasma factor VII activity and mass concentration. *Blood.* 1999, 93, 3432-3441.
321. von Ahsen N, Oellerich M. The intronic prothrombin 19911A>G polymorphism influences splicing efficiency and modulates effects of the 20210G>A polymorphism on mRNA amount and expression in a stable reporter gene assay system. *Blood.* 2004, 103, 586-593.
322. Vora S, Shetty S, Ghosh K. Thrombophilic dimension of recurrent fetal loss in Indian patients. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2008, 19(6), 581-584.
323. Yamada N, Arinami T, Yamakawa-Kobayashi K, Watanabe H, Sohda S, Hamada H, Kubo T, Hamaguchi H. The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with severe preeclampsia. *J Hum Genet.* 2000, 45, 138-141.
324. Yenicesu GI, Cetin M, Ozdemir O, Cetin A, Ozen F, Yenicesu C, Yildiz C, Kocak N. A prospective case-control study analyzes 12 thrombophilic gene mutations in Turkish couples with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol.* 2010, 63(2), 126-136.
325. Younis JS, Brenner B, Ohel G, Tal J, Lanir N, Ben-Ami M. Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation can be associated with first-as well as second-trimester recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol.* 2000, 43(1), 31-35.
326. Younis JS, Samueloff A. Gestational vascular complications. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2003, 16(2), 135-151.
327. Yu J, Yang Z, Kibukawa M, Paddock M, Passey DA, Wong GK. Minimal introns are not "junk." *Genome Res.* 2002, 12, 1185-1189.
328. Zetterberg H, Regland B, Palmér M, Ricksten A, Palmqvist L, Rymo L, Arvanitis DA, Spandidos DA, Blennow K. Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. *Eur J Hum Genet.* 2002, 10, 113-118.
329. Zivelin A, Mor-Cohen R, Kovalsky V, Kornbrot N, Conard J, Peyvandi F, Kyrle PA, Bertina R, Peyvandi F, Emmerich J, Seligsohn U. Prothrombin 20210G>A is an ancestral prothrombotic mutation that occurred in whites approximately 24,000 years ago. *Blood.* 2006, 107, 4666-4668.

STRESZCZENIE W J. POLSKIM

Wstęp: Obecnie sugeruje się, że w etiologii nawracających utrat ciąż (RPL – *recurrent pregnancy loss*) istotną rolę odgrywają warianty polimorficzne genów włączonych w patomechanizm poronień nawracających (RM – *recurrent miscarriages*) i zgonu wewnątrzmacicznego w II połowie ciąży (IUFD - *intrauterine fetal death*). Szczególną uwagę zwraca się na polimorfizmy w zakresie układu krzepnięcia i fibrynolizy, których obecność wiąże się z istotnymi zmianami w krążeniu maciczo-łożyskowym. Mechanizmem łączącym trombofilię wrodzoną z występowaniem poronień nawracających lub zgonem wewnątrzmacicznym jest zakrzepica w drobnych naczyniach krążenia maciczo-łożyskowego, obecność zawałów w łożysku, zmian miażdżycopodobnych w naczyniach oraz niewydolność łożyska.

Cel pracy: Celem pracy była próba oceny udziału wybranych trombofilii wrodzonych w etiologii powtarzających się utrat ciąż (RPL) w grupie kobiet polskich z poronieniami nawracającymi (RM) oraz zgonem wewnątrzmacicznym w II połowie ciąży (IUFD). Cel ten realizowano poprzez ocenę częstości występowania genotypów i alleli wybranych polimorfizmów genów warunkujących trombofilię wrodzoną w grupie kobiet z RPL (RM oraz IUFD) oraz w grupie zdrowych kobiet, u których co najmniej dwie ciąży zakończyły się urodzeniem zdrowego donoszonego noworodka. Do analizy wybrano następujące polimorfizmy: *1691G>A*, *1328T>C* genu czynnika V krzepnięcia, *20210G>A* czynnika II krzepnięcia, *R353Q* czynnika VII krzepnięcia, *667C>T*, *1298A>C*, *1793G>A* genu reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR – *methyltetrahydrofolate reductase*). W pracy przeprowadzono również ocenę związku badanych polimorfizmów genetycznych z parametrami klinicznymi. Analizowano ocenę współwystępowania genotypów badanych polimorfizmów w grupie RPL oraz kontrolnej, jak również analizę korelacji haplotypów badanych polimorfizmów z występowaniem nawracających utrat ciąż.

Materiał i metodyka: Badaniem objęto grupę 420 kobiet z utratami ciąż oraz 400 zdrowych kobiet, u których potwierdzono niepowikłany przebieg co najmniej dwóch ciąż zakończonych urodzeniem zdrowego donoszonego noworodka. W grupie badanej 420 kobiet wydzielono podgrupy 359 kobiet z dwoma i więcej poronieniami nawracającymi oraz 61 kobiet z obumarciem wewnątrzmacicznym po 22 tc. Pacjentki do badania kwalifikowano w Klinice Perinatologii i Chorób Kobietych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Badanie

przeprowadzono w latach 2009-2015. Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu 1082/07, 867/15, 210/16. Każda pacjentka została poinformowana o celu i zakresie badań oraz wyraziła na nie pisemną zgodę.

Częstość występowania badanych w pracy polimorfizmów genetycznych przeprowadzana była metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR - *polymerase chain reaction*) oraz polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP - *restriction fragment length polymorphism*). Analiza genetyczna przeprowadzona była w Pracowni Biologii Molekularnej w Klinice Perinatologii i Chorób Kobietych UM w Poznaniu.

Wyniki: W przypadku polimorfizmu $20210G>A$ genu czynnika II krzepnięcia odnotowano wyższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego $20210GA$ w całej grupie RM w porównaniu do grupy kontrolnej zdrowych kobiet (3,34 vs. 1,50%, $WR=1,50$, $p=0,08$). Również częstość występowania zmutowanego allele $20210A$ była wyższa w grupie RM w porównaniu do grupy kontrolnej (1,67 vs. 0,75%, $WR=2,25$, $p=0,08$).

W przypadku polimorfizmu $20210G>A$ FII ciekawą obserwacją było również odnotowanie wyższej częstości występowania heterozygotycznego genotypu $20210GA$ w podgrupie 2 RM (3,55 vs. 1,50%, $WR=2,41$, $p=0,07$) oraz w podgrupie ≥ 3 RM (2,60 vs. 1,50%, $WR=1,75$, ns) w porównaniu do grupy kontrolnej. Zmutowany allele $20210A$ występował z większą częstością w grupie z 2 RM (1,77%, $WR=2,39$, $p=0,07$) oraz w grupie z 2 RM (1,3%, $WR=1,74$, ns) w porównaniu do grupy kontrolnej (0,75%). Co więcej w przypadku analizy polimorfizmu $20210G>A$ FII zaobserwowano wyższą częstość występowania heterozygotycznego genotypu $20210GA$ w podgrupie $RM<13$ tc. (2,97 vs. 1,50%, $WR=2,01$, ns) oraz w podgrupie RM 13-22 tc. (5,36 vs. 1,50%, $WR=3,72$, $p=0,09$) w porównaniu do kontroli. Te same obserwacje odnotowano w stosunku do frekwencji zmutowanego allele $20210A$. Częstość występowania zmutowanego allele $20210A$ była wyższa w podgrupie $RM<13$ tc. (1,49 vs. 0,75%, $WR=1,99$, ns) oraz w podgrupie RM 13-22 tc. (2,68 vs. 0,75%, $WR=3,72$, $p=0,09$) w porównaniu do grupy kontrolnej.

W podgrupie IUFD zaobserwowano statystycznie istotnie częstsze występowanie genotypu heterozygotycznego $1298AC$ MTHFR w porównaniu z grupą kontrolną (55,74% vs. 43,00%, $WR=1,66$, $p=0,04$). Różnice te uwidoczniły się również podczas analizy częstości występowania alleli dla tego polimorfizmu. Zmutowany allele $1298C$ występował w 42,62% w grupie IUFD oraz w 33,75% w grupie kontrolnej. Różnica ta również była statystycznie istotna ($WR=1,46$, $p=0,04$).

Ciekawe obserwacje odnotowano w przypadku analizy polimorfizmu *1793G>A* genu *MTHFR*. W całej grupie RM odnotowano statystycznie istotnie wyższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego *1793GA* (11,98 vs. 7,75%, WR=1,62, p=0,03) oraz zmutowanego allelela *1793A* (6,27 vs. 4,13%, WR=1,55, p=0,04) w porównaniu do grupy kontrolnej. Obserwowano również statystycznie istotnie wyższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego *1793GA* w podgrupie 2 RM (12,77 vs. 7,75%, WR=1,74, p=0,02) w porównaniu do grupy kontrolnej. Częstość występowania allelela *1793A* była istotnie wyższa w grupie 2 RM (6,74 vs. 4,13% w grupie kontrolnej, WR=1,68, p=0,02). Dodatkowo odnotowano statystycznie istotnie wyższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego *1793GA* w podgrupie RM<13 tc. (12,21 vs. 7,75%, WR=1,66, p=0,03) oraz zmutowanego allelela *1793A* (6,44 vs. 4,13%, WR=1,60, p=0,03) w stosunku do grupy kontrolnej.

Dla polimorfizmu *R353Q (11496G>A)* genu czynnika VII krzepnięcia ciekawym faktem było odnotowanie statystycznie istotnie wyższej częstości występowania genotypu heterozygotycznego *353RQ (11496GA)* w grupie kontrolnej w porównaniu do podgrupy RM 13-22 tc. (10,71 vs. 23,00% w grupie kontrolnej, WR=0,40, p=0,02). Również częstość występowania zmutowanego allelela *353Q (11496A)* była wyższa w grupie kontrolnej w do podgrupy RM 13-22 tc. (7,14 vs. 13,00% w grupie kontrolnej, WR=0,51, p=0,05).

Sumaryczna analiza występowania wybranych czynników ryzyka trombofilii wrodzonej w badanych grupach kobiet z RPL (*FV 1691 GA+AA*, *FII 20210 GA+AA*, *MTHFR 677 TT*, *MTHFR 1298 CC*, *MTHFR 677/1298 CT/AC*, *MTHFR 1793 AA*) pokazała istotnie statystycznie większą liczbę czynników ryzyka w całej grupie kobiet z RM (p=0,0013) oraz w grupie IUFD (p=0,005) w porównaniu do grupy zdrowych kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym.

Analiza współwystępowania genotypów pokazała statystycznie istotnie wyższą częstość wspólnego występowania niektórych zmutowanych wariantów polimorfizmów *1691G>A* genu czynnika V, *20210G>A* genu czynnika II krzepnięcia, *R353Q (11496G>A)* genu czynnika VII krzepnięcia oraz polimorfizmów genu *MTHFR* w grupie kobiet z RPL. Tym samym analiza ta wskazała na możliwą rolę współdziałania tych polimorfizmów w etiologii nawracających utrat ciąży.

Wnioski:

1. Statystycznie istotna wyższa częstość występowania zmutowanych wariantów polimorfizmu *1793G>A* genu *MTHFR* w całej grupie RM wskazuje na rolę tego

polimorfizmu w etiologii powikłania, szczególnie we wczesnych poronieniach RM <13 tc.

2. W pracy wskazano na istotne znaczenie niezmutowanego genotypu *353RR (11496GG)* oraz niezmutowanego allela *353R (11496G)* genu czynnika VII krzepnięcia w etiologii późnych poronień RM 13-22 tc.
3. Obserwowana przewaga zmutowanego genotypu i allela polimorfizmu *20210G>A* genu czynnika II krzepnięcia w całej grupie kobiet z poronieniami nawracającymi może sugerować możliwą rolę tego wariantu w etiologii RM.
4. Statystycznie istotna przewaga zmutowanych alleli polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR* wskazuje na znaczenie tego wariantu w etiologii IUFD.
5. Sumaryczna analiza nakładania się czynników ryzyka trombofilii wrodzonej wskazuje na istotne znaczenie takiego efektu współdziałania czynników prozakrzepowych w etiologii IUFD.
6. Analiza współwystępowania genotypów pokazała na możliwą rolę potencjalizującego współdziałania polimorfizmów *1691G>A* czynnika V krzepnięcia, *20210G>A* genu czynnika II krzepnięcia, *R353Q (11496G>A)* czynnika VII krzepnięcia oraz polimorfizmów genu *MTHFR* w patomechanizmie RPL.

STRESZCZENIE W J. ANGIELSKIM

Introduction: Currently it is suggested that in etiology of recurrent pregnancy loss (RPL) the key role is playing by polymorphic variants of genes involved in pathomechanism of recurrent miscarriages (RM) and intrauterine fetal death (IUFD) in the second half of pregnancy. The particular attention is paid on the polymorphisms of coagulation cascade and fibrynolysis that are connected with significant changes in utero-placental circulation. The mechanism jointed inherited thrombophilia and recurrent miscarriages or intrauterine fetal death is thrombosis in the small arteries of utero-placental circulation, presence of placental infarction, atherosclerosis changes in vessels and placenta insufficiency.

Aim: The aim of study was the attempt to assess the contribution of several inherited thrombophilia in etiology of recurrent pregnancy loss (RPL) in the group of Polish women with recurrent miscarriages (RM) and intrauterine fetal death in the second half of pregnancy (IUFD). The goal was realized by evaluation of frequency of genotypes and alleles of several polymorphisms of genes connected with inherited thrombophilia in the group of women with RPL (RM and IUFD) and healthy women with at least two pregnancies ended by delivery of healthy newborn. For analysis the following polymorphisms were choose: *1691G>A*, *1328T>C* of coagulation factor V, *20210G>A* of coagulation factor II, *R353Q* of coagulation factor VII, *667C>T*, *1298A>C*, *1793G>A* of methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR). In the study the evaluation of connection the investigated genetic polymorphisms with clinical parameters has been performed. Additionally the assessment of connection of co-existence of genotypes of investigated polymorphisms in the RPL group and controls and analysis of haplotypes correlation of investigated polymorphisms with recurrent pregnancy loss occurrence have been performed.

Materials and methods: The study was conducted in 420 women with RPL and 400 healthy women in which the uncomplicated course of at least two pregnancies was performed with delivery of healthy newborn. The study group was divided in two subgroups: 359 women with 2 and more recurrent miscarriages and 61 women with late intrauterine fetal death (after 22 gw.). The patient was enrolled into the study in Division of Perinatology and Women's Diseases at Poznan University of Medical Sciences. The study was performed in the period 2009-2015. The study was approved by Local Bioethical Committee Poznan University of

Medical Sciences (1082/07, 867/15, 210/16). Each patient was informed about the goal of the study and give their written consent.

Frequency of investigated genetic polymorphisms was determined by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). The genetic analysis was performed in the Laboratory of Molecular Biology at Division of Perinatology and Women's Diseases at Poznan University of Medical Sciences.

Results: For *20210G>A* polymorphism of coagulation factor II the higher frequency of heterozygote *20210GA* genotype in the whole RM group (3,34 vs. 1,50%, WR=1,50, $p=0,08$) compared to the controls has been noted. Similarly the frequency of mutated *20210A* allele was higher in RM group compared to the controls (1,67 vs. 0,75%, WR=2,25, $p=0,08$).

In the case of *20210G>A FII* polymorphism the interesting fact was to note the higher frequency of *20210GA* genotype in the group 2 RM (3,55 vs. 1,50%, WR=2,41, $p=0,07$) and in the group ≥ 3 RM (2,60 vs. 1,50%, WR=1,75, ns) compared to the controls. The mutated *20210A* allele was more frequent in the group 2 RM (1,77%, WR=2,39, $p=0,07$) and in the group 2 RM (1,3%, WR=1,74, ns) compared to the controls (0,75%). Moreover for *20210G>A FII* polymorphism the higher frequency of heterozygote *20210GA* genotype in the subgroup RM<13 tc. (2,97 vs. 1,50%, WR=2,01, ns) and in the subgroup RM 13-22 tc. (5,36 vs. 1,50%, WR=3,72, $p=0,09$) compared to the controls has been observed. The same observation was noted to the mutated *20210A* allele. The frequency of mutated *20210A* allele was higher in the subgroup RM<13 tc. (1,49 vs. 0,75%, WR=1,99, ns) and in the subgroup RM 13-22 tc. (2,68 vs. 0,75%, WR=3,72, $p=0,09$) compared to controls.

In IUFD group the statistical overrepresentation of heterozygote *1298AC MTHFR* genotype compared to the controls (55,74% vs. 43,00%, WR=1,66, $p=0,04$). These differences were also revealed in analysis of alleles frequency. The mutated *1298C* allele was more frequent in IUFD group (42,62%) compared to the controls (33,75%), this difference was statistically significant (WR=1,46, $p=0,04$).

The interesting observation was noted in the case of *1793G>A* polymorphism of *MTHFR* gene. The higher frequency of heterozygote *1793GA MTHFR* genotype in the whole RM group (11,98 vs. 7,75%, WR=1,62, $p=0,03$) and mutated *1793A* allele (6,27 vs. 4,13%, WR=1,55, $p=0,04$) compared to the controls has been noted. Additionally the statistical significant higher frequency of heterozygote *1793GA MTHFR* genotype in the subgroup 2 RM compared to the controls (12,77 vs. 7,75%, WR=1,74, $p=0,02$) has been observed. The frequency of *1793A* allele was higher in the subgroup 2 RM (6,74 vs. 4,13% in the controls, WR=1,68, $p=0,02$). In the subgroup RM<13 tc. we have also observed the statistically higher

frequency of heterozygote *1793GA* genotype (12,21 vs. 7,75%, WR=1,66, p=0,03) and mutated *1793A* allele (6,44 vs. 4,13%, WR=1,60, p=0,03) compared to the controls

For *R353Q (11496G>A)* polymorphism of coagulation factor VII the interesting fact was to note the statistically significant overrepresentation of heterozygote *353RQ (11496GA)* genotype in the control group if compared to the subgroup RM 13-22 tc. (10,71 vs. 23,00% in the controls, WR=0,40, p=0,02). Additionally the frequency of mutated *353Q (11496A)* allele was higher in the controls if compared to the subgroup RM 13-22 tc. (7,14 vs. 13,00% in the controls, WR=0,51, p=0,05).

The summarizing frequency analysis of several risk factors for inherited thrombophilia in investigated groups of women with RPL (*FV 1691 GA+AA*, *FII 20210 GA+AA*, *MTHFR 677 TT*, *MTHFR 1298 CC*, *MTHFR 677/1298 CT/AC*, *MTHFR 1793 AA*) revealed statistically significant higher number of risk factors in whole RM group (p=0,0013) and IUFD group (p=0,005) compared to healthy control women.

Analysis of genotypes co-existence revealed statistically significant higher frequency of collective occurrence of several mutated polymorphic variants: *1691G>A* of coagulation factor V, *20210G>A* of coagulation factor II, *R353Q (11496G>A)* of coagulation factor VII, and polymorphisms of *MTHFR* gene in the group RPL. In this way analysis indicated the possible role in interaction of these polymorphisms in etiology of recurrent pregnancy loss.

Conclusions:

1. Statistically significant higher frequency of mutated variants of *1793G>A* polymorphism of *MTHFR* gene in the whole RM group indicated the role of this polymorphism in the etiology of condition, especially in the early miscarriages RM <13 gw.
2. In the study the important significance of wild-type *353RR (11496GG)* genotype and wild-type *353R (11496G)* allele of coagulation factor VII in etiology of late miscarriages RM 13-22 gw. has been indicated.
3. The observed overrepresentation of mutated genotype and allele of *20210G>A FII* polymorphism in the whole group RM could suggest the possible role of these variants in RM etiology.
4. Statistically significant overrepresentation of mutated allele of *1298A>C MTHFR* polymorphism indicated for significance of this variant in IUFD etiology.
5. The summarized analysis of risk factors for inherited thrombophilia applying indicated for important significance of this cooperation effect in IUFD etiology.

6. The analysis of genotypes co-existence revealed the possible role of potentiating interaction of polymorphisms: *R353Q (11496G>A)* of factor VII, *1691G>A* of factor V, *20210G>A* of factor II and the polymorphisms of *MTHFR* gene in pathomechanism of PRL.

SPIS TABEL, RYCIN I FOTOGRAFII

TABELE

- Tabela 1.** Przyczyny, diagnostyka oraz możliwości terapeutyczne poronień nawracających.
- Tabela 2.** Najczęstsze przyczyny trombofilii wrodzonej.
- Tabela 3.** Charakterystyka pacjentek z poronieniami, obumarciem wewnątrzmacicznym oraz z grupy kontrolnej.
- Tabela 4.** Charakterystyka badanych w pracy polimorfizmów.
- Tabela 5.** Startery użyte do reakcji PCR.
- Tabela 6.** Skład mieszaniny w reakcji PCR.
- Tabela 7.** Warunki dla poszczególnych etapów reakcji PCR.
- Tabela 8.** Wielkości fragmentów po reakcji hydrolizy oraz zastosowane enzymy restrykcyjne.
- Tabela 9.** Charakterystyka porównawcza grupy RM, obumarciem wewnątrzmacicznym oraz z grupy kontrolnej.
- Tabela 10.** Charakterystyka porównawcza kobiet z podgrupy z dwoma RM, z trzema i więcej RM oraz z grupy kontrolnej.
- Tabela 11.** Charakterystyka porównawcza kobiet z podgrupy RM <13 tc. oraz RM 13-22 tc. oraz z grupy kontrolnej.
- Tabela 12.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1691G>A* genu czynnika V w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 13.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1691G>A* genu czynnika V w grupie kobiet z IUFD oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 14.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1328T>C* genu czynnika V w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 15.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1328T>C* genu czynnika V w grupie kobiet z IUFD oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 16.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *20210G>A* genu czynnika II w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 17.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1328T>C* genu czynnika V w grupie kobiet z IUFD oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 18.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *R353Q* genu czynnika VII w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 19.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *R353Q* genu czynnika V w grupie kobiet z IUFD oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 20.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR* w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 21.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR* w grupie kobiet z obumarciem wewnątrzmacicznym oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 22.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR* w grupie RM oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 23.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR* w grupie IUFD oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 24.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR* w grupie RM oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 25. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR* w grupie IUFD oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 26. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1691G>A* genu czynnika V krzepnięcia w podgrupach kobiet z 2 oraz ≥ 3 RM w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 27. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1328T>C* (*M385T*) genu czynnika V krzepnięcia w podgrupach kobiet z 2 oraz ≥ 3 RM w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 28. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *20210G>A* genu czynnika II krzepnięcia w podgrupach kobiet z 2 oraz ≥ 3 RM w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 29. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *R353Q* genu czynnika VII krzepnięcia w podgrupach kobiet z 2 oraz ≥ 3 RM w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 30. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR* w podgrupach kobiet z 2 oraz ≥ 3 RM w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 31. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR* w podgrupach kobiet z 2 oraz ≥ 3 RM w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 32. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1793G>A* genu *MTHFR* w podgrupach kobiet z 2 oraz ≥ 3 RM w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 33. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1691G>A* genu czynnika V krzepnięcia w podgrupach kobiet z poronieniami wczesnymi i późnymi w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 34. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1328T>C* (*M385T*) genu czynnika V krzepnięcia w podgrupach kobiet z poronieniami wczesnymi i późnymi w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 35. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *20210G>A* genu czynnika II krzepnięcia w podgrupach kobiet z poronieniami wczesnymi i późnymi w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 36. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *R353Q* genu czynnika VII krzepnięcia w podgrupach kobiet z poronieniami wczesnymi i późnymi w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 37. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR* w podgrupach kobiet z poronieniami wczesnymi i późnymi w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 38. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR* w podgrupach kobiet z poronieniami wczesnymi i późnymi w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 39. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1793G>A* genu *MTHFR* w podgrupach kobiet z poronieniami wczesnymi i późnymi w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 40. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu *1691G>A* oraz polimorfizmu *1328T>C* (*M385T*) genu czynnika V krzepnięcia.

Tabela 41. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu *1691G>A* czynnika V krzepnięcia oraz polimorfizmu *20210G>A* genu czynnika II krzepnięcia.

Tabela 42. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu *1691G>A* czynnika V krzepnięcia oraz polimorfizmu *R353Q* (*11496G>A*) genu czynnika VII krzepnięcia.

Tabela 43. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu *1328T>C* (*M385T*) czynnika V krzepnięcia oraz polimorfizmu *20210G>A* genu czynnika II krzepnięcia.

Tabela 44. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu *1328T>C* (*M385T*) czynnika V krzepnięcia oraz polimorfizmu *R353Q* (*11496G>A*) genu czynnika VII krzepnięcia.

Tabela 45. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu *20210G>A* czynnika II krzepnięcia oraz polimorfizmu *R353Q* (*11496G>A*) genu czynnika VII krzepnięcia.

Tabela 46. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu *677C>T* oraz polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR*.

Tabela 47. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu *677C>T* oraz polimorfizmu *1793G>A* genu *MTHFR*.

Tabela 48. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR* oraz polimorfizmu *1691G>A* genu czynnika V krzepnięcia.

Tabela 49. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR* oraz polimorfizmu *1328T>C* (*M385T*) genu czynnika V krzepnięcia.

Tabela 50. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* oraz polimorfizmu 20210G>A genu czynnika II krzepnięcia.

Tabela 51. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* oraz polimorfizmu R353Q (11496G>A) genu czynnika VII krzepnięcia.

Tabela 52. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 1298A>C oraz polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR*.

Tabela 53. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 1298A>C genu *MTHFR* oraz polimorfizmu 1691G>A genu czynnika V krzepnięcia.

Tabela 54. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 1298A>C genu *MTHFR* oraz polimorfizmu 1328T>C (M385T) genu czynnika V krzepnięcia.

Tabela 55. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 1298A>C genu *MTHFR* oraz polimorfizmu 20210G>A genu czynnika II krzepnięcia.

Tabela 56. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 1298A>C genu *MTHFR* oraz polimorfizmu R353Q (11496G>A) genu czynnika VII krzepnięcia.

Tabela 57. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR* oraz polimorfizmu 1691G>A genu czynnika V krzepnięcia.

Tabela 58. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR* oraz polimorfizmu 1328T>C (M385T) genu czynnika V krzepnięcia.

Tabela 59. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR* oraz polimorfizmu 20210G>A genu czynnika II krzepnięcia.

Tabela 60. Współwystępowanie genotypów polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR* oraz polimorfizmu R353Q (11496G>A) genu czynnika VII krzepnięcia.

Tabela 61. Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu czynnika V krzepnięcia w obydwu grupach pacjentek.

Tabela 62. Częstość występowania poszczególnych haplotypów badanych polimorfizmów genu *FV* oszacowana za pomocą programu Haploview (wersja 4.2). Zapis haplotypów: pierwsza litera polimorfizm 1328T>C, druga 1691G>A.

Tabela 63. Przedstawienie wartości D' oraz LOD badanych polimorfizmów genu czynnika V krzepnięcia w obydwu grupach pacjentek.

Tabela 64. Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu *MTHFR* w obydwu grupach pacjentek.

Tabela 65. Częstość występowania poszczególnych haplotypów badanych polimorfizmów genu *MTHFR* oszacowana za pomocą programu Haploview (wersja 4.2). Zapis haplotypów: pierwsza litera polimorfizm 677C>T, druga 1298A>C, trzecia 1793G>A.

Tabela 66. Przedstawienie wartości D' oraz LOD badanych polimorfizmów genu *MTHFR* w grupach pacjentek.

Tabela 67. Sumaryczna analiza występowania czynników ryzyka trombofilii wrodzonej w badanych grupach kobiet z RPL.

Tabela 68. Sumaryczna analiza występowania czynników ryzyka trombofilii wrodzonej w badanych grupach kobiet z RPL z uwzględnieniem wariantów *FVII* 11496 GG oraz *FV* 1328 CC.

Tabela 69. Dane kliniczne kobiet z badanych grup w zależności od genotypów polimorfizmu 1691G>A genu *FV*.

Tabela 70. Dane kliniczne kobiet z badanych grup w zależności od genotypów polimorfizmu 1328T>C genu *FV*.

Tabela 71. Dane kliniczne kobiet z badanych grup w zależności od genotypów polimorfizmu 20210G>A genu *FII*.

Tabela 72. Dane kliniczne kobiet z badanych grup w zależności od genotypów polimorfizmu R353Q 11496G>A genu *FVII*.

Tabela 73. Dane kliniczne kobiet z badanych grup w zależności od genotypów polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR*.

Tabela 74. Dane kliniczne kobiet z badanych grup w zależności od genotypów polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR*.

Tabela 75. Dane kliniczne kobiet z badanych grup w zależności od genotypów polimorfizmu *1793G>A* genu *MTHFR*.

Tabela. 76. Analiza udziału trombofilii wrodzonej w RPL [Robertson i wsp. 2006].

RYCINY

Rycina 1. Schemat układu krzepnięcia.

Rycina 2. Schemat genu czynnika krzepnięcia V Leiden.

Rycina 3. Schemat genu czynnika II krzepnięcia.

Rycina 4. Schemat genu czynnika VII krzepnięcia.

Rycina 5. Schemat genu kodującego enzym MTHFR.

Rycina 6. Graficzne przedstawienie haplotypów badanych polimorfizmów genu czynnika V krzepnięcia.

Rycina 7. Graficzne przedstawienie haplotypów badanych polimorfizmów genu *MTHFR*.

FOTOGRAFIE

Fotografia 1. Analiza genotypów polimorfizmu *1691G>A* genu *FV* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *MnII*. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 3,4,6,7 homozygoty niezmutowane *1691GG*, tor 2 heterozygota *1691GA*, tor 5 homozygota zmutowana *1691AA*.

Fotografia 2. Analiza genotypów polimorfizmu *1328T>C* genu *FV* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *RsaI*. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 5, 7, 9 homozygoty niezmutowane *1328TT*, tory 2, 3, 4, 6 heterozygoty *1328TC*, tor 8 homozygota zmutowana *1328CC*.

Fotografia 3. Analiza genotypów polimorfizmu *20210G>A* genu *FII* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *HindIII*. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory od 3 do 10 homozygoty niezmutowane *GG*, tor 2 heterozygota *GA*.

Fotografia 4. Analiza genotypów polimorfizmu *R353Q* genu *FVII* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *MspI*. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 2, 3, 4, 5, 8, 9 homozygoty niezmutowane *GG*, tor 6 heterozygota *GA*, tor 7 homozygota zmutowana *AA*.

Fotografia 5. Analiza genotypów polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *HinfI*. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 3 i 5 to homozygoty niezmutowane *CC*, tory 4 i 7 heterozygoty *CT*, tory 2 i 6 homozygoty zmutowane *TT*.

Fotografia 6. Analiza genotypów polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *MboII*. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tor 7 homozygota niezmutowane *AA*, tory 3,4,5,6 heterozygoty *AC*, tory 2 i 8 homozygoty zmutowane *CC*.

Fotografia 7. Analiza genotypów polimorfizmu *1793G>A* genu *MTHFR* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *MbiI*. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 2,4 6 7 homozygoty niezmutowane *1793GG*, tory 3,5 heterozygoty *1793GA*.

APPENDIX

<i>MTHFR677C>T / MTHFR1298A>C</i>		
Cała grupa RM (n=359)		
0,2571	0,1574	0,1351
0,2380	0,0586	1,0000
0,5425	1,0000	1,0000
IUFD (n=61)		
0,1856	0,0045	0,1922
0,0459	0,4535	1,0000
0,3537	1,0000	1,0000
2 RM (n=282)		
0,2678	0,1246	0,1606
0,4193	0,0611	1,0000
0,4077	1,0000	1,0000
≥3 RM (n=77)		
0,4375	0,5152	0,2657
0,0867	0,2609	1,0000
0,2627	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,1398	0,5275	0,5617
0,0544	0,3398	1,0000
0,5487	1,0000	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,1061	0,1198	0,1082
0,4163	0,0561	1,0000
0,5417	1,0000	1,0000

<i>MTHFR677C>T / MTHFR1793G>A</i>		
Cała grupa RM (n=359)		
0,0877	0,3323	0,1351
0,3637	0,0194	1,0000
0,7226	1,0000	1,0000
IUFD (n=61)		
0,4210	0,0811	0,1922
0,0426	1,0000	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
2 RM (n=282)		
0,1202	0,2450	0,1606
0,3559	0,0111	1,0000
0,6564	1,0000	1,0000
≥3 RM (n=77)		
0,1864	0,4007	0,2657
0,5247	0,4465	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,2435	0,3807	0,5617
0,3087	0,5303	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,1065	0,2573	0,1082
0,4396	0,0122	1,0000
0,6766	1,0000	1,0000

<i>MTHFR677C>T / FV1691G>A</i>		
Cała grupa RM (n=359)		
0,0964	0,4332	0,1637
0,3135	0,3180	0,4595
1,0000	1,0000	1,0000
IUFD (n=61)		
0,1208	0,0178	0,4401
0,6131	0,3389	0,0473
1,0000	1,0000	1,0000
2 RM (n=282)		
0,1359	0,4824	0,1686
0,3126	0,3442	0,6564
1,0000	1,0000	1,0000
≥3 RM (n=77)		
0,1784	0,3984	0,3621
0,4921	0,4407	0,2971
1,0000	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,3440	0,3530	0,5371
0,5695	0,6525	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,0988	0,4928	0,1402
0,2990	0,2906	0,3970
1,0000	1,0000	1,0000

<i>MTHFR677C>T / FVM385T</i>		
Cața grupa RM (n=359)		
0,1830	0,3752	0,2855
0,3417	0,4088	0,3180
0,4493	0,3536	0,2234
IUFD (n=61)		
0,0430	0,0420	0,2857
0,1760	0,5342	0,3389
0,3474	1,0000	1,0000
2 RM (n=282)		
0,2856	0,4593	0,3362
0,3015	0,3890	0,3442
0,5483	0,4517	0,1706
≥3 RM (n=77)		
0,1469	0,2974	0,3286
0,5451	0,5602	0,4407
0,4110	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,5189	0,1465	0,4559
0,2334	0,2661	0,3050
0,3257	1,0000	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,1607	0,5205	0,2135
0,4490	0,2852	0,3959
0,5780	0,4220	0,1854

<i>MTHFR677C>T / PTM20210G>A</i>		
Cața grupa RM (n=359)		
0,0554	0,3879	0,1105
0,0489	0,4493	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
IUFD (n=61)		
0,1565	0,0388	0,1744
0,4343	1,0000	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
2 RM (n=282)		
0,0890	0,4650	0,1343
0,0641	0,3406	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
≥3 RM (n=77)		
0,1244	0,3176	0,2423
0,1855	1,0000	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,1493	0,3263	0,5371
0,0268	1,0000	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,0810	0,4504	0,0881
0,1365	0,3719	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000

<i>MTHFR677C>T / FVIIR353Q</i>		
Cața grupa RM (n=359)		
0,3008	0,1193	0,3265
0,2904	0,1603	0,0936
0,2722	1,0000	1,0000
IUFD (n=61)		
0,1412	0,1050	0,2237
0,5492	0,2229	0,5098
0,5754	1,0000	1,0000
2 RM (n=282)		
0,4035	0,1292	0,3496
0,2344	0,1227	0,1150
0,3901	1,0000	1,0000
≥3 RM (n=77)		
0,2275	0,2981	0,4165
0,5201	0,5569	0,2501
1,0000	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,5477	0,0392	0,5657
0,2502	0,0181	0,4822
0,5465	1,0000	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,2796	0,2494	0,2837
0,3806	0,3517	0,0862
0,1870	1,0000	1,0000

<i>MTHFR1298A>C / MTHFR1793</i>		
Cała grupa RM (n=359)		
0,2266	0,4788	0,3942
0,2234	0,0791	0,3179
1,0000	1,0000	0,7226
IUFD (n=61)		
0,0167	0,0336	0,4588
1,0000	0,5728	0,0790
1,0000	1,0000	1,0000
2 RM (n=282)		
0,1950	0,5222	0,2833
0,4135	0,0309	0,4025
1,0000	1,0000	0,6564
≥3 RM (n=77)		
0,5128	0,3940	0,3653
0,1614	0,4038	0,3032
1,0000	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,2751	0,1238	0,4853
0,1228	0,3990	0,6469
1,0000	1,0000	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,1327	0,4115	0,3468
0,4310	0,0737	0,2675
1,0000	1,0000	0,6766

<i>MTHFR1298A>C / FVI691G>A</i>		
Cała grupa RM (n=359)		
0,3003	0,4424	0,4793
0,5904	0,1276	0,4334
1,0000	1,0000	1,0000
IUFD (n=61)		
0,0114	0,0961	0,4018
0,4395	0,1675	0,5098
1,0000	1,0000	1,0000
2 RM (n=282)		
0,2801	0,3046	0,3377
0,4435	0,1066	0,4372
1,0000	1,0000	1,0000
≥3 RM (n=77)		
0,5072	0,2646	0,2786
0,3032	0,4987	0,5870
1,0000	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,1145	0,1939	0,4016
1,0000	0,6950	0,1608
1,0000	1,0000	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,1418	0,3023	0,5449
0,4616	0,0941	0,6487
1,0000	1,0000	1,0000

<i>MTHFR1298A>C / FVM385T</i>		
Cała grupa RM (n=359)		
0,1322	0,2044	0,5021
0,3105	0,4069	0,5088
0,4493	0,6048	1,0000
IUFD (n=61)		
0,0220	0,0247	0,2501
0,5087	0,4109	0,5132
1,0000	0,4343	1,0000
2 RM (n=282)		
0,1254	0,1464	0,5064
0,4322	0,5430	0,4014
0,3406	0,6594	1,0000
≥3 RM (n=77)		
0,3865	0,5005	0,3397
0,2081	0,2125	0,3995
1,0000	0,5067	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,1589	0,3630	0,4615
0,5864	0,1806	0,5546
1,0000	0,4090	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,0458	0,1328	0,5371
0,2759	0,5485	0,5618
0,3719	0,6281	1,0000

<i>MTHFR1298A>C / PTM20210G>A</i>		
Cața grupa RM (n=359)		
0,2215	0,3674	0,4944
0,2938	0,2023	0,4595
1,0000	1,0000	1,0000
IUFD (n=61)		
0,0199	0,0334	0,4691
1,0000	1,0000	0,2474
1,0000	1,0000	1,0000
2 RM (n=282)		
0,1566	0,2039	0,3360
0,1974	0,3156	0,3713
1,0000	1,0000	1,0000
≥3 RM (n=77)		
0,4710	0,2026	0,2426
1,0000	0,1855	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,1792	0,0967	0,4941
1,0000	0,1161	0,2308
1,0000	1,0000	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,1063	0,1887	0,5292
0,2238	0,3513	0,6766
1,0000	1,0000	1,0000

<i>MTHFR1298A>C / FVIIR353Q</i>		
Cața grupa RM (n=359)		
0,4457	0,2508	0,2757
0,2879	0,4461	0,1565
1,0000	0,2223	0,7226
IUFD (n=61)		
0,1132	0,0747	0,4141
0,0770	0,2706	0,6044
1,0000	1,0000	0,2474
2 RM (n=282)		
0,5064	0,1628	0,4401
0,1259	0,3993	0,1631
1,0000	0,3132	0,6564
≥3 RM (n=77)		
0,3865	0,3950	0,1343
0,2289	0,5280	0,4641
1,0000	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,1051	0,5596	0,3415
0,3912	0,0295	0,3937
1,0000	0,4822	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,2559	0,2202	0,3153
0,3313	0,2164	0,1939
1,0000	1,0000	0,6766

<i>MTHFR1793G>A / FVI691G>A</i>		
Cața grupa RM (n=359)		
0,0407	0,1094	0,4730
0,3602	0,0233	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
IUFD (n=61)		
0,0740	0,2237	1,0000
0,1136	1,0000	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
2 RM (n=282)		
0,0319	0,0724	0,4135
0,4122	0,0289	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
≥3 RM (n=77)		
0,3479	0,5697	1,0000
0,3775	0,1614	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,3441	0,2944	1,0000
0,5538	1,0000	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,0369	0,1235	0,4310
0,3508	0,0146	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000

<i>MTHFR1793G>A / FVM385T</i>		
Cața grupa RM (n=359)		
0,0809	0,0128	1,0000
0,5282	0,5904	0,4730
0,3114	1,0000	1,0000
IUFD (n=61)		
0,5216	0,1313	1,0000
0,3200	0,6099	1,0000
0,5098	1,0000	1,0000
2 RM (n=282)		
0,0543	0,0045	1,0000
0,5101	0,4435	0,4135
0,2943	1,0000	1,0000
≥3 RM (n=77)		
0,4881	0,6225	1,0000
0,5289	0,3032	1,0000
0,5870	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,5428	0,0988	1,0000
0,3109	1,0000	1,0000
0,4822	1,0000	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,0541	0,0202	1,0000
0,4340	0,4616	0,4310
0,3336	1,0000	1,0000

<i>MTHFR1793G>A / PTM20210G>A</i>		
Cața grupa RM (n=359)		
0,0131	0,0550	0,7226
0,1642	0,2234	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
IUFD (n=61)		
0,2501	0,2237	1,0000
0,6323	1,0000	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
2 RM (n=282)		
0,0081	0,0405	0,6564
0,1737	0,1706	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
≥3 RM (n=77)		
0,3397	0,4165	1,0000
0,3793	1,0000	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,3074	0,5657	1,0000
0,6030	0,0148	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,0109	0,0325	0,6766
0,1420	1,0000	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000

<i>MTHFR1793G>A / FVIIR353Q</i>		
Cața grupa RM (n=359)		
0,5043	0,0506	0,7226
0,1672	0,3151	1,0000
0,1816	1,0000	1,0000
IUFD (n=61)		
0,4556	0,3919	1,0000
0,3177	0,5754	1,0000
1,0000	0,1323	1,0000
2 RM (n=282)		
0,5293	0,0370	0,6564
0,0945	0,2756	1,0000
0,2865	1,0000	1,0000
≥3 RM (n=77)		
0,4650	0,4153	1,0000
0,4271	0,6544	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,0867	0,3283	1,0000
0,0145	0,5465	1,0000
0,6030	1,0000	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,3067	0,0495	0,6766
0,3751	0,3178	1,0000
0,1205	1,0000	1,0000

<i>FV1691G>A / FVM385T</i>		
Cața grupa RM (n=359)		
0,2603	0,1588	1,0000
0,5046	0,6048	1,0000
0,4268	1,0000	1,0000
IUFD (n=61)		
0,5427	0,1749	1,0000
0,2314	0,4343	1,0000
0,5754	1,0000	1,0000
2 RM (n=282)		
0,2907	0,1813	1,0000
0,5201	0,6594	1,0000
0,4005	1,0000	1,0000
≥3 RM (n=77)		
0,3476	0,3072	1,0000
0,5075	0,5067	1,0000
0,6544	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,2682	0,4887	1,0000
0,2267	1,0000	1,0000
0,5465	1,0000	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,1595	0,1466	1,0000
0,3771	0,5200	1,0000
0,4460	1,0000	1,0000

<i>FV1691G>A / PTM20210G>A</i>		
Cața grupa RM (n=359)		
0,0675	0,2016	1,0000
0,1134	0,4730	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
IUFD (n=61)		
0,1644	0,1313	1,0000
0,6323	1,0000	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
2 RM (n=282)		
0,0836	0,2569	1,0000
0,1123	0,4135	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
≥3 RM (n=77)		
0,2081	0,2585	1,0000
0,3793	1,0000	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,2272	0,5846	1,0000
0,0861	1,0000	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,0824	0,1727	1,0000
0,2114	0,4310	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000

<i>FV1691G>A / FVIIR353Q</i>		
Cața grupa RM (n=359)		
0,3583	0,1199	1,0000
0,2501	0,5666	1,0000
0,1816	1,0000	1,0000
IUFD (n=61)		
0,4023	0,0565	1,0000
0,4295	1,0000	1,0000
0,6323	1,0000	1,0000
2 RM (n=282)		
0,2635	0,1505	1,0000
0,1685	0,5628	1,0000
0,2865	1,0000	1,0000
≥3 RM (n=77)		
0,3812	0,2395	1,0000
0,4271	0,6544	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,0566	0,4197	1,0000
0,0349	1,0000	1,0000
0,6030	1,0000	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,4990	0,1163	1,0000
0,4580	0,5946	1,0000
0,1205	1,0000	1,0000

<i>FVM385T / PTM20210G>A</i>		
Cața grupa RM (n=359)		
0,2642	0,5339	0,4268
0,1044	0,4595	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
IUFD (n=61)		
0,3425	0,3023	0,5754
0,5754	1,0000	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
2 RM (n=282)		
0,2876	0,4930	0,4005
0,1142	0,3713	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
≥3 RM (n=77)		
0,3677	0,4463	0,6544
0,3154	1,0000	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,4749	0,2023	0,5465
0,0628	1,0000	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,2109	0,3984	0,4460
0,2166	0,3970	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000

<i>FVM385T / FVIIR353Q</i>		
Cața grupa RM (n=359)		
0,1777	0,4110	0,3050
0,1235	0,2993	0,5405
0,1358	0,7226	1,0000
IUFD (n=61)		
0,1635	0,1978	0,4343
0,2734	0,4272	1,0000
0,5754	1,0000	1,0000
2 RM (n=282)		
0,1625	0,4829	0,3156
0,1093	0,4690	0,6287
0,2117	0,6564	1,0000
≥3 RM (n=77)		
0,4393	0,3654	0,5067
0,4340	0,1473	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,0632	0,5383	0,4090
0,1473	1,0000	1,0000
0,5465	1,0000	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,3180	0,4144	0,3513
0,1919	0,1334	0,6030
1,0000	0,6766	1,0000

<i>PTM20210G>A / FVIIR353Q</i>		
Cața grupa RM (n=359)		
0,2564	0,2315	1,0000
0,1609	0,1054	1,0000
0,1816	1,0000	1,0000
IUFD (n=61)		
0,2698	1,0000	1,0000
0,2449	0,1323	1,0000
0,6323	1,0000	1,0000
2 RM (n=282)		
0,2154	0,1737	1,0000
0,1096	0,1706	1,0000
0,2865	1,0000	1,0000
≥3 RM (n=77)		
0,5605	0,6846	1,0000
0,5230	0,1614	1,0000
1,0000	1,0000	1,0000
RM 13-22 tc. (n=56)		
0,0701	0,2563	1,0000
0,0087	0,1228	1,0000
0,6030	1,0000	1,0000
RM <13 tc. (n=303)		
0,4259	0,3036	1,0000
0,3860	0,1854	1,0000
0,1205	1,0000	1,0000