

mgr anal. med. Jolanta Kurosz

Badanie hipotezy płodowego incydentu naczyniowego
(prenatalnej zakrzepicy) jako przyczyny występowania
jednostronnych poprzecznych wad zmniejszających kończyn
u człowieka

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w dyscyplinie biologia medyczna

Promotor: dr hab. n. med. Aleksander Jamsheer, prof. UM

Katedra i Zakład Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu



Wydział Lekarski I

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2019

Panu dr hab. n. med.

Aleksandrowi Jamsheer

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania
za życzliwość i wsparcie podczas realizacji
tematu niniejszej pracy.*

Pani mgr Ewelinie Olech

*dziękuję serdecznie za nieocenioną pomoc
w redagowaniu niniejszej rozprawy.*

*Rodzinie, Przyjaciółom,
a w szczególności narzeczonemu
Mariuszowi Gronkowskiemu
dziękuję serdecznie
za wyrozumiałość, wsparcie i wiarę.*

Słowa kluczowe:

wrodzone wady kończyn, wady zmniejszające kończyn, prenatalny incydent naczyniowy, trombofilia wrodzona, trombofilia nabyta

Key words:

congenital limb defects, limb reduction defects, prenatal vascular incident, congenital thrombophilia, acquired thrombophilia

Niniejsza praca powstała w ramach projektu naukowego pt.: "Badanie hipotezy płodowego incydentu naczyniowego (prenatalnej zakrzepicy) jako przyczyny występowania jednostronnych poprzecznych wad zmniejszających kończyn u człowieka", finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki o nr UMO-2011/03/B/NZ5/00510.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Wykaz stosowanych skrótów

ACA – przeciwciała antykardiolipinowe (ang. *anti-cardiolipin antibodies*)

APC – aktywowane białko C (ang. *activated protein C*)

APCR – oporność na aktywowane białko C (ang. *activated protein C resistance*)

APS – zespół antyfosfolipidowy (ang. *antiphospholipid syndrome*)

aPTT – czas koalinowo-kefalinowy; czas częściowej tromboplastyny po aktywacji

ASD – ubytek przegrody międzyprzedsionkowej (ang. *atrial septal defect*)

AT – antytrombina

BCSH – Brytyjski Komitet ds. Standaryzacji w Hematologii (ang. *British Committee for Standards in Haematology*)

BC – białko C

BS – białko S

β 2 GPI – β 2 glikoproteina I (ang. *beta-2-glycoprotein I*)

DIC – rozsiane wykrzepianie wewnątrznaczyniowe (ang. *disseminated intravascular coagulation*)

DL – dolna lewa

dNTP – trifosforan deoksyrybonukleotydu (ang. *deoxyribonucleotide triphosphate*)

DP – dolna prawa

dRVVT – test z zastosowaniem rozcieńzonego jadu żmii Russella (ang. *dilute Russell's viper venom test*)

DVT – zakrzepica żył głębokich (ang. *deep vein thrombosis*)

EC – numer klasyfikacyjny przypisany każdemu enzymowi przez Komitet Nazewnictwa

ECAT – zewnętrzna kontrola laboratoryjna w dziedzinie hemostazy (ang. *External quality Control of diagnostic Assays and Tests with a focus on Thrombosis and Haemostasis*)

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. *ethylene diamine tetraacetic acid*)

EPCR – śródbłonkowy receptor białka C (ang. *endothelial protein C receptor*)

EUROCAT – Europejski Rejestr Wad Wrodzonych i Bliźniąt (ang. *European Registry of Congenital Anomalies and Twins*)

FGA – gen kodujący łańcuch alfa fibrynogenu

FGB – gen kodujący łańcuch beta fibrynogenu

FGG – gen kodujący łańcuch gamma fibrynogenu

FVL – czynnik V Leiden

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- F2* – gen kodujący czynnik II układu krzepnięcia krwi
- F5* – gen kodujący czynnik V układu krzepnięcia krwi
- F7* – gen kodujący czynnik VII układu krzepnięcia krwi
- F12* – gen kodujący czynnik XII układu krzepnięcia krwi
- F13A1* - gen kodujący czynnik XIII układu krzepnięcia krwi
- GL – górna lewa
- GP – górna prawa
- GPL – jednostka przeciwciał antyfosfolipidowych w klasie IgG (1 GPL = 1 µg przeciwciał antyfosfolipidowych IgG)
- GU – jednostka przeciwciał przeciwko β2 glikoproteinie I w klasie IgG (1 GU = 1 µg przeciwciał anti- β2 glikoproteina I)
- Hbd. – tydzień ciąży (łac. *hebdomas*)
- HGVS – Towarzystwo ds. Zmienności Genomu Człowieka (ang. *Human Genome Variation Society*)
- HSV – wirus opryszczki pospolitej (ang. *Herpes simplex virus*)
- HRP – peroksydaza chrzanowa (ang. *Horseradish peroxidase*)
- ICD-10 – Międzynarodowa Klasyfikacja Chorób (ang. *International Classification of Diseases*)
- ISTH – Międzynarodowe Towarzystwo Zakrzepicy i Hemostazy (ang. *International Society on Thrombosis and Haemostasis*)
- LA – antykoagulant toczniowy (łac. *lupus anticoagulant*)
- LDL – lipoproteina o małej gęstości (ang. *low-density lipoprotein*)
- MAF – częstość występowania rzadszego allelu (ang. *minor allele frequency*)
- MPL – jednostka przeciwciał antyfosfolipidowych w klasie IgM (1 MPL = 1 µg przeciwciał antyfosfolipidowych IgM)
- MTHFR* – gen kodujący reduktazę metylenotetrahydrofolianową
- NADPH – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
- NTIC – nadciśnienie tętnicze indukowane ciążą
- NT – nadciśnienie tętnicze
- OR – iloraz szans (ang. *odds ratio*)
- OSEs – tlenowo specyficzne epitopy (ang. *oxidation specific epitopes*)
- OMIM – baza danych o wszystkich opisanych monogenowych chorobach genetycznych człowieka (ang. *Online Mendelian Inheritance in Man*)

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

PAI-1 – inhibitor aktywatora plazminogenu-1 (ang. *plasminogen activator inhibitor-1*)

PAI-2 – inhibitor aktywatora plazminogenu-2 (ang. *plasminogen activator inhibitor-2*)

PC – białko C (ang. *protein C*)

PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)

pNA – paranitroanilina

PROC – gen kodujący białko C

PROSI – gen kodujący białko S

PRWWR – Polski Rejestr Wrodzonych Wad Rozwojowych

PS – białko S (ang. *protein S*)

pz – pary zasad

rcf – względna siła odśrodkowa (ang. *relative centrifugal force*)

rpm – obroty na minutę (ang. *revolutions per minute*)

SAH – S-adenozyl-L-homocysteina

SLE – toczeń rumieniowaty układowy (ang. *systemic lupus erythematosus*)

SNV – wariant pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide variation*)

SNVs – warianty pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide variations*)

SSC/ ISTH – Komitet Naukowy oraz ds. Standaryzacji ISTH (ang. *Scientific and Standardization Committee of ISTH*)

Starter F – starter przedni (ang. *forward primer*)

Starter R – starter wsteczny (ang. *reverse primer*)

TK – tomografia komputerowa

TF – czynnik tkankowy (ang. *tissue factor*)

TFPI – inhibitor zależnej od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia (ang. *tissue factor pathway inhibitor*)

TMB – tetrametylobenzydyna

THF – tetrahydrofolian

tPA – tkankowy aktywator plazminogenu (ang. *tissue plasminogen activator*)

3'UTR – region 3' nieulegający translacji (ang. *3' untranslated region*)

5'UTR – region 5' nieulegający translacji (ang. *5' untranslated region*)

VSD – ubytek przegrody międzykomorowej (ang. *ventricular septal defect*)

VZV – wirus ospy wietrznej i półpaśca (ang. *Varicella zoster virus*)

WZK – wada(y) zmniejszające kończyn

ZŻG – zakrzepica żył głębokich

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ŻChZZ – żylna choroba zakrzepowo-zatorowa

SPIS TREŚCI

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów.....	9
Spis rycin	16
Spis tabel.....	19
1 Wstęp.....	21
1.1 Anatomia i etiologia wrodzonych wad zmniejszających kończyn.....	21
1.2 Hipoteza incydentu naczyniowego.....	23
1.3 Hemostaza	24
1.4 Trombofilia.....	26
1.4.1 Wrodzone czynniki trombofilii.....	26
1.4.2 Nabyte czynniki trombofilii.....	34
2 Założenia i cele pracy	36
3 Materiał i metody.....	37
3.1 Charakterystyka grupy badanej.....	37
3.2 Charakterystyka grupy kontrolnej.....	38
3.3 Materiał biologiczny	39
3.4 Oznaczenia koagulologiczne	40
3.4.1 Metodyka oznaczenia aktywności białka C.....	40
3.4.2 Metodyka oznaczenia stężenia antygeny wolnego białka S	41
3.4.3 Metodyka oznaczenia aktywności antytrombiny.....	43
3.4.4 Metodyka oznaczania aktywności czynnika VIII	44
3.4.5 Metodyka oznaczenia obecności antykoagulantu toczniowego	45
3.4.6 Metodyka oznaczenia czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji – aPTT	47
3.4.7 Metodyka oznaczenia miana przeciwciał antykardiolipinowych (ACA) w klasie IgG i IgM.....	48
3.4.8 Metodyka oznaczenia miana przeciwciał przeciwko β 2-glikoproteinie I (anty β 2-GPI) w klasie IgG	49
3.5 Oznaczenia biochemiczne	50
3.5.1 Metodyka oznaczenia lipoproteiny (a); Lp(a).....	50
3.5.2 Metodyka oznaczenia homocysteiny	51

SPIS TREŚCI

3.6	Badania z wykorzystaniem metod biologii molekularnej	52
3.6.1	Łańcuchowa reakcja polimerazy PCR	52
3.6.2	Sekwencjonowanie produktów PCR.....	54
3.6.3	Projektowanie starterów.....	56
3.6.4	Real-time PCR z wykorzystaniem sond typu TaqMan.....	57
3.7	Wybór analizowanych SNVs	63
3.8	Analiza statystyczna.....	63
3.8.1	Test dwumianowy.....	64
3.8.2	Test t-Studenta dla prób niezależnych	64
3.8.3	Test dokładny Fishera	64
3.8.4	Test Chi-kwadrat.....	65
3.8.5	Test Chi-kwadrat dla trendu (test Cochran-Armitage)	65
3.8.6	Iloraz szans.....	65
4	Wyniki	66
4.1	Charakterystyka WZK w grupie badanych pacjentów.....	66
4.2	Badania koagulologiczne	87
4.3	Badania biochemiczne.....	94
4.4	Badania z wykorzystaniem metod biologii molekularnej.....	98
5	Dyskusja	114
6	Wnioski.....	123
7	Streszczenie w języku polskim	124
8	Streszczenie w języku angielskim	126
9.	Piśmiennictwo	128
10	Załączniki	139
10.1	Zgoda Komisji Bioetycznej	139
10.2	Deklaracja Świadomej Zgody Pacjenta na wykonanie badań genetycznych	142
10.3	Deklaracja Świadomej Zgody Pacjenta na wykonanie laboratoryjnych badań diagnostycznych.....	143
10.4	Wzór ankiety klinicznej do badań czynników ryzyka wrodzonych ubytkowych wad kończyn	144

SPIS TREŚCI

10.5 Wzór ankiety klinicznej dla kontroli do badań zmian w układzie krzepnięcia-fibrynolizy.....	145
10.6 Izolacja DNA z limfocytów metodą wysalania	146

Spis rycin

Ryc. 1 Podział anatomiczny wad kończyny górnej i dolnej	22
Ryc. 2 Przykładowe zdjęcia pacjentów z izolowanymi wadami zmniejszającymi kończyny	38
Ryc. 3 Schemat postępowania diagnostycznego w przypadku podejrzenia obecności antykoagulantu toczniowego	46
Ryc. 4 Wykres przedstawiający częstość występowania wady zmniejszającej w kończynach górnych i dolnych u badanych pacjentów	66
Ryc. 5 Wykres przedstawiający częstość występowania wady zmniejszającej kończyn u badanych pacjentów w zależności od strony ciała.....	67
Ryc. 6 Wykres przedstawiający częstość występowania wady zmniejszającej kończyn u badanych pacjentów w zależności od segmentu kończyny	67
Ryc. 7 Rozkład średnich wartości białka S (BS, inczej PS) w grupie kontrolnej (K) i grupie pacjentów z WZK (P)	88
Ryc. 8 Rozkład średnich wartości białka S (BS, inaczej PS) w grupie kontrolnej (K) i grupie matek pacjentów z WZK (M)	88
Ryc. 9 Wykres przedstawiający wyniki badania aktywności białka C w poszczególnych grupach (P – pacjenci z WZK, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)	89
Ryc. 10 Rozkład średnich wartości białka C (BC, inaczej PC) w grupie kontrolnej (K) i grupie pacjentów z WZK (P).....	89
Ryc. 11 Rozkład średnich wartości białka C (BC, inaczej PC) w grupie kontrolnej (K) i grupie matek pacjentów z WZK (M).....	90
Ryc. 12 Wykres przedstawiający wyniki badania aktywności antytrobin w poszczególnych grupach (P – pacjenci z WZK, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)	90
Ryc. 13 Rozkład średnich wartości antytrombiny (AT) w grupie kontrolnej (K) i w grupie pacjentów z WZK (P)	91
Ryc. 14 Rozkład średnich wartości antytrombiny (AT) w grupie kontrolnej (K) i grupie matek pacjentów z WZK (M)	91
Ryc. 15 Wykres przedstawiający wyniki badań aktywności czynnika VIII w poszczególnych grupach (P – pacjenci z WZK, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)	92
Ryc. 16 Rozkład średnich aktywności FVIII w grupie kontrolnej (K) i grupie pacjentów z WZK (P).....	92
Ryc. 17 Rozkład średnich wartości aktywności FVIII w grupie kontrolnej (K) i grupie matek pacjentów z WZK (M)	93

SPIS RYCIN

Ryc. 18 Wykres przedstawiający częstość występowania zespołu antyfosfolipidowego w poszczególnych grupach (P – pacjenci z WZK, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)	93
Ryc. 19 Wykres przedstawiający wyniki badań stężenia homocysteiny w poszczególnych grupach (P – pacjenci z WZK, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna).....	95
Ryc. 20 Rozkład średnich stężeń homocysteiny w grupie kontrolnej (K) i grupie pacjentów z WZK (P).....	95
Ryc. 21 Rozkład średnich stężeń homocysteiny w grupie kontrolnej (K) i grupie matek pacjentów z WZK (P)	95
Ryc. 22 Wykres przedstawiający wyniki badań stężenia lipoproteiny a w poszczególnych grupach (P – pacjenci z WZK, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)	96
Ryc. 23 Wykres przedstawiający częstość genotypów *97GG, *97GA oraz *97AA w genie <i>F2</i> w badanych grupach	102
Ryc. 24 Wykres przedstawiający rozkład genotypów 1601GG, 1601GA oraz 1601AA w genie <i>F5</i> w badanych grupach	103
Ryc. 25 Wykres przedstawiający rozkład genotypów -463GG, -463GA oraz -463AA w genie <i>FGB</i> w badanych grupach	104
Ryc. 26 Wykres przedstawiający rozkład genotypów -156CC, -156CT oraz -156TT genie <i>FGB</i> w badanych grupach.....	105
Ryc. 27 Wykres przedstawiający częstość genotypów -4CC, -4CT oraz -4TT w genie <i>F12</i> w badanych grupach	106
Ryc. 28 Wykres przedstawiający częstość genotypów 103GG, 103GT oraz 103TT w genie <i>F13A1</i> w badanych grupach (P – pacjenci z WZK, D – dzieci - grupa kontrolna, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)	107
Ryc. 29 Wykres przedstawiający częstość genotypów 665CC, 665CT oraz 665TT w genie <i>MTHFR</i> w badanych grupach (P – pacjenci z WZK, D – dzieci - grupa kontrolna, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)	108
Ryc. 30 Wykres przedstawiający rozkład genotypów 1286AA, 1286AC oraz 1286CC w genie <i>MTHFR</i> w badanych grupach (P – pacjenci z WZK, D – dzieci - grupa kontrolna, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna).....	109
Ryc. 31 Wykres przedstawiający rozkład genotypów 1433GG, 1433GA oraz 1433AA w genie <i>FGB</i> w badanych grupach (P – pacjenci z WZK, D – dzieci - grupa kontrolna, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)	110
Ryc. 32 Wykres przedstawiający rozkład genotypów -862GG, -862GA oraz -862AA w genie <i>FGB</i> w badanych grupach (P – pacjenci z WZK, D – dzieci - grupa kontrolna, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)	111

SPIS RYCIN

Ryc. 33 Wykres przedstawiający rozkład genotypów 176TT, 176TC oraz 176CC w genie *ITGB3* w badanych grupach (P – pacjenci z WZK, D – dzieci - grupa kontrolna, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna) 112

Ryc. 34 Wykres przedstawiający rozkład genotypów 1238GG, 1238GA oraz 1238AA w genie *F7* w badanych grupach 113

Spis tabel

Tabela 1 Klasyfikacja trombofilii ze względu na stopień ryzyka zakrzepowego.....	26
Tabela 2 Kryteria klasyfikacyjne zespołu antyfosfolipidowego.....	34
Tabela 3 Zestawienie mieszanin i programów do warunków prowadzenia reakcji PCR..	53
Tabela 4 Skład żeli agarozowych stosowanych do rozdziału produktów PCR.....	54
Tabela 5 Numery sekwencji referencyjnych wykorzystanych do analizy.....	56
Tabela 6 Wykaz starterów użytych do reakcji PCR	56
Tabela 7 Wykaz badanych SNVs	58
Tabela 8 Odczynniki użyte w badaniach	59
Tabela 9 Bufory użyte w badaniach.....	61
Tabela 10 Aparatura wykorzystana w badaniach	61
Tabela 11 Bazy danych wykorzystane w badaniach.....	62
Tabela 12 Programy komputerowe wykorzystane w badaniach.....	62
Tabela 13 Zestawienie usług zewnętrznych	63
Tabela 14 Dane z wywiadu klinicznego dotyczące pacjentów z WZK.....	68
Tabela 15 Zakresy wartości referencyjnych wykonanych oznaczeń laboratoryjnych.....	87
Tabela 16 Dodatkowo wyniki badanych czynników prozakrzepowych u pacjentów z WZK i ich matek.....	97
Tabela 17 Pacjenci i grupa kontrolna dzieci zdrowych – test na równowagę Hardy’ego-Weinberga.....	98
Tabela 18 Matki pacjentów z WZK i grupa kontrolna kobiet – test na równowagę Hardy’ego-Weinberga.....	98
Tabela 19 Częstość występowania alleli rzadszych w grupie kontrolnej (MAF).....	99
Tabela 20 Porównanie częstości genotypów w grupach badanych i kontrolnych.....	100
Tabela 21 Analiza ilorazu szans (OR) w modelu dominującym i recesywnym dla wariantów typu SNV genów badanych w grupie pacjentów z WZK i w grupie dzieci zdrowych ...	101
Tabela 22 Analiza ilorazu szans (OR) w modelu dominującym i recesywnym dla wariantów typu SNV genów badanych w grupie matek pacjentów z WZK i w grupie zdrowych kobiet	101
Tabela 23 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.*97G>A genu <i>F2</i> w badanych grupach	102
Tabela 24 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.1601G>A genu <i>F5</i> w badanych grupach.....	103
Tabela 25 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.-463G>A genu <i>FGB</i> w badanych grupach.....	104

SPIS TABEL

Tabela 26 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.-156C>T genu <i>FGB</i> w badanych grupach.....	105
Tabela 27 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.-4C>T genu <i>F12</i> w badanych grupach	106
Tabela 28 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.103G>T genu <i>F13A1</i> w badanych grupach.....	107
Tabela 29 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.665C>T genu <i>MTHFR</i> w badanych grupach.....	108
Tabela 30 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.1286A>C genu <i>MTHFR</i> w badanych grupach.....	109
Tabela 31 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.1433G>A genu <i>FGB</i> w badanych grupach.....	110
Tabela 32 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.-862G>A genu <i>FGB</i> w badanych grupach.....	111
Tabela 33 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.176T>C genu <i>ITGB3</i> w badanych grupach.....	112
Tabela 34 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.1238G>A genu <i>F7</i> w badanych grupach.....	113

1 Wstęp

1.1 Anatomia i etiologia wrodzonych wad zmniejszających kończyn

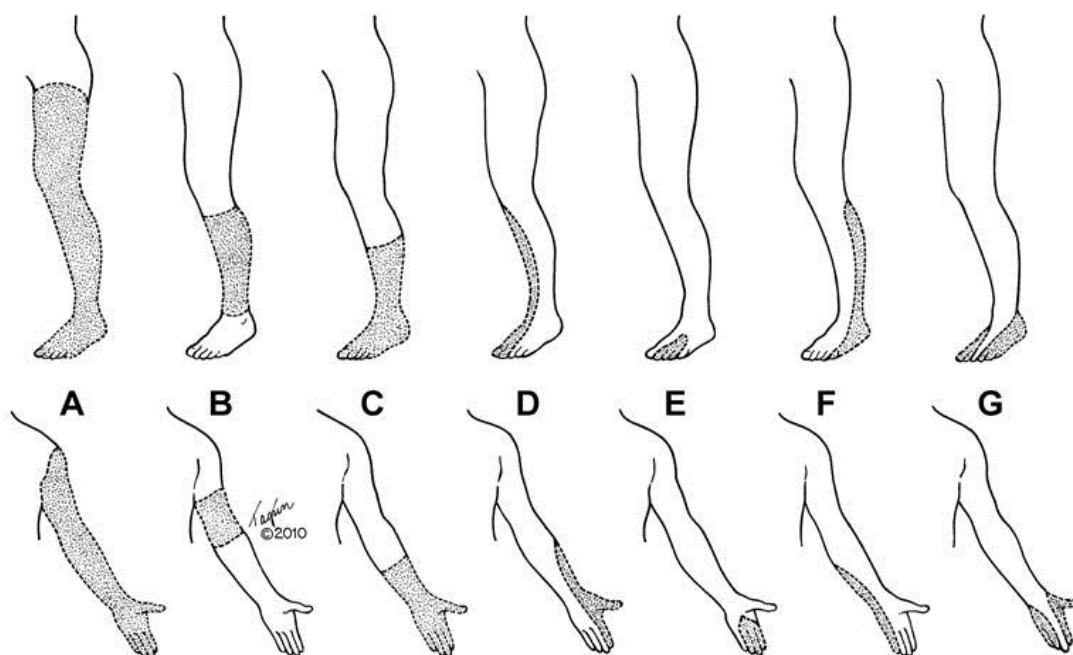
Wrodzone wady zmniejszające kończyn (WZK) obejmują ubytki części lub całej kończyny i stanowią heterogenną pod względem etiologicznym i anatomicznym grupę nieprawidłowości^{1,2}. Częstość raportowania WZK jest geograficznie zróżnicowana i wynosi od 3 do 8 na 10 000 żywych urodzeń²⁻⁴. Według danych z Polskiego Rejestru Wrodzonych Wad Rozwojowych (PRWWR) WZK występowały w Polsce u żywo urodzonych noworodków z częstością 5,7 na 10 000 żywych urodzeń. Natomiast według organizacji zrzeszającej europejskie rejestry wad (EUROCAT), częstość WZK w Europie wynosi średnio ok. 4 na 10 000 żywych urodzeń⁵. WZK mogą wystąpić w postaci wady izolowanej, tj. takiej, której nie towarzyszą inne wady wrodzone lub w postaci zespołu wad mnogich. W tym drugim przypadku, wadzie kończyny towarzyszy przynajmniej jedna dodatkowa duża wrodzona wada rozwojowa innego układu (np. wada serca, wada układu moczowego etc.). Izolowane WZK niezwykle rzadko występują rodzinie i dotyczą zazwyczaj tylko jednej kończyny pacjenta, co z wysokim prawdopodobieństwem przemawia za ich niegenetycznym uwarunkowaniem.

Podział etiologiczny WZK obejmuje wady uwarunkowane czynnikami genetycznymi i środowiskowymi. Do uwarunkowań genetycznych zaliczamy aberracje chromosomowe, w tym również mikrorearanżacje genomu oraz patogenne warianty pojedynczego genu. Wśród czynników środowiskowych wyróżnia się czynniki mechaniczne – pasma owodniowe, małowodzie, bezwodzie, fizyczne – hipotermia, hipertermia, promieniowanie rentgenowskie, biologiczne – infekcje wirusowe oraz chemiczne – dym papierosowy, kadm, kokaina, kwas retinowy, fenytoina, warfaryna, kwas walproinowy, mizoprostol, talidomid^{2,6}. Ze względu na mechanizm działania teratogennego, wymienione wśród substancji chemicznych leki można podzielić na dwie grupy: pierwszą, obejmującą substancje, które bezpośrednio zaburzają morfogenezę rozwijających się kończyn (np. talidomid, warfaryna, kwas walproinowy, fenytoina) oraz drugą, wywołującą zaburzenia naczyniowe (np. mizoprostol). U dużego odsetka pacjentów, etiologia WZK pozostaje jednak wciąż niezidentyfikowana. Jest to częste zwłaszcza w przypadkach, gdy wadom kończyn nie towarzyszą inne nieprawidłowości rozwojowe. Brak możliwości identyfikacji określonego, uchwytanego czynnika genetycznego w izolowanych WZK oraz ich sporadyczne występowanie przemawiają za udziałem w ich etiologii czynnika środowiskowego lub wielogenowego

WSTĘP

(tzw. uwarunkowanie wieloczynnikowe, w którym współuczestniczą czynniki środowiskowe oraz genetyczne)^{1,7-9}.

Podział anatomiczny, oparty o system Międzynarodowej Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych (ICD-10) dzieli WZK na wady kończyny górnej, dolnej, nieokreślone lub zespół pasm owodniowych. Dalszy podział rozróżnia całkowity lub częściowy brak kończyny, klasyfikowany następnie w obrębie jednej z trzech kategorii – interkalarny (wtrącony), końcowy poprzeczny oraz podłużny (Ryc. 1). Defekty interkalarne są rozumiane jako brak środkowej części kości długich – ramiennej, promieniowej, łokciowej, udowej, strzałkowej lub piszczelowej, przy jednoczesnym zachowaniu elementów dystalnych – ręki, stopy i paliczków. Wady poprzeczne końcowe polegają na ubytku części kończyny wzdłuż osi poprzecznej. Wady podłużne obejmują brak lub niedorozwój kończyny wzdłuż osi długiej – tutaj wyróżnia się wady przedosiowe, centralne, pozaosiowe i mieszane. Opisane ubytki mogą występować zarówno symetrycznie lub jednostronnie².



Ryc. 1 Podział anatomiczny wad kończyny górnej i dolnej²

A – całkowity ubytek; B-G – częściowy ubytek; B – interkalarny; C – poprzeczny końcowy; D-G podłużny;
D – przedosiowy, E – centralny, F – zaosiowy, G – mieszany

1.2 Hipoteza incydentu naczyniowego

Jedną z hipotez, wyjaśniających powstawanie izolowanych WZK jest hipoteza incydentu naczyniowego, polegającego na wystąpieniu prenatalnej zakrzepicy lub zatoru w krążeniu płodowym.^{8,9} Taki incydent naczyniowy, zaistniały we wczesnym etapie rozwoju płodu, miałby powodować niedokrwienie i martwicę odsiebnej części kończyny płodowej, jej resorpcję i w konsekwencji obserwowaną po urodzeniu wadę zmniejszającą. Postnatalne i okołoporodowe incydenty naczyniowe są częste w populacji ludzkiej i stanowią przyczynę chorób zarówno wieku noworodkowego, jak i dorosłego (np. żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej, udarów, zawałów narządowych). Jednocześnie znanych jest wiele czynników ryzyka zakrzepicy i incydentów naczyniowych wieku dorosłego (głównie są to zaburzenia w układzie krzepnięcia i fibrynolizy). W badaniu histopatologicznym łożysk noworodków urodzonych z WZK opisywano obecność mikroskopijnych zakrzepów w naczyniach krwionośnych. Tym samym dostarczono pośrednich dowodów na udział prenatalnej zakrzepicy w rozwoju poprzecznych ubytkowych wad kończyn, sugerując, że wady te występują wtórnie do zamknięcia światła naczyń tętniczego płodu¹⁰. Nieprawidłowości w formowaniu się naczyń krwionośnych oraz ich okluzje zostały opisane także przez van Allena i wsp. oraz Soltana i Holmesa u pacjentów z aplazją kości ramiennej i różnymi wadami wrodzonymi, w tym wadami kończyn^{11,12}. Natomiast Graziano i wsp. opisali dwie rodziny z wadami ubytkowymi kończyn, w których została zdiagnozowana nadpłytkowość samoistna, uwarunkowana patogennymi wariantami w genie trombopoetyny (*THPO*). Nadpłytkowość w okresie prenatalnym miałaby powodować zaburzenia naczyniowe, polegające na zahamowaniu przepływu krwi, następnie niedokrwieniu rozwijającej się kończyny i finalnie ograniczeniu jej wzrastania^{13,14}.

Wiadomo także, że w trakcie trwania ciąży ma miejsce szereg zmian adaptacyjnych, w tym zmiany w układzie hemostazy u ciężarnej. Nasilenie procesów wykrzepiania i zahamowanie fibrynolizy jest obserwowane od samego początku ciąży. Przyczyną takiego stanu jest przede wszystkim znaczący wzrost stężenia hormonów: progesteronu – 10-krotnie i estrogenu – 100-krotnie, które w sposób pośredni wpływają na układ krzepnięcia oraz na wzrost syntezy czynników krzepnięcia: I, II, VII, VIII, IX, X, XII. Estrogeny obniżają także stężenie antytrombiny i powodują wzmożoną agregację płytek krwi¹⁵. Zakrzepica ciężarnych jest znanym czynnikiem ryzyka przedwczesnego oddzielania się łożyska, wewnątrzmacicznego zahamowania wzrastania płodu czy stanu

WSTĘP

przedrzucawkowego¹⁶. W 2000 roku Hunter przedstawił wyniki badań pilotażowych, mających na celu ocenę częstości występowania czynników ryzyka zakrzepicy w grupie pacjentów dotkniętych WZK⁸. U 24 par pacjent z WZK-matka, Autor analizował stężenia wolnego białka S, aktywnego białka C, antytrombiny, homocysteiny, lipoproteiny (a), przeciwciał antykardiolipinowych w klasach IgG/IgM oraz trzy warianty pojedynczego nukleotydu (SNVs; ang. *single nucleotide variations*) – g.20210G>A, inaczej c.97*G>A w *F2* (rs1799963), c.1601G>A (p.Arg534Gln) w *F5* (rs6025) zwany czynnikiem V Leiden (FVL) lub błędnie mutacją czynnika V Leiden oraz c.665C>T (p.Ala222Val) w *MTHFR* (rs1801133). Istotność statystyczną osiągnęły wyniki wskazujące na obniżenie stężenia wolnego białka S zarówno u dzieci z WZK, jak i ich matek oraz podwyższenie miana przeciwciał antykardiolipinowych w klasie IgG u matek dzieci z WZK. Przedstawiona przez Huntera hipoteza incydentu naczyniowego zakładała wystąpienie prenatalnej zakrzepicy lub zatoru w krążeniu płodowym. Skutkiem zaburzeń w przepływie krwi miałyby być niedokrwienie i martwica dystalnej części kończyny, jej resorpcja, a w konsekwencji obserwowana po urodzeniu wada zmniejszająca kończyny. Carmichael i wsp.¹⁷ wykazali z kolei ok. 2,5-krotny wzrost ryzyka wystąpienia WZK w przypadku obecności u pacjenta FVL (95% przedział ufności pomiędzy 1,0-6,5). Wyższa częstość występowania czynników ryzyka zakrzepicy (tj. wariantu w *F5* oraz wariantu w *F2*) wśród matek dzieci z WZK została odnotowana w badaniach Ordala i wsp.⁹. Analiza ta przeprowadzona była w grupie zaledwie 19 matek, którym urodziło się dziecko z WZK. U czterech z nich stwierdzono obecność genetycznego czynnika ryzyka zakrzepicy w postaci nosicielstwa heterozygotycznego wariantu w *F5* (u 1 kobiety), heterozygotycznego wariantu c.97*G>A w *F2* (u dwóch kobiet) oraz jednocześnie obu w/w wariantów prozakrzepowych (u 1 kobiety).

1.3 Hemostaza

Hemostaza obejmuje procesy krzepnięcia krwi oraz fibrynolizy, które mają na celu zachowanie płynności krwi krążącej w naczyniach żylnych, tętniczych i włosowatych. Wyróżniana jest hemostaza pierwotna, z udziałem płytek krwi, oraz wtórna – z udziałem białek krzepnięcia i fibrynolizy. Pojawienie się po raz pierwszy u kręgowców kaskady krzepnięcia krwi, jako mechanizmu niezwykle skutecznej ochrony przed jej utratą, stanowiło olbrzymie osiągnięcie ewolucyjne. Zarówno u kręgowców, jak i u ssaków krzepnięcie krwi przebiega z przekształceniem rozpuszczalnego fibrynogenu w nierozpuszczalną fibrynę pod wpływem trombiny^{18,19}. U człowieka w trakcie konwersji

fibrynogenu w fibrynę ma miejsce szereg reakcji z udziałem osoczowych czynników układu krzepnięcia krwi, wymienionych poniżej:

- fibrynogen; czynnik I,
- protrombina; czynnik II,
- proakceleryna; czynnik V,
- prokonwertyna; czynnik VII,
- czynnik VIII,
- czynnik Christmasy; czynnik IX,
- czynnik Stuarta; czynnik X,
- czynnik XI,
- czynnik Hagemana; czynnik XII
- czynnik XIII,
- czynnik tkankowy,
- czynnik von Willebranda.

Na kaskadę krzepnięcia krwi składa się szlak wewnątrzpochodny i zewnątrzpochodny^{20,21}. Szlak wewnątrzpochodny rozpoczyna aktywacja czynnika XII układu krzepnięcia krwi przez ujemnie naładowaną powierzchnię. Aktywację szlaku zewnątrzpochodnego indukuje utworzenie kompleksu czynnika tkankowego (TF; *tissue factor*) z aktywnym czynnikiem VII układu krzepnięcia krwi (VIIa). Kompleks TF-VIIa przekształca czynniki X i XI układu krzepnięcia krwi w ich aktywne formy – Xa, XIa. Czynnik Xa łączy się ze swym kofaktorem, czynnikiem Va układu krzepnięcia krwi (akceleryną), powodując przekształcenie protrombiny (czynnik II układu krzepnięcia krwi) w jej aktywną postać - trombinę (czynnik IIa). Powstająca na tym etapie trombina inicjuje aktywację płytek krwi, czynnika VIII, V i XI układu krzepnięcia krwi. Zaktywowany czynnik XI układu krzepnięcia krwi (XIa) łączy się na powierzchni płytek krwi z czynnikiem VIIIa i czynnikiem X układu krzepnięcia krwi, tworząc tenazę. Powstały następnie aktywowany czynnik X układu krzepnięcia krwi (Xa) łączy się z czynnikiem Va oraz II układu krzepnięcia krwi, tworząc kompleks protrombinazy. Dochodzi wówczas do powstania dużej ilości trombiny, biorącej udział w przekształceniu fibrynogenu w fibrynę. Ostatnim etapem jest stabilizacja sieci fibryny przy udziale czynnika XIII układu krzepnięcia krwi. Nadmiernemu tworzeniu się czopu fibrynowego zapobiegają inhibitory krzepnięcia – antytrombina, układ inhibitorowy białka C, inhibitor zewnętrznego szlaku

WSTĘP

krzepnięcia (TFPI; ang. *tissue factor pathway inhibitor*) oraz składowe układu fibrynolitycznego – plazminogen, aktywatory przekształcające plazminogen w plazminę, inhibitory plazminy i jej aktywatorów²⁰.

1.4 Trombofilia

Mianem trombofilii określamy wrodzoną (pierwotną) lub nabytą (wtórną) tendencję do stanu nadkrzepliwości krwi, mogącą skutkować zakrzepicą żylną lub rzadziej tętniczą²². Do udokumentowanych czynników wrodzonej trombofilii należą – wariant c.1601G>A w genie *F5* (czynnik V Leiden), wariant c.97*G>A (g.20210G>A) genu protrombiny (*F2*), niedobór białek C, S i antytrombiny, dysfibrynogenemia oraz hiperhomocysteinemia, a częstość ich występowania jest zróżnicowana geograficznie i etnicznie. Do prawdopodobnych czynników wrodzonej trombofilii zalicza się podwyższone stężenia lipoproteiny a, trombomoduliny, czynników układu krzepnięcia krwi VII, VIII, IX, XI oraz obniżone stężenia czynnika XII, PAI, t-PA czy plazminogenu²²⁻²⁹. Czynnikiem nabytej trombofilii jest przede wszystkim zespół antyfosfolipidowy³⁰.

Biorąc pod uwagę stopień ryzyka rozwoju żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej (ŻChZZ), przedstawione czynniki nadkrzepliwości krwi zostały podzielone na dwie grupy: małego i dużego ryzyka (Tabela nr 1).

Tabela 1 Klasyfikacja trombofilii ze względu na stopień ryzyka zakrzepowego³¹

Czynniki trombofilii	
Małego ryzyka	Dużego ryzyka
1. heterozygotyczne postacie czynnika V Leiden c.1601G>A w <i>F5</i> i c.97*G>A w <i>F2</i>	1. homozygotyczne postacie czynnika V Leiden c.1601G>A w <i>F5</i> i c.97*G>A w <i>F2</i>
2. niedobór białka C	2. współistnienie heterozygotycznych wariantów czynnika V Leiden c.1601G>A w <i>F5</i> i c.97*G>A w <i>F2</i>
3. niedobór białka S	3. niedobór antytrombiny
	4. zespół antyfosfolipidowy

1.4.1 Wrodzone czynniki trombofilii

Czynnik V Leiden

Wariant c.1601G>A (p.Arg534Gln) genu czynnika V układu krzepnięcia krwi, znany także jako czynnik V Leiden (FVL) lub błędnie jako mutacja V Leiden, jest

najczęściej diagnozowaną przyczyną wrodzonej trombofilii wśród rasy kaukaskiej, a jego obecność jest stwierdzana u 20-40% chorych na ŻChZZ. Obecność FVL powoduje wzrost prokoagulacyjnych właściwości osocza i zwiększa ryzyko zakrzepowo-zatorowe – w wariantcie heterozygotycznym 3-8 krotnie, natomiast w homozygotycznym 50-80 krotnie^{27,32}. W populacji europejskiej, w układzie heterozygotycznym, wariant występuje z częstością 5-15%, najrzadziej w populacji baskijskiej, najczęściej w greckiej. Należy zauważyć, że FVL identyfikowany jest niezmiernie rzadko wśród natywnej ludności Ameryki Północnej i Południowej, Oceanii oraz wśród Azjatów, Inuitów czy Afrykańczyków. Utrwalenie się wariantu wśród ludności populacji europejskiej jest tłumaczone zjawiskiem dryfu genetycznego, a dokładniej efektu założyciela. Sam wariant zapewniał ochronę przed nadmierną utratą krwi w trakcie porodów czy urazów^{33,34}. Tranzycja guaniny na adeninę w pozycji 1601 sekwencji kodującej *F5* skutkuje zamianą argininy na glutaminę w pozycji 534 powstającego białka. Ponieważ w obrębie czynnika V układu krzepnięcia krwi istnieją trzy miejsca hydrolitycznego cięcia przez aktywowane białko C (APC; ang. *activated protein C*) – Arg306, Arg534, Arg707, brak argininy w pozycji 534 upośledza działanie APC, skutkując opornością czynnika Va układu krzepnięcia krwi na aktywowane białko C (APCR, ang. *activated protein C resistance*). Szacuje się, że FVL odpowiada za nawet 95% APCR.

Wariant c.97*G>A (g.20210G>A) czynnika II układu krzepnięcia krwi

Kolejnym znanym czynnikiem wrodzonej trombofilii jest wariant c.97*G>A, zwyczajowo opisywany jako g.20210G>A, czynnika II układu krzepnięcia (*F2*), tj. protrombiny. Protrombina jest proenzymem będącym prekursorem trombiny. Przekształcenie protrombiny w trombinę odbywa się w wyniku działania kompleksu protrombinazy i jest niezbędnym etapem przemiany fibrynogenu w fibrynę. Wariant c.97*G>A powoduje wzmożoną ekspresję *F2* i wyższą wydajność translacji, prowadzącą do 20% wzrostu stężenia protrombiny we krwi, aktywuje kaskadę krzepnięcia i skutkuje tendencją do tworzenia się zakrzepów^{28,35}. Według danych statystycznych, w populacji europejskiej wariant występuje z częstością 2%, a wśród osób z przebyłym epizodem zakrzepicy z częstością 16%. Współistnienie wariantu g.20210G>A wraz z FVL ma działanie synergistyczne i wzmacnia tendencję do nadkrzepliwości krwi³⁶.

Niedobór białka C

Rzadszymi czynnikami wrodzonej trombofilii są: niedobór białka S, białka C i antytrombiny, dysfibrynogenemie oraz hiperhomocysteinemia^{37,38}. Białko C (PC, ang.

WSTĘP

protein C) jest zależnym od witaminy K naturalnym antykoagulantem, produkowanym w formie nieaktywnej głównie przez komórki wątroby^{39,40}. PC wiąże się ze swoistym receptorem na powierzchni śródbłonka naczyniowego (EPCR, ang. *endothelial protein C receptor*), natomiast jego aktywacja zachodzi pod wpływem działania kompleksu trombina-trombomodulina⁴¹. Miejscami działania PC są: argininy w pozycjach 306, 534 i 707 czynnika Va układu krzepnięcia krwi oraz argininy w pozycjach 336 i 562 czynnika VIIIa. Niedobór PC może być uwarunkowany zaburzeniem jego struktury lub produkcji. Znane są trzy typy niedoboru PC: I, IIa i IIb, z których I-szy występuje najczęściej. Typ I jest fenotypowo heterogenny i przebiega z obniżeniem aktywności PC, w testach funkcjonalnych i immunologicznych, do około 50%. W typie II obserwuje się prawidłowe stężenie PC z obniżoną aktywnością antykoagulacyjną. Do objawów niedoboru PC zalicza się m.in.: zakrzepicę żył głębokich i powierzchniowych czy martwicę skóry na skutek podania kumarynowych antykoagulantów^{24,42-44}. Do obniżenia aktywności PC dochodzi również w przebiegu plamicy piorunującej np. w trakcie sepsy wywołanej zakażeniem *Neisseria meningitidis* lub *Streptococcus pneumoniae*^{45,46}. U podłoża deficytu białka C może leżeć jeden z 270 wariantów genetycznych, opisanych w genie *PROC*⁴⁷⁻⁴⁹. Zaburzenie wymaga różnicowania ze stanami nabytymi, spowodowanymi m.in. niedoborem witaminy K, leczeniem doustnymi antykoagulantami, chorobami wątroby, zespołem DIC czy antykoncepcją hormonalną³¹.

Niedobór białka S

Białko S (PS; ang. *protein S*) jest również zależnym od witaminy K naturalnym antykoagulantem. W krwioobiegu występuje w formie związanej (60%) z białkiem układu dopełniacza C4bBP oraz w formie wolnej (40%)^{24,50,51}. Tylko postać wolna PS pełni rolę kofaktora reakcji przekształcenia nieaktywnego PC w APC, a jej niedobór zaburza działanie APC, co powoduje zwiększone wytwarzanie trombiny. Za niedobór PS odpowiada heterogenna grupa wariantów w genie *PROS1*, niestety ze względu na obecność pseudogenu *PROS1*, diagnostyka molekularna defektu jest utrudniona⁵². Bertina w 1990 przedstawił klasyfikację niedoboru PS, dzieląc go na trzy typy: I-III⁵³. W typie I obserwuje się ilościowy niedobór wolnego i całkowitego PS oraz zmniejszoną aktywność PS, w typie II - prawidłowe stężenia wolnego i całkowitego PS, przy zmniejszonej aktywności PS, w typie III - obniżone stężenie wolnego PS oraz obniżoną aktywność PS przy prawidłowym stężeniu całkowitego PS.

Niedobór antytrombiny

Wrodzony niedobór antytrombiny (AT) był pierwszym zidentyfikowanym czynnikiem wrodzonej trombofilii²³. AT należy do serpin i jest syntetyzowana przez hepatocyty w postaci prekursora zbudowanego z 364 aminokwasów, z czego 32 stanowią peptyd sygnałowy⁵⁴. Działanie AT polega na bezpośrednim hamowaniu formowania się trombiny i pośrednim blokowaniu kaskady krzepnięcia krwi⁵⁵. Niedobór AT został podzielony na dwa typy, typ I obejmuje defekt ilościowy, typ II – jakościowy. W typie I, zwanym także klasycznym, obserwuje się obniżone stężenie AT, obniżoną aktywność AT oraz prawidłową zdolność wiązania heparyny⁵⁶. Homozygotyczny niedobór AT typu I u człowieka i genetycznie zmodyfikowanych myszy jest letalny. Typ II dzielimy na podtyp IIa, IIb i IIc. Podtyp IIa cechuje się prawidłowym stężeniem AT, obniżoną aktywnością AT oraz obniżoną zdolnością wiązania heparyny na skutek defektu regionu aktywnego oraz defektu regionu wiążącego heparynę. Podtyp IIb charakteryzuje się defektem regionu aktywnego, a podtyp IIc – defektem regionu wiążącego heparynę⁵⁴. Defekty strukturalne bądź funkcjonalne, upośledzające działanie AT, prowadzą do stanu nadkrzepliwości krwi, co wynika z funkcji antytrombiny, jako inhibitora aktywnych czynników krzepnięcia, biorących udział w wytworzeniu stabilnego czopu hemostatycznego. Według danych populacyjnych, przedstawionych przez Perry'ego i Carrella, częstość z którą niedobór AT jest stwierdzany w populacji ogólnej wynosi 1:630, a wśród pacjentów z przebyłym epizodem zakrzepicy 3-5%⁵⁷.

Dysfibrynogenemie

Fibrynogen występuje w osoczu w formie heksamery, zbudowanego z trzech par łańcuchów ($A\alpha$, $B\beta$, γ)₂. Litery A i B oznaczają fibrynopeptydy, znajdujące się na końcach łańcuchów α oraz β , odszczepiane w procesie przekształcania fibrynogenu w fibrynę. Każdy łańcuch jest kodowany przez inny gen, *FGA*, *FGB* oraz *FGG*, które razem obejmują region 50 kb w chromosomie 4 (4q31). Konwersja fibrynogenu w fibrynę jest ostatnim etapem kaskady krzepnięcia krwi, zainicjowanym poprzez odszczepienie dwóch par fibrynopeptydów. W kolejnym etapie tworzą się monomery fibryny, stabilizowane następnie przez aktywowany czynnik XIIIa. W zależności od warunków, w których powstaje sieć fibrynowa, obserwuje się różnice we właściwościach żelu fibrynowego takich jak: grubość włókien, wielkość porów, gęstość wiązań krzyżowych czy sztywność. Fibrynoliza zachodzi przy udziale plazminy, przekształconej z plazminogenu pod wpływem działania t-PA. Plazmina przecina włókna fibrynowe w określonych miejscach,

WSTĘP

ponieważ jest ich mniej we włóknach grubych, proces fibrylizacji przebiega zatem szybciej. Badania z wykorzystaniem rekombinowanego fibrynogenu potwierdziły, że szybkość i efektywność fibrylizacji jest zależna od grubości włókna. Dodatkowo zostało udowodnione, że grube pory w żelu fibrynowym ułatwiają dyfundowanie różnych cząsteczek do wnętrza żelu, ułatwiając jego fibrylizację^{58,59}. Defekty związane z fibrynogenem mogą obejmować zarówno afibrynogenezę, hipofibrynogenezę oraz dysfibrynogenezę. Dysfibrynogenezę charakteryzują się prawidłowym stężeniem fibrynogenu przy zmniejszonym stężeniu funkcjonalnego fibrynogenu, podczas gdy hipofibrynogenezę – obniżonymi stężeniami zarówno funkcjonalnego jak i immunoreaktywnego fibrynogenu^{60,61}. Dysfibrynogenezę uwarunkowane są najczęściej defektami w obrębie C-końcowego fragmentu łańcucha γ fibrynogenu, np. w fibrynogenach Tokyo, Chapel Hill, Marburg czy Kraków. W regionie promotora genu łańcucha β fibrynogenu (*FGB*) może występować kilka SNVs, które wpływają na poziom syntezy fibrynogenu, jednym z nich jest c.-463G>A, powszechnie znany jako -455G>A oraz c.-156C>T, znany jako -148C>T. Nosiciele alleli -463A i -156T prezentują wyższe stężenie fibrynogenu w porównaniu z nosicielami alleli dzikich -463G i -156C i wykazują tendencję do wystąpienia zakrzepicy tętniczej⁶²⁻⁶⁴. Dwa kolejne SNVs – rs1800791 w 5'UTR *FGB* (c.-854G>A), skutkujący wzmożoną ekspresją fibrynogenu oraz rs4220 w eksonie 8 genu *FGB* c.1433G>A (p.Arg478Lys) – są powiązane z wyższym ryzykiem zakrzepicy tętniczej.

Hiperhomocysteinemia

Homocysteina (Hcy), będąca homologiem cysteiny, jest aminokwasem egzogennym, powstającym w szlaku przemian metioniny. Przyczyną hiperhomocysteinemii mogą być warianty patogenne lub polimorficzne w obrębie genów kodujących enzymy zaangażowane w cykl przemian homocysteiny, zaburzenia metabolizmu Hcy, nadmierna podaż białka zawierającego metioninę, niedobór witamin B₁₂ i B₆, nadużywanie alkoholu, spożywanie dużej ilości kawy, czynniki demograficzne, a także niektóre leki czy choroby⁶⁵. Hiperhomocysteinemia może skutkować chorobą niedokrwinną serca, wadą cewy nerwowej, zawałem lub oddzieleniem łożyska, zahamowaniem rozwoju płodu lub wewnątrzmaciczną śmiercią płodu⁶⁶, jest także czynnikiem ryzyka zarówno zakrzepicy żyłnej, jak i tętniczej^{143,144}. Działanie prokoagulacyjne podwyższonych stężeń Hcy wynika z aktywacji czynników krzepnięcia V i VII, wzrostu nasilenia procesu tworzenia trombiny, zmniejszenia zdolności wiązania

AT na powierzchni śródbłonna, wzrostu agregacji i adhezji płytek, stymulacji prokoagulacyjnego działania TF oraz zmniejszenia działania inhibitora zewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia (TFPI; ang. *tissue factor pathway inhibitor*), przede wszystkim wobec czynnika X.

Enzymem pełniącym kluczową rolę w metabolizmie Hcy jest reduktaza metylenotetrahydrofolianowa, a dwa najczęściej badane warianty w genie reduktazy metylotetrahydrofolianowej, *MTHFR* – c.665C>T (p.Ala222Val; rs1801133) oraz c.1286A>C (p.Glu429Ala; rs1801131) zwiększają stężenie Hcy we krwi^{67,68}. Oba SNVs były przez lata uważane za czynniki ryzyka incydentów zakrzepowo-zatorowych. Ponieważ różne badania populacyjne przeprowadzone do tej pory dają sprzeczne wyniki, klasyfikacja obu wariantów w świetle obecnej wiedzy jest kłopotliwa⁶⁹.

Lipoproteina a

Lipoproteina a, Lp(a), jest modyfikowaną cząsteczką LDL, w której apoB₁₀₀ jest opłaszczane cząsteczkami apo(a). Apo(a) ma właściwości anty-fibrynolityczne, które wynikają ze zbliżonej do plazminogenu budowy i konkurencji między apo(a) i plazminogenem^{70,71}. Fizjologiczna rola Lp(a) jest wciąż niepoznana; na dzień dzisiejszy wiadomo, że bierze ona udział w procesach gojenia się ran, stymulacji monocytów, czy zmianach angiogenezy. Lp(a) jest również podatna na modyfikacje oksydacyjne, prowadzące do tworzenia się m.in. prozapalnych utlenionych fosfolipidów, oksysteroli oraz tlenowo specyficznych epitopów (OSEs, ang. *oxidation specific epitopes*). Podwyższone stężenie Lp(a) jest niezależnym czynnikiem ryzyka choroby sercowo-naczyniowej i choroby tętnic obwodowych, a jego udział został także powiązany z zawałem serca czy zakrzepami żylnymi.

Czynnik VII układu krzepnięcia krwi

Czynnik VII układu krzepnięcia krwi (FVII, ang. *factor VII*) wraz z czynnikami: II, IX i X układu krzepnięcia krwi należy do czynników zespołu protrombiny^{72,73}. Badania z wykorzystaniem modelu mysiego wykazały, że FVII jest niezbędny w procesie embriogenezy, a jego homozygotyczny niedobór jest letalny⁷⁴.

Czynnik VIII układu krzepnięcia krwi

Podwyższona aktywność i/lub stężenie czynnika VIII układu krzepnięcia krwi (FVIII; ang. *factor VIII*) jest znanym czynnikiem ryzyka zakrzepicy żył głębokich. FVIII jest białkiem należącym do β_2 -globulin, kodowanym przez gen znajdujący się w ramieniu długim chromosomu X⁷⁵⁻⁷⁷. Synteza FVIII odbywa się głównie przez hepatocyty, ale także

WSTĘP

przez śledzionę i węzły chłonne⁷⁸. FVIII aż w 95% krąży we krwi w kompleksie z czynnikiem von Willebranda, co jest ochroną dla FVIII przed aktywacją przez Xa i PC, a aktywacja FVIII odbywa się przez samoistną dysocjację i proteolizę wiązań Arg336 oraz Arg562⁷⁹⁻⁸¹. Badania przeprowadzone przez Kostera i wsp. wykazały, że aktywność FVIII > 150 j./dl wiąże się z 4,8 razy większym względnym ryzykiem zakrzepicy żyłnej⁸².

Czynnik XII układu krzepnięcia krwi

Czynnik XII układu krzepnięcia krwi (FXII; ang. *factor XII*) bierze udział w wewnątrzpochodnej kaskadzie krzepnięcia oraz w aktywacji fibrynolizy i jest zbudowany z dwóch łańcuchów – ciężkiego i lekkiego, połączonych ze sobą mostkiem disarczkowym^{83,84}. Jego aktywna forma (FXIIa) jest niezbędna w procesie aktywacji prekalikreiny i czynnika XI układu krzepnięcia krwi, a także w procesie cięcia fibryny poprzez konwersję plazminogenu w fibrynę i inicjację fibrynolizy. XIIa może także pobudzać wytwarzanie różnych mediatorów odpowiedzi immunologicznej. Niedobór FXII może skutkować wydłużonym czasem krzepnięcia, nie wywołuje jednak skaz krwotocznych; co interesujące, może nawet objawiać się tendencją do tworzenia zakrzepów^{85,86}. Jednym z polimorfizmów w obrębie genu *F12* jest wariant c.-4C>T. Wykazano, że u osób z transzycją cytozyny na tyminę w wariantcie homozygotycznym -4TT obserwuje się niższy poziom FXII w porównaniu do osób z wariantem heterozygotycznym -4CT lub dzikim -4CC. Obserwacje wykazały, że niższe stężenie FXII może predysponować do wystąpienia incydentu zakrzepowo-zatorowego^{87,88}.

Czynnik XIII układu krzepnięcia krwi

Czynnik XIII układu krzepnięcia krwi (FXIII; ang. *factor XIII*) jest zaangażowany w ostatni etap kaskady krzepnięcia i jako jedyny z czynników układu krzepnięcia krwi należy do grupy enzymów transglutaminaz. Rola czynnika XIII układu krzepnięcia krwi polega na wstawianiu wiązań kowalencyjnych w obrębie struktury fibryny. W pierwszym etapie powstają dimery γ - γ poprzez utworzenie wiązania krzyżowego γ -glutamyl- ϵ -lizynowego pomiędzy resztą Lys406 jednego łańcucha γ a resztą Glu398 lub Glu399 innego łańcucha γ fibryny. W drugim etapie na skutek sieciowania łańcuchów α , powstają oligomery i polimery łańcucha α . Końcowym produktem sieciowania fibryny przez czynnik XIII mogą być także heterodimery α - γ oraz trimery lub tetramery łańcuchów γ ⁸⁹. Znane są dwie formy czynnika XIII: osoczowa i komórkowa. Osoczowy czynnik XIII zbudowany jest z dwóch katalitycznych podjednostek A, które są białkami globularnymi o aktywności transglutaminazy i dwóch regulatorowych podjednostek B, które otaczają

podjednostkę A i są białkami transportującymi. W obrębie podjednostki A zidentyfikowano do tej pory siedem polimorfizmów, w tym najlepiej poznany p.Val34Leu, który po raz pierwszy został opisany w 1994 roku przez Mikkolę i wsp.⁹⁰. Polimorfizm znajduje się w obrębie peptydu aktywacyjnego i pod względem częstości występowania wykazuje znaczące zróżnicowanie etniczne. Ponieważ miejsce substytucji waliny w leucynę znajduje się w odległości trzech aminokwasów od miejsca proteolitycznego cięcia przez trombinę, polimorfizm ten wpływa na szybsze sieciowanie fibryny oraz na jej strukturę⁸⁹. W obecności wysokiego stężenia fibrynogenu i homozygotycznego wariantu Leu34, powstająca fibryna cechuje się luźniej upakowaną strukturą, grubszymi włóknami i podwyższoną przepuszczalnością. Odwrotnie dzieje się przy niskich stężeniach fibrynogenu, struktura jest bardziej upakowana, ma mniejszą średnicę włókien i mniejszą przepuszczalność. W tym miejscu nasuwa się bardzo istotny wniosek, że na efekt patofizjologiczny polimorfizmu, modulujący wpływ ma stężenia fibrynogenu⁹¹. Ocenia się, że obecność Leu34 skutkuje 2,5 razy szybszą aktywacją czynnika XIII, co przebiega niezależnie od poziomu fibrynogenu⁹². Warunkiem jest jednak niskie stężenie trombiny, ponieważ w wysokich stężeniach aktywacja w odniesieniu do obu genotypów przebiega z tą samą szybkością⁹³. Badania oceniające wpływ polimorfizmu w chorobach związanych z zaburzeniem hemostazy i zaleganiem zakrzepów w naczyniach krwionośnych, również dają sprzeczne wnioski, według jednych zmniejsza on ryzyko występowania zakrzepicy żyłnej, podczas gdy inni badacze nie potwierdzają tych danych^{94,95}.

Glikoproteina IIIa

Glikoproteina IIIa (GP IIIa) jest jednym z dwóch składowych płytkowego kompleksu integryn GP IIb-IIIa. Podjednostka alfa kompleksu GP IIb-IIIa jest kodowana przez *ITGA2B*, natomiast podjednostka beta przez *ITGB3*^{96,97}. Kompleks GP IIb-IIIa, działa jako represor fibrynogenu i reguluje agregację płytek krwi, będącą końcowym etapem tworzenia się płytkowego czopu hemostatycznego⁹⁸. Obecność GP IIb-IIIa warunkuje prawidłową funkcjonalność płytek krwi, co potwierdzają badania nad trombastenią Glanzmanna – szką krwotoczną, w której ciężkiej odmianie, płytki nie zawierają funkcjonalnych GP IIb-IIIa. W konsekwencji płytki nie agregują i nie wiążą fibrynogenu⁹⁹.

1.4.2 Nabyte czynniki trombofilii

Zespół antyfosfolipidowy

Zespół antyfosfolipidowy (APS; ang. *antiphospholipid syndrome*) jest chorobą o podłożu autoimmunologicznym, w której przebiegu występują autoprzeciwciała skierowane przeciwko fosfolipidom lub białkom związanym z fosfolipidami. W wyniku tej reakcji dochodzi do ekspresji czynnika tkankowego w komórkach śródbłonna naczyń oraz w monocytach, agregacji płytek krwi oraz zmniejszenia aktywności białek C i S, stąd głównym powikłaniem APS jest zakrzepica żylna bądź tętnicza. APS jest stwierdzany u kobiet 4-5 razy częściej niż u mężczyzn, podobnie jak ma to miejsce w przypadku innych chorób o podłożu autoimmunologicznym¹⁰⁰. Obowiązujące kryteria diagnostyczne pozwalają rozpoznać APS, gdy występuje jedno z kryteriów klinicznych i jedno kryterium laboratoryjne APS (Tabela nr 2)¹⁰¹.

Tabela 2 Kryteria klasyfikacyjne zespołu antyfosfolipidowego

Kryteria kliniczne APS	Kryteria laboratoryjne APS
<ul style="list-style-type: none"> • Zakrzepica tętnicza lub żylna lub małych naczyń • Określone powikłania ciążowe 	<ul style="list-style-type: none"> • Przeciwciała antykardiolipinowe IgG/IgM • Przeciwciała przeciwko β_2-glikoproteinie I (IgG/ IgM) • Antykoagulant toczniowy (LA)

Do określonych powikłań położniczych zaliczane są następujące sytuacje: co najmniej jeden przypadek niewyjaśnionego obumarcia morfologicznie prawidłowego płodu nie wcześniej niż w 10 tygodniu ciąży lub co najmniej jeden przypadek przedwczesnego porodu zdrowego dziecka na skutek stanu przedrzucawkowego bądź rzucawki lub co najmniej trzy następujące po sobie samoistne poronienia o niewyjaśnionej etiologii przed 10 tyg. ciąży, po wykluczeniu wad anatomicznych u matki oraz zaburzeń hormonalnych u obojga rodziców¹⁰¹. APS u nieleczonych ciężarnych kobiet skutkuje tylko 20% odsetkiem żywo urodzonych dzieci, jednak sama terapia APS ciężarnych wiąże się z ryzykiem krwawień na skutek stosowanych leków przeciwzakrzepowych¹⁰². Kryteriami laboratoryjnymi są: antykoagulant toczniowy stwierdzony w osoczu przynajmniej dwukrotnie w odstępie przynajmniej 12 tygodni. Wynik interpretuje się jako czynnik obecny lub nieobecny, lub przeciwciała antykardiolipinowe w klasie IgG lub IgM,

stwierdzone w surowicy, lub osoczu w mianie przekraczającym 40 GPL lub MPL, bądź powyżej 99 percentyla, oznaczone przynajmniej dwukrotnie w odstępie przynajmniej 12 tygodni, lub przeciwciała przeciw β 2 -glikoproteinie I w klasie IgG albo IgM stwierdzone przynajmniej dwukrotnie w odstępie przynajmniej 12 tygodni¹⁰¹.

2 Założenia i cele pracy

Celem niniejszej pracy była weryfikacja hipotezy o prawdopodobnym udziale incydentu zakrzepowo-zatorowego w naczyniu płodowym kończyny w okresie prenatalnym, który mógłby skutkować wystąpieniem jednostronnej wady zmniejszającej kończyny (WZK). Szczegółowe cele niniejszych badań były następujące:

- I. Sprawdzenie czy wśród pacjentów z jednostronnymi WZK i/ lub ich matek, czynniki ryzyka wrodzonej i nabytej zakrzepicy występują istotnie częściej niż w populacji ogólnej (grupie kontrolnej).
- II. Wyselekcjonowanie pojedynczych biochemicznych i genetycznych czynników ryzyka zakrzepicy, predysponujących do wystąpienia WZK, a w dalszej kolejności – wyłonienie czynników ryzyka, które mogłyby tworzyć swego rodzaju „próg” kilku czynników (skojarzonych u jednego pacjenta lub pary pacjent – matka), powyżej którego ryzyko wystąpienia WZK jest szczególnie wysokie.

3 Materiał i metody

Na przeprowadzenie wszystkich badań przedstawionych w niniejszej pracy uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu nr 889/11 (Załącznik nr 10.1). Badaniami zostały objęte następujące grupy: grupa pacjentów, którą stanowiły osoby ze sporadycznym wystąpieniem jednostronnej zmniejszającej wady kończyny (WZK), grupa ich matek oraz grupy kontrolne, którą stanowiły zdrowe dzieci bez WZK i zdrowe kobiety, dobrane losowo pod względem wieku w momencie przeprowadzenia badania. Źródłem pacjentów był Polski Rejestr Wrodzonych Wad Rozwojowych (PRWWR), działający przy Katedrze i Zakładzie Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Wszystkie osoby, którzy wzięły udział w projekcie wyraziły świadomą zgodę na pobranie materiału biologicznego oraz przeprowadzenie molekularnych badań genetycznych, badań biochemicznych i koagulologicznych. W przypadku pacjentów niepełnoletnich, zgodę wyrazili ich rodzice lub opiekunowie prawni. Wzory formularza świadomej zgody pacjenta na wykonanie molekularnych badań genetycznych oraz badań biochemicznych i koagulologicznych stanowią odpowiednio Załączniki nr 10.2 oraz 10.3).

Badania wykonano w Pracowni Hemostazy Centrum Diagnostyczno-Leczniczego w Poznaniu przy ul. 28 Czerwca 1956 r. nr 161, Pracowni Badań Rutynowych Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej i Mikrobiologicznej Szpitala Wojewódzkiego w Poznaniu przy ul. Juraszów 7-19 oraz w Katedrze i Zakładzie Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Zastosowano metody rekomendowane przez Brytyjski Komitet ds. Standaryzacji w Hematologii (BCSH, ang. *British Committee for Standards in Haematology*) oraz Komitet Naukowy oraz ds. Standaryzacji Międzynarodowego Towarzystwa Zakrzepicy i Hemostazy (SSC/ ISTH, ang. *Scientific and Standardization Committee of International Society on Thrombosis and Hemostasis*). Corocznie uzyskiwane certyfikaty zewnętrznej kontroli jakości badań układu hemostazy ECAT (ang. *External Quality Control of Diagnostic Assays and Tests*), nadawane zgodnie z normą ISO/ IEC 17043:2010, potwierdzają wiarygodność oznaczeń wykonywanych w Pracowni Hemostazy.

3.1 Charakterystyka grupy badanej

Grupę badaną stanowiło 137 pacjentów ze sporadyczną (nierodzinną), jednostronną wadą zmniejszającą kończyny oraz ich matki. W jednym przypadku nie udało się pobrać materiału od dziecka z WZK, a w trzech pobranie materiału biologicznego od matki

MATERIAŁ I METODY

pacjentów z WZK okazało się niemożliwe. Podsumowując, zebrano 134 kompletne pary pacjent z WZK-matka. Każda osoba po wyrażeniu zgody na wzięcie udziału w projekcie została zaproszona na wizytę u lekarza specjalisty genetyki klinicznej, dra hab. n. med. Aleksandra Jamsheera, Prof. UM, który specjalizuje się w zakresie diagnostyki klinicznej i molekularnej wrodzonych wad układu kostnego. W trakcie konsultacji została przeprowadzona ocena kliniczna pacjentów wraz z określeniem dokładnej lokalizacji jednostronnej wady zmniejszającej kończyny (Tabela nr 14), a z matkami pacjentów przeprowadzony został wywiad położniczy, dotyczący liczby ciąż, ich przebiegu, liczby porodów, przebytych w czasie ciąży infekcji i ewentualnej farmakoterapii w okresie trwania ciąży. Zebrano też informacje na temat występowania niepowodzeń rozrodu i chorób przewlekłych u matek oraz wywiad rodzinny, uwzględniający przede wszystkim wystąpienie przypadków zatorowości płucnej lub zakrzepicy żyłnej. Dodatkowo, jeżeli pacjent z WZK lub jego matka posiadali wynik oznaczenia liczby płytek krwi, uzupełniano wynik w kwestionariuszu. Wzór ankiety klinicznej stanowi Załącznik nr 10.4. Kryteriami włączenia do badań było sporadyczne i jednostronne występowanie wady zmniejszającej kończyny oraz brak danych przemawiających za środowiskowym uwarunkowaniem wady.



Ryc. 2 Przykładowe zdjęcia pacjentów z izolowanymi wadami zmniejszającymi kończyny. Pacjent z poważną wadą ubytkową znacznej części kończyny górnej lewej (zdjęcie po lewej). Pacjent ze zdiagnozowaną klinicznie sekwencją Polanda (zdjęcie po prawej).

3.2 Charakterystyka grupy kontrolnej

Grupę kontrolną stanowiło 168 zdrowych kobiet oraz 178 zdrowych dzieci, które dobrano pod względem wieku w momencie pobierania materiału biologicznego

i wykonywania badań. Grupy kontrolne dobierano tak, aby średni wiek matek oraz zdrowych dzieci był jak najbardziej zbliżony do grupy badanej. Z grupą zdrowych kobiet został przeprowadzony wywiad położniczy w zakresie liczby ciąż, ich przebiegu, liczby porodów, przebytych w ciąży infekcji i ewentualnie przyjmowania leków w okresie ciąży. Zebrano też informacje na temat niepowodzeń rozrodu, występowania chorób przewlekłych i wywiad rodzinny, uwzględniający występowanie przypadków zatorowości płucnej lub zakrzepicy żylniej. Jeżeli kobieta posiadała wynik oznaczenia liczby płytek krwi, uzupełniono wynik w kwestionariuszu. Wzór ankiety klinicznej kontroli stanowi załącznik nr 10.5.

3.3 Materiał biologiczny

Materiał biologiczny do badań stanowiły: osocze ubogopłytkowe, osocze ubogopłytkowe przeznaczone do oznaczania antykoagulantu toczeniowego, surowica oraz DNA, uzyskane w opisany poniżej sposób.

Osocze ubogopłytkowe

Krew pobierano z żyły łokciowej do próbki zawierającej buforowany roztwór cytrynianu dwusodowego o stężeniu 3,2%, w stosunku 9:1 (9 części krwi na 1 część cytrynianu). Próbkę dostarczano do laboratorium w czasie krótszym niż 1 godzina od pobrania (w tym czasie materiał przechowywano w temperaturze 18-21°C), następnie próbkę odwirowywano (2000 g, 10 min., 20°C), uzyskując osocze ubogopłytkowe.

Osocze ubogopłytkowe przeznaczone do oznaczenia antykoagulantu toczeniowego

W celu wykluczenia fałszywie ujemnych wyników testów zależnych od fosfolipidów np. na obecność antykoagulantu toczeniowego, uzyskaną próbkę osocza ubogopłytkowego ponownie wirowano (2500 g, 10 min., 20°C - zgodnie z zaleceniami SSC/ISTH). W ten sposób pozbywano się resztkowej zawartości płytek krwi obecnych w próbce po pierwszym wirowaniu.

Surowica

Krew pobierano w sposób zgodny z zaleceniami producenta zestawów pobraniowych, z żyły łokciowej, do próbki zawierającej aktywator krzepnięcia, a następnie pozostawiano na 20 minut w temperaturze pokojowej celem wytworzenia się

MATERIAŁ I METODY

skrzepu. Po upłygnięciu tego czasu próbkę odwirowywano (2000 g, 15 min., 20°C), uzyskując surowicę.

DNA

DNA pozyskiwano z limfocytów krwi obwodowej pobranej do próbki S-Monovette, zawierającej kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA; ang. *ethylene diamine tetraacetic acid*). W początkowym okresie projektu izolacja DNA odbywała się z wykorzystaniem manualnej metody wysalania białek (Załącznik 10.5), a następnie przy pomocy aparatu MagCore[®] HF16 Plus (*RBCBioscience*) i kitów przeznaczonych do izolacji DNA z dużych objętości krwi (Cartridge Code 104), zgodnie z zaleceniami producenta. W przypadku kontroli dzieci stosowano także kit do izolacji DNA ze śliny Oragene DNA OG-500 (*DNA Genotek*) oraz kity do izolacji DNA z wymazu z policzka Oracollect DNA (*DNA Genotek*) i Swab (*A&A Biotechnology*), zgodnie z zaleceniami producenta.

3.4 Oznaczenia koagulologiczne

3.4.1 Metodyka oznaczenia aktywności białka C

Oznaczenie aktywności białka C metodą chromogenną wykonywano przy użyciu zestawu *Chrom Z Protein C* firmy *Helena BioSciences Europe* (Wielka Brytania).

- a) Zasada metody: białko C zawarte w badanym osoczu jest aktywowane pod wpływem specyficznej frakcji jadu węża – Mokusyna miedziogłowca (łac. *Agkistrodon contortrix*), zawartej w stosowanym odczynniku. Przy współdziałaniu aktywnego białka C dochodzi do hydrolizy substratu wprowadzanego do mieszaniny reakcyjnej w drugim etapie. Produktem tej reakcji jest paranitroanilina (pNA), nadająca próbce żółte zabarwienie. Natężenie barwy badanej, mierzone spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 405$ nm, jest wprost proporcjonalne do aktywności białka C w badanym osoczu.
- b) Materiał do badań: osocze ubogopłytkowe.
- c) Metodyka oznaczenia: przed przystąpieniem do właściwego oznaczenia przygotowywano bufor do rozcieńczania próbek/ osocza wzorcowego/ kontrolnego: do 5 ml 0,9% NaCl dodawano 300 μ l wody dejonizowanej i mieszano. W kolejnym etapie dokonywano seryjnego rozcieńczenia osocza kalibracyjnego, o znanej aktywności białka C, w celu uzyskania krzywej wzorcowej. Do 4 probówek polipropylenowych dodawano kolejno: 300 μ l, 350 μ l, 375 μ l, 400 μ l

przygotowanego buforu, a następnie do 3 pierwszych dodawano kolejno 100 μ l, 50 μ l, 25 μ l osocza kalibracyjnego, a czwartą próbkę pozostawiono z pierwotną zawartością. W ten sposób uzyskiwano rozcieńczenia osocza wzorcowego, w których aktywność białka C wynosiła: 100%, 50%, 25%, 0%. W kolejnym etapie rozcieńczano osocze badane i kontrolne w przygotowanym buforze: do 400 μ l buforu dodawano 100 μ l osocza badanego lub kontrolnego. Przed rozpoczęciem oznaczenia ogrzewano aktywator białka C oraz substrat chromogeny (37°C, 10 min.). Oznaczenie aktywności białka C wykonywano w seriach, w próbkach polipropylenowych umieszczonych w bloku grzejmym (37°C). Jednocześnie oznaczano 10 próbek: 4 próbki odpowiadające seryjnym rozcieńczeniom krzywej wzorcowej, 2 próbki odpowiadające oznaczeniom w osoczu kontrolnym oraz 4 próbki badanego osocza. W czasie $t=0$ przenoszono 50 μ l rozcieńczonej próbki osocza do próbki polipropylenowej i inkubowano 2 min., następnie dodawano 100 μ l aktywatora, a po upływie 5 min. – 100 μ l substratu chromogenego. Mieszaninę inkubowano 10 min., a następnie zatrzymywano reakcję barwną przez dodanie 100 μ l kwasu octowego lodowatego. Z próbek polipropylenowych przenoszono po 200 μ l otrzymanej mieszaniny reakcyjnej na mikropłytkę i odczytywano absorbancję na spektrofotometrze przy długości fali 405 nm.

- d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody, wyrażany jako procent aktywności oznaczanej względem osocza referencyjnego, wynosi 70-140%.

3.4.2 Metodyka oznaczenia stężenia antygeny wolnego białka S

Oznaczenie stężenia antygeny wolnego białka S w osoczu metodą ELISA wykonywano z wykorzystaniem zestawu firmy *Helena BioSciences Europe* (Wielka Brytania).

- a) Zasada metody: wolne białko S zawarte w badanej próbce osocza wiąże się z przeciwciałem specyficznym dla ludzkiego wolnego białka S, unieruchomionym na płycie polistyrenowej. W kolejnym etapie koniugat peroksydazy chrzanowej z poliklonalnym przeciwciałem, skierowanym przeciwko ludzkiemu wolnemu białku S, wiąże się z ludzkim wolnym białkiem S. Dodanie roztworu substratu chromogenego – TMB – zapoczątkowuje przebieg reakcji barwnej z udziałem peroksydazy chrzanowej (HRP), pochodzącej z koniugatu. HRP w obecności H_2O_2 katalizuje reakcję utlenienia TMB do tetrametylobenzodinyliminy o niebieskim zabarwieniu. Przebieg reakcji enzymatycznej jest zatrzymywany przez dodanie

MATERIAŁ I METODY

kwasu, co powoduje zmianę barwy mieszaniny reakcyjnej z niebieskiej na żółtą. Natężenie barwy badanej próbki, mierzone spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm, jest wprost proporcjonalne do stężenia wolnego białka S w badanej próbce osocza.

- b) Materiał do badań: osocze ubogopłytkowe.
- c) Wykonanie oznaczenia: przed oznaczeniem doprowadzano wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej, a następnie przygotowywano roztwór płuczący: do zlewki przenoszono 970 ml wody dejonizowanej i dodawano 30 ml stężonego buforu do płukania, a następnie mieszano. Osocze referencyjne rekonstruowano przez rozpuszczenie zawartości fiołki w 0,5 ml wody destylowanej, zmieszanie i odstawienie na 15 min. w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu wykonywano serię rozcieńczeń osocza referencyjnego w celu uzyskania krzywej wzorcowej: do sześciu probówek polipropylenowych dodawano kolejno 500 μ l, 500 μ l, 500 μ l, 500 μ l, 1000 μ l, 2000 μ l buforu do rozcieńczania próbek, a następnie kolejno dodawano 30 μ l, 20 μ l, 15 μ l, 10 μ l, 10 μ l, 10 μ l osocza kalibracyjnego. W kolejnym etapie przygotowywano rozcieńczenie próbek badanych i osoczy kontrolnych w stosunku 1:26, tj. do 500 μ l buforu do rozcieńczania próbek dodawano 20 μ l osocza badanego/kontrolnego i mieszano. Następnie nakładano po 100 μ l rozcieńczonych próbek osocza badanego/ kontrolnego/ wzorcowego do studzienek płytki. Do studzienki przeznaczonej na próbę „ślepa” odczynnikową dodawano 100 μ l buforu do rozcieńczania próbek. Tak przygotowaną płytkę ELISA inkubowano (temperatura pokojowa, 40 min.). Po upływie czasu inkubacji, zawartość studzienek wylewano i płukano 4-krotnie, za każdym razem napełniając studzienkę buforem płuczącym, wylewając go i osuszając płytkę przy pomocy bibuły, tak aby pozbyć się resztek buforu płuczącego. W kolejnym etapie dodawano do studzienek po 100 μ l koniugatu i inkubowano (temperatura pokojowa, 10 min.), po czym płukano płytkę, a następnie dodawano po 100 μ l substratu chromogennego i ponownie inkubowano (temperatura pokojowa, 10 min.). W tym czasie zachodziła reakcja barwna z wytworzeniem niebieskiej tetrametylobenzodinyminy. Po upływie 10 min., postęp reakcji barwnej zatrzymywano przez dodanie kwasu siarkowego VI, co skutkowało zmianą barwy z niebieskiej na żółtą. Odczytu absorbancji przy długości fali 450 nm dokonywano w czasie do 30 min.
- d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody: 50-150%

3.4.3 Metodyka oznaczenia aktywności antytrombiny

Oznaczenie aktywności antytrombiny w osoczu metodą chromogenną wykonywano przy użyciu zestawu *Antithrombin Xa (Chromogenic)* firmy *Helena BioSciences Europe* (Wielka Brytania).

- a) Zasada metody: antytrombina zawarta w badanej próbce osocza inaktywuje czynnik Xa, który jest dodawany w nadmiarze w pierwszym etapie reakcji. W drugim etapie, substrat chromogeny wprowadzany do mieszaniny jest przekształcany przez resztkowy czynnik Xa do żółto zabarwionej pNA. Natężenie barwy mieszaniny reakcyjnej jest odwrotnie proporcjonalne do stężenia antytrombiny w badanej próbce osocza.
- b) Materiał do badań: osocze ubogopłytkowe.
- c) Metodyka oznaczenia: 30 min. przed przystąpieniem do wykonania oznaczenia, wyjmowano odczynniki z lodówki tak, aby osiągnęły temperaturę pokojową, a następnie przygotowywano bufor do rozcieńczania próbek/ osocza wzorcowego/ kontrolnego. Krzywą wzorcową przygotowywano w 4 próbkach polipropylenowych. Do pierwszej z nich dodawano 990 μ l buforu do rozcieńczania próbek oraz 100 μ l osocza referencyjnego. Do kolejnych trzech próbek dodawano po 500 μ l buforu do rozcieńczania próbek, a następnie, przez przeniesienie 500 μ l mieszaniny z pierwszej próbki, seryjnie rozcieńczano osocze referencyjne dla uzyskania 4 punktów krzywej wzorcowej o aktywności antytrombiny 100%, 50%, 25%, 12,5%. Osocze badane oraz kontrolne rozcieńczano buforem w stosunku 1:100 (do 990 μ l buforu dodawano 10 μ l osocza badanego lub kontrolnego). Przed rozpoczęciem oznaczania ogrzewano odczynniki: czynnik Xa i substrat (37°C, 10 min.). Oznaczenie aktywności antytrombiny wykonywano w seriach po 10, w próbkach polipropylenowych, umieszczonych w bloku grzejnym o temperaturze 37°C, według schematu: w czasie $t=0$ przenoszono 60 μ l rozcieńczonej próbki osocza do próbki polipropylenowej i inkubowano 3 min., następnie dodawano 60 μ l czynnika Xa, a po upływie 1 min. – 60 μ l substratu chromogenego. Mieszaninę inkubowano 3 min., a następnie zatrzymywano reakcję barwną przez dodanie 60 μ l kwasu octowego lodowatego. Z próbek polipropylenowych przenoszono po 200 μ l otrzymanej mieszaniny reakcyjnej na mikropłytkę i odczytywano absorbancję na spektrofotometrze przy długości fali 405 nm.

MATERIAŁ I METODY

- d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody, wyrażany jako procent aktywności względem osocza referencyjnego, wynosi 78-122%.

3.4.4 Metodyka oznaczania aktywności czynnika VIII

Oznaczenie aktywności czynnika VIII w osoczu metodą koagulometryczną wykonywano z wykorzystaniem osocza deficytowego, pozbawionego czynnika VIII, firmy *Siemens* (Niemcy).

- a) Zasada metody: oznaczenie aktywności czynnika VIII oparte jest o modyfikację metody oznaczenia aPTT, w której obserwuje się zdolność badanego osocza do korekcji aPTT w mieszaninie składającej się z osocza badanego i substratowego, pozbawionego czynnika VIII. Stopień korekcji aPTT uzyskany z oznaczenia próbki badanej jest porównywany z czasem uzyskanym dla rozcieńczonych próbek osocza wzorcowego o znanej aktywności czynnika VIII, skalibrowanego względem standardu WHO.
- b) Materiał badany: osocze ubogopłytkowe.
- c) Wykonanie oznaczenia: w pierwszej kolejności sporządzano krzywą wzorcową przy użyciu osocza wzorcowego oraz buforu weronalowego: do kolejnych probówek dodawano 400 µl, 900 µl, 1900 µl, 3900 µl buforu weronalowego, a następnie do każdej z nich dodawano po 100 µl osocza referencyjnego i mieszano. W ten sposób uzyskiwano aktywność czynnika VIII w kolejnych próbkach na poziomach: 100%, 50%, 25%, 12,5%. Następnie rozcieńczano osocze badane oraz kontrolne w stosunku 1:4 (do 400 µl buforu weronalowego dodawano 100 µl osocza badanego lub kontrolnego i mieszano). Przed wykonaniem badań wszystkie odczynniki do oznaczania aktywności czynnika VIII inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 min., a następnie ogrzewano zestaw odczynników do oznaczania aPTT w aparacie BFT II Analyzer (37°C, 15 min.). Po upływie tego czasu do naczynka pomiarowego z mieszadłkiem przenoszono 50 µl osocza deficytowego, pozbawionego czynnika VIII, następnie dodawano 50 µl osocza badanego/kontrolnego/wzorcowego, rozcieńczonego 1:4 oraz 50 µl odczynnika *Pathromtin SL* i inkubowano (37°C, 3 min.). Po upływie tego czasu przenoszono naczynko do komory pomiarowej i dodawano 50 µl CaCl₂, co uruchamiało pomiar czasu do powstania stabilnego skrzepu fibrynowego, zatrzymującego ruch obrotowy mieszadła. Wynik oznaczenia zapisywano. Dla każdego z oznaczanych

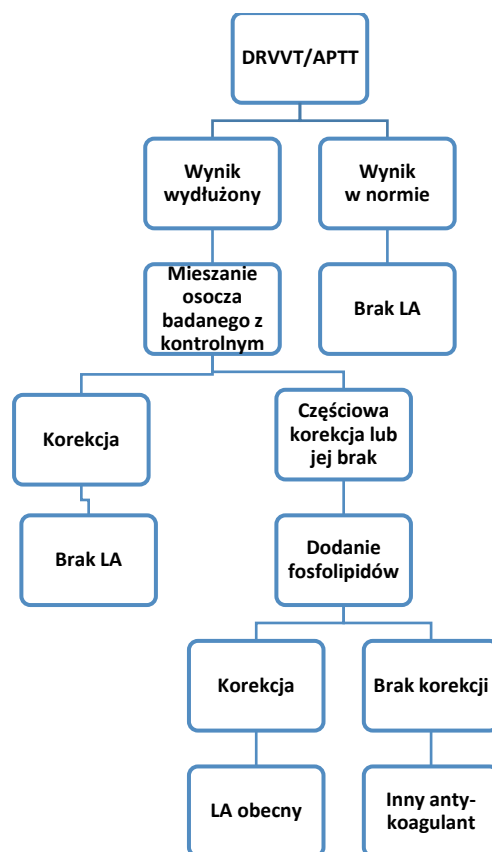
osoczy procedurę wykonywano dwukrotnie. Do dalszych obliczeń wykorzystywano wartość średnią z obu oznaczeń.

- d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody: 70-150% względem osocza referencyjnego, kalibrowanego względem standardu WHO.

3.4.5 Metodyka oznaczenia obecności antykoagulantu toczniowego

Oznaczenie obecności antykoagulantu toczniowego (LA) wykonywano dwoma testami, wykorzystującymi metodę koagulometryczną. Zastosowano test rozcieńczonego jadu żmii Russella (DRVVT, ang. *Dilute Russells Viper Venom test*), wykonany w pierwszej kolejności oraz test aPTT o zwiększonej wrażliwości na LA (z niskim stężeniem fosfolipidów), wykonany w drugiej kolejności. Użyto odpowiednio odczynniki LA1, LA2 oraz *Actin FSL*, *Actin FS* firmy *Siemens* (Niemcy).

- a) Zasada metody: Zgodnie z zaleceniami SSC/ISTH, diagnostykę obecności antykoagulantu toczniowego przeprowadzano 3- etapowo: w etapie 1 wykonywano test przesiewowy przy użyciu odczynnika, zawierającego standardowe stężenie fosfolipidów. Oznaczenie to miało na celu wykazanie przedłużenia minimum jednego z czasów krzepnięcia zależnych od fosfolipidów: aPTT lub dRVV. W 2. etapie przeprowadzano test mieszania osocza badanego z prawidłowym (stosunek 1:1). Wynik wskazywał czy zjawisko przedłużenia czasu krzepnięcia w teście przesiewowym miało charakter zależny od fosfolipidów: korekcja czasu krzepnięcia w mieszaninie dowodziła niedoboru czynnika krzepnięcia lub stosowania leków przeciwkrzepliwych, natomiast brak korekcji wskazywał na zależność zjawiska od fosfolipidów. W 3 etapie wykonywano test potwierdzający z zastosowaniem odczynnika, zawierającego wysokie stężenie fosfolipidów. Jeśli przedłużenie czasu krzepnięcia w teście przesiewowym miało charakter zależny od fosfolipidów – czas krzepnięcia osocza w teście potwierdzenia skracał się do wartości prawidłowych (nadmiar fosfolipidów wysyczał obecne w osoczu pacjenta przeciwciała antyfosfolipidowe, co pozwalało na wytworzenia skrzepu w krótszym czasie).



Ryc. 3 Schemat postępowania diagnostycznego w przypadku podejrzenia obecności antykoagulantu toczniowego

- b) Materiał do badań: osocze ubogopłytkowe przeznaczone do oznaczenia antykoagulantu toczniowego.
- c) Wykonanie oznaczenia: przed wykonaniem oznaczenia doprowadzano wszystkie odczynniki (LA1, LA2, Actin FSL, Actin FS, CaCl₂) do temperatury pokojowej, po czym rozpuszczano zawartość fiolek zgodnie z zaleceniami producenta. Po upływie 10 min. inkubowano odczynnik w aparacie BFT II Analyzer (37°C, 10 min.) i przystępowano do wykonania oznaczenia.

Oznaczenie LA1/LA2: Do naczynka pomiarowego dodawano 100 µl osocza badanego i próbę inkubowano (37°C, 1 min.), następnie przenoszono naczynko do komory pomiarowej i dodawano odczynnik LA1 lub LA2, co uruchamiało pomiar czasu do wytworzenia skrzepu. Oznaczenie LA1, LA2 dla każdego pacjenta wykonywano dwukrotnie. Wynik poszczególnych oznaczeń dla LA1, LA2 podawano w sekundach, natomiast końcowy wynik oznaczenia przedstawiano w postaci ilorazu wyniku czasu krzepnięcia osocza badanego, otrzymanego z oznaczeń za pomocą odczynników LA1 i LA2 (ang. *LA Ratio*):

$$\text{LA Ratio} = \frac{\text{czas krzepnięcia osocza badanego, otrzymany przy użyciu odczynnika LA1}}{\text{czas krzepnięcia osocza badanego, otrzymany przy zastosowaniu odczynnika LA2}}$$

Oznaczenie *Actin FSL/Actin FS*: Do naczynka pomiarowego dodawano 50 µl osocza badanego oraz 50 µl odczynnika *Actin FSL* lub *Actin FS*. Próbę inkubowano (37°C, 3 min.), następnie przenoszono naczynko do komory pomiarowej i dodawano odczynnik CaCl₂, co uruchamiało pomiar czasu do wytworzenia skrzepu. Każde oznaczenie wykonywano dwukrotnie.

d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody:

LA1: 31-44 sekundy,

LA2: 30-38 sekundy,

LA ratio < 1,3.

Actin FSL: 25 – 34 sekundy,

Actin FS: 23 – 32 sekundy.

3.4.6 Metodyka oznaczenia czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji – aPTT

Oznaczenie aPTT wykonywano przy użyciu odczynnika *Pathromtin SL* (o standardowym stężeniu fosfolipidów) firmy *Siemens* (Niemcy).

- a) Zasada metody: aPTT jest miarą aktywacji protrombiny przez czynniki układu wewnątrzpochodnego, po maksymalnej aktywacji czynników XI i XII układu krzepnięcia krwi. Przedłużenie czasu aPTT związane jest najczęściej z niedoborem czynników krzepnięcia drogi wewnątrzpochodnej (niedobór czynników VIII, IX, XI, XII, prekalikreiny i wielkocząsteczkowego kininogenu). aPTT może być również przedłużone w przypadku niedoboru czynników drogi wspólnej: II, V, X, fibrynogenu lub w obecności antykoagulantu toczniowego.
- b) Materiał do badań: osocze ubogopłytkowe przeznaczone do badania obecności antykoagulantu toczniowego
- c) Wykonanie oznaczenia: przed wykonaniem oznaczenia wszystkie odczynniki inkubowano (temperatura pokojowa, 15 min.), a następnie ogrzewano w aparacie BFT Analyzer II (37°C, 15 min.). Do naczynka pomiarowego z mieszadełkiem przenoszono 50 µl odczynnika *Pathromtin SL*, a następnie dodawano 50 µl osocza badanego i inkubowano (37°C, 3 min.). Następnie naczynko przenoszono do komory pomiarowej i dodawano 50 µl CaCl₂, co uruchamiało pomiar czasu

MATERIAŁ I METODY

do powstania stabilnego skrzepu. Oznaczenie aPTT dla każdej badanej próbki wykonywano dwukrotnie, a wynik podawano, jako wartość średnią z obu oznaczeń.

d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody: 25,0”-36,0”.

3.4.7 Metodyka oznaczenia miana przeciwciał antykardiolipinowych (ACA) w klasie IgG i IgM

Oznaczenie wykonywano metodą immunoenzymatyczną ELISA z zastosowaniem zestawu *Quanta Lite® ACA IgG III* oraz *Quanta Lite® ACA IgM III* firmy *Inova Diagnostics* (USA).

a) Zasada metody: do studzienek opłaszczonych antygenami kardiolipinowymi dodawano badaną próbę. Obecność przeciwciał kardiolipinowych powodowała połączenie się ich z antygenami, a frakcja niezwiązana została wypłukana ze studzienki. W kolejnym etapie dodawano koniugat zawierający przeciwciała przeciwko ludzkiej immunoglobulinie klasy IgG lub IgM z peroksydazą chrzanową (HRP), który przyłączał się do wcześniej zaadsorbowanych przeciwciał antykardiolipinowych klasy IgG lub IgM. Dodanie roztworu substratu chromogenego, tetrametylobenzydyny (TMB), zapoczątkowywało przebieg reakcji barwnej z udziałem peroksydazy chrzanowej pochodzącej z koniugatu. HRP w obecności H_2O_2 katalizuje reakcję utlenienia TMB do tetrametylobenzydynodiiminy o niebieskim zabarwieniu. Rozwój reakcji enzymatycznej zatrzymywano przez dodanie kwasu siarkowego VI, czemu towarzyszy zmiana barwy mieszaniny reakcyjnej z niebieskiej na żółtą. Natężenie barwy badanej próbki, mierzone spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm, jest wprost proporcjonalne do miana przeciwciał antykardiolipinowych odpowiednio w klasie IgG i IgM w badanej próbce.

b) Materiał badany: surowica.

c) Wykonanie oznaczenia: wszystkie odczynniki po wyjęciu z lodówki pozostawiano w temperaturze pokojowej na 20 min., a następnie sporządzano rozcieńczenia robocze próbek badanych 1:101. Do studzienek mikropłytki dodawano po 100 μ l surowic wzorcowych IgG/IgM, kontroli dodatniej i ujemnej oraz rozcieńczonych próbek badanych. Mikropłytkę inkubowano (temperatura pokojowa, 30 min., w wilgotnej komorze). Zawartość studzienek wylewano i przemywano buforem płuczącym. W kolejnym etapie dodawano 100 μ l koniugatu IgG do studzienek przeznaczonych do oznaczenia przeciwciał antykardiolipinowych w klasie IgG oraz

100 μ l koniugatu IgM do studzienek przeznaczonych do oznaczenia przeciwciał antykardiolipinowych w klasie IgM, po czym inkubowano płytkę (temperatura pokojowa, 30 min., w wilgotnej komorze). Po upływie czasu inkubacji ponownie płukano płytkę, dodawano po 100 μ l substratu do każdej studzienki i inkubowano (temperatura pokojowa 30 min., bez dostępu światła). W celu zatrzymania reakcji barwnej, do studzienek dodawano po 100 μ l kwasu siarkowego VI. Absorbancję próbek odczytywano przy zastosowaniu spektrofotometru, przy długości fali $\lambda = 450$ nm.

d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody:

ACA w klasie IgG $\leq 10,0$ GPL,

ACA w klasie IgM $\leq 10,0$ MPL.

3.4.8 Metodyka oznaczenia miana przeciwciał przeciwko β 2-glikoproteinie I (anty β 2-GPI) w klasie IgG

Oznaczanie miana przeciwciał anty β 2-GPI w klasie IgG metodą immunoenzymatyczną ELISA wykonywano z zastosowaniem zestawu *Quanta Lite® β 2-GPI IgG* firmy *Inova Diagnostics* (USA).

- a) Zasada metody: w obecności przeciwciał anty β 2-GPI następowało ich związanie z natywną, oczyszczoną β 2-GPI, opłaszczającą płytkę. W kolejnym etapie reakcji, koniugat (przeciwciała skierowane przeciwko ludzkiej IgG, znakowane enzymem), łączył się z przeciwciałami anty β 2-GPI. Dodanie roztworu substratu chromogenego - tetrametylobenzydyny (TMB) – zapoczątkowywało reakcję barwną z udziałem peroksydazy chrzanowej (HRP), pochodzącej z koniugatu. HRP w obecności H_2O_2 katalizuje reakcję utlenienia TMB do tetrametylobenzydynodiiminy o niebieskim zabarwieniu. Reakcję enzymatyczną zatrzymywano przez dodanie kwasu siarkowego VI, co powoduje zmianę barwy mieszaniny reakcyjnej z niebieskiej na żółtą. Natężenie barwy badanej próbki, mierzone spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm, jest wprost proporcjonalne do miana przeciwciał anty- β 2-GPI w klasie IgG.
- b) Materiał do badań: surowica.
- c) Wykonanie oznaczenia: przed wykonaniem oznaczenia doprowadzano wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej, a następnie rozcieńczano próby surowicy badanej 1:101 Do studzienek mikropłytki dodawano po 100 μ l surowic

MATERIAŁ I METODY

wzorcowych, kontrolnych oraz rozcieńczonych próbek badanych; płytkę zabezpieczano folią przed parowaniem i inkubowano (temperatura pokojowa, 30 min.). Po 3-krotnym wypłukaniu płytki, dodawano do studzienek po 100 μ l koniugatu IgG, a następnie inkubowano pod przykryciem (temperatura pokojowa, 30 min.). Niezwiązany koniugat wymywano w trakcie kolejnego 3-krotnego płukania płytki, a następnie do studzienek dodawano po 100 μ l substratu chromogenego - TMB i ponownie inkubowano (temperatura pokojowa, 30 min., bez dostępu światła). W tym czasie zachodziła reakcja z substratem chromogennym, przebiegająca z wytworzeniem niebieskiego kompleksu; reakcję zatrzymywano poprzez dodanie do studzienek 100 μ l kwasu siarkowego VI. Następnie przy zastosowaniu spektrofotometru, odczytywano absorbancję próbek przy długości fali $\lambda = 450$ nm.

- d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody $\leq 19,9$ GU.

3.5 Oznaczenia biochemiczne

3.5.1 Metodyka oznaczenia lipoproteiny (a); Lp(a)

Oznaczenie lipoproteiny (a) metodą nefelometryczną wykonano przy użyciu odczynnika *N Latex Lp (a) Reagent* firmy *Siemens*, z wykorzystaniem analizatora *Nephelometer Analyzer II* firmy *Siemens*.

- a) Zasada metody: Przeciwciała przeciwko ludzkiej lipoproteinie (a), które opłaszczają cząsteczki polistyrenu w powiązaniu z lipoproteiną (a) znajdującą się w badanej próbce, tworzą kompleksy immunologiczne. Powstały koloid zawiera zawieszone w ośrodku kompleksy immunologiczne i wywołuje rozproszenie wiązki światła, przechodzącego przez próbkę. Następnie układ optyczny analizatora mierzy natężenie powstałego rozproszenia światła, które jest wprost proporcjonalne do stężenia lipoproteiny (a) w próbce.
- b) Materiał do badań: surowica
- c) Wykonanie badania: przed wykonaniem badania wszystkie odczynniki zostały doprowadzone do temperatury pokojowej i umieszczone w aparacie, w którym podlegają automatycznemu rozcieńczeniu w stosunku 1:400. Czas od momentu przygotowania próbek do analizy do momentu wykonania oznaczenia powinien wynosić dwie godziny. Jeśli uzyskane wyniki znajdują się poza zakresem pomiarowym aparatu, badanie powinno zostać powtórzone przy zastosowaniu większego lub mniejszego rozcieńczenia próbki. Krzywe referencyjne sporządzane

są metodą kalibracji wielopunktowej z użyciem odczynnika *N Lp(a) Standard SY*. Odpowiednie rozcieńczenia standardu przygotowywane są automatycznie przez urządzenie z użyciem *N Diluent*.

- d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody: < 0,2 g/L

3.5.2 Metodyka oznaczenia homocysteiny

Oznaczanie stężenia homocysteiny w surowicy krwi odbywało się metodą immunochemiczną z użyciem mikrocząstek i znacznika chemiluminescencyjnego wchodzących w skład zestawu *ARCHITECT Homocysteine IL71*, przy wykorzystaniu analizatora *ARCHITECT* firmy *Abbott*.

- a) Zasada metody: związana lub dimeryzowana homocysteina ulega redukcji pod wpływem ditiotritolu do wolnej homocysteiny (Hcy), która pod wpływem hydrolazy S-adenozylhomocysteiny i nadmiaru adenozyliny jest przekształcana w S-adenozyl-L-homocysteinę (SAH). W dalszej kolejności SAH konkuruje ze znakowaną akrydyną S-adenozyllocysteiną o monoklonalne przeciwciała związane z mikrocząstkami. Po przepłukaniu i magnetycznej separacji, do mieszaniny reakcyjnej dodawany jest roztwór przygotowawczy zawierający 1,32% nadtlenu wodoru (*ARCHITECT Pre-Trigger Solution*) oraz roztwór wyzwalający reakcję, zawierający 0,35 mola wodorotlenku sodu (*ARCHITECT Trigger Solution*). Powstała chemiluminescencja, mierzona we względnych jednostkach światła (RLU) jest pośrednio zależna od stężenia homocysteiny w badanej próbce.
- b) Materiał do badań: surowica
- c) Wykonanie badania: przed wykonaniem badania wszystkie odczynniki zostały doprowadzone do temperatury pokojowej, następnie wraz przygotowanymi próbkami zostały umieszczone na pokładzie aparatu. Jeśli uzyskany wynik oznaczenia stężenia homocysteiny przekraczał 50,00 $\mu\text{mol/l}$, próby rozcieńczono (stosunek 1:10) z zastosowaniem protokołu rozcieńczania automatycznego lub procedury rozcieńczania ręcznego przy użyciu *ARCHITECT Multi-Assay Manual Diluent*.
- d) Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody: <10,00 $\mu\text{mol/l}$.

MATERIAŁ I METODY

3.6 Badania z wykorzystaniem metod biologii molekularnej

3.6.1 Łańcuchowa reakcja polimerazy PCR

W celu amplifikacji wybranego fragmentu DNA, obejmującego analizowane warianty pojedynczego nukleotydu (Tabela 7), przeprowadzano łańcuchową reakcję polimerazy (PCR). Stosowanymi polimerazami DNA były HiFiTaq (*Novazym Polska*) lub Green Taq (*GenScript*).

Skład mieszaniny reakcyjnej I

Skład mieszaniny reakcyjnej I obejmował:

○ FailSafe™PreMix J	5 μl
○ H ₂ O	3,45 μl
○ Matryca DNA	0,5 μl
○ Startery F+R	1μl (0,5 μl F i 0,5 μl R)
○ Polimeraza DNA	0,05 μl
	<hr/>
razem	10 μl

Skład mieszaniny reakcyjnej II

Skład mieszaniny reakcyjnej II obejmował:

○ PreMix 1	8,5 μl
○ Matryca DNA	0,5 μl
○ Startery F+R	1μl (0,5 μl F i 0,5 μl R)
	<hr/>
razem	10 μl

Parametry reakcji PCR

I. Program nr 1 dla amplifikacji eksonu 1 genu *F12*, eksonu 2 genu *F13A1*, eksonu 7 genu *MTHFR*, eksonu 1 genu *FGB*

1. Denaturacja wstępna: 95°C, 3 min.
2. Denaturacja: 94°C, 15 sek.
3. Wiązanie starterów: 63°C, 30 sek. (-0,2°C/cykl)
4. Synteza: 72°C, 45 sek.
5. Liczba cykli: 40
6. Synteza końcowa: 72°C, 10 min.
7. Schładzanie 4°C, ∞

II. Program nr 2 dla amplifikacji fragmentu regionu 3'UTR genu *F2*, eksonu 10 genu *F5*

1. Denaturacja wstępna: 95°C, 3 min.
2. Denaturacja: 94°C, 15 sek.
3. Wiązanie starterów: 63°C, 30 sek.
4. Synteza: 72°C, 60 sek.
5. Liczba cykli: 35
6. Synteza końcowa: 72°C, 7 min.
7. Schładzanie 4°C, ∞

III. Program nr 3 dla amplifikacji eksonu 4 genu *MTHFR*

1. Denaturacja wstępna: 95°C, 3 min.
2. Denaturacja: 94°C, 15 sek.
3. Wiązanie starterów: 60°C, 30 sek.
4. Synteza: 72°C, 30 sek.
5. Liczba cykli: 35
6. Synteza końcowa: 72°C, 10 min.
7. Schładzanie 4°C, ∞

Tabela 3 Zestawienie mieszanin i programów do warunków prowadzenia reakcji PCR

Gen	Amplifikowany fragment	Mieszanina reakcyjna		Program PCR		
		I	II	Nr 1	Nr 2	Nr 3
<i>F2</i>	fragm. 3'UTR		+		+	
<i>F5</i>	ekson 10		+		+	
<i>MTHFR</i>	ekson 4	+				+
<i>MTHFR</i>	ekson 7	+		+		
<i>F12</i>	ekson 5	+		+		
<i>F13A1</i>	ekson 2	+		+		
<i>FGB</i>	ekson 1	+		+		

MATERIAŁ I METODY

Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym

W celu uwidocznienia i analizy otrzymanych produktów PCR przeprowadzano elektroforezę w żelu agarozowym o stężeniu 1,5% w buforze 1xTAE, przy natężeniu 140 V przez 30 min. Do kieszonek żelu wprowadzano po 4 µl mieszaniny składającej się z 2 µl produktu PCR oraz 2 µl obciążacza *2xDNA Loading Dye (Fermentas)*. Ocena wielkości fragmentów DNA następowała poprzez porównanie tempa migracji prążków badanych produktów w stosunku do wzorca mas cząsteczkowych. Ustalenie ilości produktu PCR przebiegało na podstawie porównania intensywności fluorescencji badanego prążka do markera - *GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas)*. W celu wizualizacji DNA stosowano bromek etydyny w stężeniu końcowym 0,1 µg/ml lub *SimplySafe*.

Tabela 4 Skład żeli agarozowych stosowanych do rozdziału produktów PCR

Żel	Skład
Żel agarozowy 1,5% 40 ml	<ul style="list-style-type: none">• 0,6 g agarozy• 40 ml buforu 1 x TAE• bromek etydyny 0,1 µg/ml lub <i>SimplySafe</i>
Żel agarozowy 1,5% 120 ml	<ul style="list-style-type: none">• 1,8 g agarozy• 120 ml buforu 1 x TAE• bromek etydyny 0,1 µg/ml lub <i>SimplySafe</i>

3.6.2 Sekwencjonowanie produktów PCR

Po stwierdzeniu obecności produktu PCR oraz jego oczyszczeniu, przygotowywano próby przeznaczone do sekwencjonowania. Sekwencjonowanie metodą Sangera przeprowadzała Wydziałowa Pracownia Technik Biologii Molekularnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Oczyszczanie produktu PCR przed sekwencjonowaniem

Produkty reakcji PCR oczyszczano metodą enzymatyczną z wykorzystaniem krewetkowej fosfatazy alkalicznej (ang. *shrimp alkaline phosphatase*) oraz egzonukleazy I z *E. coli*. Reakcja usuwa wolne startery i degradowe wolne nukleotydy. Egzonukleaza I z *E. coli* degradowe jednoniciowe DNA w kierunku 3'→5', stopniowo uwalniając 5'-monofosforany deoksyrybonukleozydów i pozostawiając nienaruszone

5'-końcowe dinukleotydy, nie trawi nici DNA z zablokowanymi (resztą fosforanową -PO₃ lub acetylową -COCH₃) grupami 3'-OH. Krewetkowa fosfataza alkaliczna przeprowadza reakcję degradacji dNTP-ów w mieszaninie PCR.

Skład mieszaniny reakcyjnej do oczyszczenia produktu PCR

Skład mieszaniny reakcyjnej obejmował:

○ Produkt PCR	8 μl
○ H ₂ O	1,62 μl
○ Egzonukleaza I (E. coli) (4000U)	0,08 μl
○ Krewetkowa fosfataza alkaliczna (500 U)	0,3 μl
	<hr/>
razem	10 μl

Warunki reakcji

1. Aktywacja enzymów: 37°C, 15 min.
2. Denaturacja enzymów: 72°C, 15 min.

Skład mieszaniny reakcyjnej do sekwencjonowania

Skład mieszaniny reakcyjnej obejmował:

○ Oczyszczony produkt PCR rozcieńczony 2-krotnie	0,5 μl
○ H ₂ O	6,5 μl
○ Starter	3,0 μl
	<hr/>
razem	10 μl

Dla analizowanych eksonów w genach: *F5*, obu w *MTHFR*, *F12*, *FGB* wykorzystano starter w orientacji przedniej, dla fragmentu genu *F2* i eksonu 2 *F13A1* starter w orientacji wstecznej. Wyniki sekwencjonowania porównywano z sekwencjami referencyjnymi dla każdego z genów przy wykorzystaniu programu komputerowego *BioEdit*. Numery sekwencji referencyjnych podano w Tabeli 5.

MATERIAŁ I METODY

Tabela 5 Numery sekwencji referencyjnych wykorzystanych do analizy

Gen	Numer sekwencji referencyjnej
<i>F2</i>	NM_000506.4
<i>F5</i>	NM_000130.4
<i>MTHFR</i>	NM_005957.4
<i>F12</i>	NM_000505.3
<i>F13A1</i>	NM_000129.3
<i>FGB</i>	NM_005141.4

3.6.3 Projektowanie starterów

Startery przednie (F) i wsteczne (R) użyte do reakcji PCR (Tabela 6) zaprojektowano przy użyciu programu Primer 3, tak by ich temperatura przyłączania wynosiła ok. 60°C. Ich specyficzność była sprawdzona przy wykorzystaniu algorytmów BLASTN oraz UCSC In-Silico PCR, dostępnych w internetowych bazach danych (Tabela 8). Jedna para starterów, obejmujących ekson 10 genu czynnika V (*F5*), została zaprojektowana ze wstawkami faga M13. Sekwencja faga M13 została pogrubiona.

Tabela 6 Wykaz starterów użytych do reakcji PCR

Nazwa startera	Nr eksonu	Sekwencja startera 5'-3'	Wielkość produktu (pz)
c.97*G>A (20210G>A) w genie <i>F2</i>			
F2_F	3'UTR	TGAAGGCTGTGACCGGGATG	452
F2_R	3'UTR	TCACCTGGCCCTGCTCTGAA	
c.1601G>A w genie <i>F5</i>			
F5_F	10	tgtaaacgacggccagtGCCCAGTGCTTAACAAGACC	248
F5_R	10	caggaaacagctatgaccGAAATGCCCCATTATTTAGCC	
c.665C>T w genie <i>MTHFR</i>			
MTHF677F	4	GGAAGGTGCAAGATCAGAGC	428
MTHF677R	4	CTGGGAAGAAGACTCAGCGAAC	
c. 1298A>C w genie <i>MTHFR</i>			

MTHFR_F3	7	GGCCTCCAGACCAAAGAGTT	456
MTHFR_R	7	CCACTCCAGCATCACTCACT	
c.-4C>T w genie <i>F12</i>			
F12e1_F	5	CACTTGGCTTTCCACAAACA	230
F12e1_R	5	ACAATCCTGGGACAATCCTG	
c.103G>T w genie <i>F13A1</i>			
F13Ae2_F	2	TTTATGCAAACGGCAAATG	397
F13Ae2_R	2	CTTTTGTGGGAACCCAGT	
c.-463G>A i c.-156C>T w genie <i>FGB</i>			
FGBe1a_F	1	TGGGCCTCATTTAGTCTGTG	800
FGBe1_R	1	GCTAGGAATGACTTCAGAAATGG	

3.6.4 Real-time PCR z wykorzystaniem sond typu TaqMan

W przypadku czterech wariantów (Tabela 7), do genotypowania wykorzystano metodę Real-Time PCR z użyciem sond typu TaqMan. Sondy typu TaqMan to zmodyfikowane oligonukleotydy o długości 20-30 pz, komplementarne do badanej sekwencji i powstającego produktu PCR. Sondy zaopatrzone są w dwa znaczniki: na końcu 5' w barwnik fluorescencyjny o znanej długości światła wzbudzającego i emitowanego oraz na końcu 3' – wygaszacz fluorescencyjnego barwnika. W przypadku komplementarnego przyłączenia sondy, polimeraza wydłuża powstający produkt, jednocześnie odcinając napotkany wygaszacz. Barwnik fluorescencyjny emituje światło o znanej długości fali, co rejestrowane jest przez termocykler zaopatrzony w detektor. Sondy TaqMan komplementarne do badanych czterech SNP (Tabela 7) zostały zaprojektowane i zsyntetyzowane przez firmę *Life Technologies Polska Sp. z o. o.* DNA badanych osób został przygotowany w następujący sposób. W dzień poprzedzający nastawienie reakcji przygotowano równe rozcieńczenia DNA (8,9 ng/μl). Kolejnego dnia przygotowano mieszaninę reakcyjną na płytkach 96- lub 384-dołkowych, a reakcja była prowadzona przy użyciu sprzętu ViiATM7 (*Applied Biosystems*).

Skład mieszaniny reakcyjnej real-time PCR

Skład mieszaniny reakcyjnej obejmował:

- TaqMan[®] Master Mix 2,5 μl
- Sondy 0,25 μl

MATERIAŁ I METODY

○	H ₂ O	0,05 μl
○	Matryca DNA	2,2 μl
	razem	5 μl

Program real-time PCR:

- 1 60°C, 30 sek.
- 2 95°C, 10 min.
- 3 95°C, 15 sek. x 40 cykli
- 4 60°C, 60 sek.
- 5 60°C, 30 sek.

Tabela 7 Wykaz badanych SNVs

Gen	Numer identyfikacyjny SNV	Nazwa zgodnie z HGVS	Sekwencja
<i>F2</i>	rs1799963 ¹	NM_000506.3:c.*97	GACTCTCAGCGAAAAAAAAA
<i>F5</i>	rs6025 ¹	NM_000130.4:c.1601	CTGGACAGGCAGGAATACA
<i>F7</i>	rs6046 ²	NM_019616.3:c.1172	CCACGTGCCCCGGGTAGTGGG
<i>F12</i>	rs1801020 ¹	NM_000505.3:c.-4	AACGGACGGAAGCCATGAGG
<i>F13A1</i>	rs5985 ¹	NM_000129.3:c.103	GCTTCAGGGCGTGGTGCCCC
<i>FGB</i>	rs1800790 ¹	NM_005141.4:c.-463	TGATTTTAATGGCCCCTTTTG
<i>FGB</i>	rs1800787 ¹	NM_005141.4:c.-156	AGTAAATAAGCTTTGCTGGG
<i>FGB</i>	rs4220 ²	NM_005141.4:c.1433	TACTCAATGAGGAAGATGAG
<i>FGB</i>	rs1800791 ²	NM_005141.4:c.-862	TGGCTTGTGGGAAATGAAGG
<i>ITGB3</i>	rs5918 ²	NM_000212.2:c.176	GCCCTGCCTCTGGGCTCACCT
<i>MTHFR</i>	rs1801133 ¹	NM_005957.4:c.665	TCTGCGGGAGCCGATTCAT
<i>MTHFR</i>	rs1801131 ¹	NM_005957.4:c.1286	ACCAGTGAAGAAAGTGTCTT

¹analizowane metodą PCR-sekwencjonowanie, ²analizowane metodą real-time PCR z wykorzystaniem sond typu TaqMan

Tabela 8 Odczynniki użyte w badaniach

Odczynnik	Producent
Agaroza	Prona
Alkohol etylowy	POCH Gliwice
ARCHITECT Homocysteine 1L71 Reagent Kit	Abbott
BigDyeTerm v3.1 CycleSeq Kit	Applied Biosystems
Bromek etydyny	Sigma-Aldrich
Calcium Chloride Solution	Siemens Healthcare Sp. z o.o.
Chrom-Z ATIII (anty-Xa)	Helena Biosciences Europe
Coagulation Factor VIII Deficiency Plasma	Siemens Healthcare Sp. z o.o.
Control Plasma N	Siemens Healthcare Sp. z o.o.
Control Plasma P	Siemens Healthcare Sp. z o.o.
Dade Actin FS Activated PTT Reagent	Siemens Healthcare Sp. z o.o.
Dade Actin FSL Activated PTT Reagent	Siemens Healthcare Sp. z o.o.
dNTPs	ThermoScientific
EDTA	Sigma-Aldrich
Enzym Egzonukleaza I (E. coli) (4000U)	Fermentas
Enzym SAP (Shrimp Alkaline phosphatase) (500U)	Fermentas
FailSafe™ PCR 2xPreMix J	Epicentre Biotechnologies
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder ready-to-use	Fermentas
Green Taq Polimeraza DNA	GenScript
HiFiTaq Polimeraza DNA	Novazym Polska
Homocysteine Calibrators	Abbott
Homocysteine Controls	Abbott
Izopropanol	POCH Gliwice
KCl	POCH Gliwice
KHCO ₃	POCH Gliwice
Kwas octowy	POCH Gliwice
LA1 Screening Reagent	Siemens Healthcare Sp. z o.o.

MATERIAŁ I METODY

LA2 Confirmation Reagent	Siemens Healthcare Sp. z o.o.
Medicarine tabletki dezynfekcyjne	Ecolab
MgCl ₂	POCH Gliwice
Monoclonal Free Protein S Elisa Kit	Helena Biosciences Europe
Multi-Assay Manual Diluent	Abbott
NaCl	POCH Gliwice
N Diluent	Siemens Healthcare Sp. z o.o.
NH ₄ Cl	POCH Gliwice
N Latex Lp(a) Reagent	Siemens Healthcare Sp. z o.o.
N Lp(a) Control SY	Siemens Healthcare Sp. z o.o.
N Lp(a) Standard SY	Siemens Healthcare Sp. z o.o.
Nonidet™	Sigma
Owren's Veronal Buffer	Siemens Healthcare Sp. z o.o.
Pathromtin® SL Reagent	Siemens Healthcare Sp. z o.o.
Pre-Trigger Solution	Abbott
Protein C Chromogenic Assay Kit	Helena Biosciences Europe
QuantaLite B2 GPI IgG ELISA Kit	Inova Diagnostics
QuantaLite ACA HRP IgG III ELISA Kit	Inova Diagnostics
QuantaLite ACA HRP IgM III ELISA Kit	Inova Diagnostics
SDS	Sigma-Aldrich
Standard Human Plasma	Siemens Healthcare Sp. z o.o.
Trigger Solution	Abbott
Tris Base	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Wash Buffer	Abbott

Tabela 9 Bufory użyte w badaniach

Bufor	Skład
Bufor do lizy erytrocytów	<ul style="list-style-type: none"> • bufor TKM (962,5 ml) • Nonidet™ (37,5 ml)
TAE 50x	<ul style="list-style-type: none"> • 50mM EDTA • 5,71% v/v kwas octowy • 2M Tris-HCl
TE 1x	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mM Tris • 1 mM EDTA • pH 7,0
TKM 1x	<ul style="list-style-type: none"> • 10 Mm Tris-HCl pH 7.6 • 10 Mm KCl • 10 Mm MgCl₂ • 2 mM EDTA
PreMix 1	<ul style="list-style-type: none"> • 100 µl Fermentas 1x • 10 µl mM dNTPs • 5 µl Polimeraza DNA • 685 µl H₂O

Tabela 10 Aparatura wykorzystana w badaniach

Nazwa	Producent
Aparat do elektroforezy poziomej Sub_cell® GT	BIO-RAD
Autoklaw	Classic Prestige Medical
Termocykler	Eppendorf
Termocykler	Bio-Rad
MagCore® HF16 Plus	RBCBioscience
Nanodrop 2000	Thermo Scientific
Pipety 2,5; 10; 100; 200; 1000 µl, Pipeta 8 kanałowa 300 µl,	Eppendorf
System do dokumentacji żeli Gel Doc 2000 Gel Documentation System	Bio-Rad

MATERIAŁ I METODY

System do oczyszczania wody Elix 3	Millipore
Wirówka Mini Spin	Eppendorf
Wirówka wysokoobrotowa Centrifuge 5804 R	Eppendorf
Vortex Mixer Labnet-VX 200	Labnet International, Inc.
ViiA TM 7	Applied Biosystems
Thermomix Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf
Koagulometr BFT II Analyzer	Siemens Healthcare Sp. z o.o.
Czytnik płytek BIOTEK Synergy 2	BIOKOM
Analizator biochemiczny ARCHITECT	Abbott
Nefelometr Nephelometer Analyzer II	Siemens Healthcare Sp. z o.o.

Tabela 11 Bazy danych wykorzystane w badaniach

Nazwa baz danych	Adres WWW
BLAST	http://www.ensembl.org/Multi/blastview
dbSNP Short Genetic Variations	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html
GeneCards	http://www.genecards.org/
HGMD (Human Genome Mutation Database)	http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php
OMIM® (Online Mendelian Inheritance in Men)	http://www.omim.org/
Primer 3	http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/

Tabela 12 Programy komputerowe wykorzystane w badaniach

Nazwa programu komputerowego	Przeznaczenie
BioEdit	Analiza wyników sekwencjonowania Sangera
PQStat v1.6.2.	Analiza statystyczna

Tabela 13 Zestawienie usług zewnętrznych

Rodzaj usługi	Miejsce
Sekwencjonowanie produktów PCR	Międzywydziałowa Pracownia Techniki Biologii Molekularnej, UAM w Poznaniu
Synteza sond TaqMan	Life Technologies Polska Sp. z o. o.
Synteza starterów	Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów, IBB PAN

3.7 Wybór analizowanych SNVs

SNVs badane w niniejszej pracy zostały wybrane na podstawie obecnego stanu wiedzy, internetowych baz danych oraz dostępnego piśmiennictwa. Projekt badawczy przebiegał w dwóch etapach. Wyniki pierwszego etapu opisane w pracy magisterskiej przez Olech¹⁰³ wskazały, że istotnie statystycznie są SNVs predysponujące do zakrzepicy tętniczej, stąd w drugim etapie badań diagnostyka została poszerzona o SNVs powiązane z zakrzepicą tętniczą (rs4220, rs1800791, rs5918).

3.8 Analiza statystyczna

Wykorzystując test dwumianowy, na poziomie istotności 0,05 przeprowadzono ocenę charakterystyki klinicznej WZK (lokalizacja wady – kończyna górna vs. kończyna dolna, kończyna lewa vs. kończyna prawa oraz zajęty segment dystalny vs. środkowy vs. proksymalny). Następnie analizowano asocjacje badanych parametrów koagulologicznych, biochemicznych i genetycznych pomiędzy grupami pacjentów z WZK, matek pacjentów z WZK, a grupami kontrolnymi. Normalność rozkładu cech ciągłych została oceniona z wykorzystaniem testu Shapiro-Wilka. W przypadku porównania parametrów koagulologicznych oraz biochemicznych wyrażonych skalą interwałową zastosowano test t-Studenta dla grup niezależnych, a w przypadku zmiennych dychotomicznych wykonano test Chi-kwadrat lub test dokładny Fishera – gdy kategorie miały niewielką licznosc. Wyniki badań przeprowadzonych metodami biologii molekularnej również poddano analizie z wykorzystaniem testów Chi-kwadrat oraz testu dokładnego Fishera. Test Chi-kwadrat i test dokładny Fishera posłużył do sprawdzenia czy nie ma istotnych różnic między obserwowanymi i przewidywanymi liczebnościami poszczególnych genotypów czyli równowagą Hardy’ego-Weinberga na poziomie istotności 0,05. Asocjacje badanych SNVs były oceniane z wykorzystaniem testu

MATERIAŁ I METODY

Chi-kwadrat dla trendu (test Cochran-Armitage); porównania wykonano również w modelach genetycznych dominującym i recesywnym, wykorzystując iloraz szans wraz z 95% przedziałem ufności. We wszystkich analizach badanych parametrów, rozpatrywanych jako pojedyncze i niezależne czynniki predysponujące do incydentu zakrzepowego, przyjęto poziom istotności 0,05; w przypadku analiz wielokrotnych, tj. poszukiwania zestawu kilku czynników ryzyka incydentu zakrzepowego zastosowano korektę Bonferroniego, która wynosiła 0,0042 dla badanych SNVs (0,05/12) oraz 0,0071 (0,05/7) dla pozostałych czynników (koagulologicznych i biochemicznych). Do obliczeń wykorzystano pakiet PQStat v1.6.6.

3.8.1 Test dwumianowy

Test dwumianowy (*ang. Binominal test for one proportion*) wykorzystuje w sposób bezpośredni rozkład dwumianowy, zwany również rozkładem Bernoulliego, który należy do grupy rozkładów dyskretnych (czyli takich, w których badana zmienna przyjmuje skończoną liczbę wartości). Służy do porównywania częstości obserwowanych dwóch kategorii zmiennej dychotomicznej (zmienna, która przyjmuje tylko dwie wartości) z częstościami oczekiwanymi z rozkładu dwumianowego o określonym parametrze prawdopodobieństwa. Domyślny parametr prawdopodobieństwa dla obu grup wynosi 0,5. Aby zmienić wartości prawdopodobieństwa, można wprowadzić testowaną proporcję dla pierwszej grupy. Wartość prawdopodobieństwa dla drugiej grupy będzie równa 1 minus wartość prawdopodobieństwa dla pierwszej grupy.

3.8.2 Test t-Studenta dla prób niezależnych

Test t-Studenta dla prób niezależnych jest jedną z najczęściej stosowanych metod statystycznych. Porównuje średnie z dwóch niezależnych od siebie grup, pokazując czy występujące różnice są istotne statystycznie. Jako test parametryczny musi spełniać pewne założenia: równoliczność grup, normalność rozkładu zmiennej zależnej oraz homogeniczności wariancji między grupami.

3.8.3 Test dokładny Fishera

Test dokładny Fishera opiera się na danych zebranych w tabeli „2 x 2” (dwie cechy, z których każda ma możliwe dwie kategorie). Test ten określa dokładne prawdopodobieństwo wystąpienia konkretnego rozkładu liczb w tabeli przy znanym n i ustalonych sumach brzegowych.

3.8.4 Test Chi-kwadrat

Test Chi-kwadrat stosuje się w celu zbadania zależności pomiędzy dwiema zmiennymi nominalnymi (kategorialnymi). Bazuje on na porównywaniu ze sobą wartości obserwowanych (czyli takich, które uzyskaliśmy w badaniu) z wartościami oczekiwanymi (czyli takimi, które zakłada test, gdyby nie było żadnego związku pomiędzy zmiennymi). Jeżeli różnica pomiędzy wartościami obserwowanymi a oczekiwanymi jest istotna statystycznie to można powiedzieć, że zachodzi relacja pomiędzy jedną zmienną a drugą.

3.8.5 Test Chi-kwadrat dla trendu (test Cochran-Armitage)

Test Chi-kwadrat dla trendu służy do weryfikacji hipotezy o istnieniu trendu w proporcjach dla poszczególnych kategorii badanej zmiennej (cechy).

3.8.6 Iloraz szans

Iloraz szans (OR; ang. *odds ratio*) określa stosunek szansy wystąpienia danego zdarzenia w danej grupie do wystąpienia tego samego zdarzenia w innej porównywanej grupie. Szansą (regresją logistyczną) nazywamy stosunek prawdopodobieństwa sukcesu do prawdopodobieństwa porażki względem wystąpienia zdarzenia w danej grupie. Wartość $OR = 1$ oznacza, że szanse na wystąpienie tego samego zdarzenia w dwóch porównywanych grupach są zbliżone, $OR > 1$ wskazuje, że szanse na wystąpienie zdarzenia w grupie badanej są wyższe niż w grupie odniesienia (kontrolnej) (wskazuje np. na istnienie szkodliwego wpływu danej ekspozycji), $OR < 1$ wskazuje, że szanse na wystąpienie zdarzenia w grupie badanej są mniejsze niż w grupie odniesienia.

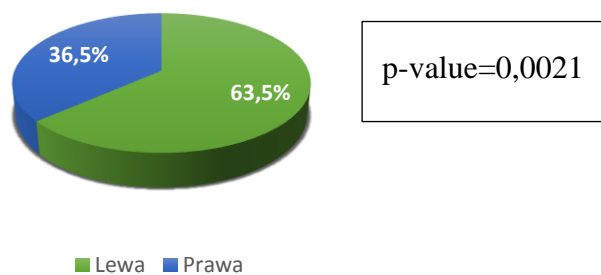
4 Wyniki

4.1 Charakterystyka WZK w grupie badanych pacjentów

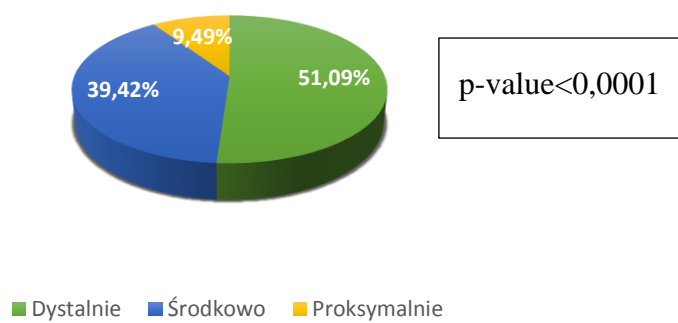
Dane kliniczne dotyczące pacjentów z WZK oraz przebiegu ciąży przedstawiono w Tabeli nr 14. Przeprowadzono charakterystykę WZK w badanej grupie pacjentów (n=137), którą w 48,91% stanowili pacjenci płci żeńskiej, a w 51,09% płci męskiej. W tym celu użyto testu dwumianowego, który pozwolił na oszacowanie czy istnieje istotna statystycznie zależność WZK względem: lokalizacji ubytku – kończyna górna vs. kończyna dolna, kończyna lewa vs. kończyna prawa oraz czy istotnie statycznie jest anatomiczne umiejscowienie WZK pod względem uszkodzonego odcinka kończyny – odcinek dystalny vs. środkowy vs. proksymalny. Wykazano, że wada ubytkowa występuje istotnie statystycznie częściej w obrębie kończyny górnej niż dolnej (p-value<0,0001), istotnie statystycznie częściej po stronie lewej niż prawej (p-value=0,0021) oraz że WZK dotyka istotnie statystycznie częściej fragmentu dystalnego i środkowego niż proksymalnego (p-value<0,0001).



Ryc. 4 Wykres przedstawiający częstość występowania wady zmniejszającej w kończynach górnych i dolnych u badanych pacjentów



Ryc. 5 Wykres przedstawiający częstość występowania wady zmniejszającej kończyn u badanych pacjentów w zależności od strony ciała



Ryc. 6 Wykres przedstawiający częstość występowania wady zmniejszającej kończyn u badanych pacjentów w zależności od segmentu kończyny

Tabela 14 Dane z wywiadu klinicznego dotyczące pacjentów z WZK

GL – górna lewa, GP – górna prawa, DL – górna lewa, DP – górna prawa, F – płeć żeńska, M – płeć męska, ASD – ubytek przegrody międzyprzedsionkowej, VSD – ubytek przegrody międzykomorowej, NTIC – nadciśnienie indukowane ciążą, m. – miesiące, Hbd – tydzień ciąży

Nr pacjenta	Płeć	Wiek (lata)	Dotknięta wadą kończyna				Opis wady kończyn	Wady towarzyszące	Leki p/krzepliwe	Wywiad ciążyowy		
			GL	GP	DL	DP				Infekcje/ inne	Leki	Wynik PLT
1-1	M	13	+				Brak dłoni, obecny nadgarstek	-	-	Lekkie przeziębienie – I trymestr	-	Prawidłowy
2-1	F	22 m.		+			Skrócenie dłoni i palców 1-5	-	-	NT, obrzęki dłoni i stóp, stan przedrzucawkowy	Dopegyt od 8 Hbd	569 (200-550) 30.03.12 495 (210-560) 13.01.12
3-1	M	17,5 m.		+			Brak palców 2-4, skrócenie śródreża	-	-	-	-	Prawidłowy
4-1	M	6 m.	+				Skrócenie ręki	-	-	-	Debridat, gasprid, laktuloza	Prawidłowy
5-1	M	29	+				Skrócenie ramienia, przedramienia, brak 5. palca	VSD-zamknął się samoistnie	-	Infekcja wirusem ospy wietrznej-półpaśca (VZV)	-	Prawidłowy
6-1	M	12 m.	+				Skrócenie ręki	-	-	-	-	Prawidłowy

7-1	M	29 m.	+				Skrócenie palców dłoni, syndaktylia palców, skrócenie śródreżca	-	-	-	-	-
8-1	F	6	+				Brak przedramienia, obecne zawiązki palców	-	-	-	-	-
9-1	F	6	+				Niedorozwój dłoni, szczątkowe palce i kości śródreżca	-	-	-	Luteina	Prawidłowy
10-1	F	5	+				Niedorozwój dłoni, obecne zawiązki palców	-	-	Poronienie zagrażające 3m. Infekcja przewlekła 5m.	-	-
11-1	F	6	+				Brak ręki, nadgarstek prawidłowy, obecne zawiązki palców	-	-	Zakażenie układu moczowego	-	Prawidłowy
12-1	F	5				+	Amputacja poniżej kolana, brak stawu kolanowego, była obecna hipoplastyczna stopa	-	-	-	-	Prawidłowy
13-1	M	6	+				Brak 2/3 przedramienia i 4. palców	-	-	-	-	Prawidłowy
14-1	F	27 m.				+	Niedorozwój dłoni, obecne zawiązki palców	-	-	-	-	-

15-1	M	16 m.		+			Dłoń hipoplastyczna, obecny nadgarstek, obecne szczytkowe śródreżce i palce bez kości-zawiązków	-	-	Zakażenie układu moczowego, toksoplazmoza	Furagin, Clotrimazol, Rovamycine od 10 Hbd	Prawidłowy
16-1	F	3	+				Brak 2/3 przedramienia, obecne bardzo drobne zawiązki palców	-	-	Niedokrwistość	-	Prawidłowy
17-1	F	5				+	Brak palca, skrócenie podudzia	-	-	Przeziębienie-I trymestr NTIC, obrzęki	Dopegyt	Prawidłowy
18-1	F	12 m.		+			Brak części kończyny od przedramienia w dół	-	-	Przeziębienie-początek ciąży, skurcze w 8 Hbd	-	Prawidłowy
19-1	F	29 m.	+				Brak dłoni i fragmentu przedramienia, obecne zawiązki palców	-	-	Przeziębienie	-	Prawidłowy
20-1	F	3	+				Skrócenie przedramienia, obecne szczytkowe palce	-	-	Infekcja 6-8 Hbd	-	Prawidłowy
21-1	F	5		+			Brak palców	-	-	-	-	Prawidłowy
22-1	F	5	+				Amputacja kończyny od przedramienia w dół	-	-	Krwiak około łożyskowy, ciąża zagrożona, poród 36+4 Hbd	-	Prawidłowy

23-1	F	6		+			Skrócenie przedramienia, brak palców, zachowany kciuk hipoplastyczny	-	-	Zakażenie układu moczowego pod koniec ciąży	-	Prawidłowy
24-1	M	3	+				Skrócenie palców 1-5, skrócenie śródreżca	-	-	-	-	Prawidłowy
25-1	F	4	+				Częściowy brak przedramienia i dłoni	-	-	-	-	-
26-1	F	5		+			Brak palców 3-4, 3 i 4 kości śródreżca, potwierdzone RTG	-	-	-	Duphaston	Prawidłowy
27-1	F	10		+			Brak dłoni	-	-	Krwawienie w 5 Hbd, przedwczesne skurcze od 27 Hbd, zakażenie układu moczowego 35 Hbd	Duphaston od 5-6 Hbd, Fenoterol od 37 Hbd, Isoptin od 27 Hbd	Prawidłowy
28-1	F	6		+			Brak dłoni, skrócenie przedramienia, obecne zawiązki palców	Pępowina dwunaczyniowa	-	Zakrzepica w ciąży	-	-
29-1	F	3	+				Skrócenie palców, minimalne skrócenie przedramienia	-	-	Infekcja wirusem opryszczki (HSV) x 2	-	-

30-1	F	5	+				Rozszczep jednostronny, brak jednego palca, syndaktylia palców 1-2	-	-	-	Od 7 m. leki tokolityczne	Prawidłowy
31-1	F	3	+				Brak kciuka, 2. palca, skrócenie przedramienia	Niedorozwój lewego mięśnia piersiowego większego, zrost żeber po lewej stronie, dekstrokardia, słaby przyrost masy ciała	-	Tomografia komputerowa (TK) w 5 Hbd	Pulmicort, Diclofenac	Prawidłowy
32-1	M	5		+			Amputacja przedramienia z dłonią	-	-	-	-	-
33-1	M	4	+				Brak 1/3 przedramienia z dłonią i palcami	-	-	-	-	-
34-1	M	4	+				Brak 2/3 przedramienia, szczątkowe nieprawidłowe kości promieniowa i łokciowa, brak dłoni	-	-	-	No-spa	-
35-1	F	4	+				Skrócenie palców	-	-	Nadpłytkowość samoistna, obrzęki kończyn dolnych	-	Prawidłowy

36-1	M	4				+	Brak jednego palca, skrócenie kości piszczelowej, prawa stopa krótsza o 3cm	-	-	Nadciśnienie tętnicze przed i po ciąży	-	-
37-1	F	3	+				Brak palca 2-4 i kości śródreżca	-	-	-	-	-
38-1	F	5	+				Amputacja dłoni, nieznaczne skrócenie przedramienia	Hipotrofia, poród przedwczesny 29 Hbd	-	NTIC, opryszczka w I trymestrze, przedwczesne pęknięcie pęcherza płodowego	-	Prawidłowy
39-1	F	3				+	Amputacja przedramienia, obecne bardzo drobne zawiązki palców	-	-	Atopowe zapalenie skóry	Sterydy na atopowe zapalenie skóry	Prawidłowy
40-1	M	4	+				Brak 5. palca, nieznaczne skrócenie przedramienia	-	-	Katar	Flixotide, Aerius	Prawidłowy
41-1	M	19 m.				+	Brak dwóch palców, stopa końsko-szpotawa	-	-	Opryszczka wargowa w 4 mc. Ciąży, przeziębienie – III trymestr	-	Prawidłowy
42-1	M	9 m.	+				Skrócenie przedramienia, głównie kości promieniowej, łukowate	-	-	-	-	Prawidłowy (?)

							wygięcie i niedorozwój kości łokciowej					
43-1	M	6	+				Amputacja przedramienia; obecne tylko bliższe fragmenty kości przedramienia	astygmatyzm	-	-	-	Prawidłowy
44-1	M	6 m.			+		Brak palca 4-5 wraz z kośćmi śródstopia, skrócenie podudzia	-	-	Zakażenie układu moczowego w I trymestrze	Furagin Flixotide, Ventolin, Luteina 6-7 Hbd	Prawidłowy
45-1	M	5	+				Skrócenie przedramienia, brak dłoni, obecne zawiązki palców ale niedorozwinięte palce	-	-	NTIC	-	Prawidłowy
46-1	F	4	+				Amputacja 2/3 przedramienia, obecne zawiązki palców	-	-	-	-	-
47-1	F	3			+		Brak kończyny górnej	-	-	Bóle brzucha i infekcja wirusowa w I trymestrze	Fenoterol	Prawidłowy
48-1	M	2			+		Skrócenie kości udowej o 5 cm, brak kości strzałkowej, skrzywienie	-	-	Przeziębienie w I trymestrze	-	Prawidłowy

							kości piszczelowej, brak trzech palców					
49-1	F	5		+			Brak ręki, 1/3 przedramienia, obecne drobne zawiązki palców	-	-	-	-	Prawidłowy
50-1	M	5		+			Amputacja od przedramienia w dół, obecny kikut przedramienia	ASD typ II	-	-	-	-
51-1	F	7		+			Brak 1/3 bliższej części przedramienia oraz całego przedramienia i ręki	-	-	-	-	Prawidłowy
52-1	F	7		+			Hipoplazja ręki, skrócenie palców	-	-	-	-	Prawidłowy
53-1	M	7		+			Brak trzech palców ręki (2-3-4)	-	-	-	-	Prawidłowy
54-1	F	7				+	Skrócenie stopy, stopy obustronnie końsko-szpotałe	-	-	Krwawienia w I trymestrze	-	Prawidłowy
55-1	M	7 m.		+			Brak 5. palca	-	-	Cukrzyca ciążowa leczona dietą	-	Prawidłowy
56-1	M	16		+			Niedorozwój palców 2-5	-	-	-	-	Prawidłowy

57-1	F	7	+				Brak ¾ przedramienia, obecny staw łokciowy, brak ręki	-	-	NTIC, gestoza	-	Prawidłowy
58-1	F	7	+				Brak 2/3 przedramienia z ręką	-	-	Przeziębienie i gorączka na początku ciąży	-	Prawidłowy
59-1	M	8 m.	+				Brak palców 2-4, brak kości śródreżcza II-IV, niedorozwój ręki	-	-	Poronienie zagrażające	-	Prawidłowy
60-1	F	9	+				Brak 1-5 palców, skrócenie śródreżcza	-	-	-	-	-
61-1	M	7	+				Niedorozwój dłoni, prawidłowy kciuk, niedorozwój palców 2-4, palec 5.- klinodaktylia i niedorozwój	-	-	-	-	Prawidłowy
62-1	M	8		+			Skrócenie palców 1-5	-	-	Infekcja układu oddechowego, gorączka w I trymestrze	-	Prawidłowy
63-1	M	8	+				Niedorozwój palca 1, brak palców 2-4, szczątkowy palec 5.	-	-	Niedokrwistość w ciąży	Sorbifer durules	Prawidłowy
64-1	F	9	+				Brak palców 2-4	-	-	-	-	-

65-1	M	6		+			Palce 2-5 szcążkowe, kciuk hipoplastyczny	-	-	-	-	Prawidłowy
66-1	M	2		+			Niedorozwój ręki, szcążkowe palce 2-5, brak kciuka	-	-	Infekcja wewnątrzmaciczna, poród przedwczesny w 35 Hbd	Betaloc 25mg przez pierwsze 4mc-e ciąży	Prawidłowy
67-1	M	8		+			Brak palców 2-4, obecne szcążkowe zawiązki, niedorozwój całej ręki	Spodziectwo prąciowe II ^o	-	Poronienie zagrażające, nieprawidłowa glikemia, obrzęki, NTIC, gestoza	-	-
68-1	F	24		+			Brak ręki, przedramię o zmniejszonym obwodzie	Alergia	-	Chlamydia w ciąży	-	Prawidłowy
69-1	M	9		+			Brak kości przedramienia ze stawem łokciowym oraz nadgarstka	ASD typ II, niedorozwój jednej nerki	-	-	Depakine Chrono	Prawidłowy
70-1	M	9					Wada przypomina SHFM, brak II, III kości śródręcza, dodatkowy palcik palca 1, brak dwóch palców	-	-	-	-	Prawidłowy
71-1	M	8		+			Sekwencja Polanda, skrócenie kończyny	Niedorozwój mięśnia piersiowego	-	-	-	Prawidłowy

72-1	M	8			+		Skrócenie uda o 3,5 cm, skrócenie piszczeli o 1 cm	-	-	-	-	Prawidłowy
73-1	M	6,5 m.	+				Brak ręki	-	-	Toxoplasmoza	Rovamicyne do końca ciąży	-
74-1	F	10	+				Brak ręki	-	-	-	-	Prawidłowy
75-1	F	9	+				Brak ręki	-	-	-	-	Prawidłowy
76-1	M	9	+				Szczątkowe palce 1-4, niedorozwój kciuka	-	-	-	-	Prawidłowy
77-1	M	7			+		Brak kości nadgarstka, śródręcza, palców	-	-	Przeziębienie z gorączką 3-4 mc. ciąży	Antybiotyk 3-4 mc. ciąży	Prawidłowy
78-1	M	9	+				Brak przedramienia i 1/3 ramienia	-	-	NTIC, obrzęki	-	Prawidłowy
79-1	M	3	+				Szczątkowe palce 1-4, kciuk prawidłowy	-	-	Przeziębienie i stan podgorączkowy w 3mc. ciąży	-	Prawidłowy
80-1	M	7,5 m.				+	Skrócenie podudzia, stopa nieco mniejsza	-	-	-	-	Prawidłowy
81-1	M	9			+		Bardzo znaczne skrócenie przedramienia, szczątkowa kość	-	-	-	-	Prawidłowy

							łokciowa, obecne 2 palce ręki (pierwotnie zrosnięte)					
82-1	F	10	+				Nieobecne 3/4 przedramienia, obecne bardzo drobne zawiązki wszystkich palców	-	-	-	Anafranil Tegretol	Prawidłowy
83-1	F	2		+			Skrócenie przedramienia, niedorozwój nadgarstka i palców (szczątkowe zawiązki palców)	-	-	-	-	Prawidłowy
84-1	M	10		+			Niewielkie skrócenie kciuka i 5. palca, bardzo znaczne skrócenie palców 2-4	-	-	-	-	Prawidłowy
85-1	M	7			+		Sztywny staw skokowy, brak kości strzałkowej	-	-	Uporczywe wymioty, siostra matki 1 poronienie samoistne	-	Prawidłowy
86-1	F	6,5		+			Skrócenie palców 1-5 (palce szczątkowe), hipoplastyczny kciuk	-	-	Kolka nerkowa w ciąży, 1 poronienie u siostry	-	-
87-1	M	11	+				Brak kości śródreżca i palców	Plamy typu kawa z mlekiem	-	Brodawczak tarczycy	-	Prawidłowy

88-1	F	7,5		+			Szczątkowy staw łokciowy, brak przedramienia z dłonią	-	-	Oddzielanie się kosmówki, podtrzymywanie ciąży	-	Prawidłowy
89-1	F	10,5	+		+		Skrócenie przedramienia, brak dwóch palców. Skrócenie kości udowej, stopa płasko-koślawą	-	-	-	-	Prawidłowy
90-1	F	13 m.		+			Obecny nadgarstek, szczątkowe palce 1-5	-	-	Cukrzyca ciążowa leczona dietą. Zator płuc u ojca ojca matki, 1 poronienie u matki ojca	-	Prawidłowy
91-1	F	9	+				Obecne szczątkowe palce 1 i 5. Brak palców 2-4, obecne skrócone kości śródreżca	-	-	Krwawienie od ok. 3 mc-a ciąży. 1 poronienie i 1 poród martwy u siostry, u ojca astma i guz płuc	-	Prawidłowy
92-1	M	9,5	+				Hipoplastyczne palce, zrosnięte i szczątkowe palce 1-5	-	-	1 poronienie u siostry	-	Prawidłowy
93-1	M	8	+				Brak palców 4 i 5, hipoplazja k. łokciowej	-	-	-	-	Prawidłowy
94-1	F	4,5		+			Brak palców 1-5 i niedorozwój kciuka	-	-	Zapalenie zatok w ciąży i leczenie Augmentinem, Infekcja Rotavirusem.	Clexane w III trymestrze	Prawidłowy

										Poronienie ciąży pierwszej, 1 poronienie u matki		
95-1	F	6				+	Skrócenie podudzia o 1,5 cm, brak przedstopia	-	-	-	-	Prawidłowy
96-1	M	6,5				+	Skrócenie palca 2, syndaktylia 1-4, brak mięśnia piersiowego większego	-	-	-	-	Prawidłowy
97-1	M	30				+	Brak mięśnia piersiowego mniejszego i większego	-	-	Acard i Bisocard u matki	-	Prawidłowy
98-1	M	2				+	Brak 2/3 przedramienia, szczątkowe palce	Wcześnieństwo 35 Hbd	-	Matka wole guzowate	-	Prawidłowy
99-1	F	10				+		Brak lewej dłoni	-	1 poronienie samoistne w 2 mc-u ciąży, choroba Hashimoto u matki	-	Prawidłowy
100-1	M	6,5				+	Niedorozwój dłoni, szczątkowe palce i kości śródręcza. Zmniejszony obwód przedramienia i ramienia	-	-	NTIC	-	Prawidłowy

101-1	M	12	+				Brak przedramienia i ręki, obecny szczątkowy kikut ręki	-	-	Zgon dziecka matki matki krótko po porodzie	-	Prawidłowy
102-1	M	5				+	Brak kości strzałkowej, niedorozwój piszczeli, stopa trójpalczasta	-	-	Poronienie samoistne u siostry matki	-	Prawidłowy
103-1	F	4	+				Brak stawu barkowego i całej kończyny górnej	-	-	W I trymestrze grypa, ciąża III – poronienie samoistne, u siostry matki zespół wad u dziecka i jego zgon, kolejna siostra matki – poród martwy	-	Prawidłowy
104-1	F	4		+			Brak kości promieniowej	-	-		-	Prawidłowy
105-1	M	5				+	Skrócenie kości udowej, podejrzenie wewnątrzmacicznego złamania kości udowej	-	-	Ciąża I – zespół wad i zgon dziecka	-	Prawidłowy
106-1	F	10		+			Szcątkowe zawiązki palców ręki z zachowanym nadgarstkiem	-	-	Krwawienie w 12 Hbd, u matki matki tętniak tętnicy podobojczykowej	-	Prawidłowy
107-1	M	3	+				Szcątkowe palce 1-5 ręki	-	-	Miażdżycza tętnic kończyn dolnych u matki matki	-	Prawidłowy

108-1	F	5	+				Szczątkowe palce 4-5 ręki, skrócenie/ niedorozwój palca 3	Wada nerki	-	Przebiegnięcie, ciąża II - poronienie samoistne	-	Prawidłowy
109-1	F	4	+				Brak 2/3 przedramienia, zawiązki palców	-	-	Zakażenie układu moczowego, opryszczka. Żylaki u matki matki	-	Prawidłowy
110-1	M	10 m.	+				Brak/ szczątkowe palce 2-5, niedorozwój kciuka	-	-	-	-	Prawidłowy
111-1	F	3	+				Brak 2/3 przedramienia	-	-	Ciąża zagrożona, krwawienia	-	Prawidłowy
112-1	M	4				+	Skrócenie kości udowej, szczątkowa kość udowa	-	-	Ciąża I – poronienie samoistne	-	Prawidłowy
113-1	F	3	+				Hipoplazja kciuka, aplazja palców 2-5	-	-	-	-	Prawidłowy
114-1	F	3 m.				+	Brak palców i kości śródreżca, szczątkowe palce 2-5	-	-	-	-	Prawidłowy
115-1	M	5	+				Szczątkowe zawiązki palców 1-5 ręki, niedorozwój śródreżca	-	-	-	-	Prawidłowy
116--1	F	4				+	Brak ręki i nadgarstka, szczątkowe zawiązki palców	-	-	Bóle brzucha w 7 mc-u ciąży, u matki leukopenia, choroba żołądka	-	Prawidłowy

117-1	M	4		+			Brak kości promieniowej, szczątkowa kość łokciowa, brak dwóch palców	-	-	-	-	Prawidłowy
118-1	F	3		+			Brak dystalnych części palców 2-4, syndaktylia palców 2-3	-	-	Leki hormonalne przyjmowane w I trymestrze ciąży, matka	-	Prawidłowy
119-1	M	7,5 m.		+			Szczałkowe palce 2-5 ręki, niedorozwój kciuka	-	-	-	-	Prawidłowy
120-1	M	3		+			Skrócenie 3 palca, brak paliczka dystalnego	-	-	2 poronienia samoistne u siostry matki	-	Prawidłowy
121-1	F	3		+			Niedorozwój palców 2 i 3	-	-	Niedoczynność tarczycy, matka matki poród martwy	-	Prawidłowy
122-1	M	3,5 m.		+			Ektrodaktylia, obecne palce 1 i 5, brak śródręcza	-	-	-	-	Prawidłowy
123-1	M	4		+			Skrócenie palców 1-5 ręki, szczątkowe kości śródręcza	-	Pulmicort, Zyrtec, Ventolin	1 poronienie u matki matki	-	Prawidłowy

124-1	M	8 m.		+			Niedorozwój mięśnia piersiowego	-	-	Ciąża I – poronienie samoistne	-	Prawidłowy
125-1	M	7		+			Brak ręki, szczątkowe palce i skrócenie przedramienia	-	-	Matka – niedoczynność tarczycy	-	Prawidłowy
126-1	M	11	+				Brak 1/2 przedramienia wraz z ręką	-	-	-	-	Prawidłowy
127-1	M	4		+			Brak palców 2-4 ręki	-	-	-	-	Prawidłowy
128-1	F	9	+				Brak palców 4 i 5 ręki	-	-	Ciąża II – poronienie samoistne	-	Prawidłowy
129-1	M	3 m.	+				Skrócenie palców 1-5	-	-	-	-	-
130-1	M	23 m.			+		Brak piątego palca stopy, skrócenie stopy	FoA, ASD	-	-	-	Prawidłowy
131-1	F	3	+				Brak palców 2-5 ręki, 5 palec szczątkowy, kciuk hipoplastyczny	-	-	NITC, małe obrzęki, infekcja układu moczowego	-	Prawidłowy
132-1	M	18 m.	+				Niedorozwój 1-5 palców ręki	-	-	Ciąża I – poronienie samoistne	-	Prawidłowy
133-1	F	5	+				Brak/ szczątkowe palce, niedorozwój ręki i palców od nadgarstka	-	-	Zielone wody płodowe, przeziębienie ok. 5 mc-a ciąży. U matki nerwica oraz niedoczynność tarczycy, zgon dziecka 1	-	Prawidłowy

										mc. po porodzie u matki matki		
134-1	F	2	+				Synbrachydaktylia	FoA	-	Podejrzenie NTIC	-	Prawidłowy
135-1	F	7	+				Niedorozwój ręki, brak palca wskazującego i środkowego, kciuk dodatkowy zrosnięty z pierwszym	-	-	-	-	Prawidłowy
136-1	F	16 m.	+				Brak przedramienia, obecne zawiązki palców	-	Ursofalk, Hepamertz, Propoanolol	Plamienia w I trymestrze. Ciąża I poronienie samoistne, żylaki u matki matki	-	Prawidłowy
137-1	F	33	+				Brak 2/3 przedramienia, obecne zawiązki palców	-	-	-	-	Prawidłowy

4.2 Badania koagulologiczne

Ze względu na trudności w pozyskiwaniu materiału badawczego (brak zgody na pobranie krwi lub trudności techniczne związane z pobraniem krwi żyłnej), badania koagulologiczne wykonano u 123 ze 137 pacjentów z WZK (u 14 nie wykonano badań), u 125 ze 134 matek pacjentów z WZK oraz u 149 kobiet ze 168 wchodzących w skład grupy kontrolnej. Badań nie wykonano w grupie dzieci, będącej grupą kontrolną, ze względu na konieczność pobierania relatywnie dużej ilości krwi. Rodzice dzieci zdrowych zazwyczaj nie wyrażali zgody na takie pobranie, w przeciwieństwie do rodziców dzieci dotkniętych WZK. W efekcie napotkanych trudności, zaprzestano analiz koagulologicznych w grupie kontrolnej dzieci.

Tabela 15 Zakresy wartości referencyjnych wykonanych oznaczeń laboratoryjnych

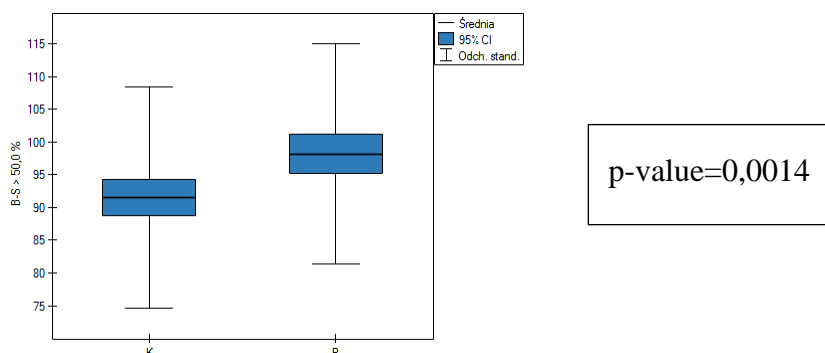
Badanie	Zakres wartości referencyjnych
Białko S	> 50%
Białko C	70 – 140%
Antytrombina	78 – 122%
Czynnik VIII (aktywność)	70 – 150%
Antykoagulant tocznia	ujemny
Przeciwciała ACA IgG i IgM	≤ 10,0 GPL lub MPL
Przeciwciała anty β2-GPI IgG	≤ 19,9 GU
Homocysteina	< 10 μmol/l
Lipoproteina a	< 0,2 g/L

Białko S

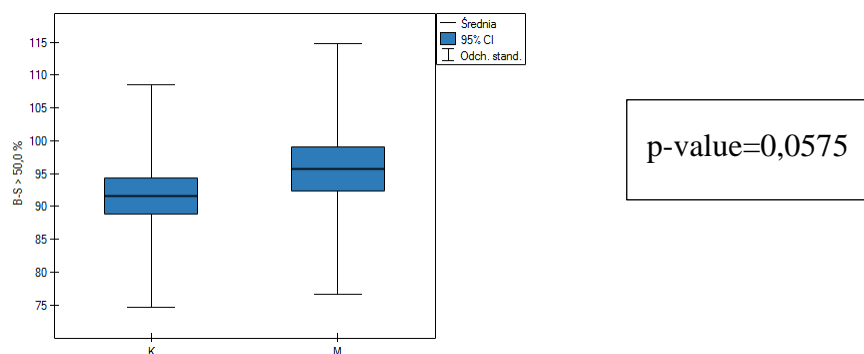
Obniżona aktywność białka S (PS < 50%) jest jedyną zmianą, która nie została zarejestrowana w żadnej z badanych grup. Ze względu na fakt, że u żadnej z badanych osób nie stwierdzono obniżenia aktywności białka S poniżej 50%, zdecydowano o przeprowadzeniu dalszych analiz średnich aktywności PS w poszczególnych grupach badanych i grupie kontrolnej kobiet. Test t-Studenta pozwolił na porównanie między sobą wyników aktywności PS w następujących grupach – w grupie pacjentów z WZK i w grupie kontrolnej zdrowych kobiet (Ryc. 7) oraz w grupie matek i grupie kontrolnej zdrowych kobiet (Ryc. 8). Średnia aktywność PS w grupach pacjentów z WZK (98%) oraz ich matek (95%) była wyższa niż uzyskane średnie wartości PS w grupie

WYNIKI

kontrolnej (91%), co okazało się istotne statystycznie w przypadku pacjentów z WZK (p-value=0,0014), a nieistotne statystycznie dla grupy matek (p-value=0,0575).



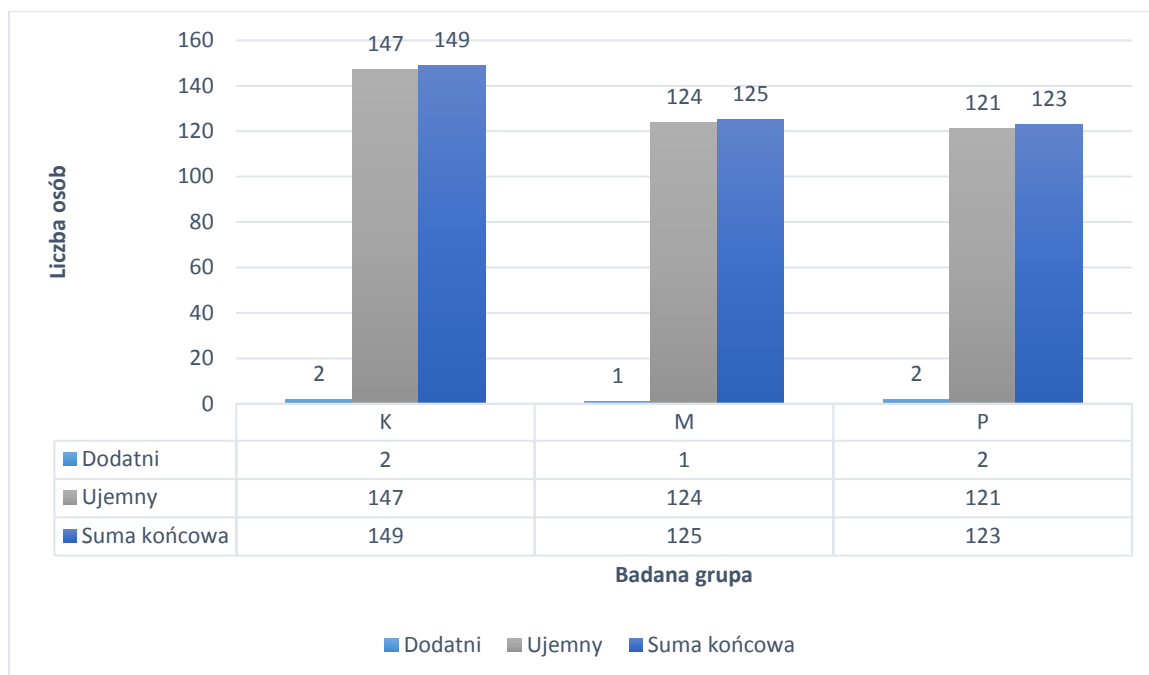
Ryc. 7 Rozkład średnich wartości białka S (BS, inzej PS) w grupie kontrolnej (K) i grupie pacjentów z WZK (P)



Ryc. 8 Rozkład średnich wartości białka S (BS, inzej PS) w grupie kontrolnej (K) i grupie matek pacjentów z WZK (M)

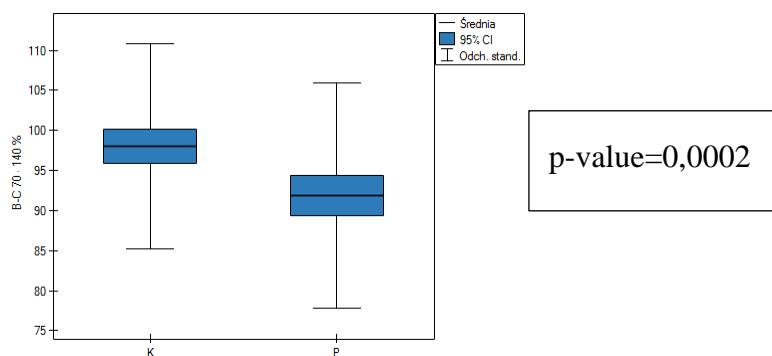
Białko C

Obniżoną aktywność białka C (PC< 70%) odnotowano w 5 przypadkach: 2 w grupie pacjentów z WZK, 1 w grupie matek oraz 2 w grupie kontrolnej. Test dokładny Fishera na poziomie istotności $\alpha=0,05$ nie wykazał istotnych statystycznie różnic między rozkładem wyników dodatnich pomiędzy grupą pacjentów z WZK a grupą kontrolną (p-value=1,0000) oraz grupą matek a grupą kontrolną (p-value=1,0000).



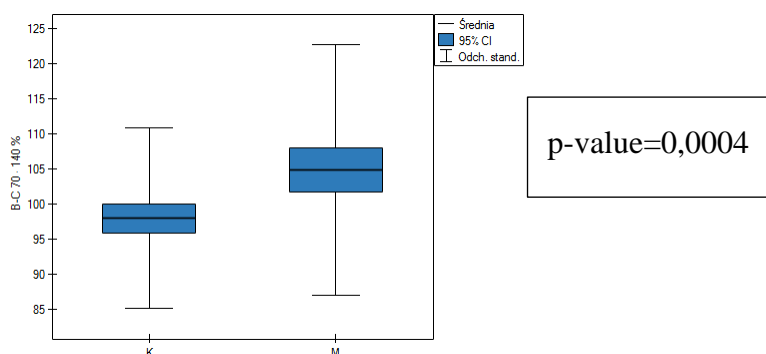
Ryc. 9 Wykres przedstawiający wyniki badania aktywności białka C w poszczególnych grupach (P – pacjenci z WZK, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)

Analiza statystyczna przy użyciu testu t-Studenta uzyskanych stężeń PC w grupie probandów i grupie kontrolnej wykazała, że średnia aktywność białka C w grupie pacjentów z WZK jest istotnie statystycznie niższa ($p\text{-value}=0,0002$) niż w grupie kontrolnej (Ryc. 10), natomiast średnia aktywność białka C jest istotnie statystycznie wyższa w grupie matek w porównaniu do grupy kontrolnej ($p\text{-value}=0,0004$) (Ryc.11).



Ryc. 10 Rozkład średnich wartości białka C (BC, inaczej PC) w grupie kontrolnej (K) i grupie pacjentów z WZK (P)

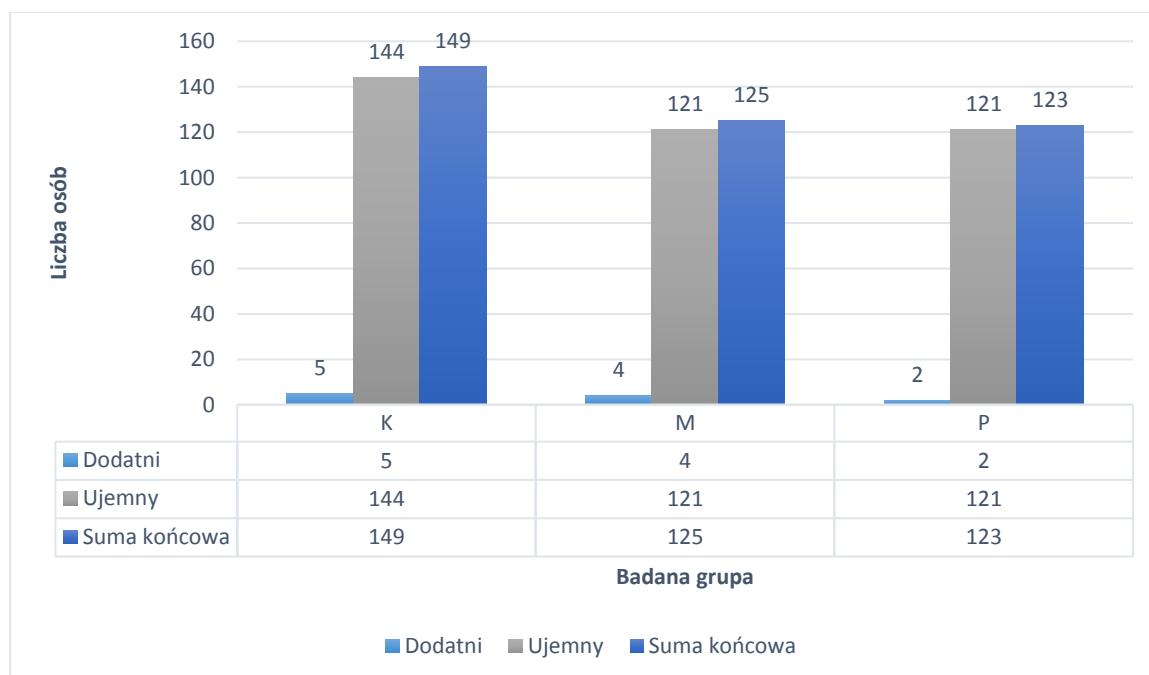
WYNIKI



Ryc. 11 Rozkład średnich wartości białka C (BC, inaczej PC) w grupie kontrolnej (K) i grupie matek pacjentów z WZK (M)

Antytrombina

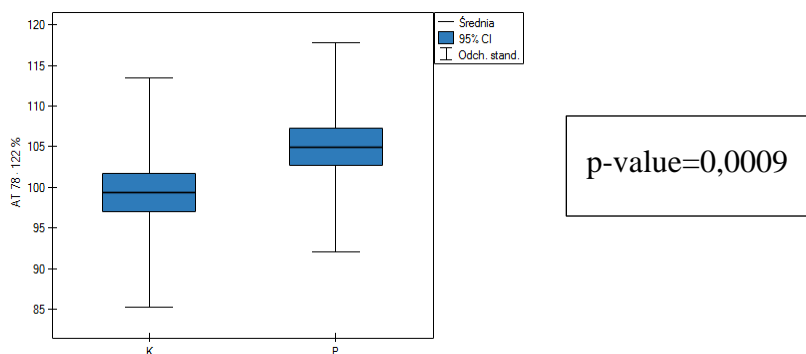
Obniżona aktywność antytrombiny ($AT < 78\%$) w badanych grupach została odnotowana: u 2 pacjentów z WZK i 4 matek pacjentów z WZK oraz u 5 kobiet z grupy kontrolnej. Na podstawie analizy danych testem dokładnym Fishera nie stwierdzono istotnych statycznie różnic między otrzymanymi wynikami w obrębie grupy pacjentów z WZK w porównaniu z grupą kontrolną oraz między grupą matek w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio $p\text{-value}=0,6941$; $p\text{-value}=0,7531$).



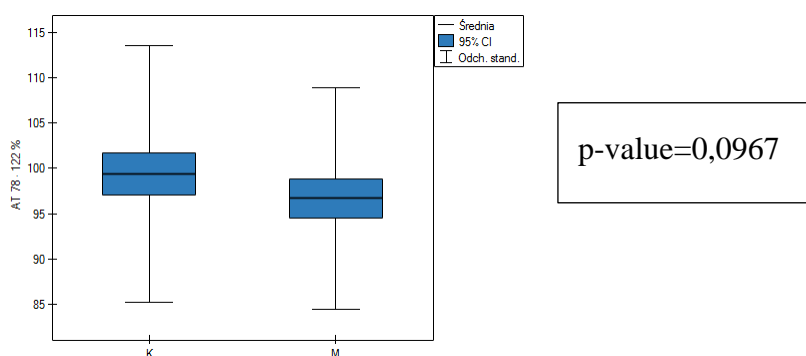
Ryc. 12 Wykres przedstawiający wyniki badania aktywności antytrombiny w poszczególnych grupach (P – pacjenci z WZK, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)

Test t-Studenta, oceniający wyniki aktywności AT uzyskane w grupach pacjentów z WZK w odniesieniu do grupy kontrolnej (Ryc. 13) wykazał, że średnia aktywność antytrombiny

w grupie pacjentów z WZK jest istotnie statystycznie wyższa ($p\text{-value}=0,0009$). Natomiast porównanie grupy matek z grupą kontrolną (Ryc. 14) wykazuje, że średnia aktywność antytrombiny w grupie matek jest nieistotnie statystycznie niższa ($p\text{-value}=0,0967$).



Ryc. 13 Rozkład średnich wartości antytrombiny (AT) w grupie kontrolnej (K) i w grupie pacjentów z WZK (P)

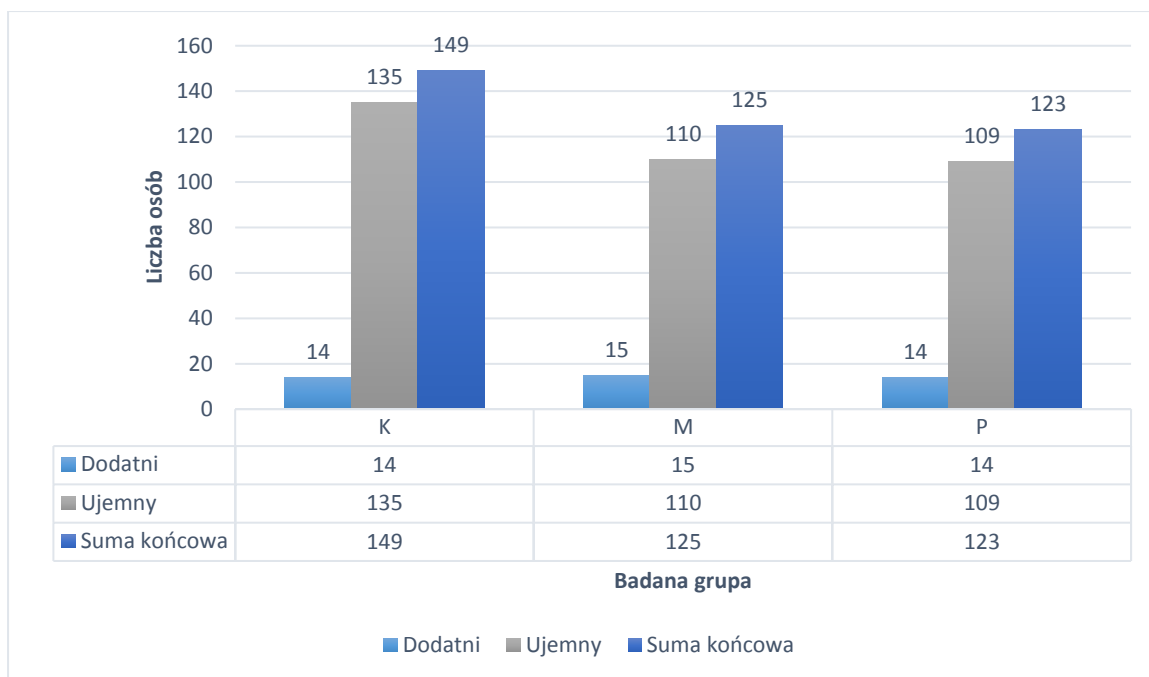


Ryc. 14 Rozkład średnich wartości antytrombiny (AT) w grupie kontrolnej (K) i grupie matek pacjentów z WZK (M)

Czynnik VIII układu krzepnięcia krwi

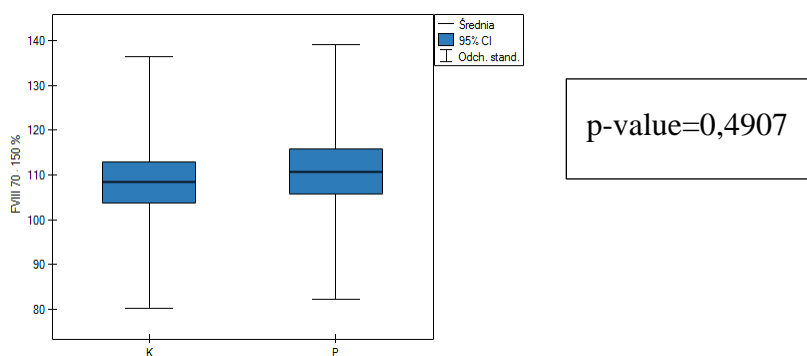
Podwyższona aktywność czynnika VIII ($FVIII >150\%$) została wykryta u zbliżonej liczby osób w każdej z badanych grup (u 14 pacjentów z WZK, 15 matek pacjentów z WZK i 14 kobiet z grupy kontrolnej). Test dokładny Fishera nie wykazał istotnych statystycznie różnic między rozkładem wyników dodatnich pomiędzy grupą probandów a grupą kontrolną ($p\text{-value}=1,0000$) oraz grupą matek a grupą kontrolną ($p\text{-value}=1,0000$).

WYNIKI

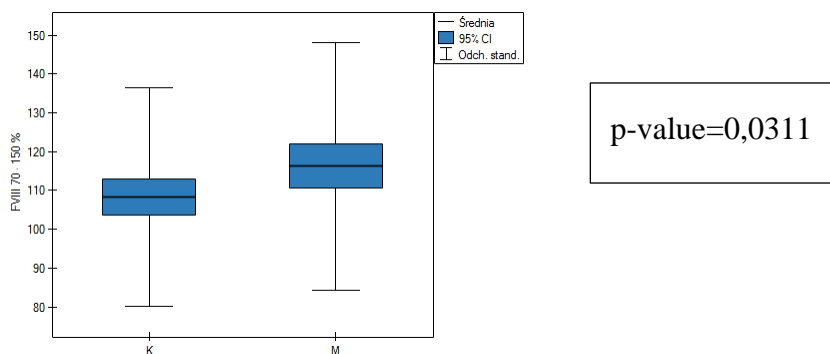


Ryc. 15 Wykres przedstawiający wyniki badań aktywności czynnika VIII w poszczególnych grupach (P – pacjenci z WZK, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)

Analiza statystyczna średniej aktywności czynnika VIII wykonana za pomocą testu t-Studenta pokazała, że w grupie pacjentów z WZK aktywność FVIII jest większa niż w grupie kontrolnej, co nie jest jednak istotne statystycznie ($p\text{-value}=0,4907$). W przypadku grupy matek aktywność ta jest istotnie statystycznie większa w porównaniu do grupy kontrolnej ($p\text{-value}=0,0311$).



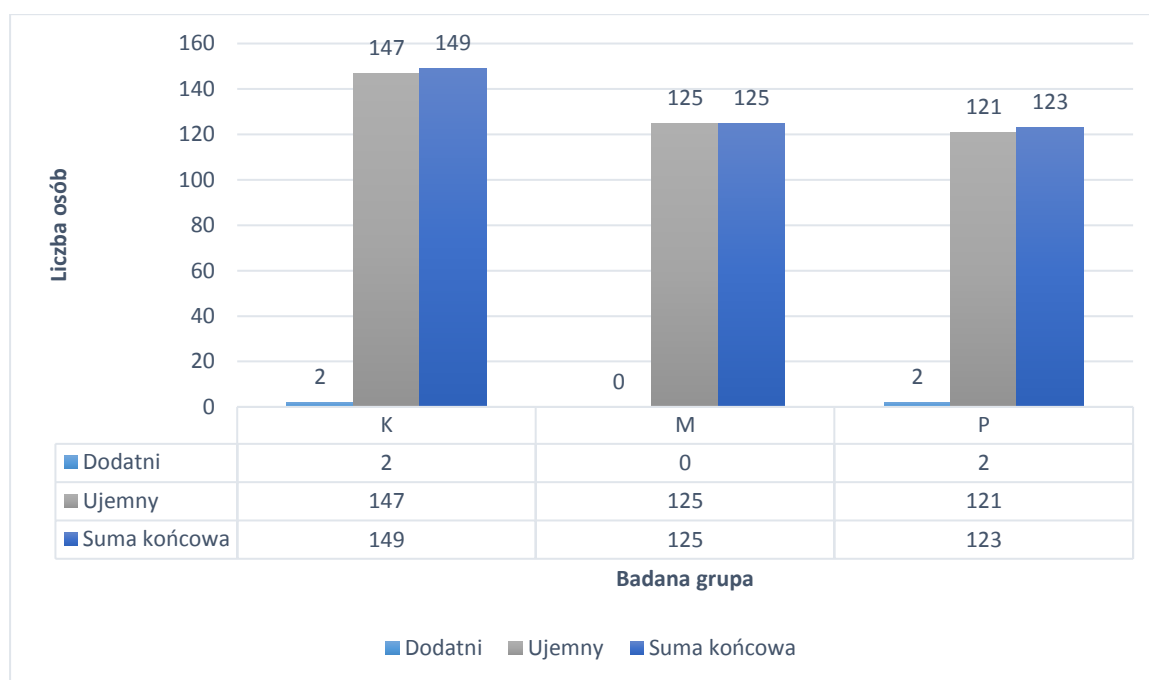
Ryc. 16 Rozkład średnich aktywności FVIII w grupie kontrolnej (K) i grupie pacjentów z WZK (P)



Ryc. 17 Rozkład średnich wartości aktywności FVIII w grupie kontrolnej (K) i grupie matek pacjentów z WZK (M)

Przeciwciała antyfosfolipidowe

Dodatknie przeciwciała antyfosfolipidowe (rozumiane jako obecność LA, ACA lub przeciwciała anti- $\beta 2$ GPI) wykryto u 2 pacjentów z WZK i u 2 kobiet z grupy kontrolnej, natomiast w grupie matek pacjentów z WZK nie odnotowano ani jednego wyniku dodatniego. Test dokładny Fishera nie wykazał istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami badanymi a grupą kontrolną (pacjenci z WZK vs. kontrola kobiet p-value=1,0000; matki pacjentów z WZK vs. kontrola kobiet p-value=0,5012).



Ryc. 18 Wykres przedstawiający częstość występowania zespołu antyfosfolipidowego w poszczególnych grupach (P – pacjenci z WZK, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)

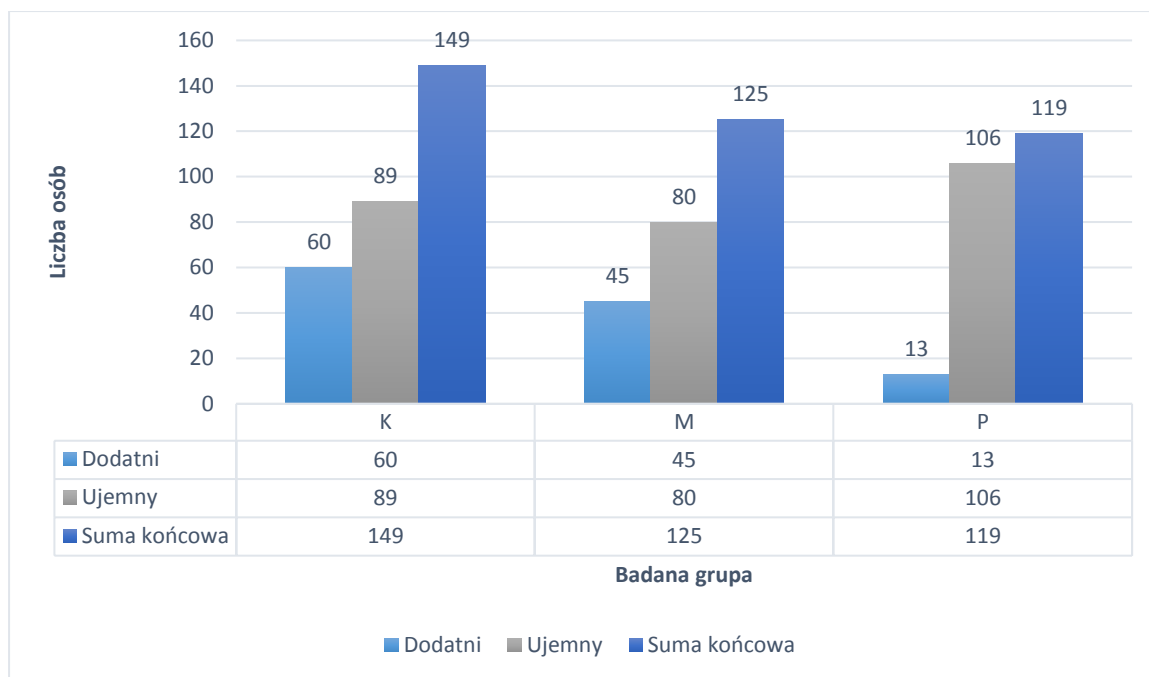
WYNIKI

4.3 Badania biochemiczne

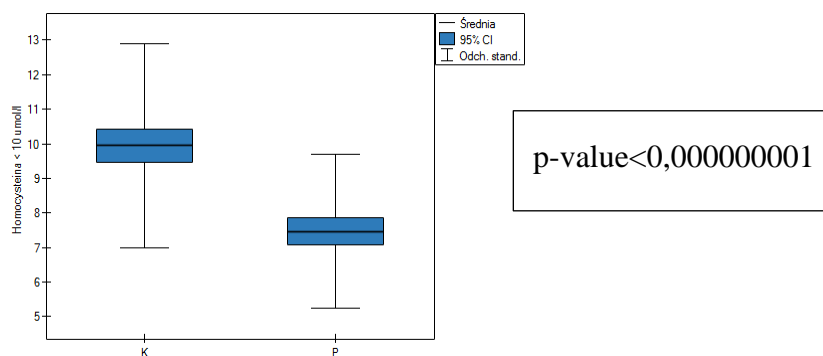
Ze względu na trudności w pozyskiwaniu materiału badawczego (brak zgody na pobranie krwi lub trudności techniczne związane z pobraniem krwi żyłnej), badania biochemiczne wykonano u 119 ze 137 pacjentów z WZK (u 18 nie wykonano badań), u 125 ze 134 matek pacjentów z WZK oraz u 149 kobiet ze 168 wchodzących w skład grupy kontrolnej. Badań nie wykonano w grupie dzieci, będącej grupą kontrolną, ze względu na konieczność pobierania relatywnie dużej ilości krwi. Rodzice dzieci zdrowych zazwyczaj nie wyrażali zgody na takie pobranie, w przeciwieństwie do rodziców dzieci dotkniętych WZK. W efekcie napotkanych trudności, zaprzestano analiz biochemicznych w grupie kontrolnej dzieci.

Homocysteina

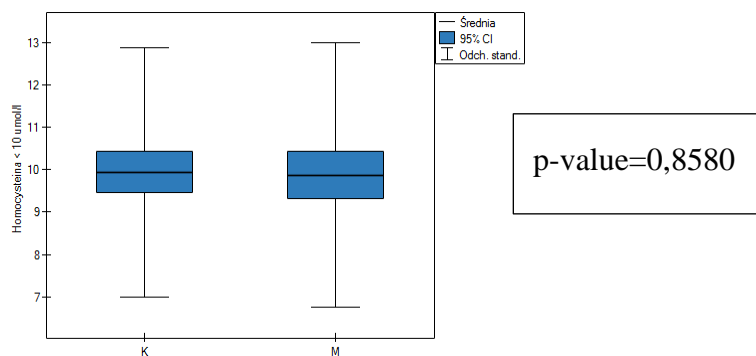
Stężenie homocysteiny powyżej zakresu wartości referencyjnych (tj. $> 10 \mu\text{mol/l}$) w wykonanych badaniach występuje częściej w grupie kontrolnej (u 40% kobiet), co jest szczególnie zauważalne w stosunku do grupy pacjentów z WZK (u 10%). Po wykonaniu testu t-Studenta również zauważalna jest znaczna różnica w średnim stężeniu homocysteiny w grupie pacjentów z WZK (oznaczenie dla wartości średniej $7,5 \mu\text{mol/l}$) w porównaniu do grupy matek pacjentów z WZK ($9,9 \mu\text{mol/l}$) i grupy kontrolnej ($9,9 \mu\text{mol/l}$). Różnica ta w przypadku grupy pacjentów z WZK jest istotna statystycznie ($p\text{-value} < 0,000000001$). Pomiędzy grupą matek pacjentów a grupą kontrolną odnotowano brak istotnej statystycznie różnicy ($p\text{-value} = 0,8580$). Test dokładny Fishera nie wykazał jednak istotnych statystycznie różnic w rozkładzie wyników dodatnich pomiędzy grupą pacjentów z WZK a grupą kontrolną ($p\text{-value} = 0,1167$) oraz pomiędzy matkami a grupą kontrolną ($p\text{-value} = 0,5347$).



Ryc. 19 Wykres przedstawiający wyniki badań stężenia homocysteiny w poszczególnych grupach (P – pacjenci z WZK, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)



Ryc. 20 Rozkład średnich stężeń homocysteiny w grupie kontrolnej (K) i grupie pacjentów z WZK (P)

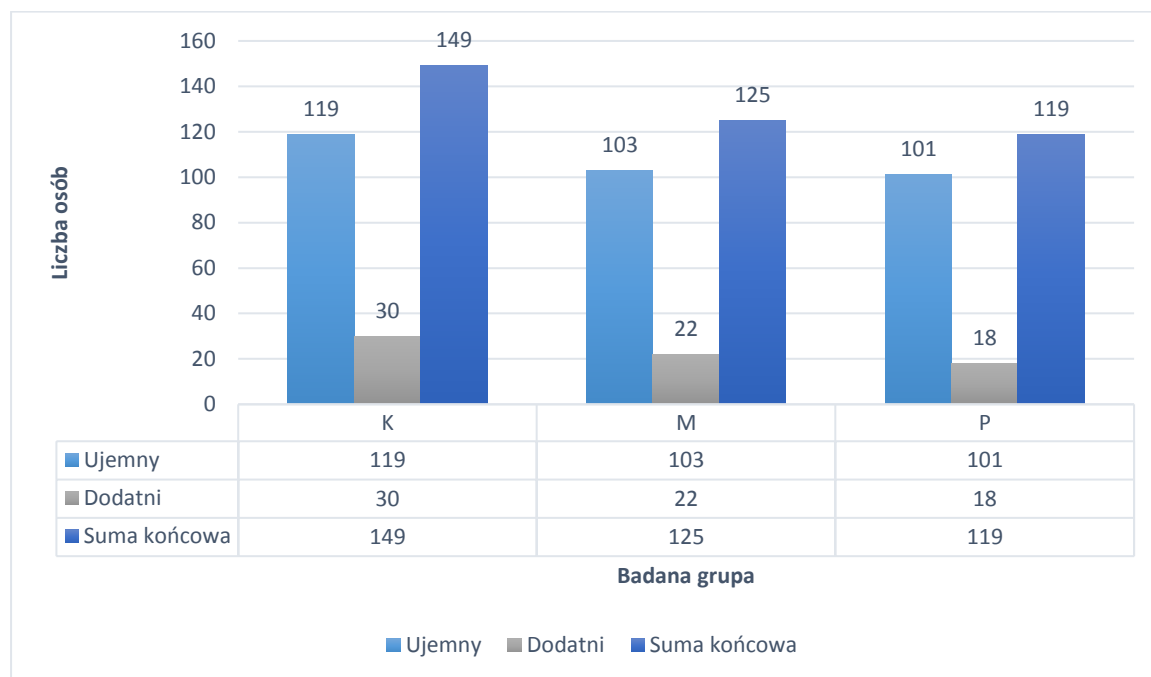


Ryc. 21 Rozkład średnich stężeń homocysteiny w grupie kontrolnej (K) i grupie matek pacjentów z WZK (P)

WYNIKI

Lipoproteina a

Wyniki podwyższonego stężenia lipoproteiny a ($Lp(a) > 0,2 \text{ g/L}$) odnotowano u około 20% osób w każdej z badanych grup. Test niezależności Chi-kwadrat nie wykazał jednak istotnych statystycznie różnic w rozkładzie wyników dodatnich pomiędzy grupą pacjentów z WZK a grupą kontrolną ($p\text{-value}=0,2487$) oraz pomiędzy matkami pacjentów z WZK a grupą kontrolną ($p\text{-value}=0,5577$).



Ryc. 22 Wykres przedstawiający wyniki badań stężenia lipoproteiny a w poszczególnych grupach (P – pacjenci z WZK, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)

Podczas analizy poszczególnych, wybranych pacjentów z WZK, u których stwierdzono niedobory białka C, antytrombiny oraz obecność prozakrzepowych wariantów FVL i $F2 \text{ c.*}97G>A$, zauważono, że zmiany te w 13 na 27 przypadków współistniały z dodatkowym zaburzeniem prozakrzepowym (tj. podwyższonym stężeniem homocysteiny, lipoproteiny a i/ lub zwiększoną aktywnością czynnika VIII) (Tabela 16). Natomiast w pozostałych 14 przypadkach zmiany te występowały pojedynczo.

Tabela 16 Dodatkowo wyniki badanych czynników prozakrzepowych u pacjentów z WZK i ich matek

Pacjent z WZK	Matka pacjenta z WZK	Zmiana
	P41-2	Białko C, FVIII
P44-1		Białko C, homocysteina
P57-1		Białko C
P59-1		Białko C
	P17-2	Antytrombina
	P36-2	Antytrombina, FVIII, lipoproteina a
P64-1		Antytrombina
P68-1		Antytrombina, FVIII
	P97-2	Antytrombina, homocysteina
	P108-2	Antytrombina, FVL
P15-1		APS
P45-1		APS
	P45-2	FVL
<u>P7-1</u>		<u>FVL</u>
	P7-2	<u>FVL</u> , homocysteina, lipoproteina a
<u>P14-1</u>		<u>FVL</u>
	P14-2	<u>FVL</u> , homocysteina, lipoproteina a
P30-1		FVL, F2 c.*97G>A
	P37-2	FVL, F2 c.*97G>A, lipoproteina a
P38-1		FVL, F2 c.*97G>A
P47-1		FVL
P61-1		FVL
P114-1		FVL
P84-2		F2 c.*97G>A
P93-1		F2 c.*97G>A
P115-2		F2 c.*97G>A
P134-1		F2 c.*97G>A

WYNIKI

4.4 Badania z wykorzystaniem metod biologii molekularnej

W grupie pacjentów z WZK dla 2 z 12 analizowanych wariantów pojedynczego nukleotydu (SNV) rozkłady genotypów nie wykazały zgodności z prawem równowagi Hardy’ego-Weinberga – c.-463G>A oraz c.-156C>T w genie *FGB* (p-value<0,05). W pozostałych grupach wszystkie badane SNVs, na poziomie istotności 0,05, nie wykazały istotnych odchyleń od prawa Hardy’ego-Weinberga (p-value>0,05).

Tabela 17 Pacjenci i grupa kontrolna dzieci zdrowych – test na równowagę Hardy’ego-Weinberga

Badany SNV	p-value	
	Pacjenci	Kontrole
<i>FGB</i> c.-862G>A	0,1808	0,5657
<i>FGB</i> c.-463G>A	0,0283	0,2142
<i>FGB</i> c.-156C>T	0,0283	0,2142
<i>FGB</i> c.1433G>A	0,0625	0,0581
<i>F2</i> c.*97G>A	1,0000	1,0000
<i>F5</i> c.1601G>A	1,0000	1,0000
<i>F7</i> c.1238G>A	0,3819	0,4944
<i>F12</i> c.-4C>T	0,1161	0,6706
<i>F13A1</i> c.103G>T	0,8706	0,3465
<i>ITGB3</i> c.176T>C	0,2485	0,3366
<i>MTHFR</i> c.665C>T	0,6284	0,9515
<i>MTHFR</i> c.1286A>C	0,8045	0,0913

Tabela 18 Matki pacjentów z WZK i grupa kontrolna kobiet – test na równowagę Hardy’ego-Weinberga

Badany SNV	p-value	
	Matki	Kontrole
<i>FGB</i> c.-862G>A	1,0000	0,6035
<i>FGB</i> c.-463G>A	0,0500	0,0500
<i>FGB</i> c.-156C>T	0,0500	0,0500
<i>FGB</i> c.1433G>A	0,0516	0,0888
<i>F2</i> c.*97G>A	1,0000	1,0000
<i>F5</i> c.1601G>A	1,0000	1,0000
<i>F7</i> c.1238G>A	0,9179	0,9089
<i>F12</i> c.-4C>T	0,9529	0,9245
<i>F13A1</i> c.103G>T	0,9559	0,3582
<i>ITGB3</i> c.176T>C	0,9154	0,0627
<i>MTHFR</i> c.665C>T	0,3227	0,3507
<i>MTHFR</i> c.1286A>C	0,6122	0,6053

Analiza statystyczna częstości występowania alleli rzadszych (MAF, ang. *minor allele frequency*) w grupie kontrolnej wykazała, że najrzadziej występowały następujące warianty: c.97*>A w obrębie genu *F2* (1%) oraz FVL w genie *F5* (3%). Pozostałe badane SNVs występowały z częstością powyżej 11%.

Tabela 19 Częstość występowania alleli rzadszych w grupie kontrolnej (MAF)

Badany SNV	Allel	MAF
<i>FGB</i> c.-862G>A	G/A	0,13
<i>FGB</i> c.-463G>A	G/A	0,26
<i>FGB</i> c.-156C>T	C/T	0,26
<i>FGB</i> c.1433G>A	G/A	0,24
<i>F2</i> c.*97G>A	G/A	0,01
<i>F5</i> c.1601G>A	G/A	0,03
<i>F7</i> c.1238G>A	G/A	0,11
<i>F12</i> c.-4C>T	C/T	0,35
<i>F13A1</i> c.103G>T	G/T	0,31
<i>ITGB3</i> c.176T>C	G/A	0,15
<i>MTHFR</i> c.665C>T	C/T	0,30
<i>MTHFR</i> c.1286A>C	A/C	0,29

Badania molekularne wykonano dla 136 pacjentów z 137 (od jednego pacjenta nie można było pobrać zarówno krwi jak i wymazu z policzka/ śliny), u 134 matek pacjentów z WZK, 178 dzieci z grupy kontrolnej oraz u 168 kobiet z grupy kontrolnej. W pojedynczych przypadkach, ze względu na brak materiału genetycznego, oznaczenia SNVs nie mogły być wykonane.

Analiza statystyczna SNVs przy wykorzystaniu testu Chi-kwadrat dla trendu wykazała istotne statystycznie różnice w rozkładzie genotypów między grupą pacjentów z WZK a grupą kontrolną dzieci (p-value=0,0414) oraz między grupą matek pacjentów z WZK a grupą kontrolną kobiet (p-value=0,0057) dla wariantu c.-4C>T w genie *F12* (Tabela 20). Częstość występowania heterozygot CT była większa w grupach kontrolnych dzieci i kobiet (odpowiednio 0,47 i 0,45) niż w grupach pacjentów z WZK i matek (odpowiednio 0,35 i 0,37) (Tabela 27). Przy założeniu dominującego modelu dziedziczenia obliczony OR dla c.-4C>T w genie *F12* wynosił dla grupy pacjentów z WZK vs. grupa kontrolna dzieci 0,565 (95% CI 0,360-0,888; p-value=0,0129), natomiast w grupach matek

WYNIKI

dzieci z WZK- grupa kontrolna kobiet OR wyniósł 0,559 (95% CI 0,353-0,884; p-value=0,0125) (Tabele 21 i 22). Wykazano istotne statystycznie różnice także dla rozkładu genotypów wariantu c.665C>T w *MTHFR* w grupie pacjentów z WZK w porównaniu do grupy kontrolnej (Tabela 20). Częstość występowania heterozygot CT była większa w grupie pacjentów z WZK niż w grupie kontrolnej (odpowiednio 0,46 i 0,37), podobnie w przypadku homozygot (odpowiednio 0,09 i 0,05) (Tabela 29). Jednak OR obliczony dla wariantu c.665C>T w *MTHFR* przy założeniu modelu dominującego wynosił dla grupy pacjentów z WZK vs. grupa kontrolna dzieci 1,689 (95% CI 1,076-2,649; p-value=0,0222) (Tabela 21). Po przyjęciu w przeprowadzonych analizach statystycznych poprawki Bonferroniego dla porównań wielokrotnych ($\alpha=0,05/12$), nie wykazano istotnej różnicy w rozkładach badanych genotypów między grupami badanymi a kontrolnymi.

Tabela 20 Porównanie częstości genotypów w grupach badanych i kontrolnych

SNV	Pacjenci z WZK i zdrowe dzieci			Matki pacjentów z WZK i kontrole kobiet		
	Pacjenci z WZK	Kontrole dzieci	p-value	Matki pacjentów z WZK	Kontrole kobiet	p-value
<i>FGB</i> c.-862G>A	0 / 28 / 108	4 / 39 / 134	0,2511	0 / 25 / 108	2 / 36 / 130	0,3122
<i>FGB</i> c.-463G>A	13 / 41 / 82	18 / 66 / 94	0,2906	5 / 61 / 66	4 / 68 / 96	0,1867
<i>FGB</i> c.-156C>T	13 / 41 / 82	18 / 66 / 94	0,2906	5 / 61 / 66	4 / 68 / 96	0,1867
<i>FGB</i> c.1433G>A	12 / 42 / 82	18 / 60 / 99	0,4512	4 / 58 / 71	4 / 64 / 100	0,2883
<i>F2</i> c.*97G>A	0 / 4 / 132	0 / 3 / 175	0,4552	0 / 3 / 131	0 / 2 / 166	0,4781
<i>F5</i> c.1601G>A	0 / 7 / 129	0 / 13 / 165	0,4382	0 / 5 / 129	0 / 6 / 162	0,9413
<i>F7</i> c.1238G>A	2 / 21 / 113	1 / 34 / 142	0,6826	1 / 20 / 112	2 / 34 / 132	0,2165
<i>F12</i> c.-4C>T	14 / 47 / 75	21 / 84 / 73	0,0414*	8 / 50 / 76	21 / 76 / 71	0,0057*
<i>F13A1</i> c.103G>T	11 / 54 / 71	20 / 71 / 87	0,3903	8 / 49 / 77	18 / 66 / 84	0,1037
<i>ITGB3</i> c.176T>C	5 / 32 / 99	3 / 52 / 122	0,7496	3 / 35 / 95	6 / 34 / 128	0,5643
<i>MTHFR</i> c.665C>T	13 / 62 / 61	10 / 65 / 103	0,0177*	11 / 63 / 60	19 / 83 / 66	0,2499
<i>MTHFR</i> c.1286A>C	14 / 57 / 64	22 / 66 / 88	0,9527	12 / 60 / 61	11 / 69 / 88	0,2184

Kolejność genotypów dd/Dd/DD (d – allel rzadszy)

*wyniki nieistotne statystycznie po zastosowaniu korekty na wielokrotne testowanie, p>0,0042

Tabela 21 Analiza ilorazu szans (OR) w modelu dominującym i recesywnym dla wariantów typu SNV genów badanych w grupie pacjentów z WZK i w grupie dzieci zdrowych

SNV	Liczba genotypów ^b		Model dominujący ^c		Model recesywny ^d	
	Pacjenci z WZK	Kontrole dzieci	Iloraz szans OR (95% CI)	p-value	Iloraz szans OR (95% CI)	p-value
<i>FGB c.-862G>A</i>	0 / 28 / 108	4 / 39 / 134	0,808 [0,471-1,385]	0,4378	0,141 [0,008-2,646]	0,0777
<i>FGB c.-463G>A</i>	13 / 41 / 82	18 / 66 / 94	0,737 [0,469-1,158]	0,1854	0,939 [0,443-1,991]	0,8706
<i>FGB c.-156C>T</i>	13 / 41 / 82	18 / 66 / 94	0,737 [0,469-1,158]	0,1854	0,939 [0,443-1,991]	0,8706
<i>FGB c.1433G>A</i>	12 / 42 / 82	18 / 60 / 99	0,836 [0,531-1,316]	0,4386	0,855 [0,397-1,841]	0,6885
<i>F2 c.*97G>A</i>	0 / 4 / 132	0 / 3 / 175	1,768 [0,389-8,033]	0,4552	1,308 [0,026-66,322]	1,0000 ^f
<i>F5 c.1601G>A</i>	0 / 7 / 129	0 / 13 / 165	0,689 [0,267-1,776]	0,4382	1,308 [0,026-66,322]	1,0000 ^f
<i>F7 c.1238G>A</i>	2 / 21 / 113	1 / 34 / 142	0,826 [0,462-1,477]	0,5183	2,627 [0,236-29,275]	0,4150
<i>F12 c.-4C>T</i>	14 / 47 / 75	21 / 84 / 73	0,565 [0,360-0,888]	0,0129	0,858 [0,419-1,756]	0,6748
<i>F13A1 c.103G>T</i>	11 / 54 / 71	20 / 71 / 87	0,875 [0,560-1,368]	0,5588	0,695 [0,321-1,505]	0,3542
<i>ITGB3 c.176T>C</i>	5 / 32 / 99	3 / 52 / 122	0,829 [0,506-1,359]	0,4566	2,214 [0,520-9,430]	0,2709
<i>MTHFR c.665C>T</i>	13 / 62 / 61	10 / 65 / 103	1,689 [1,076-2,649]	0,0222	1,776 [0,754-4,182]	0,1842
<i>MTHFR c.1286A>C</i>	14 / 57 / 64	22 / 66 / 88	1,109 [0,708-1,738]	0,6503	0,810 [0,398-1,649]	0,5607

^b Kolejność genotypów dd/Dd/DD (d – allel rzadszy)

^c Model dominujący: dd+Dd vs. DD;

^d Model recesywny: dd vs. Dd+DD;

^f Test dokładny Fishera

Tabela 22 Analiza ilorazu szans (OR) w modelu dominującym i recesywnym dla wariantów typu SNV genów badanych w grupie matek pacjentów z WZK i w grupie zdrowych kobiet

SNV	Liczba genotypów ^b		Model dominujący ^c		Model recesywny ^d	
	Matki pacjentów z WZK	Kontrole-kobiety	Iloraz szans OR (95% CI)	p-value	Iloraz szans OR (95% CI)	p-value
<i>FGB c.-862G>A</i>	0 / 25 / 108	2 / 36 / 130	0,792 [0,450-1,394]	0,4182	0,249 [0,012-5,240]	0,5051 ^f
<i>FGB c.-463G>A</i>	5 / 61 / 66	4 / 68 / 96	1,333 [0,843-2,108]	0,2179	1,614 [0,425-6,134]	0,4783
<i>FGB c.-156C>T</i>	5 / 61 / 66	4 / 68 / 96	1,333 [0,843-2,108]	0,2179	1,614 [0,425-6,134]	0,4783
<i>FGB c.1433G>A</i>	4 / 58 / 71	4 / 64 / 100	1,284 [0,811-2,033]	0,2855	1,271 [0,312-5,181]	0,7372
<i>F2 c.*97G>A</i>	0 / 3 / 131	0 / 2 / 166	1,901 [0,313-11,543]	0,4781	1,253 [0,025-63,551]	1,0000 ^f
<i>F5 c.1601G>A</i>	0 / 5 / 129	0 / 6 / 162	1,047 [0,312-3,506]	0,9413	1,253 [0,025-63,551]	1,0000 ^f
<i>F7 c.1238G>A</i>	1 / 20 / 112	2 / 34 / 132	0,688 [0,380-1,245]	0,2150	0,629 [0,056-7,010]	0,7036
<i>F12 c.-4C>T</i>	8 / 50 / 76	21 / 76 / 71	0,559 [0,353-0,884]	0,0125	0,444 [0,190-1,038]	0,0557
<i>F13A1 c.103G>T</i>	8 / 49 / 77	18 / 66 / 84	0,740 [0,469-1,169]	0,1965	0,529 [0,223-1,258]	0,1442
<i>ITGB3 c.176T>C</i>	3 / 35 / 95	6 / 34 / 128	1,280 [0,763-2,147]	0,3491	0,623 [0,153-2,539]	0,5056
<i>MTHFR c.665C>T</i>	11 / 63 / 60	19 / 83 / 66	0,798 [0,504-1,264]	0,3364	0,701 [0,321-1,530]	0,3708
<i>MTHFR c.1286A>C</i>	12 / 60 / 61	11 / 69 / 88	1,298 [0,823-2,049]	0,2615	1,415 [0,604-3,318]	0,4222

^b Kolejność genotypów dd/Dd/DD (d – allel rzadszy)

^c Model dominujący: dd+Dd vs. DD;

^d Model recesywny: dd vs. Dd+DD;

^f Test dokładny Fishera

WYNIKI

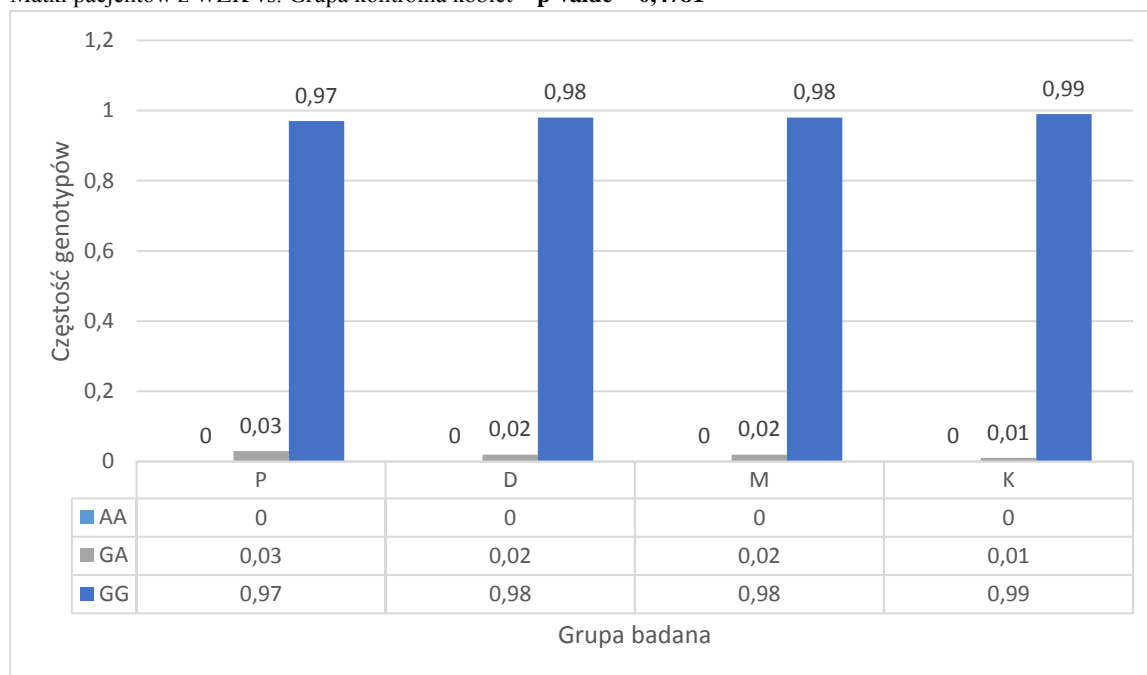
F2 c.*97G>A (g. 20210G>A)

Tabela 23 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.*97G>A genu F2 w badanych grupach

Grupa badana	n	Genotypy			Allele		
		GG	GA	AA	G	A	
Pacjenci z WZK	136	n	132	4	0	268	4
		Częstość	0,97	0,03	0	0,99	0,01
Grupa kontrolna dzieci	178	n	175	3	0	353	3
		Częstość	0,98	0,02	0	0,99	0,01
Matki pacjentów z WZK	134	n	131	3	0	265	3
		Częstość	0,98	0,02	0	0,99	0,01
Grupa kontrolna kobiet	168	n	166	2	0	334	2
		Częstość	0,99	0,01	0	0,99	0,01

Pacjenci z WZK vs. Grupa kontrolna dzieci – **p-value = 0,4552**

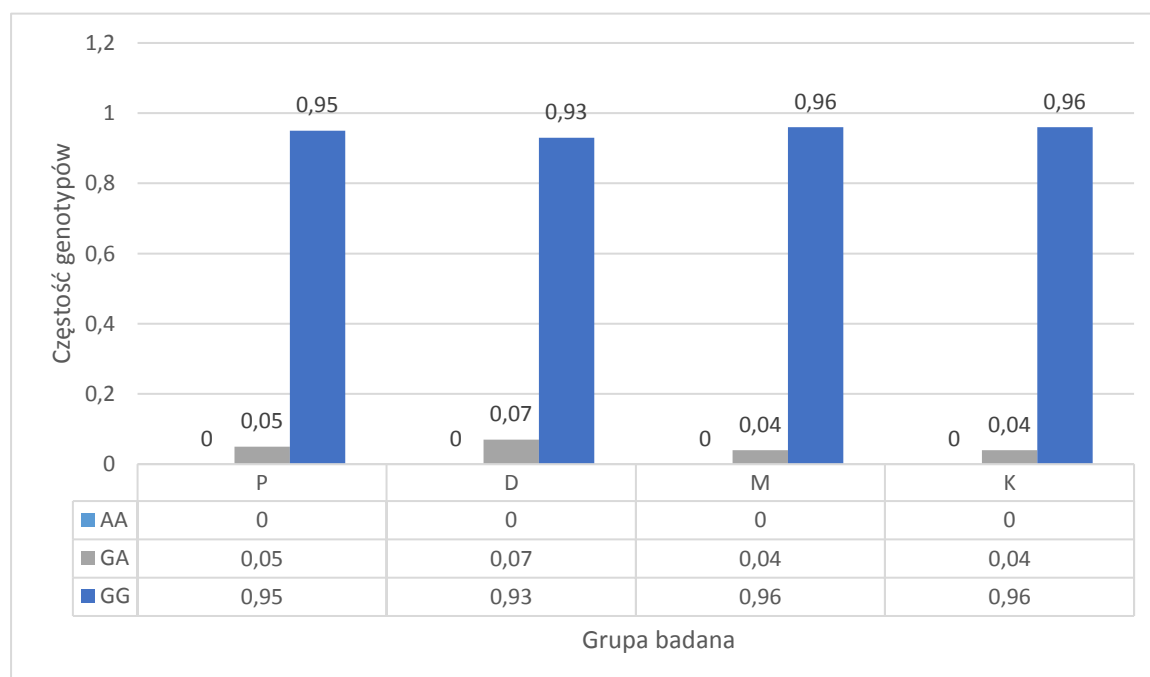
Matki pacjentów z WZK vs. Grupa kontrolna kobiet – **p-value = 0,4781**



Ryc. 23 Wykres przedstawiający częstość genotypów *97GG, *97GA oraz *97AA w genie F2 w badanych grupach (P – pacjenci z WZK, D – dzieci - grupa kontrolna, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)

F5 c.1601G>A (zwyczajowo opisywany jako c.1691G>A)Tabela 24 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.1601G>A genu *F5* w badanych grupach

Grupa		Genotypy				Allele	
	n		GG	GA	AA	G	A
Pacjenci z WZK	136	n	129	7	0	265	7
		Częstość	0,95	0,05	0	0,97	0,03
Grupa kontrolna dzieci	178	n	165	13	0	343	13
		Częstość	0,93	0,07	0	0,96	0,04
Matki pacjentów z WZK	134	n	129	5	0	263	5
		Częstość	0,96	0,04	0	0,98	0,02
Grupa kontrolna kobiet	168	n	162	6	0	330	6
		Częstość	0,96	0,04	0	0,98	0,02

Pacjenci z WZK vs. Grupa kontrolna dzieci – **p-value = 0,4382**Matki pacjentów z WZK vs. Grupa kontrolna kobiet – **p-value = 0,9413**Ryc. 24 Wykres przedstawiający rozkład genotypów 1601GG, 1601GA oraz 1601AA w genie *F5* w badanych grupach (P – pacjenci z WZK, D – dzieci - grupa kontrolna, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)

WYNIKI

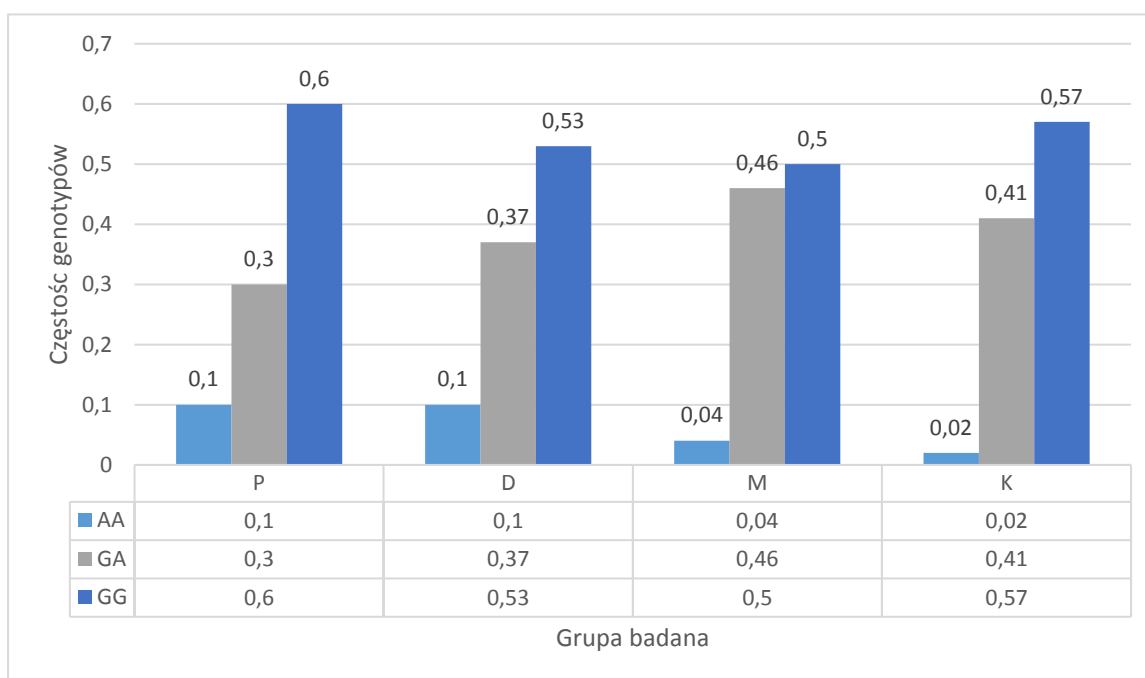
FGB c.-463G>A

Tabela 25 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.-463G>A genu *FGB* w badanych grupach

Grupa	n	Genotypy			Allele		
		GG	GA	AA	G	A	
Pacjenci z WZK	136	n	82	41	13	202	67
		Częstość	0,60	0,30	0,10	0,75	0,25
Grupa kontrolna dzieci	178	n	94	66	18	254	102
		Częstość	0,53	0,37	0,10	0,71	0,29
Matki pacjentów z WZK	132	n	66	61	5	193	71
		Częstość	0,50	0,46	0,04	0,73	0,27
Grupa kontrolna kobiet	168	n	96	68	4	260	76
		Częstość	0,57	0,41	0,02	0,77	0,23

Pacjenci z WZK vs. Grupa kontrolna dzieci – **p-value = 0,2906**

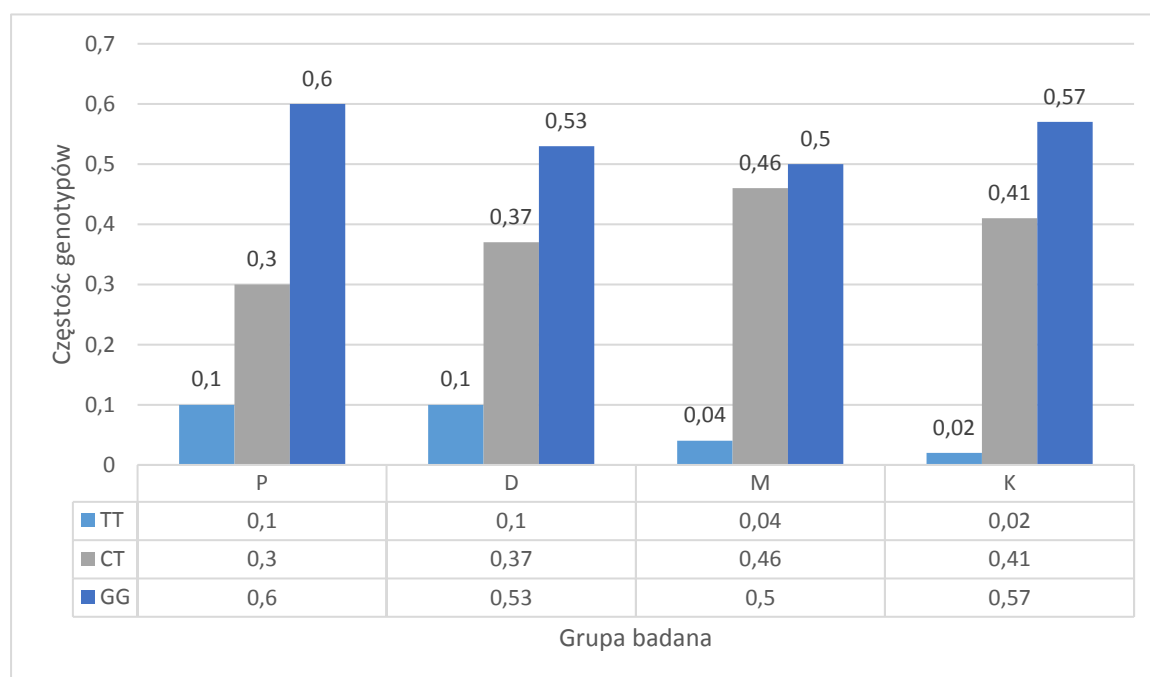
Matki pacjentów z WZK vs. Grupa kontrolna kobiet – **p-value = 0,1867**



Ryc. 25 Wykres przedstawiający rozkład genotypów -463GG, -463GA oraz -463AA w genie *FGB* w badanych grupach (P – pacjenci z WZK, D – dzieci - grupa kontrolna, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)

***FGB* c.-156C>T**Tabela 26 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.-156C>T genu *FGB* w badanych grupach

Grupa	N	Genotypy			Allele		
			CC	CT	TT	C	T
Pacjenci z WZK	136	n	82	41	13	202	67
		Częstość	0,60	0,30	0,10	0,75	0,25
Grupa kontrolna dzieci	178	n	94	66	18	254	102
		Częstość	0,53	0,37	0,10	0,71	0,29
Matki pacjentów z WZK	132	n	66	61	5	193	71
		Częstość	0,50	0,46	0,04	0,73	0,27
Grupa kontrolna kobiet	168	n	96	68	4	260	76
		Częstość	0,57	0,41	0,02	0,77	0,23

Pacjenci z WZK vs. Grupa kontrolna dzieci – **p-value = 0,2906**Matki pacjentów z WZK vs. Grupa kontrolna kobiet – **p-value = 0,1867**Ryc. 26 Wykres przedstawiający rozkład genotypów -156CC, -156CT oraz -156TT genu *FGB* w badanych grupach (P – pacjenci z WZK, D – dzieci - grupa kontrolna, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)

WYNIKI

F12 c.-4C>T

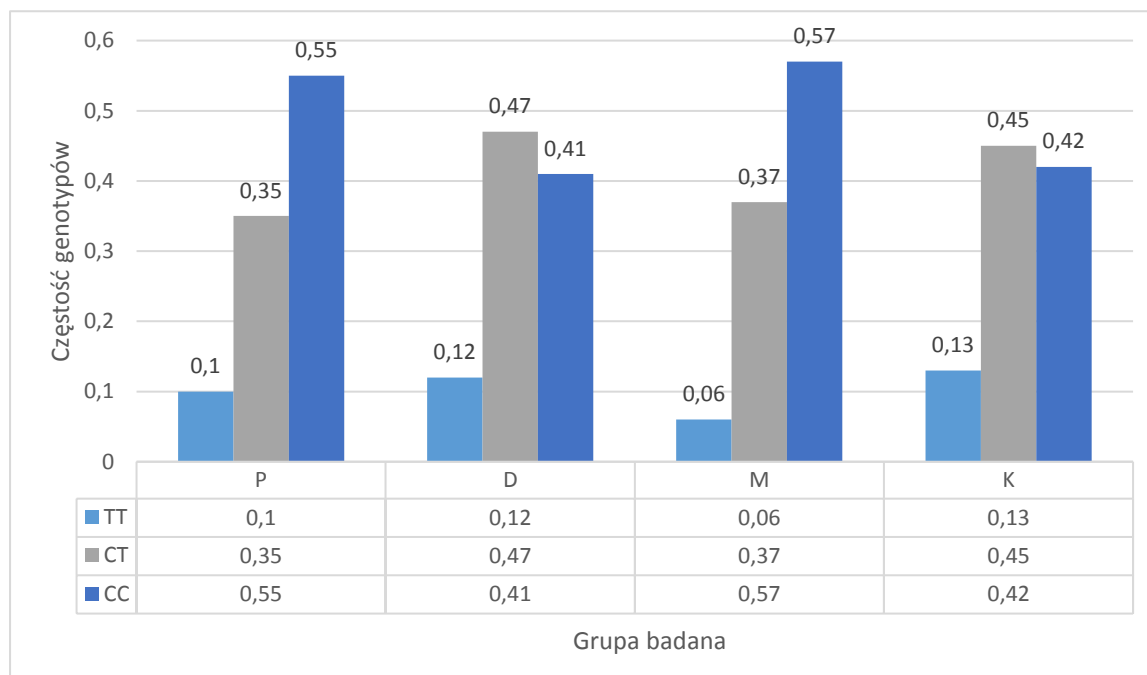
Tabela 27 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.-4C>T genu *F12* w badanych grupach

Grupa		Genotypy				Allele	
	n	CC	CT	TT	C	T	
Pacjenci z WZK	136	75	47	14	195	75	
	Częstość	0,55	0,35	0,10	0,72	0,28	
Grupa kontrolna dzieci	178	73	84	21	230	126	
	Częstość	0,41	0,47	0,12	0,65	0,35	
Matki pacjentów z WZK	134	76	50	8	202	66	
	Częstość	0,57	0,37	0,06	0,75	0,25	
Grupa kontrolna kobiet	168	71	76	21	218	118	
	Częstość	0,42	0,45	0,13	0,65	0,35	

Pacjenci z WZK vs. Grupa kontrolna dzieci – **p-value = 0,0414***

Matki pacjentów z WZK vs. Grupa kontrolna kobiet – **p-value = 0,0057***

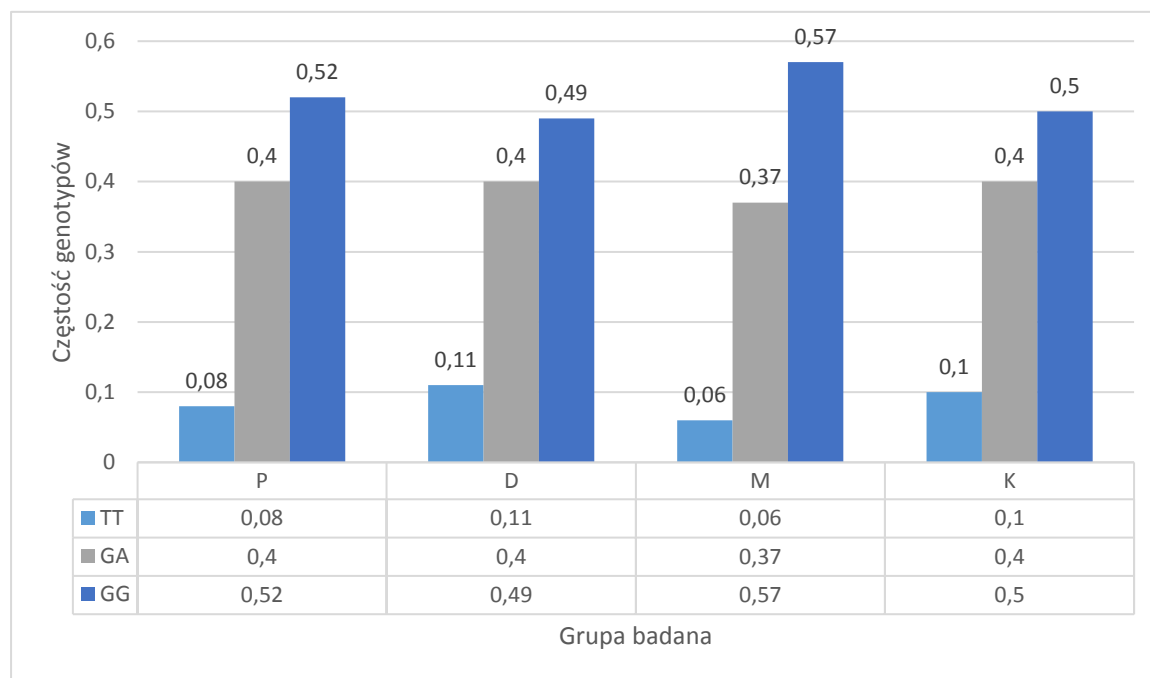
*wyniki nieistotne statystycznie po zastosowaniu korekty na wielokrotne testowanie, >0,0042



Ryc. 27 Wykres przedstawiający częstość genotypów -4CC, -4CT oraz -4TT w genie *F12* w badanych grupach (P – pacjenci z WZK, D – dzieci - grupa kontrolna, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)

F13A1 c.103G>TTabela 28 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.103G>T genu *F13A1* w badanych grupach

Grupa		Genotypy				Allele	
	N		GG	GT	TT	G	T
Pacjenci z WZK	136	n	71	54	11	196	76
		Częstość	0,52	0,40	0,08	0,72	0,28
Grupa kontrolna dzieci	178	n	87	71	20	245	111
		Częstość	0,49	0,40	0,11	0,69	0,31
Matki pacjentów z WZK	134	n	77	49	8	203	65
		Częstość	0,57	0,37	0,06	0,76	0,24
Grupa kontrolna kobiet	168	n	84	66	18	234	102
		Częstość	0,50	0,40	0,10	0,70	0,30

Pacjenci z WZK vs. Grupa kontrolna dzieci – **p-value = 0,3903**Matki pacjentów z WZK vs. Grupa kontrolna kobiet – **p-value = 0,1037**Ryc. 28 Wykres przedstawiający częstość genotypów 103GG, 103GT oraz 103TT w genie *F13A1* w badanych grupach (P – pacjenci z WZK, D – dzieci - grupa kontrolna, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)

WYNIKI

MTHFR c.665C>T (zwyczajowo opisywany jako c.677C>T)

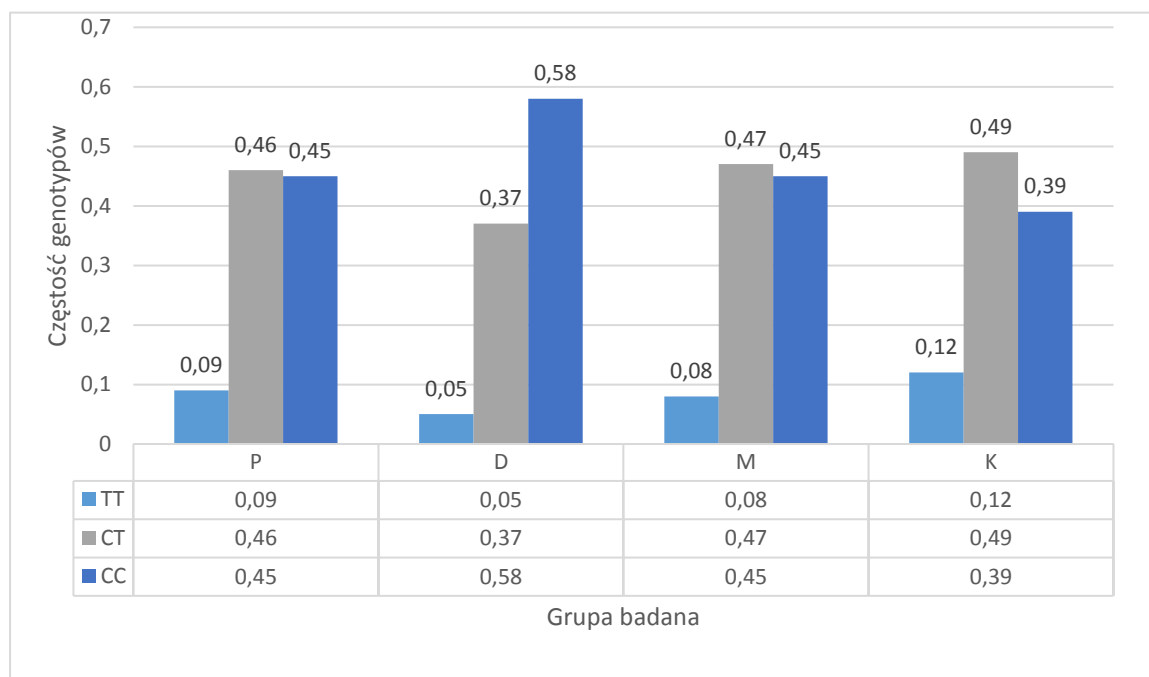
Tabela 29 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.665C>T genu *MTHFR* w badanych grupach

Grupa		Genotypy				Allele	
	n		CC	CT	TT	C	T
Pacjenci z WZK	136	n	61	62	13	184	88
		Częstość	0,45	0,46	0,09	0,68	0,32
Grupa kontrolna dzieci	178	n	103	65	10	271	85
		Częstość	0,58	0,37	0,05	0,76	0,24
Matki pacjentów z WZK	134	n	60	63	11	183	85
		Częstość	0,45	0,47	0,08	0,68	0,32
Grupa kontrolna kobiet	168	n	66	83	19	215	121
		Częstość	0,39	0,49	0,12	0,64	0,36

Pacjenci z WZK vs. Grupa kontrolna dzieci – **p-value = 0,0177***

Matki pacjentów z WZK vs. Grupa kontrolna kobiet – **p-value = 0,2499**

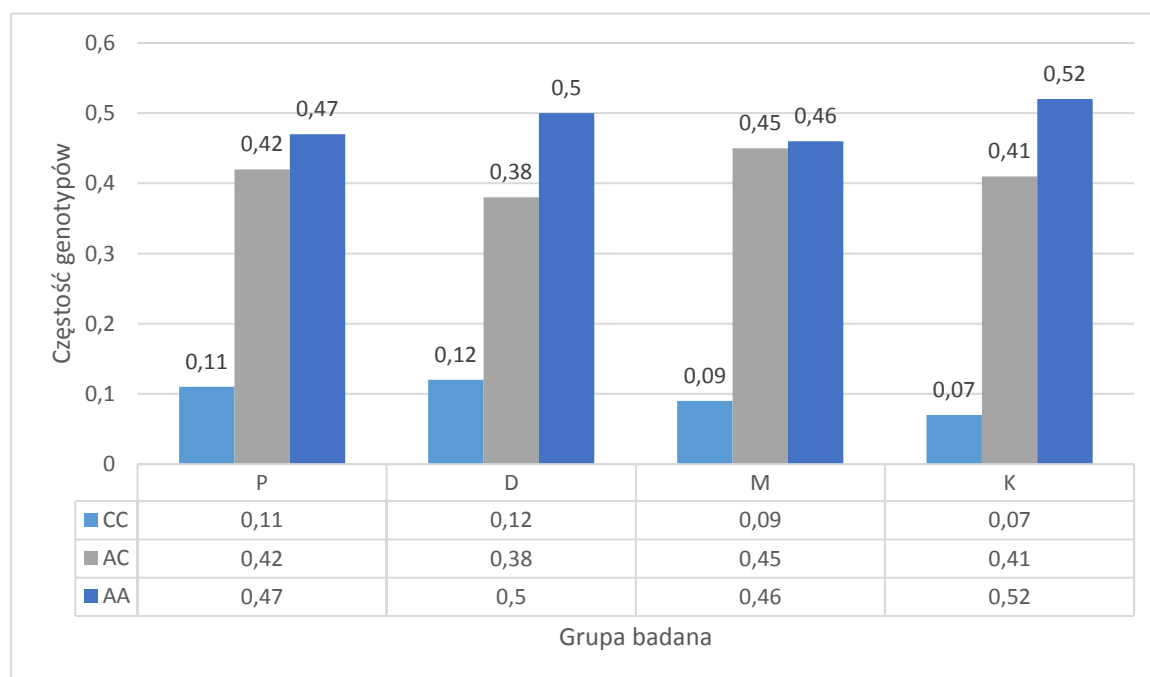
*wyniki nieistotne statystycznie po zastosowaniu korekty na wielokrotne testowanie, $p > 0,0042$



Ryc. 29 Wykres przedstawiający częstość genotypów 665CC, 665CT oraz 665TT w genie *MTHFR* w badanych grupach (P – pacjenci z WZK, D – dzieci - grupa kontrolna, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)

MTHFR c.1286A>C (zwyczajowo opisywany jako c.1298A>C)Tabela 30 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.1286A>C genu *MTHFR* w badanych grupach

Grupa		Genotypy				Allele	
	N		AA	AC	CC	A	C
Pacjenci z WZK	135	n	64	57	14	185	85
		Częstość	0,47	0,42	0,11	0,69	0,31
Grupa kontrolna dzieci	176	n	88	66	22	242	110
		Częstość	0,50	0,38	0,12	0,69	0,31
Matki pacjentów z WZK	133	n	61	60	12	182	84
		Częstość	0,46	0,45	0,09	0,68	0,32
Grupa kontrolna kobiet	168	n	88	69	11	245	91
		Częstość	0,52	0,41	0,07	0,73	0,27

Pacjenci z WZK vs. Grupa kontrolna dzieci – **p-value = 0,9527**Matki pacjentów z WZK vs. Grupa kontrolna kobiet – **p-value = 0,2184**Ryc. 30 Wykres przedstawiający rozkład genotypów 1286AA, 1286AC oraz 1286CC w genie *MTHFR* w badanych grupach (P – pacjenci z WZK, D – dzieci - grupa kontrolna, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)

WYNIKI

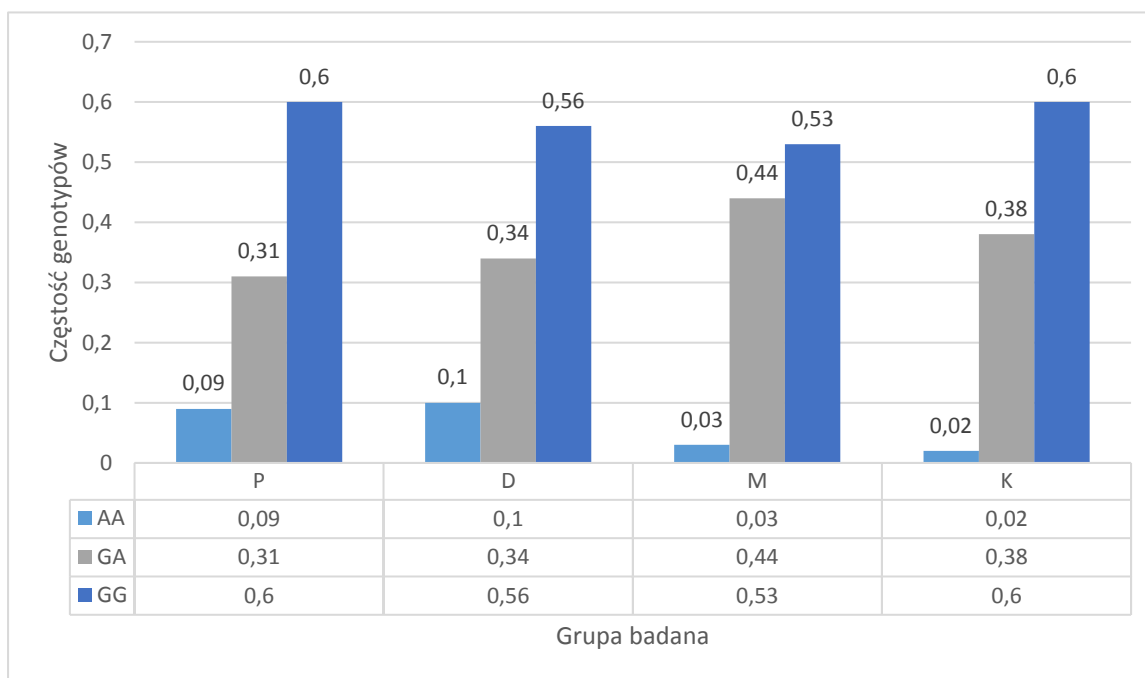
FGB c.1433G>A

Tabela 31 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.1433G>A genu *FGB* w badanych grupach

Grupa		Genotypy				Allele	
	n		GG	GA	AA	G	A
Pacjenci z WZK	136	n	82	42	12	206	66
		Częstość	0,60	0,31	0,09	0,76	0,24
Grupa kontrolna dzieci	177	n	99	60	18	258	96
		Częstość	0,56	0,34	0,10	0,73	0,27
Matki pacjentów z WZK	133	n	71	58	4	200	66
		Częstość	0,53	0,44	0,03	0,75	0,25
Grupa kontrolna kobiet	168	n	100	64	4	264	72
		Częstość	0,60	0,38	0,02	0,79	0,21

Pacjenci z WZK vs. Grupa kontrolna dzieci – **p-value = 0,4512**

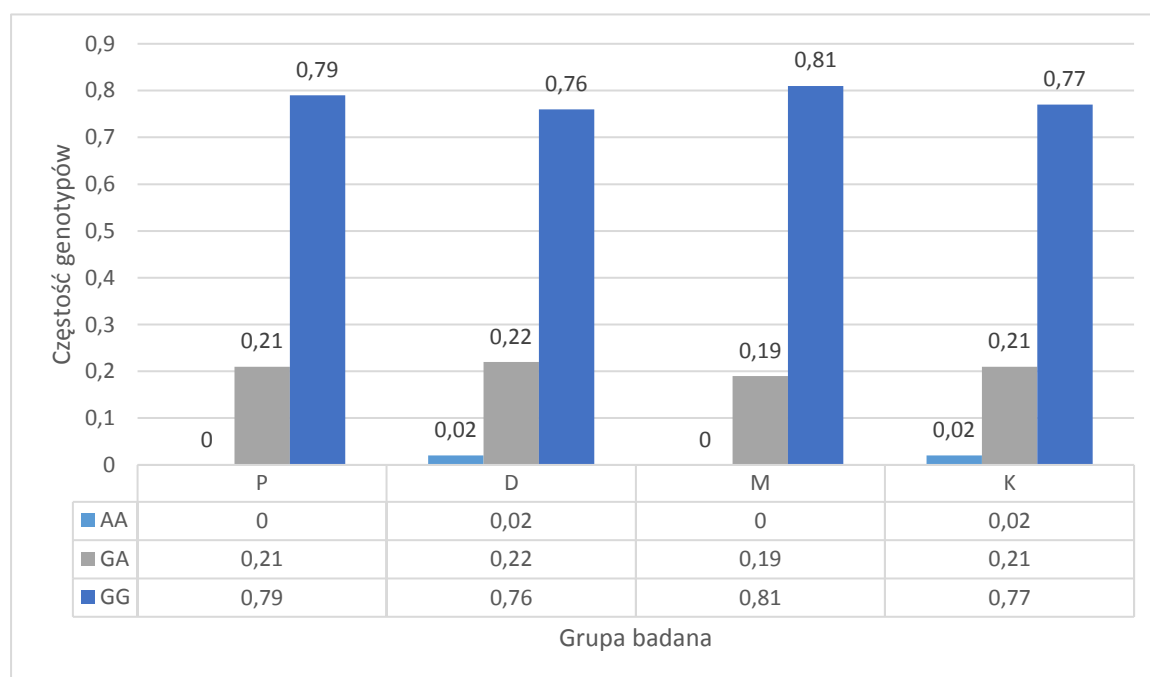
Matki pacjentów z WZK vs. Grupa kontrolna kobiet – **p-value = 0,2883**



Ryc. 31 Wykres przedstawiający rozkład genotypów 1433GG, 1433GA oraz 1433AA w genie *FGB* w badanych grupach (P – pacjenci z WZK, D – dzieci - grupa kontrolna, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)

***FGB* c.-862G>A**Tabela 32 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.-862G>A genu *FGB* w badanych grupach

Grupa	N	Genotypy				Allele	
			GG	GA	AA	G	A
Pacjenci z WZK	136	n	108	28	0	244	28
		Częstość	0,79	0,21	0	0,90	0,10
Grupa kontrolna dzieci	177	n	134	39	4	307	47
		Częstość	0,76	0,22	0,02	0,87	0,13
Matki pacjentów z WZK	133	n	108	25	0	241	25
		Częstość	0,81	0,19	0	0,91	0,09
Grupa kontrolna kobiet	168	n	130	36	2	296	40
		Częstość	0,77	0,21	0,02	0,88	0,12

Pacjenci z WZK vs. Grupa kontrolna dzieci – **p-value = 0,2511**Matki pacjentów z WZK vs. Grupa kontrolna kobiet – **p-value = 0,3121**Ryc. 32 Wykres przedstawiający rozkład genotypów -862GG, -862GA oraz -862AA w genie *FGB* w badanych grupach (P – pacjenci z WZK, D – dzieci - grupa kontrolna, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)

WYNIKI

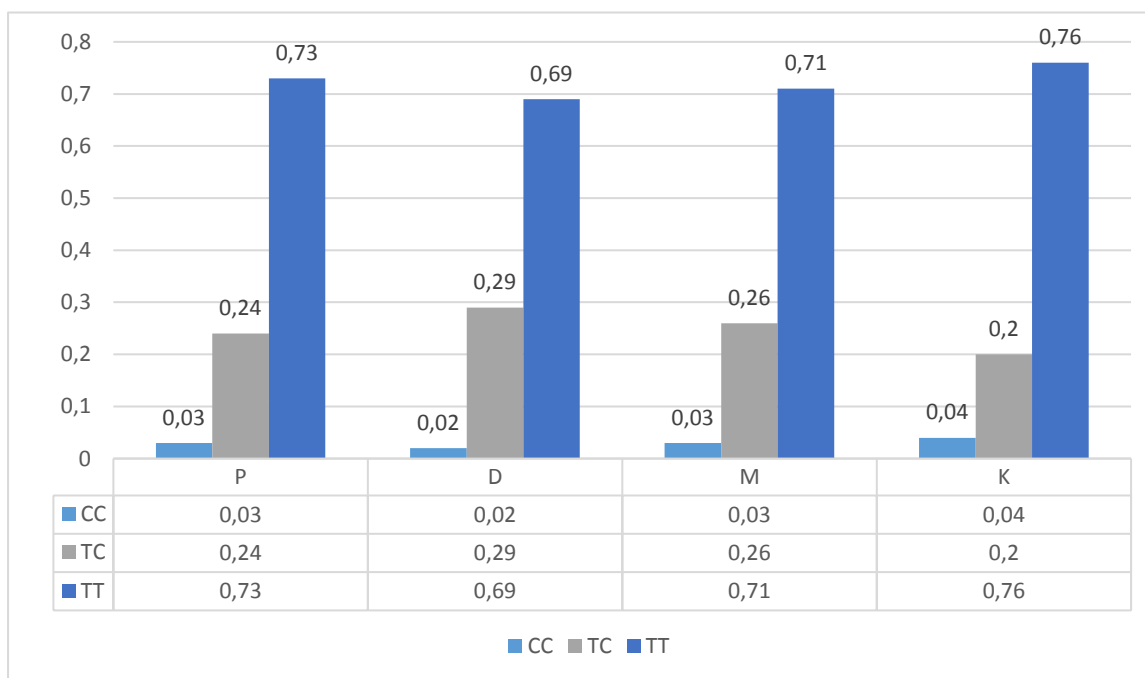
ITGB3 c.176T>C

Tabela 33 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.176T>C genu *ITGB3* w badanych grupach

Grupa	n	Genotypy			Allele		
		TT	TC	CC	T	C	
Pacjenci z WZK	136	n	99	32	5	230	42
		Częstość	0,73	0,24	0,03	0,85	0,15
Grupa kontrolna dzieci	177	n	122	52	3	296	58
		Częstość	0,69	0,29	0,02	0,84	0,16
Matki pacjentów z WZK	133	n	95	35	3	225	41
		Częstość	0,71	0,26	0,03	0,85	0,15
Grupa kontrolna kobiet	168	n	128	34	6	290	46
		Częstość	0,76	0,20	0,04	0,86	0,14

Pacjenci z WZK vs. Grupa kontrolna dzieci – **p-value = 0,7496**

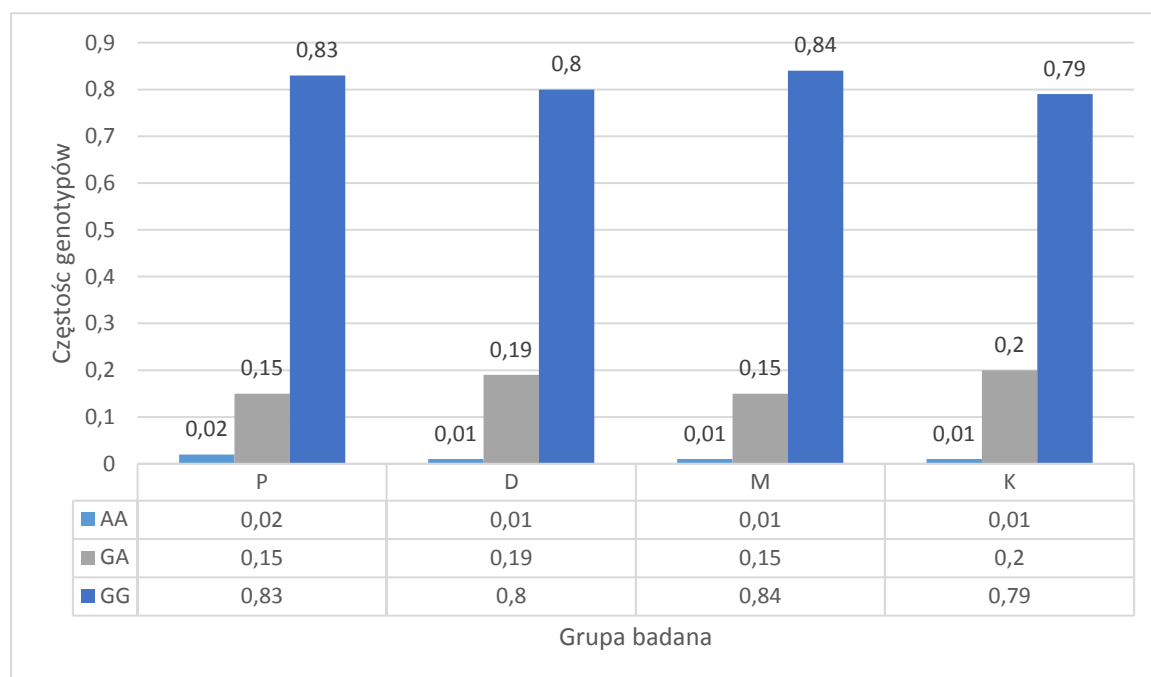
Matki pacjentów z WZK vs. Grupa kontrolna kobiet – **p-value = 0,5643**



Ryc. 33 Wykres przedstawiający rozkład genotypów 176TT, 176TC oraz 176CC w genie *ITGB3* w badanych grupach (P – pacjenci z WZK, D – dzieci - grupa kontrolna, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)

F7 c.1238G>ATabela 34 Rozkład genotypów i alleli dla wariantu c.1238G>A genu *F7* w badanych grupach

Grupa		Genotypy				Allele	
	n		GG	GA	AA	G	A
Pacjenci z WZK	136	n	113	21	2	247	25
		Częstość	0,83	0,15	0,02	0,91	0,09
Grupa kontrolna dzieci	177	n	142	34	1	318	36
		Częstość	0,80	0,19	0,01	0,90	0,10
Matki pacjentów z WZK	133	n	112	20	1	244	22
		Częstość	0,84	0,15	0,01	0,92	0,08
Grupa kontrolna kobiet	168	n	132	34	2	298	38
		Częstość	0,79	0,20	0,01	0,89	0,11

Pacjenci z WZK vs. Grupa kontrolna dzieci – **p-value = 0,6826**Matki pacjentów z WZK vs. Grupa kontrolna kobiet – **p-value = 0,2165**Ryc. 34 Wykres przedstawiający rozkład genotypów 1238GG, 1238GA oraz 1238AA w genie *F7* w badanych grupach (P – pacjenci z WZK, D – dzieci - grupa kontrolna, M – matki pacjentów z WZK, K – kobiety - grupa kontrolna)

5 Dyskusja

Wady kończyn należą do jednych z najczęściej występujących wrodzonych wad rozwojowych u ludzi. Ich podgrupę stanowią wrodzone wady zmniejszające kończyn (WZK), które występują z częstością 3-8 na 10 000 żywych urodzeń, a ich wykrywalność w życiu płodowym wynosi około 55%^{1,3,4,104,105}. Wrodzone WZK są najczęściej jednostronne i rzadko współwystępują z innymi nieprawidłowościami strukturalnymi^{1,7}. Etiologia WZK jest zróżnicowana i obejmuje przyczyny niegenetyczne (sekwencję pasm owodniowych, teratogeny) oraz genetyczne, do których należą uszkodzenia pojedynczych genów lub zaburzenia chromosomowe. W większości przypadków przyczyna WZK jest trudna do zidentyfikowania, a wady występują sporadycznie, z niskim ryzykiem ponownego pojawienia się zaburzenia rozwojowego w rodzinie. Doniesienia naukowe wskazują, że najczęściej wady te występują po lewej stronie ciała i dotyczą zazwyczaj kończyny górnej. W pracy przeglądowej autorstwa Saeeda i wsp., w której opisano dziewięć przypadków wystąpienia poprzecznych wad kończyn u płodów, wadę kończyny górnej stwierdzono aż u 7 z nich⁴. Swinyard i Pinner w swoich badaniach nad WZK w populacji amerykańskiej zauważyli, że jeśli wada dotyczy tylko jednej kończyny, to w 85% jest to ręka, tj. najbardziej dystalna część kończyny górnej. Dodatkowo odnotowali dwa razy częstsze wystąpienie ubytku po lewej stronie ciała¹⁰⁶. Do podobnych wniosków doszli Franz i O'Rahilly, Stephens i Shepard, a także ostatnio Carmichael^{17,107,108}. Przedstawiona w niniejszej pracy charakterystyka anatomiczna WZK u przebadanych pacjentów potwierdziła powyższe doniesienia – wśród 137 badanych pacjentów u 121 wada była zlokalizowana w obrębie kończyny górnej i u 87 pacjentów dotyczyła ona lewej strony ciała, co w obu przypadkach okazało się istotne statystycznie. W żadnej z przytoczonych wcześniej publikacji nie znaleziono jednak przyczyn tego zjawiska. Częstsze występowanie wady po lewej stronie kończyny górnej może wynikać z różnic budowy układu tętniczego. Tętnica podobojczykowa lewa, powstająca pomiędzy 6 a 7 tygodniem życia płodowego, odchodzi jako samodzielne naczynie bezpośrednio od aorty, podczas gdy tętnica podobojczykowa prawa odchodzi od wychodzącego z aorty pnia ramienno-głowego. Oznacza to, że tętnica podobojczykowa prawa nie odgałęzia się wprost od aorty, ale odchodzi od względnie szerokiego pnia tętniczego, co może mieć korzystne znaczenie dla rozwoju prawidłowego unaczynienia tętniczego prawej kończyny.

Hipoteza incydentu naczyniowego, której weryfikacja została podjęta w niniejszej pracy, upatruje źródła powstania WZK w zakrzepicy lub zatorze, które mogłyby wystąpić

w trakcie rozwoju płodu. Pierwsze naczynia żyłne i tętnicze powstają w kończynie górnej około 27. dnia po zapłodnieniu, tworząc sieć na bazie której w dalszej kolejności formuje się układ szkieletowy. Utworzone naczynia dostarczają tlen i składniki odżywcze do rozwijających się kości i mięśni. Zaburzenie ukrwienia, takie jak np. okluzja naczyniowa, krwotok czy hipoksja, miałyby skutkować niedokrwieniem rozwijającej się kończyny i prowadzić do jej martwicy i resorpcji, a w konsekwencji do obserwowanej po urodzeniu wady zmniejszającej kończynę⁸. Zakrzepica jako czynnik etiologiczny tych wad została zaproponowana w kilku pracach naukowych. Hoyme i wsp., stwierdzając mikrozakrzepy w łożyskach 4 kobiet, które urodziły dzieci z WZK, zasugerowali, że u 3 z nich przyczyną tych wad była zakrzepica naczyń krwionośnych¹⁰. Soltan i Holmes opisali 4 rodziny, w których zakrzepica była najbardziej prawdopodobnym powodem wad wrodzonych kończyn¹². Z kolei Van Allen i wsp. zbadali 12 pacjentów z aplazją kości promieniowej, u których stwierdzili zaburzenia angiogenezy w obrębie kończyn górnych¹¹. Robinow i wsp. opisali przypadek dziewczynki z brakiem przedramienia i obecnością 4 palców, u której udowodnili, że okluzja tętnicy podobojczykowej była przyczyną defektu¹⁰⁹. Bavinck i Weaver z kolei wskazali jednostronny niedorozwój tętnicy podobojczykowej jako przyczynę sekwencji Polanda, malformacji Klippela-Feila, sekwencji Möbiusa i defektów terminalnych części kończyn¹¹⁰. Wszystkie te doniesienia naukowe, dokumentujące niedokrwienie kończyny lub innych części ciała, jako przyczynę rozwoju wady ubytkowej, dają podstawę do sformułowania hipotezy o możliwym udziale zaburzeń układu krzepnięcia w okresie płodowym (prenatalnej zakrzepicy), jako kolejnego czynnika predysponującego do wystąpienia WZK.

Kobiety ciężarne mają *per se* zwiększone ryzyko wystąpienia incydentów zakrzepowych w okresie ciąży. W porównaniu do kobiet nieciążarnych, ryzyko zakrzepicy tętniczej wzrasta 3-4 krotnie, a zakrzepicy żyłnej – około 4-5 krotnie¹¹¹. Ogólna częstość występowania zaburzeń zakrzepowo-zatorowych w okresie ciąży i porodu wynosi 2/1000 ciężarnych¹¹²⁻¹¹⁴. W badaniach histopatologicznych łożysk kobiet, u których doszło do ich przedwczesnego odklejenia, Kinzler WL ze wsp. stwierdziła martwicę i liczne zawały, które mogły być skutkiem nieprawidłowości w krążeniu łożyskowym, spowodowanym zmniejszeniem przepływu krwi przez jego naczynia¹¹⁵. Z kolei Preston i wsp. w ogólnoeuropejskiej wielośrodkowej analizie wykazali, że kobiety, u których wykryto wrodzoną trombofilię miały zwiększone ryzyko późnej utraty ciąży w porównaniu z pacjentkami, u których nie wykryto zaburzeń w układzie krzepnięcia¹¹⁶. Natomiast

DYSKUSJA

w badaniu, w którym oceniano 188 ciąż u 60 kobiet, podzielonych na 2 grupy: tj. kobiety ze stwierdzoną wrodzoną trombofilią i kobiety, u których nie stwierdzono wrodzonej trombofilii, okazało się, że kobiety z wrodzonymi zaburzeniami krzepnięcia utraciły 22% ciąż, podczas gdy w grupie kontrolnej było to 11%¹¹⁷. Wymienione prace potwierdzają hipotezę wpływu zaburzeń koagulologicznych na rozwijający się płód. Zjawiskiem powszechnie znanym w okresie ciąży jest wzrost aktywności takich czynników układu krzepnięcia jak: czynnik VII, VIII, X, czynnik von Willebranda oraz fibrynogenu. Jednocześnie obserwuje się zmniejszenie aktywności inhibitorów krzepnięcia, np. białka S¹¹⁸. Stan nadkrzepliwości krwi ma za zadanie naturalnie chronić kobietę przed ewentualnym krwotokiem podczas porodu lub w przypadku poronienia. W krajach rozwijających się, w których brak jest szybkiego dostępu do fachowej pomocy medycznej, krwawienie okołoporodowe nadal stanowi główną przyczynę zgonów kobiet ciężarnych¹¹⁹.

Ważnym aspektem w badaniach nad hipotezą zakrzepicy lub zatoru płodowego jest uwzględnienie stanu zdrowia matki i jak najbardziej szczegółowa charakterystyka funkcjonowania matczynego układu krzepnięcia i fibrynolizy. Masa molekularna wszystkich czynników krzepnięcia wynosi pomiędzy 60-75 tys. Da, przez co swobodnie mogą one przenikać barierę łożyskową. Płód, który sam w sobie nie ma zmiany prozakrzepowej, może być poddany działaniu tych czynników ze strony matki. Zdiagnozowanie u matki zmian genetycznych, predysponujących do zakrzepicy, pozwoliłoby teoretycznie na włączenie farmakologicznej profilaktyki przeciwkrzepliwej. U ciężarnych z grupy ryzyka zaleca się włączenie profilaktyki przeciwzakrzepowej we wczesnym okresie ciąży, zazwyczaj po stwierdzeniu czynności serca płodu. Lekami z wyboru są heparyny drobnocząsteczkowe oraz heparyna niefrakcjonowana. Obie nie przechodzą przez łożysko, dlatego ich stosowanie jest bezpieczne dla płodu. Liczba ciężarnych, prowadzonych z włączeniem profilaktyki heparynowej stale rośnie, a wskazaniami do takiej profilaktyki są zazwyczaj niepowodzenia ciąży wynikające z potwierdzonej trombofilii u ciężarnej. Wydaje się, że niezwykle interesujące byłoby zbadanie częstości występowania WZK w tej grupie ciężarnych i sprawdzenie czy profilaktyka przeciwkrzepliwa ma jakiegokolwiek działanie protekcyjne, redukujące ryzyko wystąpienia WZK u żywo urodzonego noworodka.

Predyspozycje do wystąpienia dużej liczby chorób uwarunkowanych wieloczynnikowo, w tym zakrzepicy, powiązane z nosicielstwem różnych wariantów typu SNVs. Większość z opisanych dotąd SNVs nie ma wyłącznego i bezpośredniego wpływu

na rozwój danej jednostki chorobowej, ale przyczynia się do jej wystąpienia na skutek asocjacji kilku względnie częstych populacyjnie SNVs, zwłaszcza w przypadku narażenia pacjenta na działanie niekorzystnych czynników środowiskowych¹²⁰.

Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki, celem niniejszej pracy było oznaczenie biochemicznych i genetycznych czynników ryzyka predysponujących do wystąpienia zakrzepicy w grupie pacjentów ze stwierdzoną jednostronną wadą zmniejszającą kończyny, ich zdrowych matek oraz w grupach kontrolnych zdrowych dzieci i kobiet, dobranych według kryterium wieku. Pacjenci z WZK zostali wytypowani z Polskiego Rejestru Wrodzonych Wad Rozwojowych. Analizie poddano 5 czynników koagulologicznych: zespół antyfosfolipidowy, białko S, białko C, antytrombina, czynnik VIII; 2 czynniki biochemiczne: homocysteina i lipoproteina a oraz 12 SNVs zlokalizowanych w 8 genach: *F2*, *F5*, *F7*, *F12*, *F13A1*, *MTHFR*, *FGB*, *ITGB3*. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej, porównując częstość występowania zaburzeń w aktywności badanych czynników oraz rozkład poszczególnych genotypów badanych SNVs. W przeprowadzonych analizach najpierw rozpatrywano poszczególne badane parametry jako osobne, niezależne czynniki ryzyka, a następnie w dwóch grupach: parametry koagulologiczne i biochemiczne oraz układ wszystkich badanych SNVs. W pierwszym podejściu wyłoniono dwa SNVs – c.-4C>T w *F12* (rs1801020) i c.665C>T (p.Ala222Val) w *MTHFR* (rs1801133). Jednak biorąc pod uwagę obecny stan wiedzy nt. wariantu c.665C>T (p.Ala222Val) w genie *MTHFR* i fakt, że nie powinien być on rozpatrywany jako czynnik ryzyka zakrzepicy, podjęto decyzję o nieuwzględnianiu tego wariantu w dalszych rozważaniach¹²¹. Po przyjęciu w przeprowadzonych analizach statystycznych poprawki Bonferroniego dla porównań wielokrotnych ($\alpha=0,05/12$), nie wykazano istotnej różnicy w rozkładach badanych genotypów między grupami badanymi a kontrolnymi. Jak wspomniano powyżej, c.-4C>T w *F12* (rs1801020), jako jedyny rozpatrywany niezależnie SNV, osiągnął statystycznie istotną różnicę w rozkładach genotypów pomiędzy grupą pacjentów z WZK a grupą kontrolną oraz pomiędzy grupą matek a grupą kontrolną. Podobne wyniki zostały uzyskane w pierwszym etapie badań¹⁰³. Częstość występowania heterozygot CT była istotnie statystycznie większa w grupach kontrolnych dzieci i kobiet (odpowiednio 0,47 i 0,45) niż w grupach pacjentów z WZK i matek (odpowiednio 0,35 i 0,37). Przy założeniu dominującego modelu dziedziczenia, obliczony OR dla c.-4C>T w genie *F12* wynosił dla grupy pacjentów z WZK vs. grupa kontrolna dzieci 0,565 (95% CI 0,360-0,888; p-value=0,0129), natomiast w grupach matki

DYSKUSJA

dzieci z WZK w odniesieniu do grupy kontrolnej kobiet, OR wyniósł 0,559 (95% CI 0,353-0,884; p-value=0,0125) (Tabele 21 i 22). Omawiany wariant c.-4C>T w genie *F12*, poprzez naruszenie sekwencji Kozak, zaburza efektywność translacji, co skutkuje obniżonym stężeniem czynnika XII w osoczu¹²². FXII jest jednym z aktywatorów procesu krzepnięcia krwi – aktywuje czynnik XI, ale i fibrynolizy – bierze udział w konwersji plazminogenu do plazminy. Obniżona aktywność FXII definiowana jest jako skaza krwotoczna, z laboratoryjnie wydłużonym aPTT, ale bez objawów klinicznych skazy w postaci krwawień. Dane jakoby obniżona aktywność FXII była czynnikiem ryzyka żyłnej i tętniczej choroby zakrzepowej mogą wzbudzać kontrowersje^{123,124,125}. I tak np. badania wykonane przez Franco i Reitsma sugerują brak zależności pomiędzy obecnością wariantu c.-4C>T w genie *F12* a wyższym ryzykiem żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej¹²⁶. Zastanawiający jest też fakt, że w osoczu osób z tętniczą chorobą zakrzepową obserwuje się podwyższoną aktywność FXII⁸⁵. Zatem częściej stwierdzana obniżona aktywność FXII w grupach pacjentów z WZK oraz ich matek mogłaby hipotetycznie stanowić czynnik ryzyka udaru krwotocznego (wylewu), a nie zakrzepicy. Jest to również możliwy mechanizm destrukcji tkanek płodowych, w tym związków kończyn, choć udowodnienie takiego twierdzenia wymagałoby zaplanowania innego rodzaju badań. Niezwykle interesujący jest również fakt, że u pacjentów z WZK stwierdzono istotnie statystycznie wyższe średnie stężenia białka S oraz antytrombiny w stosunku do grupy kontrolnej kobiet. Podobnie, aktywność białka C u matek pacjentów z WZK była średnio wyższa w stosunku do grupy kontrolnej. Bardziej efektywne działanie układu fibrynolizy u pacjentów z WZK i/lub ich matek, wynikające z wyższych stężeń lub aktywności białka S, C i AT, mogłoby zatem przemawiać przeciwko udziałowi prenatalnej zakrzepicy w etiologii WZK. Z drugiej strony, obniżenie średniej aktywności białka C u pacjentów z wadą kończyny względem grupy kontrolnej stoi w opozycji do wspomnianej powyżej hipotezy. Wyniki oznaczeń białka C, S i AT nie są więc spójne, co utrudnia jednoznaczne wnioskowanie o udziale tych czynników w rozwoju WZK.

Zgodnie z obecnymi rekomendacjami tylko dwa SNVs powinny być rutynowo oznaczane w celu oszacowania ryzyka wystąpienia ŻChZZ – wariant V Leiden i wariant *F2* c.*97G>A¹²⁷. Częstość występowania czynnika V Leiden w populacji kaukaskiej wynosi 6%, a w populacjach afrykańskiej i azjatyckiej częstość ta jest znacznie niższa, co ma związek ze zjawiskiem dryfu genetycznego. Ocenia się, że rozpowszechnienie wariantu V Leiden w populacji europejskiej było związane z efektem

założyciela oraz przystosowaniem, mającym na celu ochronę przed utratą krwi^{27,128}. Jednak trzeba zaznaczyć, że częstość występowania FVL w krajach europejskich jest zróżnicowana i tak np. w Hiszpanii, na Ukrainie i Białorusi wynosi ona 0,6-0,9%, podczas gdy w Czechach, Niemczech, krajach skandynawskich oraz na południu kontynentu waha się między 3,2% a 8,3%¹²⁹. W niniejszej pracy częstość występowania FVL została oszacowana na 3%, podczas gdy według danych przedstawionych w 2012 roku przez Adler¹³⁰, częstość ta dla populacji polskiej wyniosła 2%. Należy jednak podkreślić, że badania prowadzone przez Adler obejmowały populację z Pomorza Zachodniego, a osoby należące do badanych przez nas grup kontrolnych pochodziły głównie z terenu Wielkopolski, natomiast grup badanych z terenu całej Polski. W badaniach obejmujących populację europejską stwierdzono FVL u 40-50% osób z wywiadem obciążonym wystąpieniem żylnej choroby zakrzepowo-zatorowej²⁷. Postać heterozygotyczna wariantu związana jest z 5-8-krotnie podwyższonym ryzykiem wystąpienia zakrzepicy, podczas gdy postać homozygotyczna zwiększa to ryzyko nawet 50-krotnie. W niniejszej pracy genotyp GA został stwierdzony u 7 pacjentów z WZK i u 5 matek pacjentów z WZK. Tylko w przypadku dwóch par pacjent-matka stwierdzono występowanie rodzinne wariantu (Tabela 16 – pary pacjent – matka podkreślone). Drugim najczęściej występującym czynnikiem ryzyka zakrzepicy jest wariant *F2* c.*97G>A. Około 2-4% populacji południowej Europy jest nosicielami wariantu *F2* c.*97G>A i około 4-8% populacji Europy Północnej¹³¹. Jego obecność zwiększa ryzyko wystąpienia ŻChZZ 3-4 krotnie¹³². Bykowska i wsp. w badaniach przeprowadzonych w grupie 323 polskich pacjentów po przebytej zakrzepicy żylnej ocenili jego częstość na 6,5%¹³³. W niniejszym badaniu, heterozygotyczny wariant *F2* c.*97G>A stwierdzono u 4 pacjentów i 3 matek, nie stwierdzono ani jednej pary z rodzinnym występowaniem wariantu. U dwóch pacjentów i u jednej matki pacjenta z WZK odnotowano jednoczesne występowanie postaci heterozygotycznej czynnika Leiden i wariantu *F2* c.*97G>A. U żadnego badanego pacjenta, będącego podwójną heterozygotą, nie odnotowano wcześniej wystąpienia objawów ŻChZZ, natomiast w najbliższej rodzinie dwóch z badanych pacjentów występowały poronienia samoistne i obumarcie ciąży. Co ciekawe, Emmerich i wsp. wykazali, że współistnienie wariantu *F2* c.*97G>A i FVL (podwójna heterozygota) zwiększa ryzyko ŻChZZ ok. 20-krotnie¹³².

Obecność wrodzonego niedoboru białka S w ogólnej populacji europejskiej szacuje się na mniej niż 0,5% i 2-12% wśród pacjentów z ŻChZZ¹³⁴. W niniejszym badaniu nie

DYSKUSJA

stwierdzono niedoboru białka S ($PS < 50\%$) zarówno w grupie pacjentów z WZK i ich matek, jak i w grupie kontrolnej. Niedobór białka C występuje rzadziej od niedoboru białka S. W populacji osób zdrowych wykrywany jest z częstością 0,2-0,3%. Niedobór białka C jest stwierdzany w 6% przypadków rodzinnej trombofilii, natomiast u pacjentów sporadycznych z pierwszym epizodem DVT, niedobór ten występuje w 3% przypadków¹³⁵. W grupie pacjentów z WZK oraz grupie matek, niedobór białka C wystąpił w 0,8% przypadków.

Wrodzony niedobór antytrombiny jest rzadkim defektem genetycznym, który wiąże się z najwyższym, sięgającym 50%, ryzykiem wystąpienia ŻChZZ, które wzrasta wraz z wiekiem¹³⁶. Wrodzony niedobór antytrombiny występuje w populacji ogólnej z częstością 0,02–0,17%¹³⁷, a wśród pacjentów z potwierdzoną ŻChZZ zaburzenie to stwierdzane jest u 0,5–4,9% pacjentów sporadycznych i u 0,5–7,0% pacjentów z rodzinną postacią trombofilii¹³⁸. W niniejszej pracy częstość tego niedoboru wyniosła 1,3%. Porównując częstość występowania niedoboru białka C i antytrombiny w grupie badanej z danymi epidemiologicznymi dostępnymi dla populacji ogólnej, można zauważyć, że częstość występowania tych defektów w grupie pacjentów z WZK i ich matek była wyższa niż w grupie kontrolnej. Należy zauważyć jednak, że w żadnym z badanych przypadków niedobór inhibitorów krzepnięcia nie pojawił się jednocześnie u pary pacjent-matka. Nie można wykluczyć dziedziczenia tych wad w linii pacjent-ojciec, gdyż grupa ojców nie brała udziału w badaniach.

Zespół antyfosfolipidowy, jako główny czynnik nabytej trombofilii, został stwierdzony u dwóch pacjentów z WZK oraz u dwóch kobiet z grupy kontrolnej. W 3 na 4 przypadkach, APS rozpoznano na podstawie podwyższonego miana przeciwciał antykardiolipinowych, a w jednym przypadku - na podstawie dodatniego wyniku obecności antykoagulantu tocznia. Pacjenci z WZK, jak i kobiety z grupy kontrolnej, nie podawały w ankiecie klinicznej informacji o jakichkolwiek chorobach autoimmunologicznych. Jak wynika z danych z piśmiennictwa, istnieje populacja ludzi zdrowych, wytwarzających przeciwciała antyfosfolipidowe przy braku jakichkolwiek objawów (aAPA, ang. *asymptomatic antiphospholipid antibodies*), tj. zakrzepicy żyłnej, tętniczej czy niepowodzeń ciąży. Obecność ACA wykazano u 2-5% osób zdrowych w średnim wieku, u 1-10% kobiet w ciąży, a także aż u 50% osób w wieku > 70 lat. Dla porównania, częstość występowania tych przeciwciał u chorych na toczeń rumieniowaty układowy, SLE (SLE ang. *Systemic Lupus Erythematosus*) wynosi 17-86% i 8-31% u członków rodzin pacjentów

z rozpoznaniem APS. LA wykrywa się tylko u około 1% osób zdrowych, zaś wśród chorych na SLE – u 7-65%¹³⁹. W niniejszym badaniu nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami badanymi a grupą kontrolną (pacjenci z WZK vs. kontrola kobiet p-value=1,0000; matki pacjentów z WZK vs. kontrola kobiet p-value=0,5012), co może świadczyć o braku wpływu występowania APA na obecność WZK. Wiele doniesień naukowych wskazuje trombofilię jako czynnik etiologiczny występowania płodowych defektów naczyniowych. Występowanie homozygotycznych mutacji w genach kodujących białko C lub białko S może mieć związek z noworodkową plamicą piorunującą i chorobą mózgowo-naczyniową^{140,141}. Moeschler i wsp. opisali przypadek noworodka z pojedynczą wadą poprzeczną kończyny, u którego wystąpiły nieokreślone zaburzenia koagulologiczne. Dodatkowo noworodek posiadał kuzyna z podobną wadą przedramienia⁴⁷. Curry z kolei opisała 5 przypadków noworodków z porażeniem mózgowym, urodzonych przez matki, u których stwierdzono obecność przeciwciał antykardiolipinowych oraz 3 przypadki noworodków z udarem niedokrwiennym mózgu, u których oznaczono niską aktywność białka C i dodatkowo antytrombiny u jednego z nich⁴⁸. Ponadto u matek dzieci z udarem mózgu stwierdzano dodatnie przeciwciała antykardiolipinowe⁴⁹.

Metodologia przedstawiona w niniejszej pracy zawiera kilka uchybień, które mogą wpływać na uzyskane wyniki oraz ich interpretację. Do pierwszego ograniczenia metody należy fakt, że matki pacjentów z WZK nie zostały przebadane w ciągu 3 tygodni od porodu pod względem wartości parametrów biochemicznych i koagulologicznych, co wyklucza dokładną ocenę poziomu aktywności m.in. białek S, C, antytrombiny czy homocysteiny, które faktycznie oddziaływały na rozwijające się dziecko z wadą zmniejszającą kończyny. Wyeliminowanie tego aspektu byłoby możliwe tylko przy pełnej współpracy z ginekologami-położnikami, którzy, wykonując badanie ultrasonograficzne, zgłaszałyby podejrzenie WZK. Z drugiej strony wymagałoby to niezwyklej koordynacji i kompleksowości prowadzonej diagnostyki. Takie badania trwałyby także zdecydowanie dłużej. Przy założeniu, że rocznie w Polsce rodzi się ok. 20 dzieci z WZK, rekrutacja 137 pacjentów oraz ich diagnostyka wraz z diagnostyką grup kontrolnych zajęłaby ok. 8 lat. Drugim ograniczeniem jest brak możliwości przeprowadzenia badań replikacyjnych, które wynikają m.in. z niemożności ponownego pobrania materiału biologicznego w celu wykonania wszystkich opisanych badań diagnostycznych.

Podsumowując, uzyskane w niniejszej pracy wyniki badań potwierdzają raportowane w światowym piśmiennictwie dane, dotyczące lokalizacji WZK. Pacjenci

DYSKUSJA

z WZK statystycznie częściej mają wadę zlokalizowaną po lewej stronie ciała oraz w kończynach górnych, co nie było dotąd opisywane w grupie polskich pacjentów. Pomimo braku wytypowania zestawu czynników (biochemicznych, genetycznych, koagulologicznych), które mogłyby warunkować prenatalny incydent zakrzepowy, udało się wskazać na wariant -4C>T w *F12*, który w układzie heterozygotycznym istotnie statystycznie częściej występuje w grupach kontrolnych niż w grupach badanych. Dane te potwierdzają wyniki pierwszego etapu badań, opublikowanych w pracy magisterskiej mgr Eweliny Olech¹⁰³. Potencjalny udział czynnika XII w rozwoju zakrzepicy może wynikać z dualistycznej funkcji samego FXII, który bierze udział zarówno w kaskadzie krzepnięcia krwi, jak i w procesach fibrynolizy. Z drugiej strony, prawdopodobnie obniżona aktywność FXII w grupach pacjentów z WZK oraz ich matek mogłaby w teorii stanowić nie czynnik ryzyka zakrzepicy, a udaru krwotocznego (wylewu krwawego), również skutkującego uszkodzeniem struktur anatomicznych płodu. W celu pełniejszego wytlumaczenia powyższej zależności istnieje potrzeba wykonania oceny funkcjonalnej aktywności białka czynnika XII układu krzepnięcia krwi, w połączeniu z analizą funkcjonalną fibrynogenu oraz ewentualnie badań nad czynnikami ryzyka występowania zaburzeń krwotocznych.

6 Wnioski

I. Na podstawie przeprowadzonych badań nie udało się wskazać konkretnego czynnika prozakrzepowego lub „progu” kilku czynników, których obecność u pacjenta lub jego matki skutkowałaby wzrostem ryzyka wystąpienia WZK. Tym samym w niniejszym badaniu, które przeprowadzone zostało na największej grupie pacjentów, nie potwierdzono postulowanego w piśmiennictwie udziału czynników prozakrzepowych (wariant *FV* Leiden, wariant *F2* c.*97G>A, *ACA*) w etiologii WZK.

II. Analiza statystyczna wykazała, że wariant c.-4C>T w genie *F12* był stwierdzany istotnie statystycznie częściej w grupach kontrolnych w porównaniu do grup badanych. Prawdopodobnie obniżona aktywność *FXII* w grupach pacjentów z WZK oraz ich matek mogłaby stanowić czynnik ryzyka udaru krwotocznego - wylewu krwawego (a nie zakrzepicy), skutkującego uszkodzeniem struktur anatomicznych płodu. Tym samym wskazano inny kierunek przyszłych badań nad etiologią WZK lub podobnych wad wrodzonych.

7 Streszczenie w języku polskim

Wrodzone wady zmniejszające kończyn (WZK) występują na świecie z częstością 3-8 na 10 000 żywo urodzonych noworodków. Izolowane WZK dotyczą zazwyczaj tylko jednej kończyny i rzadko występują rodzinnie. Ich etiologia jest silnie heterogenna i obejmuje głównie różne czynniki środowiskowe (infekcje, czynniki chemiczne, leki). Pomimo znacznego postępu wiedzy o czynnikach sprawczych, u wielu pacjentów z WZK przyczyna wady jest nieznana. W niniejszej pracy podjęto próbę weryfikacji udziału incydentu naczyniowego, rozumianego jako wystąpienie prenatalnej zakrzepicy lub zatoru w krążeniu płodowym, w etiologii WZK. W myśl w/w hipotezy, incydent naczyniowy, zaistniały we wczesnym etapie rozwoju płodu, miałby powodować niedokrwienie i martwicę części kończyny, jej resorpcję, a w ostateczności obserwowaną po urodzeniu wadę zmniejszającą kończyny.

Celem niniejszej pracy było sprawdzenie czy wśród pacjentów z jednostronnymi WZK i/lub ich matek, czynniki ryzyka wrodzonej i nabytej zakrzepicy występują istotnie częściej niż w populacji ogólnej (grupach kontrolnych). Końcowym celem pracy było wyłonienie czynników ryzyka występowania jednostronnych wad zmniejszających kończyny, które mogłyby tworzyć swego rodzaju „próg” kilku czynników, powyżej którego ryzyko wystąpienia WZK jest szczególnie wysokie.

Badaniami objęto grupę 137 pacjentów ze sporadyczną, jednostronną wadą zmniejszającą kończyny oraz ich matki. Po wyrażeniu zgody na badania u probandów została przeprowadzona ocena kliniczna ich wad, a od matek został zebrany wywiad położniczy i wywiad rodzinny. Następnie wykonano następujące oznaczenia: aktywność PC, stężenie antygeny wolnego PS, aktywność AT, aktywność FVIII, stężenie homocysteiny i lipoproteiny a, badanie obecności APS oraz występowania wybranych SNVs w genach *F2*, *F5*, *F7*, *F12*, *F13A*, *FGB*, *MTHFR*, *ITGB3*.

Testowanie statystyczne wykazało istotne statystycznie różnice w przypadku wariantu *F12* c.-4C>T. Częstość występowania heterozygot była większa w grupach kontrolnych dzieci i kobiet (odpowiednio 0,47 i 0,45) niż w grupach probandów i matek (odpowiednio 0,35 i 0,37). Test Chi-kwadrat dla trendu wykazał istotne różnice w rozkładzie genotypów między grupą probandów a grupą kontrolną dzieci (p-value=0,0414) oraz między grupą matek probandów a grupą kontrolną kobiet (p-value=0,0057). Wyniki okazały się nieistotne statystycznie po zastosowaniu korekty na wielokrotne testowanie (p>0,0042). Analiza statystyczna dotycząca lokalizacji WZK

w badanej grupie potwierdziła dane z piśmiennictwa światowego. Istotnie statystycznie u polskich pacjentów okazało się umiejscowienie wady po stronie lewej oraz w kończynach górnych.

Nie udało się wytypować zestawu czynników warunkujących prenatalny incydent zakrzepowy. Jako jedyny istotność statystyczną osiągnął heterozygotyczny wariant c.-4C>T *F12*, występujący częściej w grupie kontrolnej, co nie było raportowane w dotychczas opublikowanych analizach. Tym samym nie udało się jednoznacznie potwierdzić udziału prozakrzepowych czynników ryzyka w etiologii WZK, choć wskazano na możliwy udział zaburzeń czynnika XII układu krzepnięcia krwi w rozwoju jednostronnych wad kończyn. Obniżona aktywność FXII w grupach pacjentów z WZK oraz ich matek mogłaby stanowić czynnik ryzyka udaru krwotocznego – wylewu krwawego (a nie zakrzepicy), skutkującego uszkodzeniem struktur anatomicznych płodu. Tym samym wskazano inny kierunek przyszłych badań nad etiologią WZK lub podobnych wad wrodzonych.

8 Streszczenie w języku angielskim

Congenital limb reduction defects (LRDs) occur worldwide with a frequency of 3-8 per 10,000 liveborn neonates. Isolated (LRDs) usually affect only a single limb and rarely are familial. Their etiology is highly heterogeneous and mainly involves various environmental factors (f. e. infections, chemical agents, drugs). Despite considerable progress of the knowledge about the causative factors, in many patients with LRDs the origin of the defect remains unknown. This paper attempts to verify the contribution of a vascular incident, understood as the occurrence of prenatal thrombosis or embolism in fetal circulation, in the etiology of LRDs. According to the above-mentioned hypothesis, the vascular incident occurring at an early stage of the fetal development can cause ischemia and necrosis of a part of the limb, its resorption, and ultimately postnatal limb reduction.

The aim of this work was to check whether the risk factors for congenital and acquired thrombosis are significantly more common in the group of patients with LRDs or their mothers compared to general population (control groups). The ultimate goal of the study was to identify risk factors for unilateral limb lesions that could create a kind of "threshold" of several factors above which the risk of developing LRDs is particularly high.

The study included a group of 137 patients with sporadic LRD and their mothers. Informed consent was taken from all patients and/or their legal guardians involved in this study. Afterwards, clinical evaluation of their defects was performed, and gestational as well as family history was collected from the mothers. Next, the following assays were carried out: PC activity, free PS antigen concentration, AT activity, FVIII activity, homocysteine and lipoprotein a concentration, APS presence assays and the presence of selected SNVs in the *F2*, *F5*, *F7*, *F12*, *F13A*, *FGB*, *MTHFR*, *ITGB3* genes.

Statistical testing showed statistically significant differences for variant *F12* c.-4C>T. The incidence of heterozygotes was higher in the control groups of children and women (0.47 and 0.45, respectively) than in the probands' and mothers' groups (0.35 and 0.37, respectively). The Chi-square for trend test showed significant differences in the distribution of genotypes between the group of probands and the control group of children (p-value = 0.0414) and between the group of proband's mothers and the control group of women (p-value = 0.0057). The results turned out to

be statistically insignificant after applying the Bonferroni correction for multiple testing ($p > 0,0042$). Statistical analysis of the location of LRD in the studied group confirmed data available in the literature. In Polish patients, the more frequent location of the defect on the left side and in the upper limbs was statistically significant.

A set of prothrombotic factors giving rise to a prenatal thrombotic incident could not be determined. The only statistically significant factor that occurred more frequently in the control group was a heterozygous *F12* variant c.-4C>T, which was not previously reported in the medical literature. Thus, the contribution of pro-coagulation risk factors in the etiology of LRDs could not be unequivocally confirmed, although the possible involvement of factor XII disturbances in the blood coagulation system in the development of unilateral limb defects was indicated. Putatively reduced activity of XII in the groups of LRD patients and their mothers could contribute to the higher risk of hemorrhagic stroke – hemorrhage (and not thrombosis), resulting in a damage to the fetal structures. Therefore, our results pointed to a new possible directions of research on the etiology of LRDs or other similar congenital defects.

9. Piśmiennictwo

1. McGuirk, C. K., Westgate, M.-N. & Holmes, L. B. Limb Deficiencies in Newborn Infants. *Pediatrics* **108**, e64–e64 (2001).
2. Gold, N. B., Westgate, M. N. & Holmes, L. B. Anatomic and etiological classification of congenital limb deficiencies. *Am. J. Med. Genet. Part A* **155**, 1225–1235 (2011).
3. Stoll, C., Alembik, Y., Dott, B. & Roth, M. P. Associated malformations in patients with limb reduction deficiencies. *Eur. J. Med. Genet.* **53**, 286–290 (2010).
4. Saeed, F., Paramasivam, G., Wiechec, M. & Kumar, S. Fetal transverse limb defects: case series and literature review. *J. Clin. Ultrasound* **39**, 454–457 (2011).
5. Materna-Kiryłuk, A. Polski Rejestr Wrodzonych Wad Rozwojowych jako źródło danych do badań epidemiologicznych, etiologicznych i planowania opieki medycznej. 105–112 (2014).
6. NM, B. G. C. Genetic regulation of embryological limb development with relation to congenital limb deformity in humans. *J Child Orthop* **2**, 1–9 (2011).
7. Holder-Espinasse, M. *et al.* Pre- and postnatal diagnosis of limb anomalies: A series of 107 cases. *Am. J. Med. Genet.* **124A**, 417–422 (2004).
8. Hunter, A. G. W. A pilot study of the possible role of familial defects in anticoagulation as a cause for terminal limb reduction malformations. *Clin. Genet.* **57**, 197–204 (2000).
9. Ordal, L. *et al.* Congenital limb deficiencies with vascular etiology: Possible association with maternal thrombophilia. *Am. J. Med. Genet. A* **170**, 3083–3089 (2016).
10. Hoyme, H. E., Jones, K. L., Van Allen, M. I., Saunders, B. S. & Benirschke, K. Vascular pathogenesis of transverse limb reduction defects. *J. Pediatr.* **101**, 839–843 (1982).
11. Van Allen, M. I., Hoyme, H. E. & Jones, K. L. Vascular pathogenesis of limb defects. I. Radial artery anatomy in radial aplasia. *J. Pediatr.* **101**, 832–838 (1982).
12. Soltan, H. C. & Holmes, L. B. Familial occurrence of malformations possibly attributable to vascular abnormalities. *J. Pediatr.* **108**, 112–114 (1986).
13. Graziano, C. *et al.* Brief report Association of hereditary thrombocythemia and distal limb defects with a thrombopoietin gene mutation. **114**, 1655–1658 (2019).
14. Graziano, C., Magini, P., Superti-furga, A. & Seri, M. An Additional Family With

- Association of Hereditary Thrombocytosis and Transverse Limb Deficiency: Confirmation of a Rare Clinical Spectrum. 3211–3213 (2012). doi:10.1002/ajmg.a.35656
15. Holmes, V. A. & Wallace, J. M. W. Haemostasis in normal pregnancy: a balancing act? *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 428–432 (2005).
 16. Regan, L. & Rai, R. Epidemiology and the medical causes of miscarriage. *Baillieres. Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **14**, 839–854 (2000).
 17. Carmichael, S. L. *et al.* Risks of human limb deficiency anomalies associated with 29 SNPs of genes involved in homocysteine metabolism, coagulation, cell-cell interactions, inflammatory response, and blood pressure regulation. *Am. J. Med. Genet. A* **140**, 2433–2440 (2006).
 18. Doolittle, R. F. Step-by-step evolution of vertebrate blood coagulation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **74**, 35–40 (2009).
 19. Aird, W. C. Hemostasis and irreducible complexity. *J. Thromb. Haemost.* **1**, 227–230 (2003).
 20. Davie, E. W. & Ratnoff, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science (80-.)*. **145**, 1310–1312 (1964).
 21. Macfarlane, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as biological amplifier. *Nature* **202**, 498–499 (1964).
 22. Khan, S. & Dickerman, J. D. Hereditary thrombophilia. *Thromb. J.* **4**, 1–17 (2006).
 23. Egeberg, O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **13**, 516–530 (1965).
 24. Griffin, J. H., Evatt, B., Zimmerman, T. S., Kleiss, A. J. & Wideman, C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J. Clin. Invest.* **68**, 1370–1373 (1981).
 25. Dahlback, B., Carlsson, M. & Svensson, P. J. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 1004–1008 (1993).
 26. Comp, P. C., Nixon, R. R., Cooper, M. R. & Esmon, C. T. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J. Clin. Invest.* **74**, 2082–2088 (1984).
 27. Bertina, R. M. *et al.* Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* **369**, 64–67 (1994).

28. Poort, S. R., Rosendaal, F. R., Reitsma, P. H. & Bertina, R. M. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* **88**, 3698–3703 (1996).
29. Makris, M. Thrombophilia: grading the risk. *Blood* **113**, 5038–5039 (2009).
30. Rand, J. H. The antiphospholipid syndrome. *Annu. Rev. Med.* **54**, 409–424 (2003).
31. Szczeklik, A. *Interna Szczeklika*. (2012).
32. Association of idiopathic venous thromboembolism with single point mutation at Arg506 of factor V.
33. Semino, O. *et al.* The genetic legacy of Paleolithic Homo sapiens sapiens in extant Europeans: a Y chromosome perspective. *Science* **290**, 1155–1159 (2000).
34. Mari, D., Mannucci, P. M., Duca, F., Bertolini, S. & Franceschi, C. Mutant factor V (Arg506Gln) in healthy centenarians. *Lancet (London, England)* **347**, 1044 (1996).
35. Gehring, N. H. *et al.* Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat. Genet.* **28**, 389–392 (2001).
36. Gerhardt, A. *et al.* Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. *N. Engl. J. Med.* **342**, 374–380 (2000).
37. Bruce, A. & Massicotte, M. P. Thrombophilia screening: whom to test? *Blood* **120**, 1353–1355 (2012).
38. Crowther, M. A. & Kelton, J. G. Congenital thrombophilic states associated with venous thrombosis: a qualitative overview and proposed classification system. *Ann. Intern. Med.* **138**, 128–134 (2003).
39. Stenflo, J. A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. *J. Biol. Chem.* **251**, 355–363 (1976).
40. Esmon, C. T., Stenflo, J. & Suttie, J. W. A new vitamin K-dependent protein. A phospholipid-binding zymogen of a serine esterase. *J. Biol. Chem.* **251**, 3052–3056 (1976).
41. Esmon, C. T. The protein C pathway. *Chest* **124**, 26S–32S (2003).
42. Conard, J. *et al.* Homozygous protein C deficiency with late onset and recurrent coumarin-induced skin necrosis. *Lancet (London, England)* **339**, 743–744 (1992).

43. Pabinger, I., Karnik, R., Lechner, K., Slany, J. & Niessner, H. Coumarin induced acral skin necrosis associated with hereditary protein C deficiency. *Blut* **52**, 365–370 (1986).
44. Tsukune, N. *et al.* Lamin A overexpression promotes osteoblast differentiation and calcification in the MC3T3-E1 preosteoblastic cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **488**, 664–670 (2017).
45. Faust, S. N. *et al.* Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N. Engl. J. Med.* **345**, 408–416 (2001).
46. White, C., Guarascio, A. J. & Draper, H. M. Fatal purpura fulminans and septic shock in asplenic patient with *Streptococcus pneumoniae* bacteremia. *J. Am. Pharm. Assoc. (2003)*. **54**, 88–90 (2014).
47. Romeo, G. *et al.* Hereditary thrombophilia: identification of nonsense and missense mutations in the protein C gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 2829–2832 (1987).
48. Reitsma, P. H. *et al.* Protein C deficiency: a database of mutations. For the Protein C & S Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb. Haemost.* **69**, 77–84 (1993).
49. Millar, D. S., Wacey, A. I., Voke, J., Kakkar, V. V & Cooper, D. N. A novel point mutation (Val 297-->Met) in the serine proteinase domain of protein C in a patient with both venous and arterial thromboembolic disease. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **4**, 631–633 (1993).
50. Dahlback, B. & Stenflo, J. High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C4b-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 2512–2516 (1981).
51. Dahlback, B. Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb. Haemost.* **66**, 49–61 (1991).
52. Ploos van Amstel, J. K., van der Zanden, A. L., Bakker, E., Reitsma, P. H. & Bertina, R. M. Two genes homologous with human protein S cDNA are located on chromosome 3. *Thromb. Haemost.* **58**, 982–987 (1987).
53. Bertina, R. M. Nomenclature proposal for protein S deficiency. *XXXVI Annu. Meet. Sci. Stand. Comm. ISTH. Barcelona, Spain* (1990).

54. Lane, D. A., Olds, R. J. & Thein, S. L. Antithrombin III: summary of first database update. *Nucleic Acids Res.* **22**, 3556–3559 (1994).
55. Rosenberg, R. D. & Bauer, K. A. Thrombosis in inherited deficiencies of antithrombin, protein C, and protein S. *Hum. Pathol.* **18**, 253–262 (1987).
56. Bock, S. C. & Prochownik, E. V. Molecular genetic survey of 16 kindreds with hereditary antithrombin III deficiency. *Blood* **70**, 1273–1278 (1987).
57. Perry, D. J. & Carrell, R. W. Molecular genetics of human antithrombin deficiency. *Hum. Mutat.* **7**, 7–22 (1996).
58. Blomback, B. Fibrinogen and fibrin--proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thromb. Res.* **83**, 1–75 (1996).
59. Mullin, J. L., Norfolk, S. E., Weisel, J. W. & Lord, S. T. Clot lysis of variant recombinant fibrinogens confirms that fiber diameter is a major determinant of lysis rate. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **936**, 331–334 (2001).
60. de Moerloose, P. & Neerman-Arbez, M. Congenital fibrinogen disorders. *Semin. Thromb. Hemost.* **35**, 356–366 (2009).
61. Shemirani, A. H., Haramura, G., Bagoly, Z. & Muszbek, L. The combined effect of fibrin formation and factor XIII A subunit Val34Leu polymorphism on the activation of factor XIII in whole plasma. *BioChim. Biophys. Acta* **1764**, 1420–1423 (2006).
62. Humphries, S. E., Cook, M., Dubowitz, M., Stirling, Y. & Meade, T. W. Role of genetic variation at the fibrinogen locus in determination of plasma fibrinogen concentrations. *Lancet (London, England)* **1**, 1452–1455 (1987).
63. Tybjaerg-Hansen, A. *et al.* A common mutation (G-455--> A) in the beta-fibrinogen promoter is an independent predictor of plasma fibrinogen, but not of ischemic heart disease. A study of 9,127 individuals based on the Copenhagen City Heart Study. *J. Clin. Invest.* **99**, 3034–3039 (1997).
64. de Maat, M. P. *et al.* -455G/A polymorphism of the beta-fibrinogen gene is associated with the progression of coronary atherosclerosis in symptomatic men: proposed role for an acute-phase reaction pattern of fibrinogen. REGRESS group. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**, 265–271 (1998).
65. Sen, U., Mishra, P. K., Tyagi, N. & Tyagi, S. C. Homocysteine to hydrogen sulfide or hypertension. *Cell Biochem. Biophys.* **57**, 49–58 (2010).
66. Wouters, M. G. *et al.* Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil. Steril.* **60**, 820–825 (1993).

67. Guenther, B. D. *et al.* The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 359–365 (1999).
68. Kang, S. S. *et al.* Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am. J. Hum. Genet.* **48**, 536–545 (1991).
69. Levin, B. L. & Varga, E. MTHFR: Addressing Genetic Counseling Dilemmas Using Evidence-Based Literature. *J. Genet. Couns.* **25**, 901–911 (2016).
70. BERG, K. A NEW SERUM TYPE SYSTEM IN MAN--THE LP SYSTEM. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **59**, 369–382 (1963).
71. Gaubatz, J. W., Chari, M. V, Nava, M. L., Guyton, J. R. & Morrisett, J. D. Isolation and characterization of the two major apoproteins in human lipoprotein [a]. *J. Lipid Res.* **28**, 69–79 (1987).
72. Millar, D. S. *et al.* Molecular analysis of the genotype-phenotype relationship in factor VII deficiency. *Hum. Genet.* **107**, 327–342 (2000).
73. O'Hara, P. J. *et al.* Nucleotide sequence of the gene coding for human factor VII, a vitamin K-dependent protein participating in blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 5158–5162 (1987).
74. Toomey, J. R., Kratzer, K. E., Lasky, N. M., Stanton, J. J. & Broze, G. J. J. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood* **88**, 1583–1587 (1996).
75. Kyrle, P. A. High factor VIII and the risk of venous thromboembolism. *Hamostaseologie* **23**, 41–44 (2003).
76. Levinson, B., Kenwrick, S., Lakich, D., Hammonds, G. J. & Gitschier, J. A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics* **7**, 1–11 (1990).
77. Gitschier, J., Wood, W. I., Shuman, M. A. & Lawn, R. M. Identification of a missense mutation in the factor VIII gene of a mild hemophiliac. *Science* **232**, 1415–1416 (1986).
78. Hollestelle, M. J. *et al.* Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo--a closer look. *Thromb. Haemost.* **86**, 855–861 (2001).
79. Rick, M. E., Esmon, N. L. & Krizek, D. M. Factor IXa and von Willebrand factor modify the inactivation of factor VIII by activated protein C. *J. Lab. Clin. Med.* **115**, 415–421 (1990).

80. Noe, D. A. A mathematical model of coagulation factor VIII kinetics. *Haemostasis* **26**, 289–303 (1996).
81. Lamphear, B. J. & Fay, P. J. Proteolytic interactions of factor IXa with human factor VIII and factor VIIIa. *Blood* **80**, 3120–3126 (1992).
82. Koster, T., Blann, A. D., Briet, E., Vandenbroucke, J. P. & Rosendaal, F. R. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet (London, England)* **345**, 152–155 (1995).
83. Stavrou, E. & Schmaier, A. H. Factor XII: what does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis. *Thromb. Res.* **125**, 210–215 (2010).
84. Schmaier, A. H. The elusive physiologic role of Factor XII. *J. Clin. Invest.* **118**, 3006–3009 (2008).
85. Lammle, B. *et al.* Thromboembolism and bleeding tendency in congenital factor XII deficiency--a study on 74 subjects from 14 Swiss families. *Thromb. Haemost.* **65**, 117–121 (1991).
86. Konings, J. *et al.* The role of activated coagulation factor XII in overall clot stability and fibrinolysis. *Thromb. Res.* **136**, 474–480 (2015).
87. Soria, J. M. *et al.* A quantitative-trait locus in the human factor XII gene influences both plasma factor XII levels and susceptibility to thrombotic disease. *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 567–574 (2002).
88. Ishii, K. *et al.* Activated factor XII levels are dependent on factor XII 46C/T genotypes and factor XII zymogen levels, and are associated with vascular risk factors in patients and healthy subjects. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **11**, 277–284 (2000).
89. Muszbek, L., Berezky, Z., Bagoly, Z., Shemirani, A. H. & Katona, E. Factor XIII and atherothrombotic diseases. *Semin. Thromb. Hemost.* **36**, 18–33 (2010).
90. Mikkola, H. *et al.* Deficiency in the A-subunit of coagulation factor XIII: two novel point mutations demonstrate different effects on transcript levels. *Blood* **84**, 517–525 (1994).
91. Lim, B. C. B., Ariens, R. A. S., Carter, A. M., Weisel, J. W. & Grant, P. J. Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *Lancet (London, England)* **361**, 1424–1431 (2003).
92. Ariens, R. A. *et al.* The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin

- activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood* **96**, 988–995 (2000).
93. Muszbek, L. Deficiency causing mutations and common polymorphisms in the factor XIII-A gene. *Thromb. Haemost.* **84**, 524–527 (2000).
 94. Catto, A. J. *et al.* Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with venous thrombosis. *Blood* **93**, 906–908 (1999).
 95. Franco, R. F. *et al.* Factor XIII Val34Leu is a genetic factor involved in the etiology of venous thrombosis. *Thromb. Haemost.* **81**, 676–679 (1999).
 96. Bajt, M. L., Ginsberg, M. H., Frelinger, A. L. 3rd, Berndt, M. C. & Loftus, J. C. A spontaneous mutation of integrin alpha IIb beta 3 (platelet glycoprotein IIb-IIIa) helps define a ligand binding site. *J. Biol. Chem.* **267**, 3789–3794 (1992).
 97. Bray, P. F. *et al.* Platelet glycoprotein IIb. Chromosomal localization and tissue expression. *J. Clin. Invest.* **80**, 1812–1817 (1987).
 98. Lefkovits, J., Plow, E. F. & Topol, E. J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N. Engl. J. Med.* **332**, 1553–1559 (1995).
 99. McDowall, A. *et al.* A novel form of integrin dysfunction involving beta1, beta2, and beta3 integrins. *J. Clin. Invest.* **111**, 51–60 (2003).
 100. Shoenfeld, Y., Twig, G., Katz, U. & Sherer, Y. Autoantibody explosion in antiphospholipid syndrome. *J. Autoimmun.* **30**, 74–83 (2008).
 101. Miyakis, S. *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost.* **4**, 295–306 (2006).
 102. Skrzypczak, J. *et al.* [Frequency of antiphospholipid syndrome in women with pregnancy loss in multicenter study in Poland]. *Ginekol. Pol.* **82**, 749–754 (2011).
 103. Olech, E. M. Ocena częstości wybranych genetycznie uwarunkowanych zmian w układzie krzepnięcia i fibrylizacji u pacjentów dotkniętych jednostronnym zniekształceniem zmniejszającym kończyny. *Uniw. Med. im. K. Marcinkowskiego w Pozn.* (2014).
 104. Stoll, C. *et al.* Evaluation of the prenatal diagnosis of limb reduction deficiencies. EUROSCAN Study Group. *Prenat. Diagn.* **20**, 811–818 (2000).
 105. Kallen, B. A prospective study of some aetiological factors in limb reduction defects in Sweden. *J. Epidemiol. Community Health* **43**, 86–91 (1989).
 106. Swinyard CA, P. B. Some morphological considerations of normal and abnormal

- limb developm. *Limb Dev. Deform. Probl. Eval. Rehabil.* (1969).
107. Frantz CH, O. R. Congenital skeletal limb deficiencies. *J Bone Jt. Surg* **43A**, 1202–1224 (1961).
 108. Stephens, T. D. & Shepard, T. H. A review of limb defects in a large fetus collection. *Am. J. Hum. Genet.* **35**, 508–519 (1983).
 109. Robinow, M., Schatzman, E. R. & Oberheu, K. Peromelia, ipsilateral subclavian atresia, coarctation, and aneurysms of the aorta resulting from intrauterine vascular occlusion. *J. Pediatr.* **101**, 84–87 (1982).
 110. Bavinck, J. N. & Weaver, D. D. Subclavian artery supply disruption sequence: hypothesis of a vascular etiology for Poland, Klippel-Feil, and Mobius anomalies. *Am. J. Med. Genet.* **23**, 903–918 (1986).
 111. Heit, J. A. *et al.* Trends in the incidence of venous thromboembolism during pregnancy or postpartum: a 30-year population-based study. *Ann. Intern. Med.* **143**, 697–706 (2005).
 112. James, A. H., Bushnell, C. D., Jamison, M. G. & Myers, E. R. Incidence and risk factors for stroke in pregnancy and the puerperium. *Obstet. Gynecol.* **106**, 509–516 (2005).
 113. James, A. H. *et al.* Acute myocardial infarction in pregnancy: a United States population-based study. *Circulation* **113**, 1564–1571 (2006).
 114. James, A. H., Jamison, M. G., Brancazio, L. R. & Myers, E. R. Venous thromboembolism during pregnancy and the postpartum period: incidence, risk factors, and mortality. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **194**, 1311–1315 (2006).
 115. Kinzler, W. L., Prasad, V. & Ananth, C. V. The effect of maternal thrombophilia on placental abruption: Histologic correlates. *J. Matern. Fetal. Neonatal Med.* **22**, 243–248 (2009).
 116. Preston, F. E. *et al.* Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet (London, England)* **348**, 913–916 (1996).
 117. Sanson, B. J. *et al.* The risk of abortion and stillbirth in antithrombin-, protein C-, and protein S-deficient women. *Thromb. Haemost.* **75**, 387–388 (1996).
 118. Bremme, K. A. Haemostatic changes in pregnancy. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **16**, 153–168 (2003).
 119. Bell, S. Prevention of postpartum hemorrhage in low-resource settings : current perspectives. 737–752 (2013).

120. Kelada, S. N., Eaton, D. L., Wang, S. S., Rothman, N. R. & Khoury, M. J. The role of genetic polymorphisms in environmental health. *Environ. Health Perspect.* **111**, 1055–1064 (2003).
121. Long, S. MTHFR genetic testing : Controversy and clinical implications. (2017).
122. Kanaji, T. *et al.* A common genetic polymorphism (46 C to T substitution) in the 5'-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level. *Blood* **91**, 2010–2014 (1998).
123. Lugovskoi, E. V & Komisarenko, S. V. [Monoclonal antibodies as an instrument to study fibrin polymerization]. *Bioorg. Khim.* **26**, 883–891 (2000).
124. Halbmayr, W. M., Mannhalter, C., Feichtinger, C., Rubi, K. & Fischer, M. The prevalence of factor XII deficiency in 103 orally anticoagulated outpatients suffering from recurrent venous and/or arterial thromboembolism. *Thromb. Haemost.* **68**, 285–290 (1992).
125. Halbmayr, W. M., Mannhalter, C., Feichtinger, C., Rubi, K. & Fischer, M. [Factor XII (Hageman factor) deficiency: a risk factor for development of thromboembolism. Incidence of factor XII deficiency in patients after recurrent venous or arterial thromboembolism and myocardial infarction]. *Wien. Med. Wochenschr.* **143**, 43–50 (1993).
126. Franco, R. F. & Reitsma, P. H. Gene polymorphisms of the haemostatic system and the risk of arterial thrombotic disease. *Br. J. Haematol.* **115**, 491–506 (2001).
127. Stevens, S. M. *et al.* Guidance for the evaluation and treatment of hereditary and acquired thrombophilia. *J. Thromb. Thrombolysis* **41**, 154–164 (2016).
128. Schneider, J. A., Rees, D. C., Liu, Y. T. & Clegg, J. B. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 1258–1260 (1998).
129. Clark, J. S. C., Adler, G., Salkic, N. N. & Ciechanowicz, A. Allele frequency distribution of 1691G >A F5 (which confers Factor V Leiden) across Europe, including Slavic populations. *J. Appl. Genet.* **54**, 441–446 (2013).
130. Adler, G. *et al.* Prevalence of 1691G>A FV mutation in Poland compared with that in other Central, Eastern and South-Eastern European countries. *Bosn. J. basic Med. Sci.* **12**, 82–87 (2012).
131. Mäkelburg, A. B. U. *et al.* Brief Report Different risk of deep vein thrombosis and

- pulmonary embolism in carriers with factor V Leiden compared with non-carriers , but not in other thrombophilic defects . Results from a large retrospective family cohort study. **95**, 2008–2011 (2010).
132. Emmerich, J. *et al.* Combined Effect of Factor V Leiden and Prothrombin 20210A on the Risk of Venous Thromboembolism. 809–816 (2001).
 133. Bykowska, K., Vertun-Baranowska, B., Windyga, J. & Lopaciuk, S. [Prevalence of G20210A prothrombin gene mutation in Poland]. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **104**, 729–733 (2000).
 134. Garcia de Frutos, P., Fuentes-Prior, P., Hurtado, B. & Sala, N. Molecular basis of protein S deficiency. *Thromb. Haemost.* **98**, 543–556 (2007).
 135. Whitlatch, N. L., Ortel, T. L. & Ph, D. Thrombophilias : When Should We Test and How Does It Help ? (2008). doi:10.1055/s-2008-1047560.
 136. Bucciarelli, P. *et al.* Risk of Venous Thromboembolism and Clinical Manifestations in Carriers of Antithrombin , Protein C , Protein S Deficiency , or Activated Protein C Resistance A Multicenter Collaborative Family Study. (1999).
 137. Tait, R. C. *et al.* Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population. 106–112 (1994).
 138. Melissari E, Monte G, L. V. Congenital thrombophilia among patient with venous thromboembolism. *Blood Coagul. Fibrynolysis* **3**, 749–758 (1992).
 139. Ortel, T. L. Thrombosis and the Antiphospholipid Syndrome. 462–468
 140. Marlar, R. A. & Ph, D. Protein C in Thromboembolic Disease. **11**, (1985).
 141. Mahasandana, C., Suvatte, V., Manco-johnson, M. J., Jacobson, L. J. & Hathaway, W. E. Homozygous protein S deficiency in an infant with purpura fulminans. 5–8 (1990).

10 Załączniki

10.1 Zgoda Komisji Bioetycznej



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIUCollegium Maius
ul. Fredry 10
61-701Poznańtel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 889/11

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2005, Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2008r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniami klinicznymi produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: **03 listopada 2011 r.**

rozpatrzyła wniosek, który przedstawiła Pani:

prof. dr hab. Anna Latos- Bieleńska

w sprawie prowadzenia badań w

Katedrze i Zakładzie Genetyki Medycznej UM w PoznaniuGłówny badacz: **lek. med., mgr biol. Aleksander Jamsheer**

Członkowie zespołu

badawczego:

dr M. Badura- Stronka
mgr biol. A. Sowińska
mgr biol. Sz. Dębicki

Temat

badań: **"Badanie hipotezy płodowego incydentu naczyniowego (prenatalnej zakrzepicy) jako przyczyny występowania jednostronnych poprzecznych wad zmniejszających kończyn u człowieka".**

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

ZAŁĄCZNIKI

Podpisy członków Komisji Bioetycznej - Dotyczy Uchwały nr 889/11 z dnia 03.11.2011r.

prof. dr hab. JANUSZ WIŚNIEWSKI



prof. dr hab. ROMAN SZULC

prof. dr hab. JANUSZ SZYMAŚ

prof. dr hab. WOJCIECH SŁUŻEWSKI



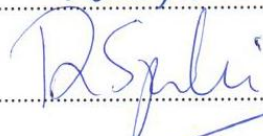
prof. dr hab. HENRYK WYSOCKI



dr hab. MACIEJ KRAWCZYŃSKI prof. UM



dr hab. ROBERT SPACZYŃSKI prof. UM



dr med. PIOTR TOMCZAK



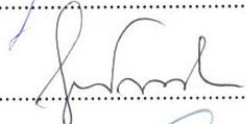
prof. dr hab. PAWEŁ CHEĆIŃSKI



prof. dr hab. JANUSZ PALUSZAK



ks. prof. dr hab. JERZY TROSKA



dr hab. JERZY W. OCHMAŃSKI prof. UAM



dr farm. OLIMPIA KLIMASZEWSKA



BARBARA LIPIAK



KOMISJA BIOETYCZNA
 PRZY
 UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
 im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
 61-701 Poznań, ul. Fredry 10
 tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
 fax (+48 61) 854 61 07

SKŁAD OSOBOWY KOMISJI BIOETYCZNEJ

03.11.2011r.

z dnia

Lp	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy
1.	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Zygmunt Przybylski	medycyna sądowa	Katedra Medycyny Sądowej UM ul. Święcickiego 6, Poznań
2.	Z- ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Janusz Wiśniewski	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, Poznań
3.	prof. dr hab. Roman Szulc	anestezjologia i reanimacja, otolaryngologia	I Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii UM, ul. Długa 1/2, Poznań
4.	prof. dr hab. Janusz Szymaś	anatomia patologiczna	Katedra Patomorfologii Klinicznej UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
5.	prof. dr hab. Wojciech Służewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UM ul. Szpitalna 27/33, Poznań
6.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Klinika Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
7.	dr hab. Maciej Krawczyński prof. UM	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UM ul. Grunwaldzka 55, Poznań
8.	dr hab. Robert Spaczyński prof. UM	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu UM, ul. Polna 33, 60-535 Poznań
9.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UM, ul. Łąkowa 1/2, Poznań
10.	prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UM, ZOZ MSWiA ul. Dojazd 34, Poznań
11.	prof. dr hab. Janusz Paluszak	fizjologia kliniczna	Katedra i Zakład Fizjologii UM, ul. Święcickiego 6
12.	ks. prof. dr hab. Jerzy Troska	teologia, etyka	Wydział Teologiczny UAM, ul. Wieżowa 2/4, Poznań
13.	dr hab. Jerzy W. Ochmański prof. UAM	prawnik	Wydział Prawa UAM, ul. Św. Marcin 90, Poznań
14.	dr farm. Olimpia Klimaszewska	farmaceuta	Apteka „Kalifarm”
15.	Barbara Lipiak	pielęgniarka	ZOZ Grunwald

10.2 Deklaracja Świadomej Zgody Pacjenta na wykonanie badań genetycznych

Deklaracja Świadomej Zgody Pacjenta na wykonanie molekularnych badań genetycznych

Dane dziecka lub pacjenta dorosłego

Nazwisko i imię pacjenta
Data urodzenia
Adres
Telefon kontaktowy

Dane rodzica lub opiekuna prawnego w przypadku pacjenta niepełnoletniego

Nazwisko i imię
Data urodzenia
Adres
Telefon kontaktowy

Wyrażam zgodę, na pobranie ode mnie lub dziecka materiału biologicznego: krew / (inne) do badań molekularnych w kierunku określenia podłoża genetycznego wad rozwojowych

Zostałem poinformowany, że:

1. Pobrany materiał biologiczny zostanie użyty w celu izolacji DNA oraz do wykonania badań molekularnych mających na celu rozszerzenie wiedzy na temat podłoża molekularnego chorób genetycznych.
2. W przypadku, gdy pokrewieństwo pomiędzy członkami badanej rodziny jest inne niż deklarowane, otrzymany wynik badania może być niewłaściwie zinterpretowany.
3. Wyizolowany DNA będzie przechowywany w odpowiednich warunkach, niemniej istnieje ryzyko degradacji DNA (proces naturalny), dlatego w wyjątkowych przypadkach może zająć potrzeba ponownego pobrania materiału w przyszłości.
4. Wyrażam zgodę na przekazanie mi odpowiednich informacji, jeśli wyniki badań naukowych prowadzonych w przyszłości mogłyby stanowić podstawę do rozpoznania choroby genetycznej lub zwiększonego ryzyka jej rozwoju.

W przypadku braku zgody proszę zaznaczyć

5. Jeśli w okresie między pobraniem materiału do diagnostyki molekularnej a datą wydania wyniku niepełnoletni badany ukończy 16 rok życia, konieczne jest podpisanie przez niego niniejszego formularza Deklaracji Świadomej Zgody na badania genetyczne (obok podpisu rodzice/opiekuna prawnego)

Zostałem poinformowany o charakterze badania genetycznego

.....

.....
Data
/ opiekuna prawnego

Podpis pacjenta / rodzica

10.3 Deklaracja Świadomej Zgody Pacjenta na wykonanie laboratoryjnych badań diagnostycznych

Deklaracja Świadomej Zgody Pacjenta na wykonanie laboratoryjnych badań diagnostycznych

Dane dziecka lub pacjenta dorosłego

Nazwisko i imię pacjenta
Data urodzenia
Adres
Telefon kontaktowy

Dane rodzica lub opiekuna prawnego w przypadku pacjenta niepełnoletniego

Nazwisko i imię
Data urodzenia
Adres
Telefon kontaktowy

Wyrażam zgodę, na pobranie ode mnie i od mojego dziecka materiału biologicznego:
 krew / (inne),
 do badań w kierunku określenia czynników ryzyka wad rozwojowych

Zostałem poinformowany, że:

1. Pobrany materiał biologiczny zostanie użyty w celu wykonania badań immunologicznych, biochemicznych i koagulologicznych mających na celu rozszerzenie wiedzy na temat podłoża wad wrodzonych.
2. Wyrażam zgodę na przekazanie mi odpowiednich informacji, jeśli wyniki badań naukowych prowadzonych w przyszłości mogłyby stanowić podstawę do rozpoznania choroby lub zwiększonego ryzyka jej rozwoju.

W przypadku braku zgody proszę zaznaczyć

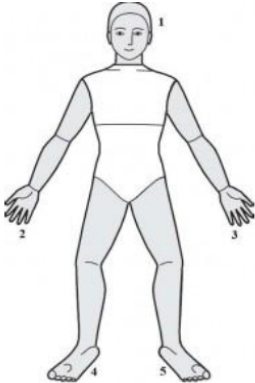
3. Jeśli w okresie między pobraniem materiału do diagnostyki a datą wydania wyniku niepełnoletni badany ukończy 16 rok życia, konieczne jest podpisanie przez niego niniejszego formularza Deklaracji Świadomej Zgody na diagnostyczne badania laboratoryjne (obok podpisu rodzica/opiekuna prawnego).

Zostałem(-am) poinformowany(-a) o charakterze badania.

.....
 Data

.....
 Podpis pacjenta / rodzica / opiekuna prawnego

10.4 Wzór ankiety klinicznej do badań czynników ryzyka wrodzonych ubytkowych wad kończyn

Data wizyty:	ID rodziny: (P - pacjent/K - kontrola)
Ankieta kliniczna	
do badań czynników ryzyka wrodzonych ubytkowych wad kończyn	
Wywiad dotyczący probanda:	
Imię i nazwisko probanda:	
Pesel probanda:	
ID probanda:	
Wiek w momencie badania:	
Opis wady kończyn:	P L
Wady towarzyszące (jeśli tak, to jakie):	
Leki przeciwkrzepliwe (jeśli tak to jakie?):	
Wywiad ciążyowy (infekcje, leki, pasma owodniowe?):	
Możliwość ABS?:	
Wynik PLT w morfologii (jeśli była):	
Wywiad dotyczący matki probanda:	
Imię i nazwisko matki:	
Pesel matki:	
ID matki:	
Wiek w momencie badania:	
Choroby w wywiadzie (jeśli tak, to jakie?):	
Wywiad położniczy (poronienia/ciąże obumarłe/urodzenia martwe, jeśli tak - rodowód?):	
Wywiad rodzinny (zatorowość płucna/zakrzepica żylna, jeśli tak to u kogo?)	
Leki przeciwkrzepliwe (jeśli tak to jakie?):	
Wynik PLT w morfologii (jeśli była):	

10.5 Wzór ankiety klinicznej dla kontroli do badań zmian w układzie krzepnięcia-fibrynolizy

Data wizyty:	ID kontroli: (D - dziecko/K - kobieta)
Ankieta kliniczna - KONTROLA do badań zmian w układzie krzepnięcia-fibrynolizy	
Wywiad dotyczący pacjenta:	
Imię i nazwisko pacjenta:	
Pesel pacjenta:	
ID pacjenta:	
Wiek w momencie badania:	
Wywiad ciążyowy (infekcje, leki, powikłania ciąży?):	
Wady wrodzone (jeśli tak, to jakie):	
Choroby w wywiadzie (jeśli tak, to jakie?):	
Leki przeciwkrzepliwe (jeśli tak to jakie?):	
Wynik PLT w morfologii (jeśli była):	
Wywiad położniczy (poronienia/ciąże obumarłe/urodzenia martwe, jeśli tak - rodowód?):	
Wywiad rodzinny (zatorowość płucna/zakrzepica żylna, jeśli tak to u kogo?)	
<u>Dane teleadresowe:</u>	
Adres korespondencyjny:	
telefon:	
email:	

10.6 Izolacja DNA z limfocytów metodą wysalania

- 1 Do izolacji DNA wykorzystano krew pobraną w systemie zamkniętym, w objętości 2-5 ml od dzieci i 10 ml od dorosłych do suchych probówek z 0,1% EDTA.
- 2 W celu wstępnej lizy erytrocytów krew przenoszono do 50-ml probówek wirówkowych i dodawano buforu do lizy (próby zawierające < 5 ml krwi do objętości 25 ml, próby zawierające > 5 ml krwi do objętości 30 ml).
- 3 Po dokładnym wymieszaniu, wirowano w 4°C przez 30 min. przy 2600 rpm (1200 rcf).
- 4 Odrzucano supernatant i dodawano 20 ml buforu 1x TKM; dokładnie mieszano i wirowano 4°C przez 30 min. przy 2600 rpm (1200 rcf).
- 5 Ponownie odrzucono supernatant i dodawano 20 ml buforu 1x TKM, dokładnie mieszano i wirowano 4°C przez 30 min. przy 2600 rpm (1200 rcf).
- 6 W razie potrzeby powtarzano powyższy etap po raz trzeci.
- 7 Po ostatnim płukaniu do osadu dodawano 750 µl TKM i przez pipetowanie rozbijano osad, następnie przenoszono go do 2-ml probówki.
- 8 Dodawano 400 µl 10% SDS, a następnie wytrząsano przez 20-25 min. w 60°C przy 650 rpm.
- 9 Dodano 800 µl 5M NaCl i intensywnie wytrząsano próby na wortexie.
- 10 Próby następnie wirowano przez 30 min. w temperaturze pokojowej przy 11 800 rpm.
- 11 Po zlaniu supernatantu do 15-ml probówek wirówkowych, dodawano 3 objętości 96% EtOH i inkubowano 10-15 min. w temperaturze pokojowej.
- 12 Poprzez wolne obracanie probówki strącano DNA i przenoszono go do probówki o objętości 1,5 ml.
- 13 Dodawano 1 ml lodowatego 70% EtOH (-20°C) i wirowano przez 5 min. w temperaturze pokojowej przy 9200 rpm.
- 14 Powtarzano kroki 12 i 13.
- 15 Po dokładnym usunięciu supernatantu, suszono osad w temperaturze 37°C.
- 16 W zależności od wielkości osadu, zawieszano go w 200-500 µl sterylnej H₂O i rozpuszczano przez około 10h w 20°C przy 500 rpm.