

P R A C E O R Y G I N A L N E

położnictwo

Częstość występowania trombofilii wrodzonej u kobiet z utratą ciąży w wielośrodkowych badaniach w Polsce

Incidence of hereditary thrombophilia in women with pregnancy loss in multi-center studies in Poland

Skrzypczak Jana¹, Rajewski Marcin¹, Wirstlein Przemysław¹, Goździewicz Tomasz¹,
Bręborowicz Grzegorz², Leszczyńska-Gorzela Bożena³, Ludwikowski Grzegorz⁴,
Preis Krzysztof⁵, Wołczyński Sławomir⁶, Zimmer Mariusz⁷

¹ Klinika Rozrodczości, Katedry Ginekologii, Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Polska

² Katedra i Klinika Perinatologii i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Polska

³ Katedra i Klinika Położnictwa i Perinatologii, Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Polska

⁴ Katedra i Zakład Andrologii Klinicznej Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy, Polska

⁵ Klinika Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku, Polska

⁶ Zakład Endokrynologii Ginekologicznej, Klinika Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, Polska

⁷ II Katedra i Klinika Ginekologii, Położnictwa i Neonatologii, Akademii Medycznej we Wrocławiu, Polska

Streszczenie

Cel pracy: celem pracy była ocena częstości występowania mutacji czynnika V Leiden i mutacji G20210A genu protrombiny u kobiet z utratą ciąży w Polsce.

Materiał i metody: badaniami objęto 396 pacjentek ze średnią wieku 30,4 ($\pm 4,6$) lat, które doświadczyły utraty przynajmniej jednej ciąży. Pacjentki, które rekrutowały się z 6 ośrodków akademickich: Poznania, Białegostoku, Lublina, Wrocławia, Bydgoszczy i Gdańska, podzielono na kilka grup. Grupę I stanowiły 122 pacjentki z trzema wczesnymi nawracającymi poronieniami, grupa II obejmowała 87 pacjentek z późną utratą ciąży i grupę III stanowiło 46 pacjentek, u których doszło do wewnątrzmacicznego obumarcia płodu. Pacjentki, które nie spełniały kryteriów kwalifikujących do wyżej określonych trzech grup zostały włączone do kolejnych grup. Pięćdziesiąt zdrowych kobiet, ze średnią wieku 29,2 ($\pm 4,5$) lat posiadających przynajmniej jedno dziecko stanowiło grupę kontrolną.

U wszystkich 396 kobiet z utratą ciąży i 50 kobiet z grupy kontrolnej wykonano badania w kierunku mutacji czynnika V Leiden i mutacji G20210A genu protrombiny. Materiał do badań molekularnych stanowiła krew obwodowa. Izolacji genomowego DNA z limfocytów dokonano za pomocą komercyjnego zestawu QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit.

Adres do korespondencji:

Jana Skrzypczak
Klinika Rozrodczości, Katedry Ginekologii, Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej UM w Poznaniu
Polska, 60-535 Poznań, ul. Polna 33
tel.: +48 61 841 93 02, fax: +48 61 841 96 25
e-mail: klinrozrod@gmail.com

Otrzymano: 10.01.2012
Zaakceptowano do druku: 20.04.2012

Skrzypczak J, et al.

Wyniki: spośród 396 kobiet z niewyjaśnioną utratą przynajmniej jednej ciąży, 36 (9,1%) było nosicielkami wrodzonej trombofilii. U 29 (7,3%) z nich wykryto mutację czynnika V Leiden, u 6 (1,5%) mutację G20210A genu protrombiny, a u 1 (0,3%) obie mutacje jednocześnie. W grupie kontrolnej obejmującej 50 kobiet nie stwierdzono żadnego z badanych defektów krzepnięcia. Mutacja czynnika V Leiden najczęściej (21,7%) występowała wśród pacjentek z wewnątrzmacicznym obumarciem płodu i była istotnie wyższa niż w grupie kobiet z nawracającymi wczesnymi poronieniami i późnymi utratami ciąży, odpowiednio $p < 0,011$ i $p < 0,006$. Częstość występowania mutacji G20210A genu protrombiny nie różniła się istotnie między grupami; najwyższą (2,6%) zanotowano wśród kobiet z wczesnymi i późnymi utratami ciąży, najniższą (0,8%) u kobiet z wczesnymi nawracającymi poronieniami.

Wnioski: u pacjentek, które doświadczyły wewnątrzmacicznego obumarcia płodu lub nawracających wczesnych poronień należy rozważyć badanie w kierunku obecności mutacji czynnika V Leiden, nawet przy ujemnym wywiadzie w kierunku choroby zakrzepowo-zatorowej.

Słowa kluczowe: **mutacja czynnika V Leiden / mutacja G20210A genu protrombiny /
/ wczesne poronienia nawracające / późne utraty ciąży /
/ wewnątrzmaciczne obumarcia płodu /**

Abstract

Aim: The aim of this study was to estimate the prevalence of factor V Leiden and prothrombin gene G20210A mutation among women with pregnancy loss in Poland.

Material and methods: we analyzed a group of 396 women (mean age of 30.4 (± 4.6) years), who experienced at least one pregnancy loss. Patients were recruited from 6 academic centers (Poznań, Białystok, Lublin, Wrocław, Bydgoszcz, Gdańsk), and were divided into the following groups: 122 patients with 3 episodes of early recurrent pregnancy loss (group 1), 87 patients with late pregnancy loss (group 2) and 46 patients with intrauterine pregnancy loss (group 3). Patients who did not fulfill the above inclusion criteria were divided into additional groups.

50 healthy women (mean age of 29.2 (± 4.5) years), having at least one child, constituted the control group. Factor V Leiden mutation and prothrombin G20210A gene mutation were examined in all 396 women with pregnancy loss and 50 controls. For molecular analysis peripheral blood was tested. Genome DNA isolation from lymphocyte was performed with commercial assay QIAampDNA Blood Mini Kit.

Results: Among 396 women with unexplained loss of at least one pregnancy 36 (9.1%) were carriers of inherited thrombophilia. Factor V Leiden mutation was present in 29 women (7.3%), prothrombin gene mutation G20210A in 6 (1.5%) and in 1 (0.3%) patient both mutations were detected. No coagulation defects were found in the control group. Factor V Leiden mutations was the most common disorder (21.7%) in patients with intrauterine demise and was significantly higher than in the group of women with early recurrent and late losses, $p < 0.011$ and $p < 0.006$ respectively. The frequency of G20210A prothrombin gene mutation did not differ substantially between the examined groups; the highest number (2.6%) was found in women with early and late pregnancy losses, and the lowest number (0.8%) was seen in women with early recurrent miscarriages.

Conclusion: Factor V Leiden screening should be performed, regardless of negative history of thrombosis, in patients who experienced intrauterine fetal demise or recurrent early miscarriages.

Key words: **factor V Leiden mutation / prothrombin G20210 gene mutation /
/ early recurrent pregnancy loss / late pregnancy loss /
/ intrauterine fetal demise /**

Wstęp

Utrata ciąży jest dla kobiety niezwykle traumatycznym wydarzeniem. Ocenia się, że 9-13% kobiet doświadczyło utraty jednej klinicznie rozpoznanej ciąży, 5% utraciło dwie, a 1-2% trzy i więcej ciąży [1]. Mimo dużego postępu w diagnostyce i rozwoju badań molekularnych przyczyna ponad 50% poronień nawracających, za które przyjmuje się trzy wczesne lub dwie późne utraty ciąży, pozostaje niewyjaśniona. W 1996 roku Sanson i wsp. [2] badając rodzinne uwarunkowania u pacjentek z żylną zakrzepicą zwrócili uwagę na związek trombofilii z utratą ciąży.

Trombofilia jest terminem określającym osobniczą skłonność do rozwoju zakrzepicy zarówno tętniczej, jak i żylniej.

Trombofilia może być nabyta (zespół antyfosfolipidowy) lub wrodzona. Ta ostatnia obejmuje niedobory białka C, białka S i antytrombiny oraz mutację czynnika V Leiden i mutację G20210A genu protrombiny. Obecność jednego z tych defektów w warunkach zmienionych przez ciążę powoduje stan hiperkoagulacji, który może prowadzić do zakrzepicy w mikronaczyniach łożyska [3]. Już sama ciąża inicjuje stan tzw. nadkrzepliwości przez wzrost stężenia czynników prozakrzepowych, zmniejszenie stężenia białka S, nabytą oporność na aktywowane białko C i obniżoną fibrynolizę. Równowaga między czynnikami pro- i antykoagulacyjnymi zapewnia prawidłową hemostazę, ale w obecności jednego z czynników trombofilii może ona być zaburzona.

Związek między trombofilią wrodzoną i przebiegiem ciąży różni się w zależności od rodzaju trombofilii i czasu utraty ciąży [4].

Wiele dotychczasowych publikacji wykazało związek trombofilii z późnymi utratami ciąży, a zaledwie w kilku pracach przeanalizowało wpływ wspomnianych mutacji na wczesne poronienia nawracające u pacjentek bez epizodów zatorowo-zakrzepowych [5]. Wynika z nich, że mutacja czynnika V Leiden, polimorfizm genu protrombiny oraz niedobór białka S, nabyta oporność na aktywowane białko C i hiperhomocysteinemia mają w różnym stopniu związek z nawracającymi poronieniami.

Według niektórych autorów wczesne poronienia nie są uwarunkowane matczyną trombofilią, a zmienny związek między trombofilią i utratą ciąży nie może być rozpatrywany jako przyczynowy [6,7,8,9].

Hipotezę, że niekorzystny wpływ trombofilii na rozród kobiet jest mniej istotny, niż się przyjmuje, potwierdza częste występowanie (15-28,1%) trombofilii wrodzonej w zdrowej populacji [10, 11]. Wrodzone defekty układu krzepnięcia dominują u ludzi zamieszkujących Europę Północną i rejon Morza Śródziemnego; praktycznie nie występują w południowej Azji, Amerykach, Afryce i Australii [12]. Niektóre teorie zakładają, iż wspomniane polimorfizmy mają postać zmian ewolucyjnych i przyczyniają się do zmniejszonej utraty krwi podczas urazów i porodu oraz zapobiegają powikłaniom krwotocznym w ciąży [13].

W ostatnim czasie pojawiły się prace na temat związku wrodzonej trombofilii i utraty ciąży w określonych populacjach. I tak u kobiet z Palestyny stwierdzono zależność tylko między mutacją czynnika V Leiden a wewnątrzmaciczną śmiercią płodu po 24 tygodniu ciąży [14]. W populacji niemieckiej nie stwierdzono zależności między mutacją czynnika V Leiden, polimorfizmem genu protrombiny i mutacją MTHFR a wczesnymi i późnymi poronieniami [15], podobnie jak w Izraelu, gdzie częstość występowania trombofilii wrodzonej wśród kobiet z niepowodzeniami położniczymi określono na 21,3%, a w bezobjawowej grupie kontrolnej na 20,7% [5]. W świetle tej analizy określenie ryzyka powikłań ciąży u kobiet z trombofilią wrodzoną jest bardzo trudne.

Cel pracy

Celem pracy była ocena częstości występowania trombofilii wrodzonej u kobiet z utratą ciąży w Polsce.

Materiał

Badaniami objęto 396 kobiet ze średnią wiekiem $\pm 30,38 (\pm 4,6)$ lat, które doświadczyły niewyjaśnionych utrat ciąży w latach 2004-2011. Pacjentki rekrutowały się z kilku ośrodków w Polsce: z Kliniki Rozrodczości UM w Poznaniu, z Kliniki Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej UM w Białymstoku, z Kliniki Położnictwa i Perinatologii UM w Lublinie, z Kliniki Położnictwa UM w Gdańsku, z Kliniki Perinatologii i Ginekologii UM w Poznaniu, z II Katedry i Kliniki Ginekologii, Położnictwa i Neonatologii AM we Wrocławiu, z Katedry i Zakładu Andrologii Klinicznej Collegium Medium Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy.

Trzysta dziewięćdziesiąt sześć pacjentek utraciło w sumie 1168 ciąży. U 15 kobiet wystąpiła choroba zakrzepowo-zatorowa przed pierwszą ciążą, w trakcie kolejnej ciąży lub po porodzie. Żadna z badanych kobiet nie chorowała na cukrzycę, nadciśnienie

i inne choroby przewlekłe, nie stosowała leków hormonalnych, preparatów przeciw-zakrzepowych ani nie paliła papierosów.

Pacjentki podzielono na kilka grup.

Grupę I stanowiły 122 pacjentki, które utraciły przynajmniej trzy wczesne, tj. do 9⁺⁶ tygodnia ciąży. Średnia wieku wynosiła 31,8 ($\pm 4,4$) lat. Pacjentki zakwalifikowane do tej grupy utraciły w sumie 423 ciąży; dwie z nich przeszły chorobę zakrzepową.

Grupa II obejmowała 87 pacjentek z późną tj. między 10 a 23⁺⁶ tygodniem utratą przynajmniej jednej ciąży. Średni wiek kobiet wynosił 30,1 ($\pm 4,5$) lat. Pacjentki z tej grupy doświadczyły utraty 196 ciąży. U dwóch pacjentek wystąpiła choroba zakrzepowo-zatorowa.

Grupę III stanowiło 46 pacjentek, u których doszło do wewnątrzmacicznej śmierci płodu w i powyżej 24 tygodnia ciąży. W sumie u 46 pacjentek, ze średnią wieku 31,5 ($\pm 6,5$) lat doszło do obumarcia 55 płodów. Cztery pacjentki chorowały na zakrzepowe zapalenie żył głębokich.

Pacjentki, które nie spełniały kryteriów kwalifikujących do wyżej wymienionych trzech grup zostały włączone do kolejnych grup:

- grupa IV obejmowała 116 pacjentek z wczesną (<10 t.c.) i późną utratą ciąży,
- grupa V zawierała 10 pacjentek z utratą wczesnej ciąży i wewnątrzmacicznym obumarciem płodu,
- grupa VI obejmowała 10 pacjentek z późną utratą ciąży i wewnątrzmacicznym obumarciem płodu,
- grupa VII obejmowała 5 pacjentek z utratą wczesnej i późnej ciąży oraz wewnątrzmacicznym obumarciem płodu.

Grupę kontrolną stanowiło 50 kobiet ze średnią wieku 29,2 ($\pm 4,5$ lat) z nieobciążonym wywiadem położniczym i posiadających przynajmniej jedno zdrowe dziecko. Kobiety te łącznie urodziły 72 zdrowych dzieci.

Wywiad osobisty i rodzinny w kierunku choroby zatorowo-zakrzepowej był ujemny. Żadna z kobiet z grupy kontrolnej nie chorowała na choroby autoimmunologiczne (choroby tarczycy, tocząc układowy, reumatoidalne zapalenie stawów itp.) oraz nie stosowała hormonalnej antykoncepcji ani innych leków hormonalnych.

Dane demograficzne kobiet z grupy badanej i kontrolnej przedstawiono w tabeli I.

Metodyka

U wszystkich 396 kobiet z niewyjaśnioną utratą ciąży i 50 kobiet z grupy kontrolnej wykonano badania w kierunku trombofilii wrodzonej oceniając mutację genu czynnika V (cz. V Leiden) i mutację genu G20210A protrombiny (cz. II). Badania wykonano w Pracowni Hemostazy Katedry i Kliniki Hematologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, która posiada certyfikat TÜVRheinland ISO9001.

Materiał do badań molekularnych stanowiła krew obwodowa pobrana do probówki zawierającej etylenodwuaminoczirooctan (EDTA). Transport krwi z ośrodków pozamiejscowych odbywał się w suchym lodzie, natomiast z Kliniki Rozrodczości oraz Kliniki Perinatologii i Ginekologii w Poznaniu krew do laboratorium przekazywano najpóźniej do 30 min. w temp. 0°C w termoizolacyjnym opakowaniu. Izolacji genomowego DNA z limfocytów krwi dokonano za pomocą komercyjnego zestawu QIAamp® DNA Blood Mini Kit; (Qiagen Inc. Germany).

Badania punktowej mutacji genu czynnika V G1691A oraz wariantu G20210A genu protrombiny wykonano za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy – PCR i porównania polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych – RFLP.

Reakcję PCR prowadzono przy zastosowaniu polimerazy typu *hot start*, w termocyklerze Biometra (Germany). Do amplifikacji czynnika V wykorzystano specyficzne startery: 5'CAT-GAGAGACATCGCCTCTG3' oraz 5'GACCTAACATGGTTCTAGCCAGAAG3' (TIB MolBiol, Polska). Długość pierwotnego produktu reakcji PCR wynosiła 146 pz. Produkt reakcji trawiono przy pomocy endonukleazy MnlI (Fermentas, Litwa), w 370C/1h. Produkty reakcji oceniano na 2% żelu agarozowym, z dodatkiem bromku etydy, w 0,5x buforze TBE. Wizualizację DNA na żelu przeprowadzono w świetle UV. Jako marker mas molekularnych zastosowano pUC19DNA/MspI. W zależności od genotypu uzyskano następujące wielkości fragmentów restrykcyjnych: homozygota GG 25, 37, 84 pz, heterozygota GA 25, 37, 84, 121 pz, homozygota 25, 121 pz.

Do oznaczenia polimorfizmu G20210A genu protrombiny wykorzystano specyficzne startery: 5'CAATAAAAGTGACTCTCATC3' oraz 5'AGGTGGTGGATTCTTAAGTC'3 (TIB MolBiol, Polska). Długość pierwotnego produktu reakcji PCR wynosiła 118 pz. Produkt reakcji trawiono przy pomocy endonukleazy TaqI (Fermentas, Litwa), w 650C/1h. Oceny dokonano tak jak dla czynnika V. W zależności od genotypu uzyskano następujące wielkości fragmentów restrykcyjnych: homozygota GG 98, 20 pz, heterozygota GA 118, 98, 20 pz, homozygota AA nie ulega trawieniu, 118 pz.

Metoda statystyczna

Do obliczenia różnic w rozkładzie występowania mutacji czynnika V Leiden i mutacji czynnika II w badanych grupach zastosowano test χ^2 . Za istotny statystycznie przyjęto poziom $p < 0,05$. Stosunek szans (OR) i przedział ufności (CI 95%) zależności wystąpienia określonej patologii ciąży, związanej z wystąpieniem mutacji wyznaczono metodą regresji logistycznej. Do przeprowadzenia obliczeń użyto pakietu statystycznego SigmaStat3.5 (Ashburn, USA).

Wyniki

Spośród 396 kobiet z niewyjaśnioną utratą przynajmniej jednej ciąży, 36 (9,1%) było nosicielkami wrodzonej trombofilii. U 29 (7,3%) z nich wykryto mutację czynnika V Leiden, u 6 (1,5%) mutację G20210A genu protrombiny, a u 1 (0,3%) obie mutacje jednocześnie. Tylko jedna z kobiet była homozygotą w zakresie mutacji czynnika V Leiden.

W grupie kontrolnej, obejmującej 50 kobiet, nie stwierdzono żadnej z badanych trombofilii. Częstość występowania analizowanych mutacji w poszczególnych grupach badanych i w grupie kontrolnej przedstawiono w tabeli II.

Najwyższy odsetek (21,7%) nosicielstwa mutacji czynnika V Leiden zanotowano wśród kobiet z wewnątrzmacicznym obumarciem płodu. W tej grupie częstość występowania mutacji czynnika V Leiden była istotnie większa niż wśród kobiet z nawracającymi wczesnymi poronieniami i z późnymi utratami ciąży, odpowiednio $p < 0,011$ i $p < 0,006$.

Wśród kobiet, u których dochodziło do utraty wczesnej i/lub późnej utraty ciąży oraz wewnątrzmacicznego obumarcia płodu (grupa V, VI, VII) częstość występowania mutacji czynnika V Leiden wahała się między 10 a 20%.

U nosicielek mutacji czynnika V Leiden ryzyko wewnątrzmacicznego obumarcia płodu było kilkakrotnie wyższe niż ryzyko wczesnych nawracających poronień (OR – 3,95; CI 95% 1,51 – 11,64) lub późnych utrat ciąży (OR – 5,15; CI 95% 1,50 – 20,1).

Częstość występowania mutacji G20210A genu protrombiny była najwyższa (2,6%) wśród kobiet z wczesnymi i późnymi utratami ciąży (grupa IV) najniższa natomiast (0,8%) wśród kobiet z wczesnymi nawracającymi poronieniami (grupa I). Częstość występowania mutacji G20210A genu protrombiny nie różniła się istotnie między badanymi grupami.

Dyskusja

Od 1996 roku, kiedy w badaniach nad rodzinnym występowaniem trombofilii po raz pierwszy zwrócono uwagę na związek zaburzeń krzepnięcia z różnymi powikłaniami ciąży, ukazało się wiele prac na ten temat. Większość z nich określała częstość występowania trombofilii, czy to nabytej czy wrodzonej, u kobiet z wczesnymi i późnymi utratami ciąży oraz ze stanem przedrzucawkowym i ograniczeniem wewnątrzmacicznego wzrastania płodu, usiłując odpowiedzieć na pytanie, u których kobiet – i czy w ogóle – jest zalecany skrining trombofilii. Inne prace usiłowały wyjaśnić mechanizm utraty ciąży w trombofiliiach, jeszcze inne dotyczyły zasadności farmakologicznej profilaktyki, czyli przeciwwązrowego leczenia w kolejnej po niepowodzeniu ciąży.

Wyniki prezentowane w pracach były różne, czasami rozbieżne, co można tłumaczyć nie tylko odmienną populacją badanych kobiet, ale także różną metodyką i niejednoznacznością kryteriami wczesnych i późnych poronień czy wewnątrzmacicznego obumarcia płodu, np. Kjellberg i wsp. [16] za późne poronienia przyjęli utratę ciąży między 17 a 22 tygodniem ciąży, podczas gdy w większości badań definicja późnego poronienia obejmuje utratę ciąży od 10 tygodnia jej trwania [17].

Poza tym częste występowanie trombofilii wrodzonej wśród zdrowej populacji rasy kaukaskiej powoduje, że negatywny wpływ trombofilii na przebieg ciąży nie jest taki jednoznaczny. Bellver i wsp. [10] ocenili częstość występowania trombofilii wrodzonej w zdrowej populacji aż na 28,1%, inni jak Kupfermanc i wsp. [11] na 15–17%. W związku z tym powyżsi autorzy uważają, że skrining trombofilii u rasy kaukaskiej nie powinien być rekomendowany.

Wyniki naszych badań pozostają diametralnie różne, bowiem nie wykryliśmy ani mutacji czynnika V Leiden, ani mutacji czynnika II w grupie kontrolnej, która obejmowała 50 zdrowych, posiadających dzieci kobiet.

Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że również w zdrowej populacji marokańskiej nie stwierdzono mutacji czynnika V Leiden, podczas gdy w leżącej w tej samej części Afryki Tunezji wykryto go u 6,1% zdrowych kobiet [18, 19, 20, 21], podobnie jak u najbliższych nam sąsiadów, czyli w populacji niemieckiej (7,4%) [15].

Nie podlega żadnej dyskusji, że mutacja czynnika V Leiden zwiększa ryzyko choroby zakrzepowo-zatorowej podczas ciąży i porożu, ale kontrowersyjnym jest jej wpływ na przebieg ciąży.

W naszych wielośrodkowych badaniach analizowaliśmy częstość występowania mutacji czynnika V Leiden i mutacji czynnika II u kobiet z nawracającymi wczesnymi poronieniami, późnymi utratami ciąży i wewnątrzmacicznym obumarciem płodu.

Wyniki tych badań wykazały istotny związek między mutacją czynnika V Leiden i wewnątrzmacicznym obumarciem płodu, ale nie z wczesnymi nawracającymi poronieniami i późnymi utratami ciąży. Spośród 46 kobiet z wewnątrzmacicznym obumarciem płodu 21,7% było nosicielkami mutacji czynnika V Leiden. Podobne wyniki uzyskali Abu-Asab i wsp. [14] w badaniach kobiet palestyńskich przy prawie identycznej klasyfikacji nawracających utrat ciąży i wewnątrzmacicznego obumarcia płodu. Również w raporcie EPCOT [22] ryzyko wewnątrzmacicznego obumarcia płodu u kobiet z trombofilia było wyższe niż ryzyko poronienia (3,6 v 1,3).

Dane z piśmiennictwa i własne wyniki potwierdzają istotny związek między mutacją czynnika V Leiden i wewnątrzmacicznymi obumarzeniami płodu, dlatego też u kobiet, które doświadczyły tego rodzaju powikłań należy rozważyć wykonanie skriningu w kierunku mutacji czynnika V Leiden. Wprawdzie aktualne rekomendacje *American College of Chest Physicians* (ACCP) [23] nie zalecają skriningu w kierunku trombofilii wrodzonej u kobiet z niepowodzeniami ciążowymi ani profilaktyki przeciwzakrzepowej u pacjentek z rozpoznaną trombofilia wrodzoną i obciążonym wywiadem położniczym, co trudno zaakceptować w klinicznej praktyce.

W piśmiennictwie nie ma zgodności co do wpływu mutacji G20210A genu protrombiny na wewnątrzmaciczne obumarzenia płodu. Tylko w badaniach grupy norweskiej [24] powyższa mutacja była istotnie związana z wewnątrzmaciczną śmiercią płodu, gdzie OR wyniosło 4,0 (95% CI 1,1–14,4). Takiej zależności nie obserwowano ani dla czynnika V Leiden ani dla niedoboru antytrombiny.

W naszych badaniach spośród 46 kobiet z wewnątrzmaciczną śmiercią płodu tylko 2,2% było nosicielkami mutacji G20210A genu protrombiny.

Istotny związek między mutacją czynnika II i wczesnymi oraz późnymi utratami ciąży wykazali Kovalevsky i wsp. [25] oraz Rey i wsp. [4]. My, podobnie jak Abu-Asab i wsp. [14] takich zależności nie obserwowaliśmy.

Jeszcze bardziej kontrowersyjnym jest związek wrodzonej trombofilii z nawracającymi wczesnymi poronieniami. Reznikoff-Etievant i wsp. [26] zbadali 260 kobiet, które doświadczyły dwóch lub więcej poronień przed 10 tygodniem ciąży i znaleźli, że 10,3% z tych kobiet było nosicielkami mutacji czynnika V Leiden w porównaniu do 4,6% kobiet z grupy kontrolnej. Autorzy wnioskują, że mutacja czynnika V Leiden jest istotnie związana z nawracającymi utratami wczesnych ciąży. Stosując te same kryteria czasowe odnośnie wczesnych poronień (<10 t.c.) uzyskaliśmy podobne wyniki. Spośród 122 kobiet z trzema poronieniami przed 10 tygodniem ciąży, 5,7% było nosicielkami mutacji czynnika V Leiden w porównaniu do braku nosicielstwa czynnika V Leiden w grupie kontrolnej. Natomiast Bellver i wsp. [10] badając 24 kobiety rasy kaukaskiej z przynajmniej 3 poronieniami między 5 a 13 tygodniem ciąży i 6 kobiet z 2 poronieniami, nie znaleźli u żadnej z nich nosicielstwa mutacji czynnika V Leiden ani mutacji czynnika II, tylko u 2 wykryli obniżony poziom białka S.

Do metaanalizy Robertson i wsp. [27] włączono 79 badań, z czego 25 (7167 pacjentek) dotyczyło związku między trombofilia i utratą wczesnej ciąży, a 15 (4038 pacjentek) związku trombofilii z utratą późnej ciąży. Podczas gdy OR dla utraty wczesnej ciąży u heterozygot mutacji czynnika V Leiden wyniosło 1,68

Tabela I. Dane demograficzne pacjentek z grupy badanej i kontrolnej.

	Grupa badana	Grupa kontrolna
Liczba kobiet	396	50
Średni wiek w latach	30,4 (±4,6)	29,2 (±4,5)
Liczba utraconych ciąży	1168	-
Liczba zdrowych dzieci	111	72
Choroba zakrzepowo-zatorowa	15	-
Choroba zakrzepowo-zatorowa w rodzinie	16	-

(95% CI 1,09–2,58), to dla utraty późnej ciąży kształtowało się na poziomie 2,06 (95% CI 1,10–3,86). Autorzy konkludują, że rzeczywiście kobiety z trombofilia są obciążone większym ryzykiem choroby zatorowo-zakrzepowej i większym ryzykiem powikłań podczas ciąży. Jednak mimo wzrostu względnego ryzyka, ryzyko absolutne pozostaje małe.

Natomiast analiza 101 kobiet z populacji niemieckiej nie potwierdziła związku między mutacjami czynnika V Leiden i czynnika II a wczesnymi (<12 t.c.) i późnymi utratami ciąży. Nosicielstwo mutacji czynnika V Leiden wyniosło odpowiednio 8,7 i 3,1% przy 7,4% w grupie kontrolnej [15].

Uzyskane przez nas wyniki są zbliżone z opublikowanymi w metaanalizie Rey i wsp. [4] gdzie OR dla mutacji czynnika V Leiden i wczesnych poronień wynosi 2,01 (CI 95 1,13–3,58), a dla mutacji czynnika V Leiden i późnych utrat ciąży 7,83 (CI 95 2,83–21,67). Jest jednak mało prawdopodobne, aby zakrzepowy mechanizm odgrywał rolę w utracie ciąży do 12 tygodnia jej trwania. W odróżnieniu od zespołu antyfosfolipidowego, w zakresie trombofilii wrodzonej brakuje prac eksperymentalnych dotyczących różnicowania trofoblastu i wczesnej placentacji [28]. W jednym z badań wykazano, że mysz pozbawiona tromboomoduliny nie jest zdolna utrzymać ciąży dłużej niż 8,5 tygodni. Utrata płodu w tym modelu jest spowodowana aktywacją wykrzepiania w przestrzeni maczyno-płodowej przez czynniki tkankowe. Wykazano, że aktywujące krzepnięcie czynniki indukują śmierć komórki i hamują wzrastanie trofoblastu. Podanie myszom aspiryny lub heparyny opóźniało absorpcję zarodków, ale nie odnawiało różnicowania trofoblastu ani nie odwracało jego nieprawidłowego wzrastania [29].

Z naszych badań kosmówek i łożysk z ciąży powikłanych zespołem antyfosfolipidowym i trombofilia wrodzoną wynika, że najbardziej charakterystyczną cechą są złogi fibryny odkładające się między kosmkami i w płycie kosmkowej oraz, że leczenie aspiryną i heparyną nie zapobiega odkładaniu się fibryny ani zastojowi w krążeniu płodowym i maczynym [30].

Ostatnio zwrócono uwagę na jeszcze inne powikłania związane z mutacją czynnika V Leiden i przeciwciałami antyfosfolipidowymi. Wykazano, że mogą być one istotne w patogenezie niedokrwiennego udaru w okresie perinatalnym nie tylko u matek, ale również u płodów.

Tabela II. Częstość występowania analizowanych mutacji w grupach badanych i kontrolnej.

Grupa	Rodzaj utraty ciąży	Liczba kobiet	Czynnik V Leiden		Czynnik II		Czynnik V Leiden i czynnik II		Ogółem	
			L	%	L	%	L	%	L	%
I	trzy nawracające wczesne poronienia <10 t.c.	122	7	5,7	1	0,8	1	0,8	9	7,4
II	przynajmniej jedna niewyjaśniona utrata ciąży (≥10 t.c. do 23 ⁺⁶)	87	4	4,6	1	1,2	-	-	5	5,8
III	wewnątrzmaciczne obumarcie płodu (≥24t.c.)	46	10	21,7	1	2,2	-	-	11	23,9
IV	wczesne (<10 t.c.) i późne (do 23 ⁺⁶) utraty ciąży	116	4	3,4	3	2,6	-	-	7	6,0
V	wczesne (<10 t.c.) utraty ciąży i wewnątrzmaciczne obumarcie płodu (≥24 t.c.)	10	1	10,0	-	-	-	-	1	10,0
VI	późne utraty (do 23 ⁺⁶ t.c.) i wewnątrzmaciczne obumarcia płodu	10	2	20,0	-	-	-	-	2	20,0
VII	wczesne (<10 t.c.) i późne (do 23 ⁺⁶ t.c.) utraty ciąży oraz wewnątrzmaciczne obumarcia płodu	5	1	20,0	-	-	-	-	1	20,0
kontrolna	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-

Czterdzieści siedem noworodków z klinicznymi objawami udaru, potwierdzonego radiologicznie, zbadano w kierunku trombofilii potwierdzając ją u 64% badanych dzieci i u 68% ich matek [31].

Odnosnie leczenia heparyną kobiet z trombofilją wrodzoną w ciąży nie ma konsensusu. Pomimo, że większość badań potwierdza korzystny wpływ stosowania leków przeciwzakrzepowych na rozwój ciąży u kobiet z trombofilją i uprzednią utratą płodów, to w ostatnim czasie nie brakuje głosów krytycznych podważających zasadność farmakologicznej profilaktyki u tych kobiet [6, 32].

Jednym z argumentów przeciw stosowaniu leków przeciwzakrzepowych w ciąży i położeniu u kobiet z trombofilją jest brak randomizowanych badań z podwójnie ślepa próbą. Kontrowersje budzi nadal odpowiedź na pytanie o związek przyczynowo-skutkowy wrodzonej trombofilii i utrat wczesnych ciąży.

Mimo braku jednoznacznych zaleceń w wielu ośrodkach diagnostyki i leczenia poronień nawracających, kobietom z trombofilją wrodzoną i utratą płodów przedstawia się korzyści i zagrożenia stosowania leków przeciwzakrzepowych w ciąży.

Wniosek

U pacjentek, które doświadczyły wewnątrzmacicznego obumarcia płodu lub nawracających wczesnych poronień należy rozważyć wykonanie badania na nosicielstwo mutacji czynnika V Leiden, nawet przy ujemnym wywiadzie w kierunku choroby zakrzepowo-zatorowej.

Praca została zrealizowana z funduszy MNiSW nr N N407056637.

Piśmiennictwo

- Lissalde-Lavigne G, Cochery-Nouvelon E, Mercier E, [et al.]. The association between hereditary thrombophilias and pregnancy loss. *Hematologica*. 2005, 90, 1223-1230.
- Sanson B, Friederich P, Simioni P, [et al.]. The risk of abortion and stillbirth in antithrombin-, protein C-, and protein S-deficient women. *Thromb Haemost*. 1996, 75, 387-388.
- Coppens M, Folkeringa N, Teune J, [et al.]. Outcome of the subsequent pregnancy after a first loss in women with the factor V Leiden or prothrombin 20210A mutations. *J Thromb Haemostat*. 2007, 5, 1444-1448.
- Rey E, Kahn S, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet*. 2003, 361, 901-908.
- Carp H, Salomon O, Seidman D, [et al.]. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod*. 2002, 17, 1633-1637.
- Middeldorp S, van Hylckama Vlieg A. Does thrombophilia testing help in the clinical management of patients? *Br J Haematol*. 2008, 143, 321-335.
- Gris J. Thrombophilia and pregnancy loss: cause or association. *Thrombosis Research*. 2009, 123, 105-110.
- Rogue K. Czy trombofilia prowadzi do wczesnych poronień w pierwszym trymestrze ciąży. *Ginekologia po Dyplomie*. 2004, 11, 71-74.
- Rogue H, Paidas M, Fauni E, [et al.]. Maternal thrombophilias are not associated with early pregnancy loss. *Thromb Haemost*. 2004, 91, 290-295.
- Bellver J, Soares S, Alvarez C, [et al.]. The role of thrombophilia and thyroid autoimmunity in unexplained infertility, implantation failure and recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod*. 2008, 23, 278-284.
- Kupferminc M, Eldor A, Steinman N, [et al.]. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med*. 1999; 340, 9-13.

Częstość występowania trombofilii wrodzonej u kobiet z utratą ciąży...

12. Rees D, Cox M, Clegg J, [et al.]. World distribution of factor V Leiden. *Lancet*. 1995, 346, 1133-1134.
13. Van Dunné F, De Craen A, Heijmans B, [et al.]. Gender-specific association of the factor V Leiden mutation with fertility and fecundity in a historic cohort. The Leiden 85-Plus Study. *Hum Reprod*. 2006, 21, 967-997.
14. Abu-Asab N, Ayesh K, Ateeg R, [et al.]. Association of inherited thrombophilia with recurrent pregnancy loss in Palestinian women. *Obstet Gynecol Intern*. 2011, 2011: 689684. Published online 2011 June 14. doi: 10.1155/2011/689684.
15. Pauer H, Voigt-Tschirschwitz T, Hinney B, [et al.]. Analyses of three common thrombophilic gene mutations in German women with recurrent abortions. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2003, 82, 942-947.
16. Kjellberg U, van Rooijen M, Bremme K, Hellgren M. Factor V Leiden mutation and pregnancy-related complications. *Am J Obstet Gynecol*. 2010, 203, 1-8.
17. Farquharson R, Jauniaux E, Exalto N. Updated and revised nomenclature for description of early pregnancy events. *Hum Reprod*. 2005, 20, 3008-3011.
18. Miraoui N, Borgi L, Gris J, [et al.]. Factor V Leiden, Prothrombin G20210A and antibodies against phospholipids in recurrent spontaneous abortion. *J Thromb Haemost*. 2004, 2, 1482-1484.
19. Chafa O, Reghis A, Aubert A, Fischer A. Prevalence of the FVQ506 (factor V Leiden) mutation in the normal thrombophilic Algerian population. *Br J Haematol*. 1997, 97, 688-689.
20. Irani-Hakime N, Tamim H, Kreidy R, Almawi W. The prevalence of factor V R506Q mutation-Leiden among apparently healthy Lebanese. *Am J Hematol*. 2000, 65, 45-49.
21. Mathonnet F, Nadfii S, Serazin-Leroy V, [et al.]. Absence of factor V Leiden mutation and low prothrombin G20210A mutation prevalence in a healthy Moroccan population. *Thromb Haemost*. 2002, 88, 1073-1074.
22. Preston F, Rosendaal F, Walker L, [et al.]. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet*. 1996, 348, 913-916.
23. American College of Chest Physician February 8, 2012. Executive Summary: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis 9th ed: American College of Chest Physician Evidence-Based Clinical Practice Guidelines.
24. Helgadottir L, Skjeldestad F, Jacobsen A, [et al.]. The association of inherited thrombophilia and intrauterine fetal death: a case-control study. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2011, 22, 651-656.
25. Kovalevsky G, García C, Berlin J, [et al.]. Evaluation of the association between hereditary thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2004, 164, 558-563.
26. Reznikoff-Etiévant M, Cayol V, Carbonne B, [et al.]. Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutations are risk factors for very early recurrent miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol*. 2001, 108, 1251-1254.
27. Robertson L, Wu O, Langhorne P, [et al.]. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol*. 2005, 132, 171-196.
28. Middeldorp S. Pregnancy failure and heritable thrombophilia. *Semin Hematol*. 2007, 44, 93-97.
29. Isermann B, Sood R, Pawlinski R, [et al.]. The thrombomodulin-protein C system is essential for the maintenance of pregnancy. *Nat Med*. 2003, 9, 331-337.
30. Skrzypczak J, Jasiński P, Wirstlein P, [i wsp.]. Histologiczne zmiany w łożyskach i kosmówkach u kobiet z zespołem antyfosfolipidowym i trombofilią wrodzoną. *Ginekol Pol*. 2011, 82, 652-663.
31. Simchen M, Goldstein G, Lubetsky A, [et al.]. Factor V Leiden and antiphospholipid antibodies in either mothers or infants increase the risk for perinatal arterial ischemic stroke. *Stroke*. 2009, 40, 65-70.
32. Lindqvist P. Should thromboprophylaxis be used in hereditary thrombophilias with RPL- against. In: Recurrent Pregnancy Loss Causes, controversies and treatment. Ed. Howard J.A. Carp, Informa Healthcare. 2007, 143-145.



MAZURSKA SZKOŁA USG I GINEKOLOGII

KURSY ORGANIZOWANE PRZEZ MAZURSKĄ SZKOŁĘ USG I GINEKOLOGII

6-11 maja

USG w ginekologii i położnictwie dla początkujących.
Teoria i praktyka.

Kierownik naukowy: prof. dr hab. Romuald Dębski

17-19 maja

Diagnostyka prenatalna z elementami echokardiografii płodu.

Kierownik naukowy: dr hab. Dariusz Borowski

24-26 maja

Kolposkopia dla początkujących.

Kierownik naukowy: prof. dr hab. Andrzej Malarewicz

31 maja – 2 czerwca

Choroby sutka z elementami USG.

Kierownik naukowy: prof. dr hab. Romuald Dębski

14-16 czerwca

Patologia ciąży.

Kierownik naukowy: prof. dr hab. Romuald Dębski

29 sierpnia – 1 września

USG w ginekologii i położnictwie dla zaawansowanych.

Kierownik naukowy: prof. dr hab. Romuald Dębski

16-21 września

USG w ginekologii i położnictwie dla początkujących.

Teoria i praktyka.

Kierownik naukowy: prof. dr hab. Romuald Dębski

27-29 września

Doppler w ginekologii i położnictwie.

Kierownik naukowy: prof. dr hab. Mariusz Dubiel

4-6 października

Diagnostyka prenatalna z elementami echokardiografii płodu.

Kierownik naukowy: dr hab. Dariusz Borowski

11-13 października

Kolposkopia dla zaawansowanych.

Kierownik naukowy: prof. dr hab. Andrzej Malarewicz

21-24 listopada

USG w ginekologii i położnictwie dla zaawansowanych.

Kierownik naukowy: prof. dr hab. Romuald Dębski

Wszelkie informacje oraz zapisy na kursy:

www.usg.pisz.pl, usg@usg.pisz.pl

tel.: 0 504 075 804

MAZURSKA SZKOŁA USG I GINEKOLOGII,

GEMELLI S.C.

uL. Leśna 18, 12-200 Pisz