

Badania molekularne w kierunku trombofilii u pacjentek skierowanych do poradni genetycznej z powodu niepowodzeń ciąży. Doświadczenia jednego ośrodka

Molecular diagnostic tests for thrombophilia in patients referred to genetic counseling clinic because due to recurrent pregnancy failure. One center's experience.

Pasińska Magdalena^{1,2}, Soszyńska Krystyna³, Runge Agata^{1,2}, Dąbrowska Anita⁴, Juraszek Anetta², Janiszewska Tatiana², Olga Haus^{1,2,5}

¹ Katedra i Zakład Genetyki Klinicznej, Collegium Medicum, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Bydgoszcz, Polska

² Poradnia Genetyczna, Szpital Uniwersytecki nr 1 im. dr A. Jurasza, Bydgoszcz, Polska

³ Pracownia Genetyki Klinicznej, Zakład Patomorfologii, 10 Wojskowy Szpital Kliniczny z Polikliniką SP ZOZ, Bydgoszcz, Polska

⁴ Katedra Podstaw Teoretycznych Nauk Biomedycznych i Informatyki Medycznej, Collegium Medicum, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Bydgoszcz, Polska

⁵ Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku AM, Wrocław, Polska

Streszczenie

Utrata kolejnych trzech i więcej ciąży do 22 tygodnia dotyczy 0,4–1% kobiet. Do chwili obecnej, mimo znacznego postępu nauki, w połowie przypadków nie można precyzyjnie ustalić przyczyn niepowodzeń ciąży (poronień, ciąż obumarłych, martwych urodzeń), lub urodzenia dziecka lub dzieci z wadami.

Cel pracy: Celem pracy była ocena związku mutacji i polimorfizmów genów czynników II i V krzepnięcia oraz genu reduktazy metylenotetrahydrofolianowej z przebiegiem ciąży oraz z rodzajem niepowodzenia ciążowego.

Materiał i metody: Grupę badaną stanowiło 116 kobiet z Poradni Genetycznej Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 w Bydgoszczy, skierowanych w latach 2009–2010 z powodu niepowodzeń ciąży w wywiadzie. U wszystkich wykonano badanie molekularne w kierunku trombofilii: mutacji Leiden genu czynnika V krzepnięcia, mutacji 20210G>A genu protrombiny oraz polimorfizmu 677C>T genu reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR).

Wyniki: Mutację Leiden genu czynnika V rozpoznano u 8 osób, przy czym u dwóch mutacja wystąpiła w obu allelach (mutacja homozygotyczna). Mutację genu protrombiny rozpoznano u 3 kobiet. Mutację jednego allela genu MTHFR stwierdzono u 85, a obu alleli u 24 kobiet. Współwystępowanie mutacji Leiden z polimorfizmem MTHFR rozpoznano w trzech przypadkach, u pacjentek z poronieniami.

Adres do korespondencji:

Magdalena Pasińska

Katedra i Zakład Genetyki Klinicznej

Polska, 85-094 Bydgoszcz, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9

tel./fax: 52 585 35 68, tel. 52 585 36 70

e-mail: magdalena@cm.umk.pl

Otrzymano: 30.06.2011

Zaakceptowano do druku: 22.02.2012

Pasińska M, et al.

Wnioski:

1. Obecność mutacji sprzyjających trombofilii w genach metabolizmu folianów i genach czynników krzepnięcia osocznego kojarzy się często z niepowodzeniami ciążowymi, mogąc być, w niektórych przypadkach, ich podstawową przyczyną.
2. Odsetek kobiet z niepowodzeniami ciążowymi, będących pod względem polimorfizmu 677C>T genu MTHFR heterozygotami (73,3%), homozygotami (20,7%) lub należących do którejs z tych grup (94%), jest istotnie statystycznie wyższy od maksymalnej częstości populacyjnej tego polimorfizmu wynoszącej, odpowiednio, 55, 13 i 68%.
3. Mutacja Leiden genu czynnika V krzepnięcia kojarzy się głównie z nawracającymi poronieniami samoistnymi. W obecnych badaniach stwierdzono ją tylko w grupie kobiet z poronieniami, zarówno wczesnymi, jak i późnymi.

Słowa kluczowe: **poronienia / niepowodzenia ciążowe / trombofilia /
/ mutacja Leiden / mutacje genu protrombiny / mutacje MTHFR /**

Abstract

The loss of three or more subsequent pregnancies before the end of the 22nd week is observed in 0.4–1% of women. Despite great advances in medicine, the causes of pregnancy failure (miscarriages, missed abortions and stillbirths), and the birth of a child or children with congenital abnormalities, are still not determined precisely.

The aim: The purpose of the research was to determine the association of polymorphisms and mutations of coagulation factors II and V genes, as well as methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism, with the course of pregnancy and the type of reproductive failure.

Methods: The research was performed in a group of 116 women referred to the Genetic Outpatient Clinic of the NCU SM in Bydgoszcz between 2009–2010 due to reproductive failures. The molecular tests for thrombophilia, i.e. mutation of the factor V Leiden, prothrombin gene mutation 20210G>A, and MTHFR polymorphism 677C>T were done in all patients.

Results: The Leiden mutation was found in 8 women (homozygotic in 2 of them) and prothrombin gene mutation in 3. 85 women had the heterozygotic MTHFR polymorphism, while 24 the homozygotic one. Coexistence of the Leiden mutation and the MTHFR polymorphism was found in 3 patients with history of miscarriages.

Conclusions:

1. The presence of the mutations that promote thrombophilia in the genes responsible for the foliate metabolism and for the plasma coagulation is often associated with pregnancy failures and may be their basic cause in some cases.
2. The percentage of women with pregnancy failures being heterozygotes (73.3%), homozygotes (20.7%) or both (94%) of the MTHFR gene 677C>T polymorphism is statistically significantly higher than the highest prevalence of these changes in the general population (55, 13%, and 68%, respectively).
3. The factor V gene Leiden mutation is associated mainly with recurrent spontaneous abortions. In the present study it was found only in the group of women with both early and late miscarriages.

Key words: **miscarriages / reproductive failures / thrombophilia /
/ Leiden mutation / prothrombin gene mutations / MTHFR mutations /**

Utrata kolejnych trzech i więcej ciąż do 22 tygodnia występuje u 0,4–1% kobiet [1]. Brak potomstwa w małżeństwie jest narastającym problemem społecznym, bowiem dotyczy 10–8% par. Do chwili obecnej, mimo znacznego postępu nauki, w połowie przypadków nie można precyzyjnie ustalić przyczyn niepłodności, niepowodzeń ciążowych (poronień, ciąż obumarłych, martwych urodzeń), lub urodzenia dziecka lub dzieci z wadami [2]. Przyczyny pojedynczego poronienia są różnorodne, jednak dla kobiety, która przeżyła już jedno poronienie, ryzyko wystąpienia kolejnego wzrasta do 5% i jest jeszcze większe u kobiet powyżej 35 roku życia [3]. Spośród czynników etiologicznych, mających wpływ na wystąpienie nawracających poronień samoistnych, należy wymienić: nieprawidłowości anatomiczne (wrodzone i nabyte), zaburzenia hormonalne, nieprawidłowości genetyczne (aberracje chromosomowe i mutacje genowe), czynniki infekcyjne, środowiskowe i inne [4].

Okolo 35% wad wrodzonych o znanej etiologii jest spowodowanych wyłącznie przez czynniki genetyczne (aberracje chromosomowe, mutacje pojedynczych genów), okolo 50% przez mieszane czynniki genetyczno-środowiskowe (uwarunkowanie wieloczynnikowe) [4, 5].

Jednym z zaburzeń prowadzących do wczesnych poronień jest trombofilia, spowodowana najczęściej jedno- lub dwuallelicznymi mutacjami lub polimorfizmami genów: czynnika V (1691G>C – Leiden), protrombiny (20210G>A) i MTHFR (677C>T). Polimorfizm MTHFR może ponadto sprzyjać powstawaniu wad wrodzonych cewy nerwowej, serca, lub twarzoczaszki u płodów. Populacyjna częstość występowania w układzie heterozygotycznym mutacji Leiden, w/w mutacji genu protrombiny oraz polimorfizmu MTHFR wśród rasy kaukaskiej wynosi odpowiednio: 3-7%, 1,7-3% i 32-55%, natomiast częstość polimorfizmu MTHFR w układzie homozygotycznym wynosi 8-13% [6].

Cel pracy

Celem pracy było określenie związku mutacji i polimorfizmów genów czynników II i V krzepnięcia oraz genu reduktazy metylenotetrahydrofolianowej z przebiegiem ciąży oraz z rodzajem niepowodzenia ciążowego.

Materiał i metody

Grupę badaną stanowiło 116 kobiet w wieku od 20 do 44 lat (średnia 32 lata, odchylenie standardowe 5, mediana 32, moda 29), konsultowanych w Poradni Genetycznej Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 w Bydgoszczy w latach 2009 – 2010 z powodu niepowodzeń ciążowych; poronień i/lub urodzeń martwego płodu lub żywego dziecka z wadami wrodzonymi. U wszystkich kobiet wykonano badanie molekularne w kierunku trombofilii: mutacji Leiden genu czynnika V (1691G>A), mutacji genu protrombiny (20210G>A) oraz mutacji genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej (*MTHFR*) (677C>T). Kryterium włączenia pacjentki do grupy badanej było: przebycie przynajmniej dwóch poronień (92 kobiety), obumarcie płodu w III trymestrze ciąży (18 kobiet) lub przebycie poronienia i urodzenie dziecka martwego lub z wadami (6 kobiet). U 14 martwo urodzonych płodów w badaniu pośmiertnym makroskopowym i histopatologicznym nie stwierdzono wad wrodzonych. U 10 pozostałych stwierdzono: izolowaną wadę serca u 3, zespół wielu wad wrodzonych u 3, zespół Pottera u 2, zespół Patau (potwierdzony badaniem cytogenetycznym) u 1 i wadę cewy nerwowej u 1. U wszystkich kobiet oraz ich partnerów wykonano wcześniej badania kariotypu konstytucyjnego, ich wyniki były prawidłowe. Spośród wszystkich badanych obecność chorób towarzyszących podawało 10 kobiet, palenie tytoniu 8. (Tabela I).

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa, pobrana na EDTA. DNA izolowano przy użyciu zestawu QIAamp Blood Kit (Qiagen). Do reakcji PCR użyto 500ng DNA. Amplifikację materiału prowadzono przez 40 cykli w następujących warunkach: denaturacja w 94°C – 30 sek., hybrydyzacja w 60°C – 45 sek., elongacja w 72°C – 45 sek. Etap denaturacji wstępnej trwał 9 min. w temperaturze 94°C, wydłużanie końcowe 5 min. w 72°C. Wizualizację reakcji PCR wykonano techniką paskową przy użyciu medycznego testu genetycznego RHA Thrombo.

Analizę statystyczną wykonano w programie Excel oraz Statistica w wersji 9.1. Do weryfikacji hipotezy o równości dwóch proporcji zastosowano test jednorodności chi-kwadrat. Jednostronny test istotności wykorzystano do porównania proporcji z próby oraz proporcji z populacji. Różnice uznawano za statystycznie istotne dla wartości $p < 0,05$.

Wyniki

Analizie poddano pacjentki z niepowodzeniami ciążowymi, które zakwalifikowano do dwóch grup. Do pierwszej włączono te, które przebyły tylko poronienia (dwa lub więcej), do drugiej – pozostałe (kobiety, które urodziły martwy płód w III trymestrze ciąży lub urodziły dzieci z wadami wrodzonymi, a ponadto niektóre z nich przebyły poronienia).

Porównanie częstości występowania mutacji poszczególnych genów w obu grupach zawiera tabela II.

Brak wartości p w tabeli oznacza, że nie wykonano analizy statystycznej z powodu małej liczebności grupy, w której wystąpiły mutacje.

Mutację Leiden genu czynnika V krzepnięcia osoczonego stwierdzono u 8 pacjentek (6,9% spośród wszystkich badanych kobiet), przy czym u dwóch z nich (1,7%) mutacja wystąpiła w obu allelach (mutacja homozygotyczna). Wszystkie te kobiety należały do grupy z poronieniami nawracającymi.

Mutację genu protrombiny stwierdzono u 3 (2,6%) kobiet. W jednym przypadku była to pacjentka z grupy z poronieniami, a w dwóch - z obumarciem płodu w III trymestrze ciąży.

Polimorfizm jednego allela genu *MTHFR* stwierdzono u 85 (73,3%), a obu alleli u 24 (20,7%) kobiet, polimorfizm co najmniej jednego allela występował w prawie całej grupie kobiet z niepowodzeniami ciążowymi (94%). Jednoczesne występowanie mutacji Leiden i polimorfizmu *MTHFR* rozpoznano w trzech przypadkach, u pacjentek z poronieniami.

Różnice między badanymi grupami okazały się statystycznie nieistotne. (Tabela II).

Stwierdzony w całej grupie z niepowodzeniami ciążowymi odsetek kobiet z polimorfizmem jednego allela genu *MTHFR*, 73,3% (w grupie z poronieniami 73,9%), okazał się istotnie wyższy od maksymalnej szacowanej wartości dla populacji,

Tabela I. Grupy wiekowe kobiet z podziałem na rodzaj niepowodzenia ciążowego, z uwzględnieniem czynników pozagenetycznych.

Grupy wiekowe [lata]	Poronienia		Dziecko martwo urodzone		Dziecko żywe lub martwo urodzone z wadami oraz poronienie	Dziecko zdrowe	Choroby współistniejące*	Palenie tytoniu	Czynniki zawodowe
	2	>2	bez wad	z wadami					
20-25	4	3	1	0	1	0	0	0	1
26-30	25	7	3	4	2	2	6	5	1
31-35	22	12	1	1	2	1	2	1	2
36-40	6	8	3	1	1	1	2	1	1
>40	2	3	0	0	0	0	0	1	0
Razem	59	33	8	6	6	4	10	8	5

Legenda: *choroby współistniejące: choroby tarczycy, nadciśnienie, depresja, łuszczyca, hiperprolaktynemia.

Tabela II. Mutacje genowe stwierdzone u badanych kobiet z niepowodzeniami ciążowymi. Przedziały ufności (PU) dla odsetka mutacji przy poziomie ufności $1 - \alpha = 0,95$.

Mutacja lub polimorfizm	Poronienia (dwa lub więcej) (N=92)	Inne niepowodzenia ciążowe (N=24)	Niepowodzenia ciążowe razem (N=116)	Wartość p	95% PU dla próby
FVL (1) Mutacja Leiden C1691G>A	6,5% (N=6)	0,0% (N=0)	5,2% (N=6)	0,20	[2,4%;10,8%]
FVL (2) Mutacja Leiden C1691G>A	2,2% (N=2)	0,0% (N=0)	1,7% (N=2)	-	[0,5%;6,1%]
FVL (1) lub (2) Mutacja Leiden C1691G>A	8,7% (N=8)	0,0% (N=0)	6,9% (N=8)	0,13	[3,5%;13,0%]
PT Mutacja genu protrombiny (20210 G>A)	1,1% (N=1)	8,3% (N=2)	0,9% (N=3)	-	[0,9%;7,3%]
MTHFR (1) Mutacja genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej (677C>T).	73,9% (N=68)	70,8% (N=17)	73,3% (N=85)	0,76	[65,2%;81,3%]
MTHFR (2) Mutacja genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej (677C>T).	19,6% (N=18)	25,0% (N=6)	20,7% (N=24)	0,56	[13,3%;28,1%]
MTHFR (1) lub (2) Mutacja genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej (677C>T).	93,5% (N=86)	95,8% (N=23)	94,0% (N=109)	0,67	[88,1%;97,0%]

Legenda: FVL – mutacja Leiden w genie czynnika V krzepnięcia, PT = protrombina (II czynnik krzepnięcia), MTHFR – reduktaza metylenotetrahydrofolianu, (1) – zmiana pojedynczego *allela* (mutacja lub polimorfizm heterozygotyczny), (2) – zmiana obu *alleli* (mutacja lub polimorfizm homozygotyczny), PU – przedział ufności.

wynoszącej 55% ($p < 0,001$). Odsetek kobiet z polimorfizmem dwuallelicznym (homozygotycznym) genu *MTHFR*, równy 20,7% (w grupie z poronieniami 19,6%), był również istotnie wyższy od częstości populacyjnej, wynoszącej 13% ($p = 0,043$).

Dyskusja

Wrodzona trombofilia jest uwarunkowana występowaniem mutacji, bądź polimorfizmów w genach biorących udział w kaskadzie krzepnięcia i fibrynolizy [6, 7].

Trombofilia może prowadzić do zakrzepicy w łożysku, a przez to wpływać na występowanie poronień nawykowych, utrat ciąż w drugiej połowie ich trwania, niewydolności łożyska, stanu przedrzucawkowego, wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrostu płodu, czy też przedwczesnego oddzielenia łożyska [7, 8, 9].

Do najczęstszych zmian genetycznych warunkujących występowanie trombofilii należą: mutacja Leiden czynnika V krzepnięcia (1691G>A) (30–60% pacjentów z rodzinną trombofilia), mutacja (20210G>A) genu czynnika II oraz mutacja 677C>T genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej (*MTHFR*) [9,10].

Częstość występowania mutacji Leiden czynnika V nie jest jednakowa w różnych populacjach, np. występuje średnio u 3-7% zdrowych osób rasy kaukaskiej, szczególnie często u

Szwedów i Greków, aż w 15% populacji. Bardzo rzadko występuje u Chińczyków i u osób rasy czarnej [11]. Ta autosomalna, dominująca, o niepełnej penetracji mutacja powoduje zamianę argininy na glutaminę w pozycji 506, co sprawia, że czynnik V staje się odporny na degradację pod wpływem aktywnego białka C. Mutacja Leiden jest przyczyną zwiększonego ryzyka hiperkoagulacji [11, 12]. Duża częstość rozpowszechnienia tej mutacji w populacjach świadczy o tym, że miała ona najprawdopodobniej znaczenie ewolucyjne – chroniła kobiety przed nadmierną utratą krwi podczas porodu [12]. Obecność czynnika V Leiden zwiększa ryzyko zakrzepicy dopiero wtedy, gdy zadziała dodatkowy czynnik ryzyka [12]. Ciąża jest właśnie stanem, w którym wzrasta stężenie wielu czynników krzepnięcia (I, V, VII, IX, X, XII) oraz oporność aktywnego białka C, a spada aktywność fibrynolityczna [11, 13].

W badanym materiale mutację Leiden czynnika V rozpoznano u 8 ze 116 kobiet (6,9%), przy czym u 2 mutacja wystąpiła w formie homozygotycznej. W badaniach innych autorów częstość występowania heterozygot mutacji Leiden wśród kobiet z niepowodzeniami ciążowymi wynosiła ok. 30%, w porównaniu do 3-10% w grupach kontrolnych [13]. Znaczną różnicę w częstości tej mutacji między wynikami badań innych autorów, a wynikami bieżących badań można tłumaczyć małą grupą pacjentek z grup z innymi, niż poronienia, niepowodzeniami

ciążowymi. W badanym materiale mutację Leiden stwierdzono tylko u kobiet, u których występowały poronienia. Według większości autorów obecność tej mutacji zwiększa ryzyko wystąpienia poronienia w II trymestrze ciąży oraz obumarcia płodu w późniejszym okresie [6,13]. W niniejszych badaniach, ze względu na małą liczebność grupy badanej nie dokonano ponadto podziału na pacjentki z wczesnymi i z późnymi poronieniami. Poronienie traktowano zgodnie z definicją, jako utratę ciąży do 22 tygodnia, późniejszą utratę ciąży traktowano jako poród. Obecność mutacji heterozygotycznej zwiększa 2-7-krotnie, a homozygotycznej wielokrotnie, ryzyko powikłań zakrzepowych [13, 14].

Mutacja 20210G>A czynnika II występuje w populacji europejskiej z częstością 1,7–3% [11]. Jej efektem biologicznym jest zwiększenie stężenia protrombiny w osoczu, co powoduje 2-5-krotny wzrost ryzyka zakrzepicy żyłnej. U kobiet w ciąży obecność tej mutacji wiąże się z większym ryzykiem poronień, zwłaszcza we wczesnej ciąży oraz odklejenia łożyska, a także innych powikłań zakrzepowych [12, 13, 14, 15, 16].

W badanym materiale obecność tej mutacji stwierdzono u 3 kobiet (1,09%), przy czym u dwóch nastąpił wewnątrzmaciczny zgon dziecka w III trymestrze ciąży.

Obecność mutacji 677C>T genu *MTHFR* i jej korelację z poronieniami nawykowymi opisali w 1993 r. Wouters i wsp. [18]. Mutacja ta powoduje powstanie termolabilnego enzymu o zmniejszonej o 50% aktywności, co prowadzi do zwiększenia stężenia homocysteiny i zmniejszenia stężenia kwasu foliowego we krwi. Objawy kliniczne hiperhomocysteinemii zazwyczaj ujawniają się u homozygot, jednakże – w łagodniejszej postaci – mogą również występować u osób heterozygotycznych [13, 18]. Hiperhomocysteinemia wykazuje działanie genotoksyczne oraz embriotoksyczne, ma związek z upośledzeniem funkcji śródbłonna naczyniowego, włóknieniem naczyń, przestrojeniem układu krzepnięcia, stresem oksydacyjnym, co może powodować zaburzenia zagnieżdżenia się zarodka i zaburzenia czynności płodowo-łożyskowej. Jest czynnikiem ryzyka utraty wczesnej ciąży oraz ryzyka wystąpienia u potomstwa wad cewy nerwowej, serca, wad rozszczepowych części twarzowej czaszki oraz zwiększonej częstości aberracji chromosomowych. Mutacje genu *MTHFR* mogą być przyczyną miażdżycy oraz nowotworów [13, 18]. Wykazano również związek między polimorfizmem *MTHFR* a obniżeniem gęstości kości, występowaniem migreny z aurą, występowaniem nieswoistych zapaleń jelit, obniżeniem poziomu czynnika von Willebranda [18, 19].

Nieliczne są doniesienia analizujące powikłania ciążowe u złożonych heterozygot, czyli osób, u których współistnieją różne mutacje lub polimorfizmy. Preston i wsp. zaobserwowali większe od populacyjnego ryzyko wewnątrzmacicznego zgonu płodu u kobiet ze złożonym nosicielstwem mutacji genów odpowiedzialnych za trombofilie [10, 20].

Wnioski

1. Obecność mutacji sprzyjających trombofilii w genach metabolizmu folianów i genach czynników krzepnięcia osoczkowego kojarzy się często z niepowodzeniami ciążowymi, mogąc być, w niektórych przypadkach, ich podstawową przyczyną.

2. Odsetek kobiet z niepowodzeniami ciążowymi, będących pod względem polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* heterozygotami (73,3%), homozygotami (20,7%) lub należących do którejś z tych grup (94%), jest istotnie statystycznie wyższy od maksymalnej częstości populacyjnej tego polimorfizmu wynoszącej, odpowiednio, 55, 13 i 68%.
3. Mutacja Leiden genu czynnika V krzepnięcia kojarzy się głównie z nawracającymi poronieniami samoistnymi. W obecnych badaniach stwierdzono ją tylko w grupie kobiet z poronieniami, zarówno wczesnymi, jak i późnymi.

Piśmiennictwo

1. Reddy U. Recurrent pregnancy loss. *Contemp OB/GYN*. 2007, 6, 63-69.
2. Skrzypczak J. Poronienie. W: Położnictwo i ginekologia. Red. Bręborowicz G. Warszawa: PZWL, 2005, 111-119.
3. Branch D, Gibson M, Silver R. Clinical practice. Recurrent miscarriage. *N Engl J Med*. 2010, 363, 1740-1747.
4. Latos-Bieleńska A. Genetyka rozrodczości. W: Ciąża wysokiego ryzyka. Red. Bręborowicz G. Poznań: OWN, 2006, 51-80.
5. Sierra S, Stephenson M. Genetics of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med*. 2006, 24, 17-24.
6. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Puacz P, Kaluba-Skotarczak A. Trombofilia dziedziczna u kobiet z poronieniami nawracającymi oraz utratami ciąży w wywiadzie – doświadczenia własne. *Ginekol Pol*. 2008, 79, 630-634.
7. Patnaik M, Haddad T, Morton C. Pregnancy and thrombophilia. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2007, 5, 753-765.
8. Gumus I, Uslu H, Bavbek N, Turhan N. Multifactorial thrombophilia in a pregnancy: a case report. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2008, 14, 112-125.
9. Aksoy M, Tek I, Karabulut H, [et al.]. The role of thrombophilia related to Factor V Leiden and Factor II G20210A mutations in recurrent abortions. *J Pak Med Assoc*. 2005, 55, 104-108.
10. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Barlik M. Przebieg ciąży, porodu i porożu u ciężarnej z trombofilią złożoną – opis przypadku. *Ginekol Pol*. 2009, 80, 299-302.
11. Kurzawińska G, Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, [i wsp.]. Trombofilia wrodzona jako przyczyna poronień nawracających w I trymestrze ciąży. *Ginekol Pol*. 2009, 80, 657-663.
12. Adamek Ł, Niżankowska-Mogilnicka E, Szczeklik A. Genetyczne aspekty żyłnej choroby zakrzepowo zatorowej. W: Genetyka chorób układu krążenia. Red. Ciechanowicz A. [et al.]. Kraków: MP, 2002, 73-80.
13. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Mrozikiewicz P. Wybrane zagadnienia diagnostyki molekularnej w położnictwie. Warszawa: Fundacja WIENER LAB, 2010, 26-35.
14. Reznikoff-Etievant M, Cayol V, Carbonne B, [et al.]. Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutations are risk factors for very early miscarriage. *BJOG*. 2001, 108, 1251-1254.
15. Mougou A, Androutsopoulos G, Karakanza M, [et al.]. Inherited thrombophilia screening in Greek women with recurrent fetal loss. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2008, 35, 172-174.
16. Carp H, Salomon O, Seidman D, [et al.]. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod*. 2002, 17, 1633-1637.
17. Hozyas K. Hiperhomocysteinemia. W: Wybrane choroby metaboliczne u dzieci. Red. Cabalska B. Warszawa: PZWL, 2002, 134-170.
18. Wouters M, Boers G, Blom H, [et al.]. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexpected recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril*. 1993, 60, 820-824.
19. Androutsopoulos G, Mougou A, Karakanza M, [et al.]. Combined inherited thrombophilia and adverse pregnancy outcome. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2007, 34, 236-238.
20. Preston F, Rosendaal F, Walker I, [et al.]. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet*. 1996, 348, 913-916.