

PRACE ORIGINALNE  
*ginekologia*

# Polimorfizmy 1691 G > A (czynnik Leiden) i 1328 T > C genu V czynnika krzepnięcia a występowanie poronień nawracających

The 1691 G > A (Factor V Leiden) and 1328 T > C V Coagulation Factor polymorphisms and recurrent miscarriages

Marta Bałajewicz-Nowak<sup>1</sup>, Kazimierz Pityński<sup>2</sup>, Tomasz Milewicz<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Klinika Ginekologii i Onkologii UJ CM, Kraków, Polska

<sup>2</sup> Klinika Ginekologii i Onkologii UJ CM, Kraków, Polska

<sup>3</sup> Klinika Endokrynologii Ginekologicznej UJ CM, Kraków, Polska

## Streszczenie

**Cel pracy:** Uważa się, iż trombofilia wrodzona może stanowić czynnik ryzyka nawracających poronień (RPL). Celem pracy była ocena występowania najczęstszych mutacji genów związanych z trombofilią wrodzoną u kobiet z RPL o niewyjaśnionej etiologii, w regionie Małopolski.

**Materiał i metody:** Grupa badana 136 pacjentek z utratą przynajmniej dwóch kolejnych ciąż, o niewyjaśnionej etiologii. Grupa kontrolna 106 kobiet z przynajmniej 1 ciążą zakończoną urodzeniem zdrowego dziecka, bez utraty ciąży w wywiadzie. W obu grupach przeprowadzono genotypowanie metodą real-time PCR z użyciem sond genetycznych Taq-Man mutacji: czynnika V Leiden (FVL) i mutacji 1328 T>C genu V czynnika krzepnięcia.

**Wyniki:** W regionie Małopolski u kobiet z nawracającymi poronieniami częściej niż u kobiet bez przebytych poronień stwierdza się nosicielstwo FVL i 1328 T>C genu V czynnika krzepnięcia oraz współistnienie polimorfizmów FVL i M385T genu V czynnika krzepnięcia w grupie wczesnych i późnych poronień nawracających.

**Wnioski:** U nosicieli genotypu TC mutacji 1328 T>C genu V czynnika krzepnięcia istnieje tendencja do występowania poronień przed ukończeniem 7 tygodnia ciąży. Na podstawie wykonanych badań wydaje się być zasadne, aby nadal kryterium do wykonania badań w kierunku trombofilii wrodzonej w RPL było przebycie 2 lub więcej poronień.

Słowa kluczowe: **czynnik V Leiden / nawracające poronienia / wrodzona trombofilią / mutacja 1328 T>C /**

## Adres do korespondencji:

Marta Bałajewicz-Nowak  
Klinika Ginekologii i Onkologii UJ CM,  
ul. Kopernika 23, 31-501 Kraków, Polska  
tel. 603 963 659  
marta.balajewicz@gmail.com,

Otrzymano: 28.03.2014  
Zaakceptowano do druku: 26.08.2014

Marta Bałajewicz-Nowak et al. Polimorfizmy 1691 G > A (czynnik Leiden) i 1328 T > C genu V czynnika krzepnięcia. a występowanie poronień nawracających.

## Abstract

**Objectives:** Inherited thrombophilia might lead to recurrent pregnancy loss (RPL). The aim of the study was to estimate the prevalence of V coagulation factor polymorphisms related with inherited thrombophilia among women in Malopolska region.

**Material and methods:** Group of 136 women, who experienced at least 2 unexplained, idiopathic pregnancy loss. 106 healthy women having at least one uncomplicated pregnancy and delivered healthy children constituted a control group. Each patient were examined for factor V Leiden (FVL) and mutation 1328 T>C of factor V gene with use of real-time PCR and Taq-Man probes.

**Results:** Among patients with RPL inhabiting region of Malopolska compared to control group occurred higher prevalence of FVL and mutation 1328 T>C. There is coincidence of polymorphism 1328 T>C of factor V gene and FVL in group of early and late RPL.

**Conclusions:** TC genotype of 1328 T>C mutation carriers reveal tendency toward RPL below 7 weeks of pregnancy. Based on results of these findings inherited thrombophilia evaluation in patients after two or more RPL should be recommended.

Key words: **factor Leiden / recurrent pregnancy loss / inherited thrombophilia / polymorphism 1328 T>C /**

## Wstęp

Przyczyny nawracających utrat ciąży (RPL, *Recurrence Pregnancy Loss*) dzieli się obecnie na genetyczne, immunologiczne, anatomiczne, hormonalne, infekcyjne i idiopatyczne. Etiopatogeneza RPL jest bardzo złożona i wymaga zindywidualizowanego podejścia diagnostyczno-terapeutycznego. Po szczegółowej analizie badań nad RPL wydaje się mało prawdopodobne, aby za etiopatogenezę tej patologii był odpowiedzialny tylko jeden czynnik. Aktualnie badania nad patomechanizmem utraty wczesnej ciąży przede wszystkim dotyczą zaburzeń implantacji czy inwazji trofoblastu oraz czynników embrionalnych. Te ostatnie są szczególnie trudne do badania, a ponadto problematyczne z uwagi na aspekt etyczny. Dodatkowo w poronieniach zupełnych, występujących najczęściej, uzyskanie materiału genetycznego zarodka jest niemożliwe. Należy podkreślić, że biochemiczna utrata ciąży ma miejsce przed 6 tygodniem, przy braku widocznego pęcherzyka ciążowego w macicy i przy niskim stężeniu gonadotropiny kosmówkowej [1, 2, 3].

Częstość występowania RPL waha się w populacji ogólnej w zakresie od 0,8 do 2,3%. Szacuje się, że ryzyko utraty wczesnej ciąży u kobiety, która nigdy nie była w ciąży lub urodziła co najmniej jedno dziecko wynosi ok. 5%. Ryzyko to wzrasta z każdym następnym niepowodzeniem ciąży. Po pierwszym poronieniu wynosi 13-20%, po drugim 18-28%, a po trzech lub więcej sięga 30-45% [2, 4]. Czas pomiędzy kolejnymi ciążami powinien być wykorzystany na przeprowadzenie możliwych badań diagnostycznych u obojga partnerów. Partnerzy po utracie ciąży oczekują indywidualnego podejścia do ich przypadku, nie zawsze wymagają inwazyjnego leczenia a jedynie odpowiedniej opieki psychologicznej. Podstawą każdej terapii, także RPL jest właściwe stosowanie się do zaleceń (tzw. *compliance*). Należy podkreślić, że interwencje medyczne powszechnie do tej pory

stosowane w przypadku RPL nie są oparte na zasadach opartych na faktach (*Evidence Based Medicine*, EBM), a sama obserwacja może być postępowaniem racjonalnym, zważywszy że u 75% tych par kolejna ciąża zakończy się sukcesem mimo niepodjęcia jakiegokolwiek interwencji [1, 5, 6].

Do najczęstszych trombofilii wrodzonych w patologii ciąży opisywanych w literaturze należą mutacja Leiden genu czynnika V (około 20% powikłań położniczych), mutacja 20210G>A genu protrombiny (około 10% powikłań) oraz mutacja 677C>T genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej powodująca hiperhomocysteinemię. Znacznie rzadziej opisuje się występowanie wrodzonego niedoboru antytrombiny III, czy niedoboru białek C. Trombina połączona z trombomoduliną aktywuje białko C na poziomie nabłonka naczyniowego. Aktywacja białka C powoduje degradację aktywowanego czynnika V (Va) i aktywowanego czynnika VII (VIIa). Występują trzy miejsca przyłączenia cząsteczki białka C do czynnika V: Arg306, Arg506 i Arg 679 oraz dwa na czynniku VII: Arg336, Arg562. Degradacja czynnika V i VII powoduje utratę właściwości prozakrzepowych tych czynników. Dwa czynniki (czynnik V oraz białko S) są niezbędne do prawidłowego działania białka C. W 1994 roku Bertina i wsp. wykazali, że za oporność na aktywowane białko C odpowiedzialna jest w większości przypadków mutacja genu czynnika V spowodowana substytucją argininy przez glutaminę w położeniu 506, w miejscu przyłączenia aktywowanego białka C [11, 12]. Ta mutacja czynnika V została nazwana Leiden. Dla rasy kaukaskiej częstość występowania mutacji typu Leiden wynosi 3-5% [7, 8, 9].

Mutacja 1328 T > C czynnika V krzepnięcia (rs6033) polega na substytucji tyminy przez cytozynę w pozycji 1328 w eksonie 8. Występuje w łańcuchu ciężkim czynnika V przez co jej mechanizm prozakrzepowy jest bezpośrednio związany z tworzeniem

Marta Bałajewicz-Nowak et al. Polimorfizmy 1691 G > A (czynnik Leiden) i 1328 T > C genu V czynnika krzepnięcia. a występowanie poronień nawracających.

trombiny oraz polega na wytworzeniu oporności na aktywowane białko C. Grupa fińska wykazała, że mutacja M385T czynnika V wiąże się ze zwiększonym ryzykiem powikłania ciąży jakim jest odklejenie łożyska. Z kolei grupa japońska pokazała związek mutacji M385T czynnika V z występowaniem stanu przedzucawkowego u kobiet rasy kaukaskiej. Zaznaczyła jednocześnie, że ta zależność może być związana z tzw. nierównowagą sprzężeń (ang. linkage disequilibrium). [10, 11, 12]

## Cel pracy

Celem pracy była ocena częstości występowania oraz zbadania obecności polimorfizmów 1691 G > A (czynnik Leiden) i 1328 T > C genu V czynnika krzepnięcia w grupie kobiet z co najmniej dwoma poronieniami w I i II trymestrze ciąży w regionie Małopolski.

## Materiał i metody

Badanie przeprowadzono w Katedrze Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie, w latach 2011-2013. Na badanie uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego (KBET/3/B/2011). Zbadano łącznie 242 pacjentki w wieku od 21 do 59 roku życia, zamieszkujące województwo Małopolskie.

Do badania zakwalifikowano 136 kobiet w wieku od 23 do 52 roku życia, rasy kaukaskiej, narodowości polskiej, które przebyły co najmniej 2 poronienia. Wykluczono z badania kobiety z zespołem antyfosfolipidowym w wywiadzie, zaburzeniami genetycznymi, chorobami tarczycy, zaburzeniami hormonalnymi, cukrzycą, nadciśnieniem tętniczym i innymi przewlekłymi schorzeniami internistycznymi. U wszystkich pacjentek zebrano dane z wywiadu położniczego i ogólnolekarskiego. U żadnej pacjentki z nawracającymi poronieniami nie stwierdzono w wywiadzie występowania zakrzepicy żyłnej, ani tętniczej, żadna pacjentka nie zgłosiła również występowania choroby zakrzepowo-zatorowej u najbliższych członków rodziny. Grupę badaną podzielono na trzy podgrupy ze względu na wiek ciąży w momencie poronienia (< 7 tygodnia, 7-12 tygodnia, >12 tygodnia ciąży) oraz na trzy podgrupy ze względu na ilość przeżytych poronień (Tabela I i II).

Do grupy kontrolnej włączono 106 kobiet w wieku od 18 do 60 roku życia, rasy kaukaskiej, narodowości polskiej, o spontanicznej koncepcji, bez technik wspomaganego rozrodu, które urodziły co najmniej jednego zdrowego, donoszonego noworodka. Z badania wykluczono pacjentki, u których w wywiadzie wystąpiły poronienia, poród przedwczesny i przewlekłe choroby internistyczne. Żadna pacjentka nie zgłosiła występowania incydentu choroby zakrzepowo-zatorowej.

DNA do badań genetycznych wszystkich opisanych w pracy wariantów polimorficznych izolowane było przy użyciu zestawu Blood Mini (A&A BIOTECHNOLOGY, Gdynia). Krew była lizowana w odpowiednim buforze lizującym z dodatkiem silnej proteazy (Proteinazy K). Wyizolowane przy pomocy tego zestawu DNA było amplifikowane i poddawane genotypowaniu przy użyciu metody real-time PCR (*real-time polymerase chain reaction*). W tym przypadku użyto sond TaqMan (TaqMan probes, 5'-nuclease probes). Reakcja real-time PCR przeprowadzana była na płytkach 96-dołkowych w aparacie 7900 HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Standardowa mieszanina reakcyjna zawierała roztwory substratów i polimerazy, TaqMan Universal PCR Master Mix, startery, sondy, wodę oraz DNA zgodnie

z zaleceniem producenta (TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol – Applied Biosystems). Sondy oraz startery zakupiono w firmie Applied Biosystems w postaci gotowych do użycia TaqMan Gene Expression Assay. Wykrywały one następujące mutacje: F5 G1691A (rs 6025) i F5 M385T (rs 6033).

Do analizy statystycznej wyników częstości występowania genotypów i polimorficznych alleli badanych genów uzyskanych w pracy zastosowano program STATISTICA 10 PL oraz R 2.15.0. Wartości oczekiwane i obserwowane były zgodne z prawem Hardy-Weinberga. Wartość  $p < 0,05$  przyjęto za statystycznie istotną.

## Wyniki

W grupie pacjentek z poronieniami nawracającymi częściej występowały heterozygoty mutacji Leiden V czynnika krzepnięcia w porównaniu z grupą kontrolną, jednak bez różnicy statystycznie istotnej (5,9% vs 3,8%;  $p = 0,4534$ , OR 1,59). Allel A występował częściej w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej (2,9% vs 1,9%;  $p = 0,4592$ , OR 1,57). (Tabela III). W obu grupach nie stwierdzono występowania zmutowanego genotypu homozygotycznego AA.

W przypadku genotypu GA mutacji typu Leiden czynnika V krzepnięcia większy odsetek heterozygot stwierdzono u pacjentek, które utraciły ciążę poniżej 7 i pomiędzy 7 a 12 tygodniem ciąży w stosunku do grupy z utratą ciąży >12 tygodnia (6,7% vs 6,2% vs 4%,  $p = 0,94$ ). (Tabela I).

Zaobserwowano porównywalny rozkład homozygot 1328TT i heterozygot w grupie pacjentek z poronieniami nawracającymi i w grupie kontrolnej (77,9% vs 78,3% oraz 20,6% vs 21,7%,  $p = 0,4505$ ). Homozygoty 1328CC występowały tylko w grupie badanej, nie zaobserwowano homozygoty w grupie kontrolnej (1,5% vs 0%,  $p = 0,4505$ ). Rozkład alleli T w obu grupach był porównywalny (11% vs 12%,  $p = 0,7528$ , OR 1,09). (Tabela IV)

W przypadku polimorfizmu 1328 T > C czynnika V krzepnięcia najwyższy odsetek heterozygot stwierdzono u pacjentek, które utraciły ciążę poniżej 7 tygodnia w stosunku do grupy z utratą ciąży 7-12 tygodnia i >12 tygodnia (36,7% vs 17,3% vs 12%,  $p = 0,08$ ). (Tabela I).

Nie zaobserwowano zależności pomiędzy częstością występowania badanych polimorfizmów, a ilością przeżytych poronień. (Tabela II).

Ponadto po przeprowadzeniu analizy koincydencji poszczególnych polimorfizmów zaobserwowano równoczesne występowanie polimorfizmów 1328 T > C i 1691 G > A (Leiden). Nosicielki równocześnie obu mutacji miały 2,5 – krotnie większe ryzyko występowania poronień nawracających (OR=2,5, 95% CI: 0,2-144,6). (Tabela V).

## Dyskusja

Uzyskany w badaniach indeks nosicielstwa heterozygot FVL dla całej grupy jest podobny jak w rasie kaukaskiej. Częstość występowania FVL w populacji ogólnej wynosi 5-15% dla heterozygot i poniżej 1% dla homozygoty zmutowanej [6, 13, 14]. Różnice w odsetkach występowania poszczególnych genotypów mogą być związane z populacją i rasą. W pracy zaobserwowano w grupie pacjentek z poronieniami nawracającymi wyższy odsetek występowania heterozygot mutacji Leiden genu V czynnika krzepnięcia w porównaniu z grupą kontrolną, jednak bez różnicy statystycznie istotnej. Wyniki własne są zgodne z badaniami kohortowymi European Prospective Cohort on Thrombophilia

Marta Bałajewicz-Nowak et al. Polimorfizmy 1691 G &gt; A (czynnik Leiden) i 1328 T &gt; C genu V czynnika krzepnięcia. a występowanie poronień nawracających.

**Tabela I.** Ocena rozkładu genotypów oraz alleli polimorfizmów genów warunkujących wrodzoną trombofiliją w grupie pacjentek z poronieniami nawracającymi w zależności od wieku ciąży, w którym nastąpiło poronienie.

Czynnik krzepnięcia	Genotyp	< 7 tygodnia (N=30)	7-12 tygodni (N=81)	>12 tygodnia (N=25)	Grupa kontrolna (N=106)	p-wartość
<b>V 1328 T &gt; C (M385T)</b>	TT	19 [63.3%]	66 [81.5%]	21 [84.0%]	83 [78.3%]	0.08
	TC	11 [36.7%]	14 [17.3%]	3 [12.0%]	23 [21.7%]	
	CC	0 [0%]	1 [1.2%]	1 [4%]	0 [0%]	
	Suma	30 [100%]	81[100%]	25[100%]	106[100%]	0.2019
	Allel T	49 [81.7%]	146 [90.1%]	45 [90%]	189 [89.2%]	
	Allel C	11 [18.3%]	16 [9.9%]	5 [10%]	23 [10.8%]	
	Suma	60 [100%]	162 [100%]	50 [100%]	212 [100%]	
<b>V 1693 G &gt; A (Leiden)</b>	GG	28 [93.3%]	76 [93.8%]	24 [96%]	102[96.2%]	0.9410
	GA	2 [6.7%]	5 [6.2%]	1 [4%]	4[3.8%]	
	AA	0 [0%]	0 [0%]	0 [0%]	0[0%]	
	Suma	30[100%]	81[100%]	25[100%]	106[100%]	1.0
	Allel G	58 [96.7%]	157 [96.9%]	49 [98%]	208[98.1%]	
	Allel A	2 [3.3%]	5[3.1%]	1 [2%]	4[1.9%]	
	Suma	60 [100%]	162[100%]	50[100%]	212[100%]	

**Tabela II.** Ocena rozkładu genotypów oraz alleli polimorfizmów genów warunkujących wrodzoną trombofiliją w grupie pacjentek z poronieniami nawracającymi w zależności od ilości poronień.

Czynnik krzepnięcia	Genotyp	2 poronienia N=87	3 poronienia N=28	≥ 4 poronienia N=21	Grupa kontrolna N=106	p-wartość
<b>V 1328 T &gt; C (M385T)</b>	TT	66 [75.9 %]	22 [78.6 %]	18 [85.7 %]	83 [78.3 %]	0.7689
	TC	19 [21.8 %]	6 [21.4 %]	3 [14.3 %]	23 [21.7 %]	
	CC	2 [2.3 %]	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]	
	Suma	87 [100%]	28 [100%]	21 [100%]	106 [100%]	0.6255
	Allel T	151[86.8%]	50 [89.3 %]	39 [92.9 %]	189[89.2%]	
	Allel C	23 [13.2 %]	6 [10.7 %]	3 [7.1 %]	23 [10.8 %]	
	Suma	174[100 %]	56 [100 %]	42 [100 %]	212[100 %]	
<b>V 1693 G &gt; A (Leiden)</b>	GG	81 [93.1 %]	26 [92.9 %]	21 [100%]	102[96.2%]	0.4596
	GA	6 [6.9 %]	2 [7.1 %]	0 [0 %]	4 [3.8 %]	
	AA	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]	0 [0 %]	
	Suma	87 [100%]	28 [100%]	21 [100%]	106 [100%]	0.6645
	Allel G	168[96.6%]	54 [96.4 %]	42 [100%]	208[98.1%]	
	Allel A	6 [3.4 %]	2 [3.6 %]	0 [0 %]	4 [1.9 %]	
	Suma	174[100 %]	56 [100 %]	42 [100 %]	212[100 %]	

(EPCOT, 1996), w których u 141 z 1384 obserwowanych kobiet stwierdzono nosicielstwo mutacji trombofilii FVL, z czego u 37,58% nosicielek wystąpił zgon wewnątrzmaciczny powyżej 28 tygodnia ciąży lub poronienie [15]. Podobne wyniki przedstawili także Bellver i wsp. (2008, Hiszpania, grupa badana N=24 kobiety rasy białej) i Kutteh i wsp. (1999, USA, grupa badana N=50 kobiet rasy białej) [13, 16, 17, 18]. Również Razieli i wsp. (Izrael, 2001) nie wykazali statystycznie istotnej różnicy w nosicielstwie FVL pomiędzy grupą RPL (N=36), a grupą kontrolną (OR 3,42; 95% CI: 0.14-87,71) [19]. W badaniach populacji niemieckiej (2003) także nie zaobserwowano związku pomiędzy

mutacją FVL a poronieniami wczesnymi i późnymi (nosicielstwo FVL wynosiło odpowiednio 8,7 % vs. 3,1% vs. 7.4% w grupie kontrolnej) [20].

W 2003 roku Roque i wsp. analizując kilkanaście czynników układu krzepnięcia w grupie 491 kobiet z wczesnymi poronieniami nawracającymi (poniżej 10 tygodnia ciąży) stwierdzili, że poronienia występują rzadziej u kobiet z tą trombofiliją niż w grupie kontrolnej (36,4% vs. 63,9%). W związku z tym badacze wysunęli hipotezę o chroniącym przed poronieniem przed 10 tygodniem ciąży działaniu mutacji FVL [7]. W 2012 roku Cardona i wsp. (Kolumbia, grupa badana, N= 93) i Dissanayake i wsp. (Sri

Marta Bałajewicz-Nowak et al. Polimorfizmy 1691 G > A (czynnik Leiden) i 1328 T > C genu V czynnika krzepnięcia. a występowanie poronień nawracających.

**Table III.** Ocena współczynnika ryzyka występowania polimorfizmu 1691 G > A (Leiden) genu czynnika V krzepnięcia w grupie pacjentek z poronieniami nawracającymi (grupa badana N=136, grupa kontrolna N=106).

Czynnik V 1691 G > A (Leiden)	Grupa badana N = 136 [%]	Grupa kontrolna N = 106 [%]	OR (95% CI)	p-wartość
GG	128 [94.1%]	102 [96.2%]	0.63 (0.13-2.42)	0.5583
GA	8 [5.9%]	4 [3.8%]	1.59 (0.47-7.42)	0.5583
AA	0	0	-	-
Allel A	8 [3%]	2 [1.9%]	1.57 (0.42-7.24)	0.4592

**Table IV.** Ocena współczynnika ryzyka występowania polimorfizmu 1328 T > C genu czynnika V krzepnięcia w grupie badanej pacjentek z nawracającymi poronieniami (grupa badana N=136, grupa kontrolna N=106).

Czynnik V 1328 T > C	Grupa badana N (%)	Grupa kontrolna N (%)	OR (95% CI)	p-wartość
TT	106 [77.9%]	83 [78.3%]	0.98 (0.50-1.89)	0.9463
TC	28 [20.6%]	23 [21.7%]	0.93 (0.48-1.93)	0.8336
CC	2 [1.5%]	0	-	-
Allel C	32 [12%]	23 [11%]	1.09 (0.60-2.03)	0.7528

**Tabela V.** Ocena koincydencji polimorfizmów 1691 G>A (Leiden) i 1328 T > C genu V czynnika krzepnięcia w grupie badanej pacjentek z nawracającymi poronieniami i w grupie kontrolnej.

1691 G > A	1328 T > C								
	TT			TC			CC		
	Grupa badana (N)	Grupa kontrolna (N)	OR (95% CI)	Grupa badana (N)	Grupa kontrolna (N)	OR (95% CI)	Grupa badana (N)	Grupa kontrolna (N)	OR (95% CI)
GG	101	80	0.8 (0.1-4)	25	22	0.4 (0-5.2)	2	0	-
GA	5	3	1.3 (0.2-8.7)	3	1	<b>2.5</b> <b>(0.2-144.6)</b>	0	0	-
AA	0	0	-	0	0	-	0	0	-

Lanka, grupa badana, N= 200) nie wykazali żadnej zależności pomiędzy FVL i RPL [22, 23]. Ciekawe wyniki otrzymano w badaniu opublikowanym w 2005 roku przez Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development's Maternal-Fetal Medicine Units Network w USA, które objęło 4885 pierworodek niskiego ryzyka. Występowanie heterozygot FVL stwierdzono u 2,7% kobiet bez objawów zagrażającego poronienia (OR 0,96; 95% CI: 0,5-1,84) [24, 25].

W polskim badaniu z regionu Wielkopolski wykazano częstsze występowanie heterozygoty GA w grupie poronień końca I trymestru (GA 12,5% vs 5,51%, p = 0,31, dla allela A 6,25 vs. 3,25%, p = 0,31), co jest zgodne z badaniami Roque (2004) i Rai (2006) [26, 27, 21]. Stwierdzono również wzrost częstości występowania genotypów zawierających przynajmniej jeden zmutowany allel dla polimorfizmu FVL wraz ze wzrostem wieku poronienia (GA 7,69% vs. 12,5%). Wyniki przeprowadzonych badań własnych nie potwierdzają tej zależności. Odbiegają one także od międzyośrodkowych badań polskich (2012), w których przebadano 396 kobiet z co najmniej jednym poronieniem [27].

W badaniu mutację FVL wykryto u 7,3% całej grupy badanej. Tylko u 1 pacjentki stwierdzono homozygotę mutacji FVL. Najwyższy odsetek nosicielstwa mutacji FVL (21,7%) wykazano w grupie ze zgonem płodu po 23 tygodniu ciąży, który był istotnie statystycznie wyższy niż dla grupy poronień późnych (10-23 tydzień ciąży) i poronień wielokrotnych do 9 tygodnia i 6 dni (odpowiednio p<0.006, OR 5,15; 95% CI 1,5-20,1 vs. p<0,011, OR 3,95% 95% CI: 1,51-20,1).

Indeks nosicielstwa mutacji 1328 T>C genu czynnika V krzepnięcia w całej obserwowanej grupie wyniósł 21,9%. Współczynnik występowania tej mutacji dla heterozygot w grupie badanej wynosił 20,6% i 21,7% w grupie kontrolnej, a dla homozygot zmutowanych odpowiednio 1,5% i 0% (p=0,45). W badaniach własnych najwyższy odsetek heterozygot TC odnotowano w grupie pacjentek z RPL poniżej 7 tygodnia ciąży w porównaniu z grupą z poronieniami w 7-12 tygodniu ciąży i powyżej 12 tygodnia ciąży (36,7% vs. 17,3% vs. 12%, p=0,08). Współwystępowanie dwóch mutacji genu V czynnika krzepnięcia 1328TC/1691GA (Leiden) zaobserwowano dwukrotnie częściej w grupie



Marta Bałajewicz-Nowak et al. Polimorfizmy 1691 G > A (czynnik Leiden) i 1328 T > C genu V czynnika krzepnięcia. a występowanie poronień nawracających.

badanej w porównaniu z grupą kontrolną (2,2% vs 0,9%, OR 2,5, 95% CI: 0,2-144,6), co wynika z większego odsetka nosicielstwa FVL w grupie badanej. Porównywalne wyniki nosicielstwa mutacji 1328 T>C opublikowano w 2004 roku [12]. Przeanalizowano 116 pacjentek, u których wystąpiło oddzielenie łożyska prawidłowo usadowionego oraz 112 kobiet z grupy kontrolnej z co najmniej 2 niepowikłanymi ciążami, u których wykazano, że mutacja 1328 T>C czynnika V wiąże się ze zmniejszonym ryzykiem odklejenia łożyska prawidłowo usadowionego. Częstość występowania heterozygoty 1328TC wynosiła 10% w grupie badanej i 25% w grupie kontrolnej ( $p=0,013$ ), a z kolei allel T występował prawie 2 razy częściej w grupie kontrolnej w porównaniu z badaną (13% vs. 7%,  $p=0,21$ ). Autorzy wysunęli tezę, że rzadziej występujący wariant mutacji z allelem T w pozycji 385 stanowi ochronę dla występowania oddzielenia łożyska (OR: 0,519, 95% CI:0,272-0,987) [12]. Podobnie nie wykazano zwiększonego ryzyka wystąpienia stanu przedrzucawkowego z powodu nosicielstwa polimorfizmu 1328TC. Częstość występowania heterozygoty 1328TC była niższa w grupie badanej (19% vs 25%,  $p=0,47$ ). Podobnie była dla allela T (11% vs 13%,  $p=0,4$ ) [10]. Analogiczne wyniki opublikowała grupa japońska (2001), która wykazała protekcyjne działanie mutacji 1328T>C czynnika V w stosunku do zagrożenia stanem przedrzucawkowym. Zależność ta może być związana z tzw. nierównowagą sprzężeń (ang. *linkage disequilibrium*). Genotyp 1328TC występował częściej w grupie kontrolnej (N=224) w porównaniu z grupą badaną 133 pacjentek ze stanem przedrzucawkowym (13,3% vs 7,5%,  $p=0,13$ ). Podobnie allel T wykazano dwa razy częściej w grupie kontrolnej (7,5% vs 3,75%,  $p=0,05$ ) [29]. Należy zaznaczyć, że znaczenie funkcji wariantu mutacji z allelem T w pozycji 385 nie jest do końca poznane [29, 30].

W badaniach własnych u żadnej z pacjentek nie wystąpił epizod zakrzepicy, ani w trakcie trwania ciąży ani poza ciążą. Analiza badanych polimorfizmów w I połowie ciąży nie wykazała zwiększonego ryzyka wystąpienia VTE w ciąży u kobiet bez dodatkowych czynników ryzyka zakrzepicy. Potwierdza to metaanaliza Bowman i wsp. (2012), w której dokonano oceny dwóch najczęściej występujących dziedzicznych trombofilii, tj. heterozygotycznej postaci mutacji FVL i mutacji PT G20210A. Nie stwierdzono, aby nosicielstwo tych mutacji stanowiło klinicznie istotne ryzyko VTE u zdrowych ciężarnych, bez zakrzepicy w wywiadzie [5, 31].

## Wnioski

Analiza wyników wskazuje na możliwy wpływ zmutowanego allela zarówno mutacji Leiden jak i mutacji 1328 T>C genu V czynnika krzepnięcia na ryzyko występowania poronień nawracających w I trymestrze ciąży. U kobiet z nawracającymi poronieniami zamieszkującymi region Małopolski częściej niż u kobiet z tego regionu bez poronień stwierdza się nosicielstwo mutacji Leiden, oraz mutacji 1328 T>C genu V czynnika krzepnięcia. Ponadto u nosicielek genotypu TC mutacji 1328 T>C genu V czynnika krzepnięcia istnieje tendencja do występowania poronień przed ukończeniem 7 tygodnia ciąży. Na podstawie przeprowadzonego badania i wyników uzyskanych przez innych autorów kryterium do wykonania badań w kierunku trombofilii wrodzonej w nawracających poronieniach powinno pozostać przebycie 2 lub więcej poronień.

Do pełnego wyjaśnienia roli trombofilii w etiologii RPL niezbędne są dalsze badania większej liczby kobiet z poronieniami nawracającymi oraz uwzględniające jednocześnie inne polimorfizmy warunkujące trombofilie oraz wpływ czynników środowiskowych.

## Oświadczenie autorów:

1. Marta Bałajewicz-Nowak – autor koncepcji i założeń pracy, zebranie materiału, analiza statystyczna wyników, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa - autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Kazimierz Pityński – współautor tekstu pracy, przygotowanie manuskryptu.
3. Tomasz Milewicz – współautor tekstu pracy, analiza statystyczna wyników.

## Źródło finansowania:

Na realizację badania uzyskano środki w ramach dotacji docelowej na działalność służącą rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich – K/DSC/000952.

## Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów i nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

## Piśmiennictwo

1. Skrzypczak J. Algorytmy. Diagnostyka i leczenie nawracających poronień. *Medycyna po Dyplomie*. 2013, 1 (3).
2. Skrzypczak J. Poronienia nawracające. Wydanie I. Warszawa: PZWL. 2011, 50-128.
3. Speroff L, Fritz M. W: Kliniczna endokrynologia ginekologiczna i niepłodność. Red. Jakimiuk A, Czajkowski K. Warszawa: *MedPage*. 2007, 1268-1272.
4. Bimber E, Sanfilippo J, Horowitz I. *Ginekologia Kliniczna*. Red. Wyd. pol. Dębski R. 2009, 829-835.
5. American College of Obstetricians and Gynecologists. Bulletin: management of recurrent early pregnancy loss. No.24 ACOG Practice: Washington DC. February 2011.
6. American College of Obstetricians and Gynecologists. Inherited thrombophilias in pregnancy. ACOG Practice Bulletin No.124. *Obstet Gynecol*. 2011, 118, 730-740.
7. Bertina R. The prothrombin 20210 G to A variation and thrombosis. *Curr Opin Hematol*. 1998, 5, 339-342.
8. Bertina R, Koelman B, Koster T, [et al.]. Mutation on blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994, 369, 64-67.
9. Dahlback B, Carlsson M, Svensson P. 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*. 1993, 90, 1004-1008.
10. Faisel F, Romppanen E, Hiltunen M, [et al.]. Susceptibility to pre-eclampsia in Finnish women is associated with R485K polymorphism in the factor V gene, not Leiden mutation. *Eur J Hum Genet*. 2004, 12, 187-191.
11. Watanabe H, Hamada H, Yamada N, [et al.]. Association analysis of nine missense polymorphisms in the coagulation factor V gene with severe preeclampsia in pregnant Japanese women. *J Hum Genet*. 2002, 47, 131-135.
12. Jaaskelainen E, Toivonen S, Romppanen E, [et al.]. M385T polymorphism in the factor V gene, but not Leiden mutation, is associated with placental abruption in Finnish women. *Placenta*. 2004, 25, 730-734.
13. Kutteh WH, Triplett DA. Thrombophilias and recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med*. 2006, 24 (1), 54-66.

Marta Bałajewicz-Nowak et al. Polimorfizmy 1691 G > A (czynnik Leiden) i 1328 T > C genu V czynnika krzepnięcia. a występowanie poronień nawracających.

14. Rees D, Cox M, Clegg J. Word distribution of factor V Leiden. *Lancet*. 1995, 346, 1133-1134.
15. Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID, [et al.]. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet*. 1996, 348 (9032), 913-916.
16. 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.
17. Kutteh W. Antiphospholipid antibody-associated recurrent pregnancy loss: treatment with heparin and low-dose aspirin is superior to low-dose aspirin alone. *Am J Obstet Gynecol*. 1996, 174, 1584-1589.
18. Kutteh WH, Park VM, Deitcher SR. Hypercoagulable state mutation analysis in white patients with early first-trimester recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 1999, 71 (6), 1048-1053.
19. Razieli A, Kornberg Y, Friedler S, [et al.]. Hypercoagulable thrombophilic defects and hyperhomocysteinemia in patients with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*. 2001, 45 (2), 65-71.
20. Pauer HU, 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 (10), 942-947.
21. Roque H, Paidas M, Fauni E, [et al.]. Maternal thrombophilias are not associated with early pregnancy loss. *Thromb Haemost*. 2004, 91, 290-295.
22. Cardona H, Castañeda SA, Cardona Maya W, [et al.]. Lack of association between recurrent pregnancy loss and inherited thrombophilia in a group of colombian patients. *Thrombosis*. 2012, 367, 823.
23. Dissanayake V, Sirisena N, Weerasekera L, [et al.]. Candidate gene study of genetic thrombophilic polymorphisms in pre-eclampsia and recurrent pregnancy loss in Sinhalese women. *J Obstet Gynaecol Res*. 2012, 38 (9), 1168-1176.
24. Dizon-Townson DS, Nelson LM, Jang H, [et al.]. The incidence of the factor V Leiden mutation in an obstetric population and its relation to deep vein thrombosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1997, 176, 883-886.
25. Dizon-Townson D, Miller C, Sibai B, [et al.]. The relationship of the factor V Leiden mutation and pregnancy outcomes for mother and fetus. National Institute of Child Health and Human Development's Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Obstet Gynecol*. 2005, 106, 517-524.
26. Kurzawińska G. Polimorfizm genów warunkujących trombofiliję wrodzoną w grupie kobiet z poronieniami w I trymestrze ciąży. Rozprawa doktorska. Poznań: Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2009.
27. Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet*. 2006, 368, 601-611.
28. Skrzypczak J, Rajewski M, Wirstlein P, [et al.]. Częstość występowania trombofilii wrodzonej u kobiet z utratą ciąży w wielośrodkowych badaniach w Polsce. *Ginekol Pol*. 2012, 83, 330-336.
29. Watanabe H, Hamada H, Yamakawa-Kobayashi K, [et al.]. Evidence for an association of the R485K polymorphism in the coagulation factor V gene with severe preeclampsia from screening 35 polymorphisms in 27 candidate genes. *Thromb Haemost*. 2001, 86 (6), 1594-1595.
30. De Visser M, Guasch J, Kamphuisen P, [et al.]. The HR2 haplotype of factor V: effects on factor V levels, normalized activated protein C sensitivity ratios and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost*. 2000, 83 (4), 577-582.
31. Bowman Z, Branch W. Thromboprophylaxis in pregnancy. *Contemporary OB/GYN*. 2012, 57 (46).

K O M U N I K A T

**PATRONAT**



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE



Szpital  
Uniwersytecki  
w Krakowie



Polskie  
Towarzystwo  
Ginekologiczne



Polskie  
Towarzystwo  
Medycyny  
Perinatalnej



Fundacja  
Dobro Matki i Dziecka



SERDECZNIE ZAPRASZAMY PAŃSTWA NA

VIII Sympozjum  
Kliniki Położnictwa i Perinatologii  
Uniwersytetu Jagiellońskiego  
Collegium Medicum  
oraz Fundacji Dobro Matki i Dziecka

# AKTUALNE PROBLEMY PERINATOLOGII

10-11 kwietnia 2015 r.  
Hotel Nosalowy Dwór, Zakopane

**Przewodniczący Komitetu Naukowego**

Prof. dr hab. n. med. Alfred Reroń  
Klinika Położnictwa i Perinatologii, Szpital Uniwersytecki w Krakowie

Prof. UJ dr hab. n. med. Hubert Huras  
Klinika Położnictwa i Perinatologii, Szpital Uniwersytecki w Krakowie

**Tematy wiodące konferencji:**

- Poród przedwczesny: terapia i diagnostyka
- Ciąża powiktana wewnątrzmacicznym zahamowaniem wzrostu płodu
- Cięcie cesarskie
- Diagnostyka prenatalna
- Ciąża powiktana chorobą nowotworową
- Ciąża powiktana nadciśnieniem tętniczym
- Ciąża powiktana cukrzycą
- Schorzenia kardiologiczne w ciąży
- Wybrane patologie ciąży wielopłodowej



Szczegółowy program oraz informacje organizacyjne  
znajdą Państwo na stronie [www.grupamedica.pl](http://www.grupamedica.pl)  
w zakładce Bieżące konferencje