

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**VLIV POLYMORFISMŮ ENZYMU  
METHYLENTETRAHYDRAFOLÁT REDUKTÁZA A  
TROMBOFILNÍCH MUTACÍ NA PRŮBĚH  
GRAVIDITY**

Bakalářská práce

**MARKÉTA STRÁSKÁ**

Školitelka: Mgr. Dagmar Bystřická, Ph.D.; Genlabs s.r.o.

České Budějovice 2015

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Stráská, M. 2015: Vliv polymorfismů enzymu methylenetetrahydrofolát reduktáza a trombofilních mutací na průběh gravidity. [The influence of the enzyme methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and the thrombophilic mutations on the course of pregnancy, Bachelor Thesis, in Czech] – 72 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **ANNOTATION**

The aim of this work was to give a summary of the enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and particular thrombophilias in the lead with the mutations in the coagulation factors V (Leiden) and II (prothrombin G20210A) and their possible connection with some of the most frequent pregnancy complications. The practical part was designed as an optimization of the multiplex RFLP–PCR for detection of MTHFR C677T polymorphism, prothrombin G20210A and factor V Leiden mutations.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 10. 12. 2015

.....

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Dagmar Bystřické, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, čas, dohled a také za poskytnutí vzorků, materiálu a prostorů pro experimentální část mé práce. Nadále také děkuji garantovi mé práce doc. RNDr. Jindřichu Břízovi, CSc., který mi umožnil spolupracovat s externím školitelem. A nesmím opomenout poděkovat mým jedinečným rodičům, ostatním členům rodiny a mému příteli, protože právě oni mě po celou dobu studia bezmezně podporovali a dodávali sílu v časech největší beznaděje.

# OBSAH

ÚVOD.....	1
1 METHYLENTETRAHYDROFOLÁT REDUKTÁZA.....	2
1.1 Metabolismus homocysteinu .....	2
1.2 Polymorfismy v genu pro MTHFR.....	3
1.2.1 MTHFR C677T .....	4
1.2.2 MTHFR A1298C .....	5
2 TROMBOFILNÍ STAVY A TROMBOFILIE.....	6
2.1 Trombofilie vrozená .....	7
2.1.1 Faktor V Leiden.....	7
2.1.2 Protrombin G20210A .....	8
2.1.3 Hyperhomocysteinémie .....	10
2.2 Trombofilie získaná .....	11
2.2.1 Antifosfolipidový syndrom.....	12
2.3 Trombofilie smíšená .....	13
2.3.1 Deficit proteinu C .....	13
2.3.2 Deficit proteinu S.....	14
2.4 Tromboembolická nemoc (TEN) .....	14
2.4.1 Hluboká žilní trombóza .....	17
2.4.2 Plicní embolie .....	17
3 DALŠÍ KOMPLIKACE V TĚHOTENSTVÍ.....	19
3.1 Opakované spontánní potraty .....	19
3.1.1 Rizikové faktory .....	20
3.1.2 Potratovost uplynulých let v České republice .....	22
3.2 Hypertenze.....	25
3.2.1 Preeklampsie .....	27
3.2.2 Eklampsie .....	28
3.2.3 HELLP syndrom.....	28
3.3 Trombocytopenie.....	28
3.3.1 Trombocytopenie v těhotenství .....	31
3.3.2 Poléková trombocytopenie .....	34

4 KLINICKÁ UVÁŽENÍ A DOPORUČENÍ.....	35
5 CÍLE EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI .....	36
6 MATERIÁL A METODY .....	37
6.1 Izolace DNA.....	37
6.2 Primery.....	38
6.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	38
6.4 Gelová elektroforéza .....	40
6.5 Štěpení enzymem MnlI.....	40
7 VÝSLEDKY .....	42
8 DISKUZE .....	44
8.1 ÚVODNÍ PROBLEMATIKA .....	44
8.1.1 Hemostáza a hemokoagulace.....	44
8.1.2 Význam trombofilních mutací v reprodukci.....	44
8.1.3 Genetické testování polymorfismů MTHFR.....	45
8.1.4 Metody detekce trombofilních mutací v České a Slovenské republice .....	46
8.2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	46
9 ZÁVĚR... ..	48
10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	49
11 SEZNAM TABULEK .....	59
12 SEZNAM OBRÁZKŮ .....	61
13 PŘÍLOHA .....	62

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFLP	akutní steatóza jater v těhotenství
APA	antifosfolipidové protilátky (antiphospholipid antibodies)
APC	aktivovaný protein C
APS	antifosfolipidový syndrom
ART	technologie asistované reprodukce
AT	antitrombin
CBS	cystatin beta-syntetáza
FV	faktor V
FVa	aktivovaná forma faktoru V
FVIII	faktor VIII
FVIIIa	aktivovaná forma faktoru VIII
FVL	faktor V Leiden (Leidenská mutace)
FXa	aktivovaná forma faktoru X
HAK	hormonální antikoncepce
Hcy	homocystein
HHcy	hyperhomocysteinémie
HUS	hemolyticko-uremický syndrom
HŽT	hluboká žilní trombóza
ITP	imunitní trombocytopenie
LA	lupus antikoagulans
MTHFR	methylen tetrahydrofolát reduktáza
PE	preeklampsie
PT	protrombin
RPL	opakované spontánní potraty (recurrent pregnancy loss)

SLG	Společnost lékařské genetiky
tHcy	celková hladina homocysteinu
TEN	tromboembolická nemoc
TMA	trombotické mikroangiopatie
TTP	imunitní trombocytopenická purpura

## ÚVOD

Říká se, že těhotenství je nejšťastnějším obdobím v životě každé ženy. Věřím, že s tímto výrokem budou souhlasit především ty z nás, které si tímto procesem prošly bez větších přidružených problémů. Ovšem ne každá žena má to štěstí. Existuje nespočet možných komplikací, které se mohou a nemusí v průběhu gravidity či po jejím skončení objevit, a to ať už jde o nemožnost otěhotnět, o (opakované) spontánní potraty, o různé syndromy či o poruchy funkcí jednotlivých orgánů. V naprosté většině případů mají takovéto komplikace stejného jmenovatele – trombofilní stavy a trombofilní mutace, které jsou v prevenci problémového nebo neúspěšně zakončeného těhotenství aktuálním tématem.

V teoretické části mé práce se primárně zaměřuji na hojně probírané polymorfismy v klíčovém enzymu regulujícím cyklus kyseliny listové, tzv. methylenetetrahydrofolát reduktáza. Nadále udávám ucelený přehled nejčastějších defektů hemostatického systému v těhotenství, které bývají spjaty s vrozenou (Leidenská mutace, mutace v genu pro protrombin G20210A), získanou (antifosfolipidový syndrom) či smíšenou (deficit proteinů koagulační kaskády) trombofilií. Kromě obecných informací a incidencí jednotlivých poruch také práci doplňuji o těhotenské komplikace a jejich možnou souvislost s výše uvedenými poruchami.

Experimentální část je zpracována jako optimalizace metody multiplex RFLP-PCR z roku 2007, která umožňuje hromadnou detekci polymorfismu C677T v enzymu methylenetetrahydrofolát reduktáza a mutacích v genech pro koagulační faktory V (Leidenská mutace) a II (protrombin G20210A).

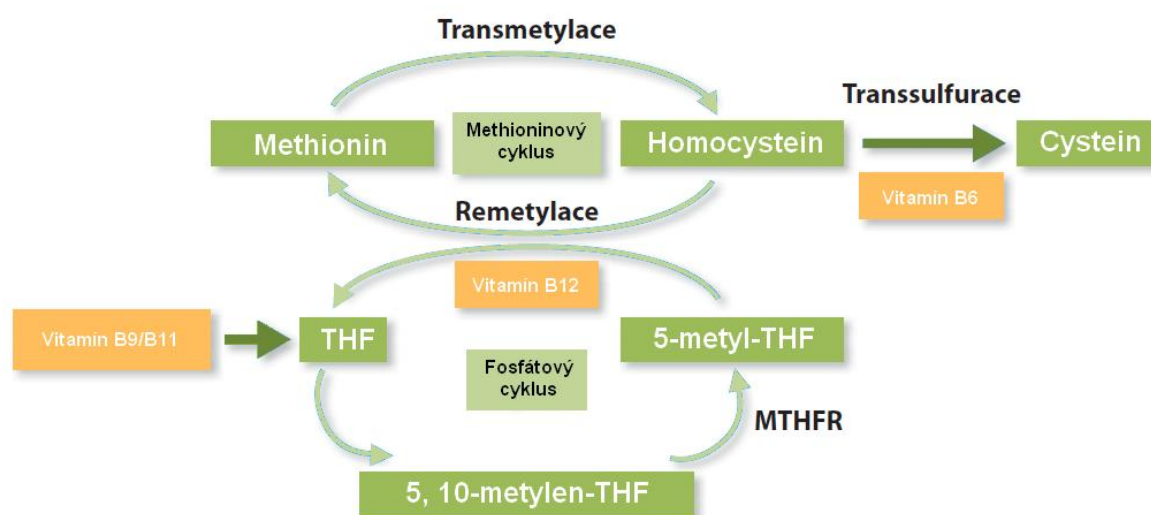


# 1 METHYLENTETRAHYDROFOLÁT REDUKTÁZA

Methylentetrahydrofolát reduktáza (MTHFR) je klíčovým enzymem regulujícím cyklus kyseliny listové (folátu) v přímé závislosti na metabolismu homocysteinu (Hcy), (Leclerc *et al.*, 2000; Rodriguez-Guillén *et al.*, 2009).

## 1.1 METABOLISMUS HOMOCYSTEINU

Homocystein je aminokyselinou, která při normálním sa věm metabolismu vzniká při přeměně methioninu na cystein (Homocystein. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]; Pokorný & Minárik, 2013). Tento proces vzniku homocysteinu nazýváme transmetylací (Obr. 1) a dochází k němu ve většině buněk lidského organismu, zatímco odbourávání, které je možné provádět dvěma procesy (transsulfurace na cystein a remetylaci na methionin), probíhá především v jaterních a ledvinových buňkách (Pokorný & Minárik, 2013). Enzym MTHFR se na celém koloběhu podílí jakožto katalyzátor konverze 5,10 - methylentetrahydrofolátu na 5 - methyltetrahydrofolát, který je hlavní formou folátu v lidském organismu a který slouží jako donor uhlíku při remetylaci Hcy na methionin. Foláty však neslouží jen jako dárci monokarbonů při metylaci Hcy, ale také při mnohých jiných metabolických reakcích jako jsou syntéza nukleotidů, neurotransmiterů proteinů a fosfolipidů (Cao *et al.*, 2012; Hickey *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014).



THF: tetrahydrofolát; MTHFR: N-5, N-10-methyltetrahydrofolát reduktáza

**Obr. 1:** Schéma metabolismu homocysteinu (převzato a upraveno dle Pokorný & Minárik, 2013).

## 1.2 POLYMORFISMY V GENU PRO MTHFR

V genu pro MTHFR, který je lokalizován na chromozomu 1, na krátkém raménku (p) na pozici 36.6 (Rodriguez-Guillén *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 20014), bylo doposud nalezeno 34 vzácných mutací a 9 běžných polymorfismů (Leclerc *et al.*, 2000), což je označení pro stav, kdy v populaci pro určitý znak existují minimálně dvě genetické varianty a zároveň frekvence výskytu dané varianty v této populaci překračuje 1 % (Polymorfismus. In: *WikiSkripta* [online]).

V případě dvou nejčastěji studovaných mutací v genu pro MTHFR - C677T a A1298C se frekvence výskytu v bělošské populaci udává v rozmezí 30 – 55 % pro C677T heterozygota, 40 – 45 % A1298C heterozygota, 4 – 25 % pro C677T mutovaného homozygota a 10 – 12 % pro A1298C mutovaného homozygota (více Tab. I), (MDL [online]).

**Tab. I:** Procentuální zastoupení mutací MTHFR v jednotlivých světových populacích (převzato a upraveno dle MDL [online]).

FREKVENCE MUTACÍ V GENU MTHFR [%]			
ETNIKUM	WILD TYPE HOMOZYGOT	HETEROZYGOT	MUTOVANÝ HOMOZYGOT
<b>MTHFR C677T</b>			
Africké	78	20	2
Asijské	30 - 60	35 – 50	3 – 20
<b>Bělošské</b>	<b>30 – 55</b>	<b>40 – 50</b>	<b>4 – 25</b>
Hispanšské	20 - 45	40 – 50	20 - 30
<b>MTHFR A1298C</b>			
Africké	65	30	3
Asijské	50 – 65	30 – 45	2 – 4
<b>Bělošské</b>	<b>45 – 50</b>	<b>40 – 45</b>	<b>10 – 12</b>
Hispanšské	50 - 65	25 – 35	2 - 6

---

## KOMBINOVANÝ HETEROZYGOT

(varianty C677T / A1298C)

---

Africké	4
Asijské	14 – 15
<b>Bělošské</b>	<b>15 – 23</b>
Hispánské	15

---

### 1.2.1 MTHFR C677T

Nejznámější a v dnešní době nejstudovanější missense mutací v genu MTHFR je mutace C677T, která byla poprvé objevena v roce 1994 (Goyette *et al.*). Mutace MTHFR C677T je velice častá, v evropské populaci se vyskytuje v 10 – 16 % (Lockwood & Wendel, 2010).

Ke vzniku této mutace dochází následkem substituce báze C (cytosin) za T (tyrosin) v pozici 677 nukleotidového řetězce, což způsobí vznik alaninového zbytku namísto valinového na pozici 226 aminokyselinového řetězce (Wang *et al.*, 2013; Procházka *et al.*, 2003). Tento jev je pak příčinou vzniku termolabilní formy enzymu s redukovanou aktivitou, kdy dochází ke snížené přeměně homocysteinu na methionin a to znamená vyšší náchylnost k ukládání homocysteinu v krvi a následnému vzniku trombóz (Wang *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2012; Procházka *et al.*, 2003). Nositelé heterozygotní formy (677CT) mají tuto aktivitu redukovanou o zhruba 35 % a u homozygotních forem (677TT) mohou tyto hodnoty dosahovat 50 – 70 % (Tab. II), (Cao *et al.*, 2012; Rodriguez-Guillén *et al.*, 2009; van der Put *et al.*, 1998).

**Tab. II:** Procentuální aktivita enzymu MTHFR vycházející ze vztahů mezi jednotlivými genotypy (údaje převzaty z van der Put *et al.*, 1998).

GENOTYP	677CC	677CT heterozygot	677TT homozygot
1298AA	100 %	66 %	25 %
1298AC heterozygot	83 %	48 %	-
1298CC homozygot	31 %	-	-

pozn.: data označené symbolem „-“ nebyla analyzována

Varianta C677T je považována za nejběžnější genetickou příčinu hyperhomocysteinémie (viz 2.1.3) a homocystinurie (Leclerc *et al.*, 2000; Lockwood & Wendel, 2010).

Homocystinurie je porucha s autozomálně recesivní dědičností vyznačující se deficitem cystatin beta-syntetázy (CBS), (Honzík, 2009 [online]; Leeda *et al.*, 1998; Orendáč *et al.*, 2000), který se podílí na přeměně methioninu na cystein, kdy se kromě methioninu v těle hromadí i toxický homocystein. Výskyt je udáván až na 1 z 15 000 narozených dětí, v České republice to tedy odpovídá zhruba 2 – 3 novým případům ročně. Mezi příznaky patří postižení čtyř orgánových soustav – oka, skeletu, cévního endotelu a centrální nervové soustavy (Honzík, 2009 [online]).

### 1.2.2 MTHFR A1298C

Méně studovaná ale přesto významná mutace A1298C objevená roku 1998 (van der Put *et al.*) vzniká záměnou původní báze A (adenin) za C (cytosin) na pozici 1298 nukleotidového řetězce a to má za následek záměnu kyseliny glutamátové za alanin v aminokyselinovém řetězci (Yang *et al.*, 2014). Přítomnost tohoto polymorfismu je v evropské populaci stanovena na 4 – 6 % (Lockwood & Wendel, 2010).

Podobně jako polymorfismu C677T i polymorfismus A1298C redukuje aktivitu enzymu MTHFR (Tab. II), ačkoliv ne v takové míře. Zatímco u heterozygotní formy 677CT funguje enzym MTHFR jen ze zhruba 66 %, u heterozygotní formy 1298AC je jeho aktivita 83%. Rozdíl mezi aktivitou enzymu MTHFR u homozygotních forem obou polymorfismů pak není tak markantní a pohybuje se kolem 70 % (van der Put *et al.*, 1998).

## 2 TROMBOFILNÍ STAVY A TROMBOFILIE

Těhotenství pro ženské tělo představuje mimořádně složitou hemostatickou výzvu, protože právě hemostatický systém hraje podstatnou roli ve všech třech základních fázích reprodukce, kterými jsou ovulace, implantace a placentace, a také při porodu nového jedince (Lockwood & Wendel, 2010; Sergi *et al.*, 2015).

Důležitost hemostatického systému vychází z potřeby dostatečného oběhu krve v placentě (Lockwood & Wendel, 2010; Sergi *et al.*, 2015). Ovšem těhotenství vyvolává mnoho fyziologických změn, což může negativně ovlivnit i pravděpodobnost výskytu krevní sraženiny (Karatas *et al.*, 2014; Tanaka *et al.*, 2015).

Trombofilie je vrozená či získaná porucha hemostatického mechanismu, která je charakterizována zvýšenou náchylností ke krevnímu srážení a trombotizaci (vzniku krevní sraženiny). Predispozice ke zrodu krevní sraženiny může vznikat v důsledku působení genetických faktorů či získaných změn v mechanismu srážení krve, anebo nejčastěji vzájemnou interakcí obou těchto faktorů (Tab. III), (Khan & Dickerman, 2012; Poul, 2006; Procházka *et al.*, 2004).

**Tab. III:** Vrozené a získané trombofilní poruchy (převzato a upraveno dle Bick, 2002).

VROZENÉ FORMY	VROZENÉ I ZÍSKANÉ FORMY	ZÍSKANÉ FORMY
APC rezistence	deficit antitrombinu	antifosfolipidové protilátky
▪ mutace faktoru V Leiden	deficit kofaktoru II	▪ antikardiolipinové protilátky
▪ mutace faktoru V Cambridge	deficit proteinu C	▪ Lupus antikoagulanty
▪ mutace faktoru V Hong Kong	deficit proteinu S	▪ podskupina antifosfolipidových protilátek
▪ mutace faktoru V HR2	další deficity fibrinolytického systému	myeloproliferativní onemocnění
▪ mutace protrombinu G20210A		Trousseauův syndrom
deficit faktoru XII (Hagemanův faktor)		
dysfibrinogenémie		

---

hyperhomocysteinémie

defekt krevních destiček

- Wein-Penzingův efekt
  - syndrom lepivých destiček
- 

## 2.1 TROMBOFILIE VROZENÁ

Vrozenou formou rozumíme genetické predispozice k rozvoji trombofilie. Ta se projeví, když vrozený faktor, jako například deficit proteinu C, interaguje s další vrozenou nebo získanou složkou před samotným propuknutím nemoci. Homozygotní forma nebo kombinace dvou či více heterozygotních abnormálních faktorů může vést až k zjevným trombotickým poruchám u osob již v raném věku (Khan & Dickerman, 2012).

Existuje silné spojení mezi vrozenou trombofilii a tromboembolickou nemocí (TEN, kapitola 2.4), a proto je detekce trombofilních mutací logickým krokem v prevenci této nemoci. Stále ale zůstává otázkou, zdali by měla být vrozená trombofilie spojována s nepříznivými výsledky těhotenství v důsledku trombózy v uteroplacentární cirkulaci, tedy ve spojitosti se spontánními potraty, preeklampsii, růstovou destrukcí plodu či placentární abrupcí. A ačkoliv stále neexistují uspokojivá tvrzení podporující tuto spojitost, četnost testování těhotných žen v této souvislosti se v dnešní době stále zvyšuje (Lockwood & Wendel, 2010).

### 2.1.1 FAKTOR V LEIDEN

Leidenská mutace (mutace faktoru V) je nejznámějším a nejčastějším genetickým defektem a vrozeným rizikovým faktorem trombózy objevujícím se v bělošské populaci (Procházka *et al.*, 2004), a to v rozmezí 2 – 15 % (Kjellberg *et al.*, 2010). V evropské populaci je výskyt odhadnut na zhruba 5 %, zatímco u afrických černochů, Číňanů, Japonců a dalších Asijských prakticky chybí. U Afroameričanů se pak vyskytuje ve 3 % (Lockwood & Wendel, 2010).

Jedná se o autozomálně dominantně dědičnou bodovou mutaci v genu pro hemokoagulační faktor V. Vzniká substitucí nukleotidu G (guaninu) za A (adenin) na pozici 1691 (exon 10) v genu pro faktor V, díky čemuž dochází k substituci aminokyseliny argininu za glutamin v peptidickém řetězci. Tento proces má za následek vznik rezistence faktoru V k aktivovanému proteinu C (tzv. APC rezistence, APC-R; více kapitola 2.3.1), který je

potřebný pro degradaci faktoru V a VIII. Tím dochází k ovlivnění hemokoagulace, protože protein C ztrácí funkci přirozeného inhibitoru koagulační kaskády (EGAPP Working Group, 2011; Leidenská mutace In: *Wikiskripta* [online]; Lindqvist & Dahlbäck, 2008; Sergi *et al.*, 2015; Procházka *et al.*, 2004; Urbánková *et al.*, 2002).

U osob s počáteční epizodou tromboembolické nemoci (TEN) se výskyt FVL pohybuje v rozmezí 15 – 20 % (EGAPP Working Group, 2011), ve 20 – 40 % u pacientů s žilní trombózou a až u 60 % pacientek, kterým je diagnostikována trombóza během těhotenství (Sergi *et al.*, 2015). Nicméně riziko toho, že těhotnou heterozygotní nosičku FVL bez předchozího výskytu TEN či těhotnou heterozygotku s pozitivním výskytem TEN před 50. rokem věku u příbuzného v přímé linii prvního stupně (například matka a dcera) postihne TEN, je stanoveno pouze na 0,3 %. Toto riziko ale stoupá nejméně na 17 % u těhotných homozygotních nosiček, které samy měly již v minulosti problémy s TEN nebo se problémy objevily i u jiných rodinných příslušníků. U těhotných homozygotek bez předchozího výskytu TEN u nich samotných či u prvostupňového příbuzného v přímé linii se riziko pohybuje v rozmezí 1 – 2 % (Tab. IV.), (Lockwood & Wendel, 2010).

**Tab. IV:** Riziko výskytu TEN v obecné populaci a u těhotných žen s Leidenskou mutací - s historií TEN a bez předchozího výskytu TEN (údaje převzaty z Lockwood & Wendel, 2010).

GENOTYP	PREVALENCE V OBECNÉ POPULACI (%)	TEN BEZ PŘEDCHOZÍHO VÝSKYTU (%)	POZITIVNÍ HISTORIE TEN (%)	ZASTOUPENÍ VŠECH TEN (%)
HETEROZYGOT	1 - 15	< 0,3	10	40
HOMOZYGOT	< 1	1 – 2	17	2

### 2.1.2 PROTROMBIN G20210A

Druhou nejrozšířenější trombofilní mutací objevenou roku 1996 (Poort *et al.*), kterou řadíme mezi zděděné rizikové faktory pro TEN, je bodová mutace genu pro protrombin (faktor II), (Bosler *et al.*, 2006).

V hemokoagulační kaskádě slouží protrombin, jehož gen je lokalizován na 11. chromozomu (11p11.2), (Bosler *et al.*, 2006; Gao & Tao, 2014; Meeks & Abshire, 2008),

jako prekurzor trombinu, který je K-dependentním vitamínem, který slouží k přeměně fibrinogenu na fibrin (Bosler *et al.*, 2006; Meeks & Abshire, 2008).

Deficit faktoru II je tedy vzácná autozomálně dědičná porucha koagulace, která se vyskytuje ve zhruba 40 známých mutacích (Meeks & Abshire, 2008). Tou nejznámější a nejčastěji studovanou mutací je mutace G20210A. Ta se ve zdravé bělošské populaci vyskytuje u zhruba 2 % osob, zatímco u osob s historií žilní trombózy stoupá výskyt až na 6 % (Flaujac *et al.*, 2007). U evropské populace je přítomna zhruba ve 3 % a je příčinou až 17 % případů TEN v průběhu gravidity. Podobně jako u faktoru V Leiden se pravděpodobnost toho, že nosičku této mutace postihne TEN v průběhu těhotenství, zvyšuje či snižuje v závislosti na předchozím výskytu TEN, buďto v rodině či u těhotné ženy samotné. V případě, kdy se TEN nevyskytla ani u pacientky ani u žádného jejího prvostupňového příbuzného před 50. rokem věku, se pravděpodobnost zrodu TEN pohybuje pod 0,5 %, v opačném případě toto riziko překračuje 10% hranici. U homozygotek pro protrombinovou mutaci G20210A bez předchozího výskytu TEN se tato hranice pohybuje v rozmezí 2 – 3 %, zatímco pozitivní historie značí výrazně zvýšené riziko rozvoje TEN v těhotenství (Tab. V), (Lockwood & Wendel, 2010).

**Tab. V:** Riziko vzniku TEN v obecné populaci a u těhotných žen s mutací v genu pro protrombin G20210A - s historií TEN a bez předchozího výskytu TEN (údaje převzaty z Lockwood & Wendel, 2010).

<b>GENOTYP</b>	<b>PREVALENCE V OBECNÉ POPULACI (%)</b>	<b>TEN BEZ PŘEDCHOZÍHO VÝSKYTU (%)</b>	<b>POZITIVNÍ HISTORIE TEN (%)</b>	<b>ZASTOUPENÍ VŠECH TEN (%)</b>
HETEROZYGOT	2 - 5	< 0,5	> 10	17
HOMOZYGOT	< 1	2 – 3	> 17	0,5

V populaci se ale vyskytuje i kombinace mutací G20210A a faktoru V Leiden, která sice není tak častá (Tab. VI), jelikož je přítomna pouze u zhruba 1 člověka z 10 000, ale nese s sebou synergetický hyperkoagulační účinek těchto dvou mutací (Lockwood & Wendel, 2010; Ziakas *et al.*, 2015). To ve své podstatě znamená, že se riziko projevu tromboembolické nemoci u pacientek bez jejího předchozího výskytu i v rodině pohybuje v rozmezí 4 – 5 % (Lockwood & Wendel, 2010).



**Tab. VI:** Riziko vzniku TEN v obecné populaci a u těhotných žen s mutacemi v genu pro faktor V a v genu pro protrombin G20210A - s historií TEN a bez předchozího výskytu TEN (údaje převzaty z Lockwood & Wendel, 2010).

<b>GENOTYP</b>	<b>PREVALENCE V OBECNÉ POPULACI (%)</b>	<b>TEN BEZ PŘEDCHOZÍHO VÝSKYTU (%)</b>	<b>POZITIVNÍ HISTORIE TEN (%)</b>	<b>ZASTOUPENÍ VŠECH TEN (%)</b>
DVOJITÝ HETEROZYGOT	0,01	4,7	> 20	1 - 3

### 2.1.3 HYPERHOMOCYSTEINÉMIE

Hyperhomocysteinémii (HHcy) lze definovat jako zvýšenou hladinu homocysteinu (Hcy) nad referenční hodnoty, které se liší v závislosti na věku, pohlaví, způsobech výživy, etnické příslušnosti aj. Na konci dvacátého století se jako horní hranice určující HHcy používala hladina tHcy (součet koncentrací všech redukovaných a oxidovaných forem homocysteinu v krevní plazmě) 12  $\mu\text{mol/l}$ , která je v dnešní době považována spíše za normální nález. Fyziologicky se tHcy pohybuje v rozmezí od 5 – 15  $\mu\text{mol/l}$ , přičemž pacientovi s hodnotami vyššími než 15  $\mu\text{mol/l}$  lze již diagnostikovat HHcy (Hyánek *et al.*, 2009; Pokorný & Minárik, 2013). U fyziologických těhotenství nacházíme jedny z nejnižších hodnot tHcy (2 - 5  $\mu\text{mol/l}$ ), (Hickey *et al.*, 2012; Pokorný & Minárik, 2013).

HHcy můžeme rozdělit dle hladiny tHcy v krvi na mírnou, středně těžkou a těžkou (Tab. VII). Mírná a středně těžká HHcy jsou obvykle způsobené nedostatkem vitamínu B6, B12 nebo kyseliny listové v potravě. Vitamíny B jsou totiž kofaktory jednotlivých reakcí potřebných k odbourávání homocysteinu v lidském těle (viz Obr. 1), takže při nedostatku těchto vitamínů nemohou takové reakce probíhat, a proto dochází k hromadění Hcy. Těžká forma HHcy je pak nejčastěji způsobována vrozenými defekty genů pro klíčové enzymy metabolismu Hcy, ale lze jí pozorovat i u chronického selhání ledvin či vitamínového deficitu (Hyánek *et al.*, 2009; Pokorný & Minárik, 2013).

**Tab. VII:** Stupně hyperhomocysteinémie (převzato a upraveno dle Pokorný & Minárik, 2013).

STUPEŇ HYPERHOMOCYSTEINÉMIE	μmol/l
mírná hyperhomocysteinémie	15 – 30
středně těžká hyperhomocysteinémie	30 – 100
těžká hyperhomocysteinémie	nad 100

Díky svým toxickým účinkům na metabolismus je akumulace Hcy v těhotenství velice nebezpečná. Jeho akumulací je v organismu vyvolán oxidační stres, který se může projevit zvýšenou náchylností k mnoha chorobám. Oxidací homocysteinu vzniká peroxid vodíku, ze kterého se uvolňuje vysoce reaktivní hydroxylový radikál, který napadá především mastné kyseliny. To vede k poškození buněčných membrán, lipoproteinů, trombocytů, leukocytů a organel v cytoplazmě, jako mitochondrie, endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát. Zvláště citlivé na oxidační stres jsou pak endoteliální buňky, ve kterých nemůže probíhat transsulfurace, to vede k endoteliální dysfunkci kvůli nadbytku homocysteinu. Podobně citlivé jsou i oocyty, ve kterých může v takovém případě probíhat pouze remethylace homocysteinu na methionin (Pokorný & Minárik, 2013).

Bylo prokázáno, že suplementace kyselinou listovou tři měsíce před otěhotněním a pak v průběhu prvního trimestru těhotenství snižuje u plodu riziko vzniku defektů neurální trubice a jiných vrozených vad (Leeda *et al.*, 1998; Stránský & Ryšavá, 2010; Vollset *et al.*, 2000), což má za následek snižování hladiny homocysteinu v krvi (Leeda *et al.*, 1998), nikoliv snižování hyperhomocysteinémie, jak bylo dříve mylně interpretováno (Bultas, 2009).

## 2.2 TROMBOFILIE ZÍSKANÁ

Defekty proteinů C, S či AT nemusejí souviset jen s vrozenou trombofilií. Jsou-li tyto faktory získané, mohou stát i u zrodu získaných trombofilií. Ty se v populaci vyskytují stejně často jako vrozené formy (Bick, 2002).

### 2.2.1 ANTIFOSFOLIPIDOVÝ SYNDROM

Fosfolipidy jsou základní složkou každé buněčné membrány. Jsou uspořádány do dvou vrstev. Každý z fosfolipidů je tvořen z glycerolové hlavičky, která je připevněna k dvěma řetězcům esterifikovaných mastných kyselin (jedna nasycená a druhá nenasycená), (Carp, 2014). Antifosfolipidové protilátky jsou heterogenní fosfolipidy na povrchu krevních destiček a vaskulárního endotelu (Šubrt *et al.*, 2007). Jsou heterogenní skupinou protilátek, která je silně spojována s trombofilii (Bick, 2003; Buliková & Crha, 2004;). Lze je podle metody detekce dělit na lupus antikoagulant (LA), antikardiolipinové protilátky (ACLA), antifosfolipidové nebo anti  $\beta_2$ -glykoprotein I-ové (Buliková & Crha, 2004).

Laboratorním kritériem je průkaz alespoň jedné z výše uvedených protilátek v minimálním časovém odstupu 12 týdnů mezi analýzami (Miyakis *et al.*, 2006; Nytrová *et al.*, 2009). Pozitivní výskyt APA je tedy možné detekovat i u jinak zdravého jedince jako náhodný nález. Nejčastěji však bývají prokazovány po prodělaných infekcích, jde tedy pouze o dočasný stav (Buliková & Penka, 2005). U těhotných žen můžeme graviditu brát jako „speciální šanci“ na klinickou manifestaci nemocných s APA (Buliková & Crha, 2004).

Antifosfolipidový syndrom (APS) je život ohrožující autoimunitní porucha koagulace (nejčastěji získaná), jejími charakteristickými projevy mohou být arteriální či venózní mikrocirkulační trombóza (popřípadě oba typy naráz), přítomnost antifosfolipidových protilátek a těhotenské komplikace, mezi které řadíme například recidivující spontánní potraty (a to jak rané, tak i pozdní), nadále nitroděložní retardace růstu plodu, předčasný porod, abrupce placenty, hypertenzi způsobenou těhotenstvím, HELLP syndrom, trombocytopenii či uteroplacentární insuficienci (nedostatečnost placenty a jejího mateřského cévního zásobení pocházejícího z dělohy (Bick, 2002; Buliková & Penka, 2005; Carp, 2014; Hanouana *et al.*, 2013; Hluší & Krčová, 2003; Nytrová *et al.*, 2009; Procházka *et al.*, 2004; Šubrt *et al.*, 2008; Uteroplacentární insuficience [online]). V průběhu posledních pár desetiletí bylo prokázáno, že APS je systémovým onemocněním, které potenciálně postihuje téměř každou orgánovou soustavu v lidském těle. Jako u jiných autoimunitních onemocnění ani u APS nelze hledat žádnou specifickou příčinu vzniku, protože jde o výsledek environmentálních, hormonálních a genetických faktorů (Carp, 2014).

Rozlišujeme APS primární a sekundární. O sekundárním APS hovoříme tehdy, je-li APS až projevem jiných chorob (cerebrovaskulární, srdeční, infekční, renální či dermatologické onemocnění), a o primárním ve chvílích, kdy se příznaky projevují

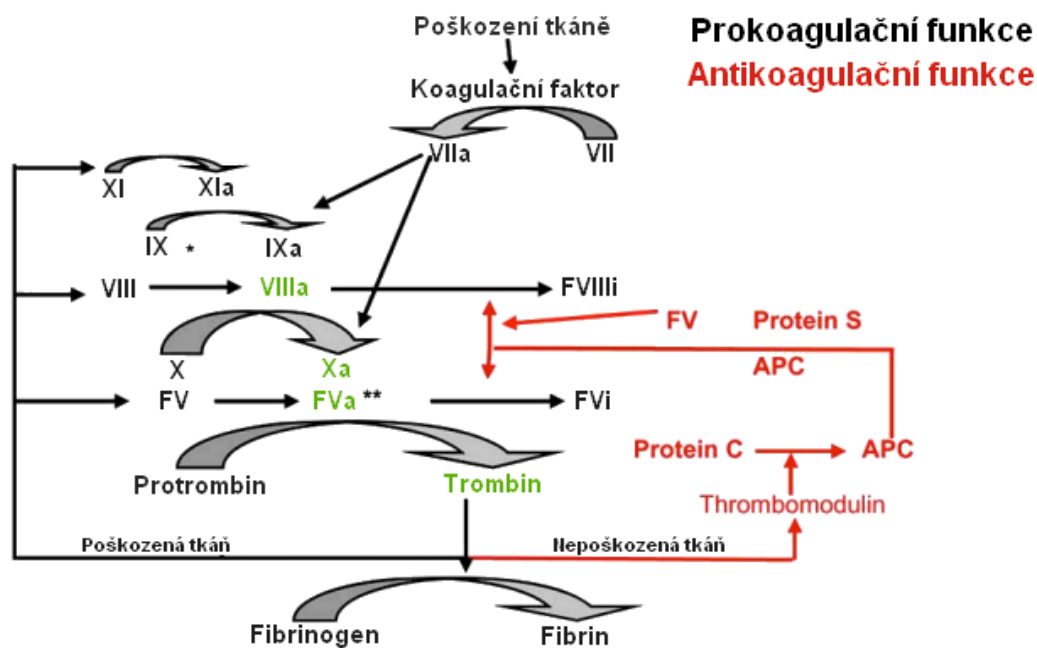
osamoceně bez přítomnosti jiného onemocnění (Carp, 2014; Šubrt *et al.*, 2008). U 1 % případů s APS může docházet k velice vzácné komplikaci, k tzv. katastrofálnímu APS, který je charakteristický multiorgánovým selháním v důsledku vzniku malých žilních trombóz spojených s trombotickými mikroangiopatiemi (viz kapitola 3.3.1), (Hanouana *et al.*, 2013).

## 2.3 TROMBOFILIE SMÍŠENÁ

### 2.3.1 DEFICIT PROTEINU C

Protein C patří mezi K-dependentní proteiny (závislost na vitamínu K) a jeho neaktivovaná forma je společně s proteinem S tvořena v játrech (Protein C. In: *Wikiskripta* [online]). Deficit proteinu C je spojován s více než 160 různými mutacemi, které dávají vznik velice variabilním fenotypům. Prevalence této poruchy je stanovena na 0,2 – 0,3 % (Lockwood & Wendel, 2010) a její nositelé mají 7x zvýšené riziko vzniku hluboké žilní trombózy oproti normální populaci.

Aktivovaná forma proteinu C (APC) hraje stěžejní roli v hemokoagulačním mechanismu (Obr. 2). Slouží jako inhibitor zajišťující zpětnovazebnou kontrolu aktivace jednotlivých faktorů koagulační kaskády (Procházka *et al.*, 2004), takže je-li FV aktivován trombinem či faktorem Xa (FXa), vzniká prokoagulační FVa. Tato aktivovaná forma pak působí jako kofaktor FXa a hraje svou roli i při aktivaci protrombinu (Urbánková *et al.*, 2002). Bez přítomnosti mutace v genu pro faktor V (Leidenská mutace) je proto možné stimulovat degradaci FVIIIa za pomoci aktivovanému proteinu C. Ovšem díky přítomnosti mutace je tato schopnost ztracena, takže mají nositelé mutace FVL snížený účinek degradace jak inaktivované (*i*) formy faktoru FVIII, tak té aktivované (*a*), což vede ke zvýšené náchylnosti ke krevnímu srážení a následnému vzniku krevní sraženiny (Lindqvist & Dahlbäck, 2008). Nicméně tento fakt lze posuzovat i pozitivním způsobem, protože například při porodech pak dochází ke snížené ztrátovosti krve (Kjellberg *et al.*, 2010), což podporuje myšlenku toho, že tyto mutace mohou být svým způsobem i evoluční výhodou (Lindqvist & Dahlbäck, 2008).



a = aktivovaný, i = inaktivovaný, APC = aktivovaný protein C

\* Tenázový komplex

\*\* Protrombinázový komplex

**Obr. 2:** Schéma koagulační kaskády (převzato a upraveno dle Lindqvist & Dahlbäck, 2008).

### 2.3.2 DEFICIT PROTEINU S

Podobně jako protein C i protein S patří mezi K-dependentní proteiny. Jakožto kofaktor aktivovaného proteinu C, se kterým vytváří komplex, společně inhibují koagulační systém (Obr. 2), především faktory V a VIII (Bick, 2002; Protein C. In: *Wikiskripta* [online]; Protein S. In: *Wikiskripta* [online]).

Obecně se dá říci, že deficit proteinu S má dva původce (umlčený gen či mutaci), kteří redukuje množství volného proteinu S v plazmě a jeho aktivitu. U nositelů této poruchy je riziko vzniku hluboké žilní trombózy až 10x vyšší oproti zdravé populaci (Lockwood & Wendel, 2010; Urbánková *et al.*, 2002). Existují i případy, kdy se tento deficit vyskytuje v homozygotní formě, ale ta se projeví, podobně jako homozygotní forma deficitu faktoru C, vážnou trombózou a/nebo smrtelným neonatálním onemocněním *purpura fulminans* (Lockwood & Wendel, 2010; Marlar & Neumann, 1990; Urbánková *et al.*, 2002)

## 2.4 TROMBOEMBOLICKÁ NEMOC (TEN)

Tromboembolickou nemocí (TEN; žilní tromboembolismus) se rozumí hluboká žilní trombóza a plicní embolie, a to jako dva různé projevy stejného onemocnění (Kadlec &

Skříčková, 2008; Poul, 2006). V obecné populaci je výskyt TEN udáván do hodnoty 1 z 1 000 osob, ale jelikož je rozvoj této nemoci limitován věkem, u osob nad 75 let je výskyt udáván zhruba jako 1 ze 100 osob, u osob mladších 40 let je pak tento výskyt činí 1 z 10 000 osob (Brůhová, 2011). U gravidních žen je pak riziko TEN podle Skalické (2002) až 5x vyšší a podle Poula (2006) dokonce 6x až 10x vyšší než u netěhotných žen stejné věkové kategorie. Žilní tromboembolická příhoda tedy postihuje více než 1 z 1 000 těhotných žen, přičemž plicní embolie je nejčastější příčinou mortality v těhotenství (Poul, 2006).

Tromboembolismus je proces, při kterém se za jistých podmínek vytvoří uvnitř cévy trombus (krevní sraženina), který následně putuje cévním řečištěm, a právě tato putující krevní sraženina může být příčinou uzavření další cévy (embolizace), (Kadlec & Skříčková, 2008).

**Tab. VIII:** Prevalence jednotlivých trombofilií u pacientek s TEN v těhotenství, relativní riziko TEN v těhotenství u trombofilních pacientek vztaženo k riziku netěhotných žen bez trombofilie a pravděpodobnost s těhotenstvím spojené TEN na 1 000 gravidit u jednotlivých trombofilií (převzato a upraveno dle Poul, 2006).

<b>TROMBOFILIE</b>	<b>PREVALENCE U TĚHOTNÝCH S TEN</b>	<b>OR* TEN V TĚHOTENSTVÍ</b>	<b>PRAVDĚPODOBNOST TEN NA 1 000 GRAVIDIT</b>
Mutace faktoru V Leiden heterozygotní	20 – 46	5 – 16	2 – 3
Mutace faktoru V Leiden homozygotní	2 – 4	20 – 40	40
Mutace protrombinu G20210A	6 – 26	3 – 15	3 – 5
Dvojitě heterozygotní pro FVL a PGM	7 – 9	9 – 107	10 – 50
Deficit proteinu S	1 – 12	2 – 3	1 – 3
Deficit proteinu C	2 – 14	4 – 7	1 – 9
Deficit antitrombinu	1 – 19	7 – 64	4 – 333
Zvýšená hladina f. VIII	18	4 – 5	2 – 3

\*OR je zkratkou pro Odds Ratio

pozn.: Velké rozpětí u některých hodnot je podmíněno relativně malými soubory u některých trombofilií a různě nastavenými kritérii pro deficit.

Již v roce 1856 předložil německý lékař Rudolf Virchow hypotézu, ve které vysvětlovat etiologii plicní embolie, což vedlo k pochopení 3 primárních příčin venózní a arteriální trombózy: současné působení aktivace koagulace, krevní sraženiny a poškození cévních stěn. Tuto tzv. Virchowovu triasu dále doplňují získané i vrozené rizikové faktory, mezi které mohou patřit věk nad 40 let, operace, trauma, imobilizace, infekce, nicméně rizikovým faktorem je i sama anamnéza prodělané HŽT, ale též gravidita a užívání hormonální antikoncepce (HAK), (Brůhová, 2011; Khan & Dickerman, 2012; Poul, 2006).

Mezi jednu z nejspecifičtějších rizikových skupin patří ženy v reprodukčním věku. Právě ony jsou vystaveny zvýšenému riziku díky užívání HAK, substituční terapii estrogenu, léčbě antiestrogenu, těhotenstvím a šestinedělím. Díky projevům trombotických příhod nejen klasickým způsobem, ale často právě skrze různé těhotenské komplikace (samovolný potrat, abrupce placenty, preeklampsie) má pro tuto problematiku gravidita zvláštní klinický význam (Brůhová, 2011; Poul, 2006). Tento význam podtrhují stále více probírané trombofilní mutace (faktor V Leiden a protrombin G20210A), které podle recentních dat hrají významnou roli v rozvoji TEN u těhotných, zatímco polymorfismus MTHFR ne (Lockwood & Wendel, 2010; Ziakas *et al.*, 2015)

#### **2.4.1 HLUBOKÁ ŽILNÍ TROMBÓZA**

Žilní trombóza je onemocněním, které se vyskytuje poměrně často a u kterého riziko výskytu stoupá s věkem. Odhadovaná incidence v populaci je stanovena zhruba na 160 – 180 případů na 100 000 obyvatel za 1 rok (Broulíková, 2007).

Hluboká žilní trombóza (HŽT) je onemocněním, při kterém dochází ke vzniku trombu v hlubokých žilách. V běžné populaci je incidence tohoto onemocnění odhadována na 3-4 případy na 1 000 osob za 1 rok (Kadlec & Skříčková, 2008). Prevalence HŽT v předporodním období u žen do 35 let je zhruba 0,06 % a 0,12 % u žen nad 35 let. V poporodním období se HŽT vyskytuje v 0,03 % případů v mladší věkové skupině a 0,07 % v té starší (Skalická, 2002).

HŽT nejčastěji postihuje hluboké žíly dolních končetin (Kadlec & Skříčková, 2008), ale ve zhruba 1 – 2 % z celkového počtu všech trombóz může dojít ke vzniku trombu i v hlubokých žilách horních končetin, ovšem jiné lokality vzniku HŽT jsou považovány za velice neobvyklé (Broulíková, 2007).

#### **2.4.2 PLICNÍ EMBOLIE**

Plicní embolie je těžko diagnostikovatelnou a život ohrožující nemocí, která patří mezi nejzávažnější komplikace HŽT (Broulíková, 2007; Kadlec & Skříčková, 2008). Ve vyspělých zemích světa patří mezi nejčastější příčiny mortality v těhotenství (Leung *et al.*, 2012).

Nedávné studie (Kline *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2015) přicházejí se závěry, že těhotenství výrazně nezvyšuje riziko rozvoje plicní embolie u těhotných žen. Meng *et al.*



(2015) uvádí, že plicní embolie se vyskytuje zhruba u 3 z 10 000 těhotných žen, ale riziko se zvyšuje v období dvou týdnů po porodu, a to až do takové míry, že 70 % TEN asociovaných s těhotenstvím se objevují právě v tomto období (Meng *et al.*, 2015).

### 3 DALŠÍ KOMPLIKACE V TĚHOTENSTVÍ

Gravidita s sebou nese mnoho přidružených komplikací, které se mohou objevit již na samém počátku či v jejím v průběhu a můžou či nemusí přímo souviset s trombofilií.

#### 3.1 OPAKOVANÉ SPONTÁNNÍ POTRATY

Termín spontánní potrat lze popsat jako neúspěšné těhotenství, které je ukončeno úmrtím či vypuzením embrya (v pozdějším stádiu gravidity označovaném jako plod), (Carp, 2014). Obecně uznávaná definice formulovaná Světovou zdravotnickou organizací (WHO, též SZO) udává, že embryo či plod by mělo vážit méně než 500 g, což koresponduje s jeho stářím zhruba do 20. týdne těhotenství, aby se jednalo o potrat. Ovšem v některých studiích jsou jako (spontánní) potraty nesprávně označovány i situace, kdy se narodí dítě již mrtvé nebo i situace, kdy předčasně umírá novorozenec (Carp, 2014).

Abychom mohli mluvit o opakovaných spontánních potratech (RPL), je nutné vytyčit si spodní hranici počtu potratů, od které můžeme tento termín zavést. To tedy znamená, že stav, kdy žena ztratí 3 a více ( $\geq 3$ ) těhotenství trvajících do jejich 20. týdne, lze označit jako opakované spontánní potraty (Carp, 2014; Ocak *et al.*, 2013). Důležité je ale uvědomit si, že v každé zemi mohou být pravidla pro určení této diagnózy nastavena jinak (Carp, 2014). Například odborná komise z American Society for Reproductive Medicine (Practice committee of the American society for reproductive medicine, 2013) definovala opakované spontánní potraty již jako ztrátu  $\geq 2$  těhotenství. Baumann *et al.* (2013) pak ve své studii zacházejí ještě do větších podrobností, když do výběru studijní skupiny zařazují pouze ženy, které potratily souvisle více než dvakrát se stejným partnerem. Je tedy možné setkávat se s různými alternativami této definice napříč odbornými publikacemi.

Opakované spontánní potraty postihují 1 % všech žen. Pokud si ale pro svou definici zvolíme druhou možnost formulace, tedy že se jedná o dvě a více aborcí, jejich podíl vzroste z 1 % až na 5 % (Baumann *et al.*, 2013; Karatas *et al.*, 2014).

Důvody pro ztrátu gravidity jsou multifaktoriální záležitostí (Baumann *et al.*, 2013), jejíž příčinou mohou být například etiologické faktory jako endokrinní problémy, děložní malformace, chromozomální abnormality rodičů či plodů, autoimunitní onemocnění a v mnoha případech trombofilní stavy. Naneštěstí u zhruba 40 – 60 % případů nejsou zjevné příčiny detekovatelné (Baumann *et al.*, 2013; Ocak *et al.*, 2013).

### 3.1.1 RIZIKOVÉ FAKTORY

I to, zdali bude ženské vajíčko oplozeno mužskou spermií, zdali se po splnutí těchto pohlavních buněk oplozené vajíčko následně správně vyrýhuje či zdali v průběhu vývoje embrya/plodu nedojde k různorodým těžkostem, je předem i ve svém průběhu ovlivněno rizikovými faktory. Nejdůležitějšími a naneštěstí i těmi nejzávažnějšími rizikovými činiteli jsou ty neovlivnitelné. Do této skupiny můžeme zařadit matčinu a ve své podstatě i otcovu genetickou výbavu (Rodriguez-Guillén *et al.*, 2009). Rodinná anamnéza je při jakékoliv následné diagnostice klíčovou. Do značné míry se na riziku vzniku obtíží podílí i životní styl.

### TROMBOFILNÍ MUTACE A POLYMORFISMY ENZYMU MTHFR

Napříč odbornými studiiemi zkoumajícími účinek trombofilních mutací na opakované spontánní potraty se vyskytují rozporuplné názory. Některé z nich podporují myšlenku, že i tyto mutace mohou v uvedené problematice hrát určitou roli (Goodman *et al.*, 2006), jiné to naopak vyvracejí (Karatas *et al.*, 20014; Ocak *et al.*, 20013). Baumann *et al.* (2013) tento nesoulad vysvětlují způsobem, kterým jsou vybírány studijní a kontrolní skupiny, kdy jsou vybírána a společně posuzována jiná etnika, což logicky ústí v nesprávné výsledky.

Podle rozsáhlé meta-analýzy z roku 2014 (Yang *et al.*) ovlivňují oba nejstudovanější polymorfismu C677T a A1298C enzymu MTHFR možný výskyt spontánního potratu. Původcem může být podle jejich závěrů nejen maternální genetická výbava, ale i ta sternální. U polymorfismu C677T je toto spojení významné především v homozygotní konstituci (CC). I Goodman *et al.* (2006) také potvrzují negativní vliv polymorfismu C677T a mutací pro koagulační faktory II a V.

### POČET PŘEDCHOZÍCH POTRATŮ

Téměř všechny studie zabývající se spontánními potraty vykazují nezanedbatelné zvyšující se riziko následných potratů v návaznosti na počet potratů předchozích (Carp, 2014). Jinými slovy řečeno, čím více potratů žena v minulosti prodělá, tím vyšší je u ní nebezpečí, že ho prodělá znovu.

Carp (2014) s odkazem na použité studie ve své knize udává, že šance, že se ženám s neléčenými spontánními potraty narodí dítě živé, se u těch se třemi, čtyřmi a více než pěti pohybuje kolem 42 – 86 %, 41 – 72 % a 23 – 51 %. Podstatná variabilita v jednotlivých

procentuálních zastoupeních se pak dá pravděpodobně přiřknout času, kdy byla jednotlivá těhotenství prokázána. Existují totiž výzkumy, ve kterých jsou pacientky nabádány, aby svá těhotenství hlásily 2-3 dny po zpoždění menstruace. To ve svém důsledku způsobí, že do studie jsou započítávány i preklinické ztráty těhotenství (včetně tzv. biochemického těhotenství, viz výše), tudíž je pacientkám v době pozorování diagnostikována zvýšená ztrátovost plodů (41,7 %), ale na druhou stranu nízká frekvence výskytu „netěhotenství“ (14,7 %). Naproti tomu ve studiích, ve kterých jsou pacientky instruovány upozornit na své těhotenství v období mezi 6. až 7. gestačním týdnem a je jim nabízena standardní lékařská péče, je frekvence výskytu „netěhotenství“ výrazně vyšší (38,3 – 55,6 %) a ztrátovost plodů pak výrazně nižší (11,1 – 14,4 %).

## **MATČIN VĚK**

Dalším velice důležitým aspektem je i samotný věk matky. Z dlouhodobého hlediska může i ten souviset s počtem předchozích potratů, protože se čím dál starší ženy snaží poprvé otěhotnět v pokročilejším věku. Nicméně podle závěrů dánské studie z let 1978 – 1992 zahrnující přes 600 000 pacientek jsou zvýšeným rizikem výskytu RPL postihovány v souvislosti s věkem spíše ženy po 40. roku života. To podtrhují získané výsledky, které říkají, že frekvence výskytu RPL u žen ve věku 31 – 35 let byla téměř identická s těmi ve věku 36 – 39 let (38 – 40 %), ale u pacientek v letech 40 – 44 tato frekvence stoupla na 70 %. Proto Carp (2014) doporučuje v budoucích studiích na toto téma kompletovat jak studijní, tak kontrolní skupiny pacientek ženami v obdobném věku a rozčlenit je nejlépe na ty před a po 40. roku života. Z těchto výsledků tedy jasně vyplývá neblahá úloha matčina věku, jež se radikálně zvyšuje právě v tomto období. Špatný výběr pacientek tedy může vnášet rozporuplné výsledky a z nich plynoucí chybné závěry.

## **PARTNERSKÁ SPECIFITA**

V mnohých studiích zabývajících se vlivem partnerské specifity na RPL se předpokládá, že právě ta je podstatným faktorem ovlivňující výsledek těhotenství. Klasickým příkladem dokládající tuto skutečnost je partnerské sdílení hlavního histokompatibilního komplexu (HLA), který rozeznává vlastní od cizorodého, tudíž bylo vyvíjející se embryo odmítnuto matčíným tělem, které produkuje HLA protilátky a jiné blokující protilátky. Nicméně partnerská specifita je stále neprozkoumanou oblastí (Carp, 2014).

## **ASOCIACE S PORODNICTVÍM**

Není překvapením, že se u žen trpících recidivujícími spontánními potraty vyskytuje zvýšené riziko výskytu i jiných gynekologických komplikací v průběhu těhotenství, a to před i po sérii spontánních potratů. To podle Carpa (2014) dokazují i mnohé studie, které mimo jiné poukazují i na fakt, že samy takové ženy se mohly narodit s výrazně nižší porodní váhou.

### **3.1.2 POTRATOVOST UPLYNULÝCH LET V ČESKÉ REPUBLICCE**

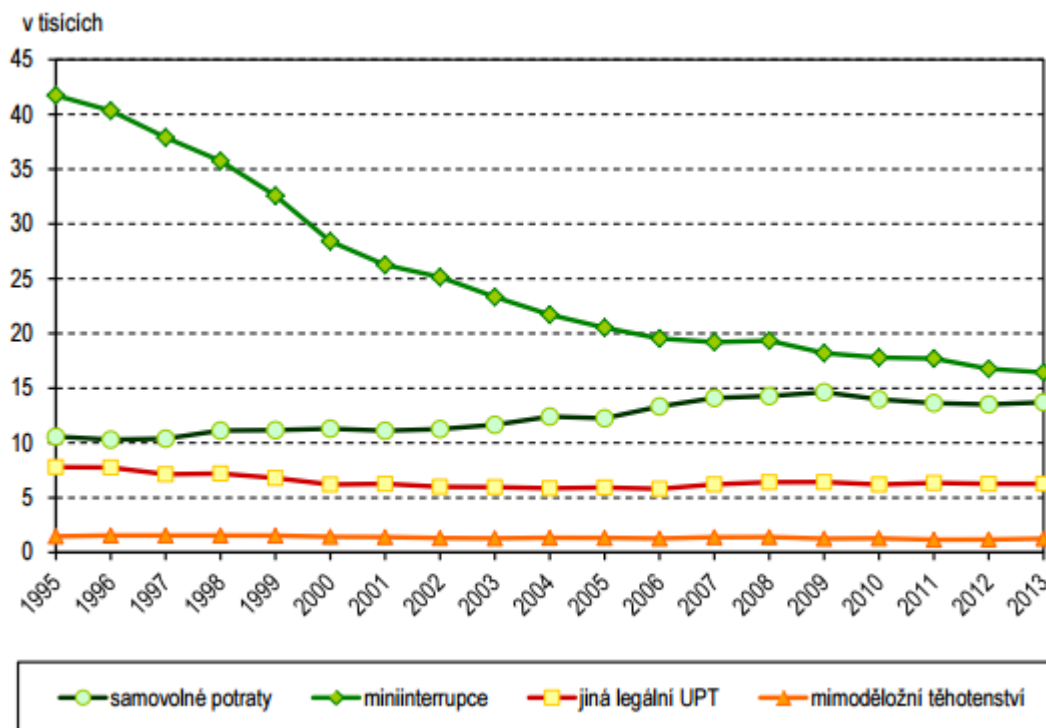
O evidenci každoročních bilancí počtů potratů se u nás v republice stará Ústav zdravotnických informací a statistik České republiky (nadále jen ÚZIS ČR). Data pro své statistiky čerpá z Národního registru reprodukčního zdraví, ve kterém jsou sloučeny stávající Národní registr rodiček, Národní registr novorozenců, Národní registr vrozených vad, Národní registr potratů a Národní registr asistované reprodukce do jednotného systému za účelem zjednodušení administrativní náročnosti a lepší koordinace, provázanosti a hodnocení kvality poskytované péče v oblasti reprodukčního zdraví (ÚZIS ČR [online]).

Vývoj počtu potratů v České republice (Tab. IX a Obr. 3) procházel během let 1960 – 2000 střídavými poklesy a následnými nárůsty, které svých maximálních hodnot dosahovaly v 80. letech (ÚZIS ČR, 2001). Od roku 2008 pak počet potratů trvale klesá (ÚZIS ČR, 2014). Většina z pozorovaných změn je mimo jiné důsledkem změn v legislativních opatřeních. Například poklesy počtu potratů v letech 1962 a 1973 souvisely s přísnějšími předpisy v jejich provádění a se zavedením významných pronatálních opatření. Po zrušení interrupčních komisí v roce 1986 sice počet potratů vzrostl, tento jev však neměl dlouhého trvání, což bylo předpokladem pro jejich zrušení. Již po třech letech začaly počty potratů klesat. V 90. letech byl tento pokles velmi prudký s postupnou zpomalující tendencí. Jako hlavní příčiny tohoto pozitivního vývoje jsou udávány jednak rozšíření všech možných typů antikoncepcí, větší seberealizace mladých lidí, menší podpora státu poskytovaná dětem a také zavedení poplatku za provedení potratu jiného než ze zdravotních důvodů (ÚZIS ČR, 2001). V dubnu roku 2012 pak došlo ke změně zákona v účinnosti sledování potratů. Od 1. dubna 2012 jsou tedy děti narozené bez známek života s porodní hmotností mezi 500 g až 1 000 g, popřípadě děti narozené v období mezi 22. až 28. gestačním týdnem, považovány za mrtvě narozené (ÚZIS ČR, 2014).

Nejtěžnějšími daty pro danou problematiku jsou bezpochyby počty samovolných potratů, které mají v porovnání s celkovým počtem potratů stále vzrůstající tendenci. V roce 2013 činil podíl samovolných potratů 36,3 %, což je nejvyšší zaznamenaná hodnota od roku 1990, kdy tento podíl dosahoval „pouze“ 11,72 %. Tento trend souvisí nejen s rostoucím počtem chtěných a plánovaných těhotenství, kdy je rodičovství čím dál tím častěji odkládáno až do vyššího věku, ale také s genetickým profilem žen a mužů. Je proto důležité uvědomit si, že s rostoucím věkem ženy stoupá také riziko samovolného potratu. To zdůrazňují i nashromážděná data z roku 2013, kdy bylo evidováno 31,5 % žen starších 35 let, které prodělaly samovolný potrat, což se téměř rovnalo třetině z celkového počtu samovolných potratů pro daný rok (ÚZIS ČR, 2014).

**Tab. IX:** Vývoj počtu potratů českých občerek a cizinek v ČR v letech 1990–2013 (údaje převzaty z ÚZIS ČR, 2014).

Rok	Samovolné potraty	Umělá přerušení těhotenství				Mimoděl. těhotenství	ostatní	celkem	z toho cizinky
		miniinterupce	jiná legální	celkem	z toho ze zdr. důvodů				
1990	14 772	87 933	21 428	109 361	9 504	1 907	15	126 055	2 361
1991	13 986	84 713	19 568	104 281	8 91	1 764	23	120 054	1 266
1992	13 420	77 586	16 618	94 204	10 314	1 696	4	109 324	880
1993	13 228	57 939	12 696	70 635	15 873	1 579	4	85 446	1 409
1994	11 109	46 609	8 227	54 836	13 217	1 478	11	67 434	1 334
1995	10 571	41 735	7 796	49 531	11 838	1 476	12	61 590	1 447
1996	10 296	40 333	7 753	48 086	11 036	1 560	20	59 962	1 778
1997	10 392	37 882	7 140	45 022	9 709	1 552	7	56 973	2 002
1998	11 128	35 762	7 207	42 959	8 896	1 555	12	55 654	2 356
1999	11 173	32 579	6 803	39 382	7 756	1 536	12	52 103	2 634
2000	11 300	28 418	6 205	34 623	6 472	1 432	15	47 370	2 476
2001	11 116	26 253	6 275	32 528	6 019	1 411	2	45 057	2 576
2002	11 256	25 147	5 995	31 142	5 606	1 321	24	43 743	2 751
2003	11 660	23 325	5 973	29 298	5 385	1 288	58	42 304	2 660
2004	12 402	21 715	5 959	27 574	4 597	1 339	9	41 324	2 254
2005	12 245	20 519	5 934	26 453	4 678	1 324	1	40 023	2 238
2006	13 326	19 537	5 815	25 352	4 779	1 278	3	39 959	2 285
2007	14 102	19 201	6 213	25 414	4 789	1 401	-	40 917	2 658
2008	14 273	19 343	6 417	25 760	4 569	1 413	-	41 446	3 252
2009	14 629	18 211	6 425	24 636	4 567	1 263	-	40 528	3 020
2010	13 981	17 797	6 201	23 998	4 423	1 287	7	39 273	2 659
2011	13 637	17 701	6 354	24 055	4 400	1 172	-	38 864	2 571
2012	13 516	16 768	6 264	23 032	4 488	1 186	-	37 734	2 319
2013	13 708	16 439	6 275	22 714	4 350	1 265	-	37 687	2 171



Obr. 3: Vývoj počtu potratů dle druhu v ČR v letech 1995–2013 (převzato z ÚZIS ČR, 2014).

### 3.2 HYPERTENZE

Hypertenze (vysoký krevní tlak), jejíž prevalence se v průběhu posledních let dramaticky zvýšila (ovlivňuje 15 – 20 % dospělé populace na západě), je významným rizikovým faktorem u mnoha závažných onemocnění, jako jsou mrtvice, kardiovaskulární poruchy či selhání ledvin (Mom & Ka, 2005; Yang *et al.*, 2014). Setkáváme se s ní i v průběhu těhotenství, především u primigravidit a v těhotenstvích s novým partnerem (Kovacs & Briggs, 2015), kdy se vyskytuje zhruba v 6 – 8 % případů, díky čemuž jsou syndromy, které podmiňuje, nejběžnějšími zdravotními komplikacemi tohoto období (Dağdeviren *et al.*, 2014). Díky tomu můžeme hypertenzi označit za hojnou příčinu nejen úmrtí matky a plodu, ale v konečném důsledku může být fatální i pro novorozence (Dağdeviren *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013).

Na rozvoj hypertenze působí jak genetické, environmentální, tak demografické faktory, které mezi sebou vzájemně interagují. Současné důkazy dokonce nasvědčují tomu, že 30 – 50 % zaznamenaných kolísání hladin krevního tlaku může být přičítáno právě genetickým činitelům. Tato tvrzení ale v současné době nejsou podložena příhodnými studii (Mom & Ka, 2005; Wang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014).



Je důležité uvědomit si, že krevní tlak v průběhu těhotenství neustále kolísá, a to jak u hypertenzních pacientek, tak i u těch normotenzních. V průběhu druhého trimestru dokonce klesá na nižší hodnoty než před otěhotněním, přičemž nejnižších hodnot je dosaženo zhruba v polovině gravidity. Ve třetím trimestru se pak tlak vrací k hodnotám před těhotenstvím (Cífková, 2007). Díky tomuto různorodému kolísání hodnot krevního tlaku se v těhotenství s hypertenzí setkáváme ve 4 základních typech (Tab. X), přičemž nejdůležitějšími jsou – preexistenční (obvykle detekována do 20. týdne těhotenství či před jeho začátkem) a gestační hypertenze (vzniká v průběhu těhotenství, nejčastěji po 20. týdnu), (Cífková, 2007; Kovacs & Briggs, 2015).

**Tab. X:** Klasifikace hypertenze v těhotenství (převzato a upraveno dle Cífková, 2007).

---

### **I. Preexistující hypertenze**

předcházející graviditu nebo diagnostikovaná před 20. týdnem těhotenství, většinou přetrvává déle než 42 dní po porodu; může být provázena proteinurií:

1. esenciální
2. sekundární

### **II. Gestační hypertenze**

vzniká v průběhu těhotenství, nejčastěji po 20. týdnu, ve většině případů vymizí do 42 dnů po porodu

1. bez proteinurie – „hypertenze indukovaná těhotenstvím“, „tranzientní hypertenze“ a „neproteinurická hypertenze“
2. s proteinurií odpovídá definici „preeklampsie“, „preeklamptická toxémie“ a „toxémie“

### **III. Preexistující hypertenze + „naroubování“ gestační hypertenze s proteinurií**

### **IV. Hypertenze neklasifikovatelná před narozením**

---

Při diagnostice jakkoliv závažné hypertenze je nezbytně nutná včasná antihypertenzní léčba a profylaxe (ochrana před určitou nemocí). Některé případy mohou být natolik vážné, že vyžadují předčasný porod (Dağdeviren *et al.*, 2014), kdy odrození placenty zastavuje další progres nemoci a zabraňuje tak nešťastnému konci těhotenství. Ovšem předčasný porod s

sebou nese i jistá rizika. Za prvé, předčasně narozené dítě je více náchylné k neonatálním komplikacím a za druhé, umělé vyvolání porodu může zvýšit potřebu zakončit takový pokus sekci (císařským řezem). Z těchto důvodů je klíčové zvládnout celou situaci s rozvahou a rozhodnout, zdali podstoupit rizika předčasného porodu nebo pokračovat v těhotenství (Broekhuijsen *et al.*, 2015).

Podle výsledků z meta-analýzy z roku 2014 (Yang *et al.*), která se zabývá souvislostí mezi jednotlivými polymorfismy enzymu MTHFR s hypertenzí a s hypertenzí v těhotenství, existuje spojitost mezi polymorfismem C677T a hypertenzí i hypertenzí v těhotenství. Spojitost s polymorfismem A1298C však byla vyvrácena. Se stejnými závěry přišli v roce 2004 i Kosmas *et al.*

### 3.2.1 PREEKLAMPSIE

Preeklampsie (PE) je multisystémovou poruchou s neznámou etiologií, která je považována za nejnebezpečnější gestační formu hypertenze (Cífková, 2007; Kovacs & Briggs, 2015; Dağdeviren *et al.*, 2014) postihující 10 – 14 % primipar (prvorodiček) a 5 – 7 % multipar (Procházka *et al.*, 2003).

Preeklampsie se obvykle objevuje po 20. týdnu těhotenství, nejčastěji u primigravidit, ale existuje zvýšené riziko rozvoje tohoto syndromu v dalších těhotenstvích i u žen, kterým byla preeklampsie diagnostikována již v minulosti. Nalezneme ale i řadu dalších rizikových faktorů, jako jsou vícečetná těhotenství, pozitivní rodinná anamnéza preeklampsie, preexistující hypertenze, diabetes a jiné (Cífková *et al.*, 2007).

Navzdory tomu, že existuje nepřehledné množství studií zaměřujících se na PE, etiologie této nemoci není stále jasně vymezená a pro správné pochopení a následnou diagnostiku je potřeba jí objasnit a ucelit (Wang *et al.*, 2013). Z tohoto důvodu můžeme diagnostiku preeklampsie obecně považovat za velmi obtížný úkol, ačkoliv existují jisté symptomy a náznaky, které lze považovat za ukazatele závažnosti tohoto onemocnění. Kromě zvýšeného krevního tlaku (systolický krevní tlak >160 mm Hg, diastolický krevní tlak >110 mm Hg) se vyznačuje přítomností většího množství bílkoviny v moči - proteinurii s hodnotami >3,5 g/24 h, snížením renálních funkcí (kreatinin >120 μmol/l), trombocytopenií (počet destiček <100 x 10<sup>9</sup>/l) nebo průkazem hemolytické anémie, hepatální léze, plicním edémem a neurologickými poruchami (Cífková, 2007; Kovacs & Briggs, 2015).

Preeklampsie bývá nejčastěji spojována s polymorfismy enzymu MTHFR, i když v současné době bývá toto spojení spíše vyvracováno (Jääskeläinen *et al.*, 2006; Kaiser *et al.*, 2001; Procházka *et al.*, 2003). Nalezneme ale i studie potvrzující spojitost této těhotenské komplikace nejen s polymorfismy C677T a A1298C, ale i s Leidenskou mutací (Grandone *et al.*, 1997; Salimi *et al.*, 2015). Procházka *et al.* (2003) ovšem vyvracejí souvislost s polymorfismy MTHFR a mutací FII, přiklánějí se ale k závěrům jiných studií (Dizon-Townson *et al.*, 1996; Benedetto *et al.*, 2002), že výskyt preeklampsie v těhotenství ovlivňuje mutace FVL. Benedetto *et al.* (2002) pak přicházejí se závěry, že obě trombofilní mutace pro koagulační faktory II a V mohou být příčinou preeklampsie.

### **3.2.2 EKLAMPSIE**

Eklampsie je jedním z možných pokračujících stádií navazující na preeklampsii končícím v některých případech až smrtí. Tento syndrom se vyznačuje křečemi těhotné ženy v důsledku hypertenzní encefalopatie (onemocnění mozku), (Cífková, 2007; Eklampsie, In: *Wikiskripta* [online]). Výsledkem zlepšené prenatální péče je snížení počtu případů, kdy se eklampsie v průběhu těhotenství vyskytla, odhadem na 1 z 2 000 porodů v Evropě a Severní Americe (Cífková, 2007).

### **3.2.3 HELLP SYNDROM**

HELLP syndrom (Hemolysis = rozpad krvinek; Elevated Liver enzymes = zvýšení jaterních enzymů; Low Platelet count = pokles krevních destiček) představuje závažnou formu preeklampsie, jež se projevuje jaterním selháním a zhoršením trombocytopenie (viz kapitola 3.3) za přítomnosti pouze mírné či střední hypertenze. Největší komplikací tohoto syndromu, která může nastat, je ruptura jater, která je příčinou vysoké mortality (Cífková, 2007).

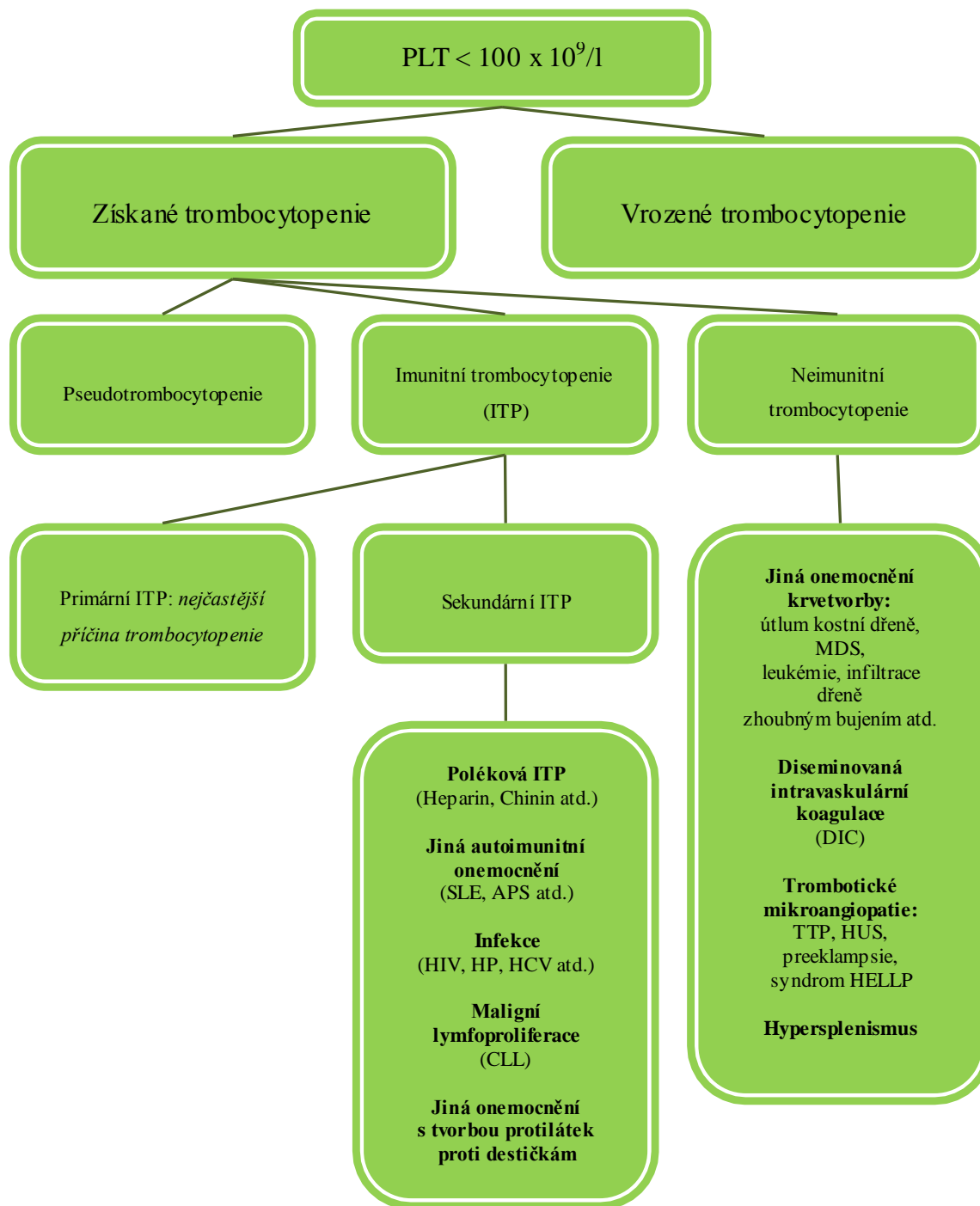
## **3.3 TROMBOCYTOPENIE**

Trombocytopenií je nazýván nedostatečný počet trombocytů (krevních destiček) s hladinou  $< 100 \times 10^9/l$  krve, přičemž hodnoty zdravého jedince se pohybují v rozmezí  $150 - 400 \times 10^9/l$  krve. Tento stav může mít dva původce - buď se tvoří nedostatečné množství trombocytů v kostní dřeni, nebo tyto již vytvořené a uvolněné krevní destičky předčasně zanikají (Kozák, 2012). Je tedy možné se s trombocytopenií setkávat u pacientů, kteří

podstupují chemoterapii či radiační léčbu rakoviny, nebo je jejich kostní dřeň napadena nádorem (Bick, 2002).

Jednou z nejhojnějších příčin v průběhu života získané trombocytopenie, která je na rozdíl od trombocytopenie vrozené tou častější formou, bývá primární imunitní trombocytopenie (ITP) způsobená autoprotilátkami proti trombocytům. Diagnóza primárního typu je těžko stanovitelná. Pro její dosažení je zapotřebí aplikovat tzv. vylučovací metodu, kdy nejdříve vyloučíme alespoň ty nejobvyklejší příčiny trombocytopenie a až poté je přijatelné diagnostikovat právě primární ITP. Naneštěstí v dnešní době neexistuje žádný průkazný test, který by snadno odhalil tento typ nemoci. Existuje ale i sekundární ITP, která bývá spojená s jinými chorobami, nejčastěji doprovází některé infekce či jiná autoimunitní onemocnění. Vzácně se dokonce může vyskytovat i trombocytopenie vrozená, která je občas sdružená i s dalšími vrozenými odchylkami (Kozák, 2012).

Ucelit si rozdělení jednotlivých trombocytopenií dle mechanismu jejich vzniku je možné v následujícím grafu (Obr. 4).



**Obr. 4:** Rozdělení trombocytopenií podle mechanismu vzniku<sup>1</sup> (převzato a upraveno dle Kozák, 2012).

<sup>1</sup> PLT = počet krevních destiček

### 3.3.1 TROMBOCYTOPENIE V TĚHOTENSTVÍ

Trombocytopenie provázející těhotenství, kterou lze pozorovat u 7 – 12 % žen, s ním může či nemusí přímo souviset. V drtivé většině případů se jedná o benigní formu, tzv. *gestační trombocytopenii*, ale vyskytují se i závažnější stavy, kdy pokles trombocytů ohrožuje život matky i plodu. V takovou chvíli je nutná diagnostika a včasné zahájení terapie. Je ale možné setkat se i s falešně pozitivní trombocytopenií, tzv. *pseudotrombocytopenií*, která je diagnostikovatelná *in vitro* a neodráží skutečný stav počtu trombocytů v krvi pacientky. Tento jev nastává díky přítomnosti protilátek závislých na protisrážlivému roztoku (EDTA), díky kterému dochází ke shlukování destiček ve zkumavce. K posouzení shlukování lze použít mikroskop, pod kterým se prohlédne nátěr periferní krve. Jednoduchou metodou detekce reálného počtu trombocytů v krvi je vyšetření krve odebrané do jiného protisrážlivého roztoku (Adámková In: *Trombocytopenie* [online]; Šimkovič, 2013).

**Tab. XI:** Rozdělení trombocytopenií dle závislosti na těhotenství (převzato a upraveno dle Kozák, 2012)

SPECIFICKÁ PRO TĚHOTENSTVÍ	NEZÁVISLÁ NA TĚHOTENSTVÍ	
Preeklampsie	Trombotické mikroangiopatie	Systémový lupus erytematodes
HELLP syndrom	Diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC)	Virová onemocnění
Akutní steatóza jater	Onemocnění kostní dřeně	Hypersplenismus
	Poruchy výživy	

### GESTAČNÍ TROMBOCYTOPENIE

Gestační trombocytopenie postihuje až 7 % gravidních žen, zejména pak ve III. trimestru. Většinou se však jedná o lehkou formu trombocytopenie s počtem krevních destiček kolem 110 – 150 x 10<sup>9</sup>/l krve, jejichž počet je před nebo na samém počátku těhotenství v normě. Kromě monitorování počtu trombocytů není potřeba žádná speciální

lčba (Adámková In: *Trombocytopenie* [online]), protože není zvýšeno riziko krvácení ani riziko rozvoje trombocytopenie u plodu (Gumulec *et al.*, 2010).

## **IMUNITNÍ TROMBOCYTOPENIE**

Jednou ze závažnějších forem, jež ohrožuje na životě matku i plod, je imunitní trombocytopenie (ITP), které se obvykle objevuje již v prvních dvou trimestrech těhotenství (Šimkovič, 2013). To může být způsobeno mimo jiné i tím, že těhotné ženy s ITP mívají zpravidla pozitivní anamnézu trombocytopenie ještě před otěhotněním (Gumulec *et al.*, 2010).

Pokles počtu trombocytů bývá u této formy výraznější než u jiných, obvykle se hranice pohybuje pod  $50 \times 10^9/l$  krve. V těhotenství se ale s poklesem krevních destiček pod  $100 \times 10^9/l$  krve setkáváme výjimečně a to zhruba u 1 % žen, přičemž pouze u 3 % z tohoto 1 % lze jako příčinu považovat ITP (Šimkovič, 2013).

Toto onemocnění se může projevit buď v důsledku tvorby autoprotilátek namířených nejčastěji proti destičkovým glykoproteinům, a to díky relativnímu nedostatku trombopoetinu vedoucí k porušené tvorbě trombocytů, či v důsledku alterace mechanismů buněčné a humorální imunity (Gumulec *et al.*, 2010).

## **TROMBOTICKÉ MIKROANGIOPATIE**

Trombotické mikroangiopatie (TMA) představují syndrom, který je příznačný výskytem trombů v cévách různých orgánů, akutní hemolytickou anémií, poškozením erytrocytů (schistocyty) a trombocytopenií v periferní krvi (Honsová, 2008). Kromě hypertenzních syndromů, mezi které řadíme preeklampsii a HELLP syndrom, do této kategorie spadají i imunitní trombocytopenická purpura (TTP), postpartální hemolyticko-uremický syndrom (HUS) a akutní steatóza jater (AFLP), (Gumulec *et al.*, 2010).

### **Imunitní trombocytopenická purpura**

TTP je vzácným život-ohrožujícím multisystémovým onemocněním projevujícím se pětici příznaků: hemolytickou anémií, jež je způsobena předčasným rozpadem erytrocytů, trombocytopenií, neurologickými projevy, poruchami funkce ledvin a horečkou. Kromě již výše zmíněné anémie a trombocytopenie, které jsou přítomny vždy, se ve většině případů

nemusejí vyskytovat ostatní příznaky (Adámková In: *Trombocytopenie* [online]; Delmas *et al.*, 2015).

Příčinou TTP je porucha štěpení velkých multimerů von Willebrandova faktoru, což je glykoprotein účastnící se reakce krevních destiček (druhá část hemostatického mechanismu), (von Willebrandův faktor In: *Wikiskripta* [online]). To má za následek hyperagregaci (zvýšené shlukování) destiček s tvorbou malých sraženin (mikrotrombů), které poškozují hlavně mozek a ledviny. I proto je nezbytná rapidní diagnostika a následná léčba, v opačném případě totiž odklad adekvátní terapie (výměnná plazmaferéza zahájená během prvních 24 hodin) představuje pro pacientku zvýšené riziko zhoršení dalšího vývoje nemoci (Gumulec *et al.*, 2010).

TTP není pro těhotenství specifickou komplikací, i přesto je její incidence zvýšená až na 10 % a to obvykle před 24. týdnem těhotenství, ovšem v případě rozvoje TTP mohou přidružené projevy nastat ve třetím trimestru nebo postpartálně (po porodu), (Gumulec *et al.*, 2010).

### **Postpartální hemolyticko-uremický syndrom**

Postpartální hemolyticko-uremický syndrom (HUS) se projevuje až postpartálně a je kombinací hemolytické anemie, trombocytopenie a různého stupně poškození ledvin, a to vše zpravidla u primipar (Adámková In: *Trombocytopenie* [online]; Gumulec *et al.*, 2010).

### **Akutní steatóza jater v těhotenství**

Akutní steatóza jater v těhotenství (AFLP) postihuje pacientky výhradně v průběhu těhotenství a to zhruba v 0,01 % ze všech těhotenství v období mezi 30. a 38. týdnem. Existují ale i záznamy o výskytu již ve 26. týdnu (Adámková In: *Trombocytopenie* [online]; Gumulec *et al.*, 2010).

AFLP je příznačná tím, že mezi symptomy patří slabost, malátnost, neklid, nauzea (pocit na zvracení), bolesti v pravém podžebří či nadbřišku, dušnost, zhoršující se žloutenka a někdy i mentální poruchy. Podle laboratorních výsledků lze AFLP diagnostikovat díky zvýšené hladině jaterních testů, minerálnímu rozvratu, anemii a samozřejmě trombocytopenii (Adámková In: *Trombocytopenie* [online]; Gumulec *et al.*, 2010).



### 3.3.2 POLÉKOVÁ TROMBOCYTOPENIE

Poléková trombocytopenie není výhradně syndromem postihující těhotné ženy, ale vyskytuje se i u ostatních farmakologicky léčených pacientů. Recidivě se dá snadno zabránit ukončením podávání léku, který mohl stav vyvolat buďto zhruba 1 – 2 týdny od začátku užívání nebo náhle po jednotlivé dávce léku, který byl v minulosti užíván občasně, a vyvarovat se jeho opakovanému podávání v budoucnu. Pro účely snadné diagnostiky polékové trombocytopenie či v lepším případě k vyhnutí se možným komplikacím byla vytvořena neustále aktualizovaná databáze<sup>2</sup> léků s potenciálem rozvoje polékové trombocytopenie (Gumulec *et al.*, 2010).

---

<sup>2</sup> databáze dostupná na internetové adrese [www.ouhsc.edu/platelets/](http://www.ouhsc.edu/platelets/)

## 4 KLINICKÁ UVÁŽENÍ A DOPORUČENÍ

Během několika posledních let bylo provedeno nespočet studií zkoumajících vliv mutace koagulačních faktorů V a II a polymorfismů enzymu MTHFR na nemoci a stavy komplikující těhotenství. Výsledky jednotlivých studií jsou ale mnohdy protichůdné a nepřesvědčivé, ať už z důvodu nesourodého výběru studijních a kontrolních skupin nebo kvůli malému počtu zkoumaných vzorků (Yang *et al.*, 2014). A právě to společně s velkou prevalencí v evropské populaci vrhá stín na testování polymorfismů enzymu MTHFR v souvislosti s předcházením možných těhotenských komplikací a TEN.

Zda testovat či netestovat na trombofilii spojenou s těhotenstvím je tedy patrně sporné. Lockwood & Wendel (2010) nedoporučují testovat ženy, které prodělaly spontánní potrat či abrupci placenty. Ačkoliv můžeme nalézat jistou spojitost, neexistují dostačující klinické důkazy o tom, že předporodní profylaxe zabrání opětovnému výskytu těchto komplikací (Lockwood & Wendel, 2010). V roce 2010 (Kvasnička) vyšlo doporučení, ve kterém byl kladen důraz na testování mutací V Leiden G1691A a protrombin G20210A, které mají zásadní klinický význam pro problematiku tromboembolické nemoci. I přes znění tohoto doporučení jsou společně s výše uvedenými trombofilními mutacemi rutinně vyšetřovány i polymorfismy MTHFR. Proto v roce 2014 doporučila Společnost lékařské genetiky (SLG) na základě mezinárodního doporučení American College of Medical Genetics (Hickey *et al.*, 2013) netestovat tyto polymorfismy v souvislosti s TEN (Společnost lékařské genetiky, 2014).

## **5 CÍLE EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI**

Cílem praktické části práce bylo zoptimalizovat metodu „Primer-engineered multiplex PCR–RFLP for detection of MTHFR C677T, prothrombin G20210A and factor V Leiden mutations“ (Koksal *et al.*, 2007) pro použití v podmínkách genetické laboratoře Genlabs.

## 6 MATERIÁL A METODY

### 6.1 IZOLACE DNA

Ke genetickému vyšetření byly použity vzorky, které poskytla Mgr. Dagmar Bystřická, Ph.D. z genetické laboratoře Genlabs. Jednalo se buďto o DNA izolovanou z bukálního stěru či z periferní krve. Vzorky byly odebírány po předchozím získání informovaného souhlasu k vyšetření trombofilních mutací a k použití k vědeckým účelům.

Samotná izolace DNA byla provedena dle protokolů (PP3\_GL\_001\_C) a (PP5\_GL\_001\_C) sestavených pro potřeby genetické laboratoře Genlabs (Přílohy 1 a 2). Při izolaci DNA byly použity následující reagenty v uvedeném množství (Tab. XII a Tab. XIII).

**Tab. XII:** Reagenty a jejich potřebné množství k izolaci DNA z bukálního stěru dle protokolu PP3\_GL\_001\_C.

REAGENCIE	OBJEM (μl)
Lysis buffer	500
Proteinkinase K	20
Capture buffer CT	500
Re-hydration buffer TE	150

**Tab. XIII:** Reagenty a jejich potřebné množství k izolaci DNA z periferní krve dle protokolu PP3\_GL\_001\_C.

REAGENCIE	OBJEM (μl)
Plná krev	300
RBC Lysis Buffer	1 000
GB Lysis Buffer	100
96% etanol	200
W1 Buffer	400

Wash Buffer	600
Elution Buffer	100

## 6.2 PRIMERY

K amplifikaci DNA byly použity převzaté primery (Tab. XIII) z práce Koksál *et al.* (2007). Tyto primery byly navrženy za pomoci programu PRIMER 3.0<sup>3</sup> dostupného online. Pro kontrolu specifity primerů byl použit program „BLAST“<sup>4</sup> a pro hypotetické výsledky RFLP NEBcutter V2.0<sup>5</sup>. Potřebné tři páry primerů dodala společnost Elisabeth Pharmacon.

**Tab. XIV:** Přehled použitých primerů, PCR produkt – předpokládaná velikost amplifikovaného úseku (údaje převzaty z Koksál *et al.*, 2007).

NÁZEV PRIMERU	PCR PRODUKT (bp)	SEKVENCE 5' → 3'
FAKTOR V LEIDEN	169	F: ACATCGCCTCTGGGCTAATA
		R: TTGAAGGAAATGCCCCATTA
PROTROMBIN	221	F: ATGGGGTGAAGGCTGTGACC
		R: AGCACTGGGAGCATTGAGCCT
MTHFR C677T	96	F: CCACCCCGAAGCAGGGAGCTTTCAGG
		R: CAAAGAAAAGCTGCGTGATGAGAAAGAG

pozn.: F – forwardový/souběžný primer – ve směru transkripce, R – reverzní/zpětný primer – proti směru transkripce

## 6.3 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Izolovaná DNA byla amplifikována pomocí duplex PCR (FVL + PT G20210A).

<sup>3</sup> dostupné z <http://workbench.sdsc.edu>

<sup>4</sup> dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

<sup>5</sup> dostupné z <http://tools.neb.com/NEBcutter2>

Pro amplifikaci byly použity dva různé reakční kity MyTaq<sup>TM</sup> HS Red DNA polymerase (BIOLINE, LabMark) a PCR Master Mix gb Basic (Generi Biotech). Výsledky této optimalizace v práci nejsou uvedeny, ale v případě druhého zmíněného kitu nedošlo k současné amplifikaci obou očekávaných PCR produktů pro FV i FII, amplifikován byl pouze PCR produkt odpovídající FII. Pro další optimalizaci byla vybrána amplifikační souprava MyTaq<sup>TM</sup> HS Red DNA polymerase (BIOLINE, LabMark). PCR byla provedena v gradientovém termocykleru (Multigene, Labnet) dle zoptimalizovaného časově-teplotního profilu (Tab. XVI), kdy každý vzorek obsahoval 4U MyTaq DNA polymerase, 1xMyTaq Red Reaction Buffer, 40 pmol + 40 pmol primerů FVL (reverse a forward), 20 pmol + 20 pmol primerů PT (reverse a forward), přibližně 60 – 100 ng DNA a výsledný objem byl doplněn pomocí sterilní H<sub>2</sub>O do celkového objemu 50 µl (Tab. XV). Reakce proběhla po počáteční denaturaci DNA (94 °C – 5 min) v 35 cyklech při teplotách 95 °C – 45s, 60 °C – 45s a 72 °C – 45s a s finální extenzí 72 °C – 10 min.

**Tab. XV:** Složení reakční směsi pro multiplex PCR.

<b>REAGENCIE</b>	<b>OBJEM (µl)</b>
MyTaq DNA polymerase	0,8 (4U)
Crystal 10x TBE Buffer	10
Primery FVL	1 + 1 (40 pmol)
Primery PT	0,5 + 0,5
DNA	2 (60 – 100 ng)
H <sub>2</sub> O	33,2
<b>CELKOVÝ OBJEM REAKCE</b>	<b>50 µl</b>

pozn.: dva udané objemy u kolonky primery značí množství pro forward a reverse

**Tab. XVI:** Teplotně - časový profil amplifikace.

	<b>OPAKOVÁNÍ</b>	<b>TEPLOTA</b> (°C)	<b>DOBA</b>
<b>DENATURACE</b>	-	94	5 min
<b>ANNEALING</b>		94	45 s
	35x	95	45 s
		60	45 s
<b>ELONGACE</b>	-	72	10 min

## 6.4 GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

Po dokončení PCR reakce byly přítomnost a velikost ampliconů ověřeny pomocí elektroforetické separace na 4% agarózovém gelu při 135V (elektroforéza - Advance, Mupid-One). Pokud byly přítomny fragmenty o velikosti 169 bp (protrombin) a 221 bp (FVL), bylo provedeno štěpení enzymem MnlI a výsledek separován na 4% agarózovém gelu.

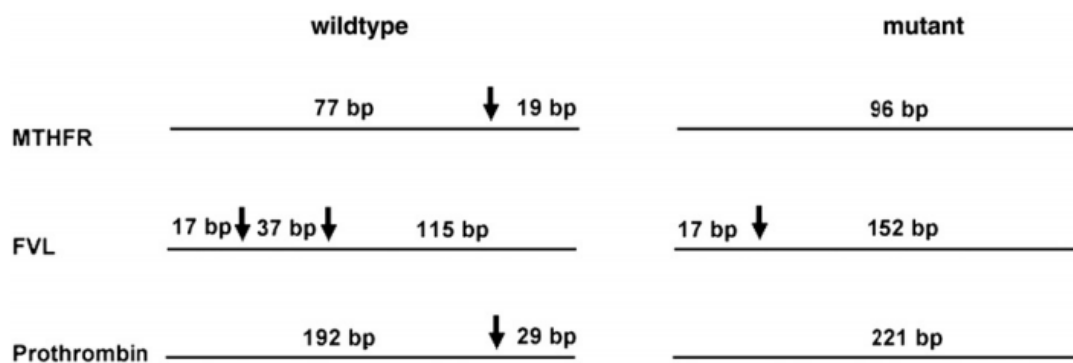
## 6.5 ŠTĚPENÍ ENZYMEM MnlI

Výsledné PCR produkty (20  $\mu$ l) byly štěpen enzymem MnlI (BioLabs). Restrikční štěpení proběhlo během inkubace PCR produktu při 37 °C přes noc. Štěpené fragmenty byly elektroforeticky separovány při 135V na 4% agarózovém gelu po dobu nejméně 15 minut.

**Tab. XVII:** Použité reagensie nutné ke štěpení PCR produktů pomocí enzymu MnlI.

<b>REAGENCIE</b>	<b>OBJEM (<math>\mu</math>l)</b>
PCR produkt	20
Enzym MnlI	2 (10U)

Naštěpené PCR produkty byly porovnávány se schematickým znázorněním profilů štěpení enzymem MnlI (Obr. 5).



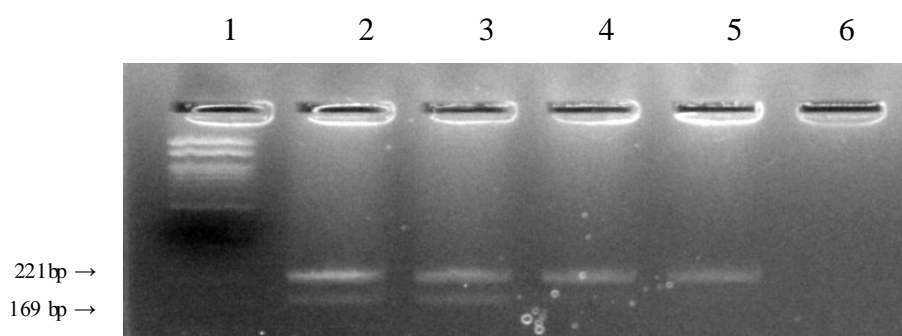
**Obr. 5:** Schematické znázornění profilů štěpení enzymem MnlI u wild type a mutantních alel amplikonů MTHFR C677T, FVL a protrombinu G20210A (převzato z Koksál *et al.*, 2007).



## 7 VÝSLEDKY

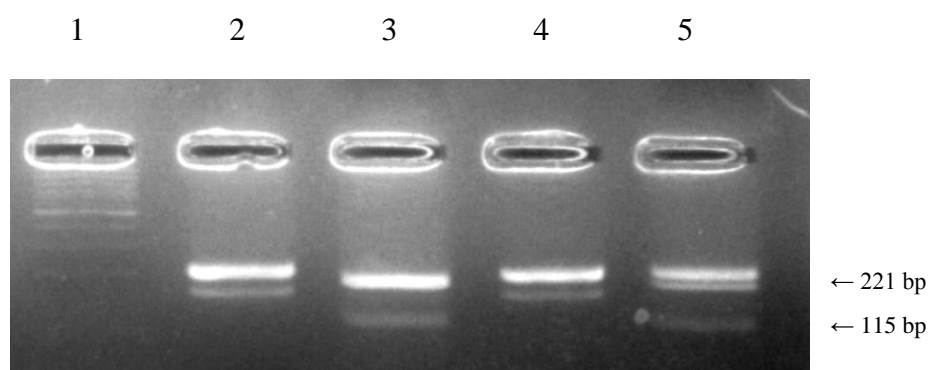
Po nezdarech s optimalizací metody multiplex RFLP-PCR jsme se přiklonily k možnosti optimalizovat tuto metodu pouze pro dvě trombofilní mutace ze tří, a to faktorů II (protrombin G2010A) a V (Leiden).

K optimalizaci reakčního protokolu byl použit jeden vzorek z periferní krve a jeden vzorek z bukálního stěru, tímto se ověřily dvě různé matrice DNA. Po dokončení amplifikace pomocí duplex RFLP-PCR byly výsledné produkty elektroforeticky separovány na 4% agarózovém gelu (Obr. 6) a zároveň zkontrolovány velikosti ampliconů pro FVL (169 bp) a PT G20210A (221 bp).



**Obr. 6:** Neštěpené PCR produkty o velikosti 169 bp (FVL) a 221 bp (protrombin) na 4% agarózovém gelu, kdy byly analyzovány různé matrice DNA (DNA získaná z periferní krve a DNA získaná z bukálního stěru): 1. marker, 2. neštěpený PCR produkt (DNA izolovaná z periferní krve), 3. neštěpený PCR produkt (DNA izolovaná z bukálního stěru), 4. neštěpený PCR produkt (DNA izolovaná z periferní krve) s DMSO, 5. kolonka neštěpený PCR produkt (DNA izolovaná z bukálního stěru) DMSO a 6. kolonka negativní kontrola.

PCR produkty byly poté štěpeny enzymem MnlI.



**Obr. 7:** Duplex RFLP-PCR analýza pro FVL a protrombin G20210A na 4% agarózovém gelu: 1. marker, 2. neštěpený PCR produkt (DNA z periferní krve), 3. štěpený produkt PCR (DNA z periferní krve) – FVL wild-type a PT wild-type, 4. neštěpený PCR produkt (DNA z bukálního stěru), 5. kolonka štěpený PCR produkt (DNA z bukálního stěru) – FVL wild-type a PT heterozygot.

Podařilo se nám zoptimalizovat metodu duplex RFLP-PCR jak pro vzorky DNA odizolovaných z bukálního stěru, tak i pro ty z periferní krve.

## **8 DISKUZE**

### **8.1 ÚVODNÍ PROBLEMATIKA**

#### **8.1.1 HEMOSTÁZA A HEMOKOAGULACE**

Obecně je vznik krevních sraženin způsobený postupnou aktivací srážecích faktorů (hemokoagulační kaskáda; Obr. 2), díky čemuž dochází k přeměně fibronogenu na nerozpustný fibrin, což je klíčovým dějem hemokoagulace. Ta je součástí souhrnného procesu zvaným hemostáza, který zabraňuje ztrátám krve při poškození krevních cév (Hemokoagulace. In: *Wikiskripta* [online]). Ale i hemostatický mechanismus může podléhat vrozeným či získaným poruchám. Tou nejčastější poruchou charakteristickou zvýšenou náchylností ke krevnímu srážení a trombotizaci (vzniku krevní sraženiny), buďto v důsledku působení genetických faktorů či změn v mechanismu srážení krve, popřípadě vzájemnou interakcí obou z nich, je trombofilie (Khan & Dickerman, 2012; Poul, 2006; Procházka *et al.*, 2004). Jejím nejčastějším klinickým projevem je tzv. tromboembolická nemoc (TEN), která se vyskytuje u více než 50 % osob s některou ze známých trombofilií (Poul, 2006). Přidá-li se k ní ještě další rizikový faktor v podobě těhotenství, jež vyvolává nespočet fyziologických změn (Karatas *et al.*, 2014; Tanaka *et al.*, 2015), může docházet ke vzniku neočekávaných komplikací ohrožující nejen život pacientky, ale i život plodu. V tuto chvíli se tedy tlak na psychiku ženy bezesporu stupňuje, protože pokud není rozvoj takové komplikace podchycen včas, v drtivě většině dochází k fatálním následkům v podobě smrti matky a/nebo plodu, popřípadě novorozence.

#### **8.1.2 VÝZNAM TROMBOFILNÍCH MUTACÍ V REPRODUKCI**

Trombofilní mutace bývají v České republice stále více skloňovány především v souvislosti s hormonální antikoncepcí a těhotenskými komplikacemi – hlavně se spontánními potraty. Obecné povědomí o těchto mutacích ovšem není příliš velké. Já sama jsem se s tímto termínem poprvé setkala až v době, kdy jsem začala shánět podklady pro svou práci. Dnes už vím, že trombofilní mutace v čele s mutacemi pro koagulační faktory V (Leiden) a II (protrombin) a polymorfismy enzymu methylenetrahydrofolát reduktáza (MTHFR) lze považovat za rizikové faktory pro vznik mnoha onemocnění (nejen) v těhotenství.

Ačkoliv je toto téma stále aktuálnější, existuje příliš mnoho studií, které si navzájem protirečí v tom, zdali daná mutace má či nemá vliv na určitou těhotenskou komplikaci. Proto se vědci uchylují k tvorbám rozsáhlých meta-analýz, které si za svůj cíl kladou vytvoření uceleného názoru na studovanou problematiku. Ale i jejich úsudky mnohdy nebývají jednotným shrnutím s jasně vymezenými závěry. To může mít příčinu v nejednotných designech zahrnutých studií, kdy autoři vybírají nesourodé studijní a kontrolní skupiny (Baumann *et al.*, 2013) a/nebo nejsou-li obě tyto skupiny dostatečně obsáhlé. I přes výsledky studií popírajících souvislost trombofilních mutací s problematikou těhotenských komplikací a nejednoznačných závěrů meta-analýz lze soudit, že tyto genetické rizikové faktory společně s těmi environmentálními ovlivňují graviditu u každé těhotné ženy individuálně.

### **8.1.3 GENETICKÉ TESTOVÁNÍ POLYMORFISMŮ MTHFR**

Genetické testování v populaci velice častých polymorfismů enzymu MTHFR v souvislosti s trombofilií a těhotenskými komplikacemi nebývá v dnešní době doporučováno u nás i ve světě. Mezi důvody proč netestovat patří velké procentuální zastoupení v populaci, což zákonitě zvyšuje výskyt u jednotlivých rizikových skupin, tedy i u těhotných žen, a zatím stále neurčitá souvislost s těhotenskými komplikacemi i přes mnohé snahy tyto vztahy objasnit. Stále ale existuje tendence, a to i po vydání doporučení SGL (Společnost lékařské genetiky, 2014), vyšetřovat polymorfismy MTHFR jako součást velkého balíčku trombofilních mutací (FVL, protrombin, MTHFR C677T a A1298C) a jejich detekce patří i mezi náplň mezilaboratorní kontroly kvality při stanovování genetických trombofilních markerů.

Jak je patrné z tabulky shrnující procentuální aktivitu enzymu MTHFR vycházející ze vztahů mezi jednotlivými genotypy (Tab. II, kapitola 1.2.1), data pro složeného homozygota TT/CC nebyla analyzována a ani o něm neexistují důkazy (Hanson *et al.*, 2001; Weisberg *et al.*, 1998). Možným důvodem je naprostá neexistence takové varianty v populaci, protože procentuální aktivita enzymu MTHFR by se u takového jedince odhadem pohybovala kolem 0. To by mohlo patrně vést k selekci takového jedince již v raném počátku těhotenství v podobě spontánního potratu či zamlklého těhotenství. Na druhou stranu v roce 1998 nebyla analyzována ani data pro nosiče genotypů CC/CT a AC/TT, ačkoliv dnes už víme, že takoví jedince jsou životaschopní.

### 8.1.4 METODY DETEKCE TROMBOFILNÍCH MUTACÍ V ČESKÉ A SLOVENSKÉ REPUBLICE

Existuje relativně velké množství metod sloužících k detekci trombofilních mutací, které jsou používané v laboratořích po celé České a Slovenské republice. Mezi poslední dostupnou mezilaboratorní kontrolu kvality patří ta z dubna 2015 (Hrachovinová, 2015), která shrnuje možné metody detekci trombofilních mutací a jejich procentuální zastoupení napříč laboratořemi (Tab. XVIII), které se testování zúčastnily. Z celkového počtu 36 laboratoří, které odeslaly výsledky, používá 36 % metodu alelické diskriminace s fluorescenční detekcí, 27 % alelově specifickou PCR s různou detekcí, 20 % klasickou RFLP-PCR, 13 % real-time PCR, 5,5 % HRM analýzu a u 3 % probíhá testování pomocí hybridizační metodiky na membráně (Hrachovinová, 2015).

**Tab. XVIII:** Procentuální zastoupení metod používaných k detekci trombofilních mutací na území ČR a SR (údaje převzaty z Hrachovinová, 2015).

METODA	METODICKÉ ZASTOUPENÍ (%)
metoda alelické diskriminace s fluorescenční detekcí	36
alelově specifická PCR s různou detekcí	27
RFLP-PCR	20
real-time PCR	13
HRM analýza	5,5
hybridizační metodika na membráně	3

## 8.2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Hlavním cílem experimentální část bylo zoptimalizování metody multiplex RFLP-PCR pro polymorfismus C677T a mutace faktoru V (FVL) a faktoru II (protrombin G20210A). Optimalizace se ovšem nezdařila dle očekávání. I přes nesčetné pokusy získat v samostatné PCR reakci pro polymorfismus enzymu MTHFR C677T (tedy s jedním párem primerů) amplicon o velikosti 96 bp (viz Obr. 6) jsme při prvních pokusech nezískali vůbec žádný produkt. Při dalších pokusech jsme stále získávaly nespecifický PCR produkt. Mezi

možné příčiny tohoto jevu lze zařadit rozdílně validované a kalibrované laboratorní přístroje, odlišné podmínky panující při provádění pokusů a především pak lišící se reagentie. Při našich snahách o optimalizaci studované metody byl použit buďto PCR Master Mix gb Basic (Generi Biotech) či amplifikační souprava MyTaq<sup>TM</sup> HS Red DNA polymerase (BIOLINE, LabMark), která byla nakonec vybrána pro další optimalizaci. Tento kit obsahoval předem nadefinované množství dNTPs (5 mM) a MgCl<sub>2</sub> (15 mM). Naproti tomu v původní studii autoři zoptimalizovali množství těchto dvou uvedených reagentií v závislosti na výsledcích PCR. Dalším přijatelným vysvětlením neúspěchu amplifikace MTHFR fragmentu může být i design nadefinovaných primerů. Po nezdarech jsme tedy přistoupily „pouze“ k optimalizaci duplex RFLP-PCR pro mutace v genech faktorů II (protrombin) a V (Leiden) s tím, že multiplex RFL-PCR bude náplní další spolupráce.

Neštěpený produkt o velikosti 221 bp (FII) byl krásně viditelný jak u bukálního stěru, tak i u vzorku DNA odizolované z periferní krve již u nižší koncentrace primerů. Na druhou stranu i s neštěpeným PCR produktem mutace V Leiden (169 bp) jsme zpočátku neměly štěstí. Musely jsme optimalizovat koncentraci primerů FVL z počátečních 20 pmol (reverse a forward) na 40 pmol (reverse a forward), původní poměr koncentrací jednotlivých primerů 1:2 uvedený ve zdrojové publikaci byl zachován. Z výsledku duplex PCR je patrná preferenční amplifikace PCR produktu odpovídajícímu FII (obr. 7).

## 9 ZÁVĚR

Prevalence trombofilních mutací v čele s mutacemi pro koagulační faktory II (protrombin G20210A) a V (Leidenská mutace) a polymorfismů enzymu MTHFR (C677T a A1298C) stále stoupá zřejmě v souvislosti s možnostmi testování těchto mutací. Zvyšuje se tím i výskyt těhotenských komplikací v čele s opakovanými spontánními potraty. Ačkoliv se objevují odborné názory, které odepírají trombofilním mutacím a polymorfismům souvislost s těhotenskými komplikacemi, většina publikovaných studií přichází s opačnými závěry.

V této práci jsem snažila poskytnout ucelený přehled polymorfismů enzymu MTHFR a trombofilních stavů a mutací a jejich možný vliv na těhotenské komplikace. Zabývala jsem se především obecnou definicí a prevalencí mutací a poruch patřících do základních skupin trombofilie (vrozená, získaná a smíšená). V druhé části shrnuji nejčastější těhotenské komplikace a jejich možnou souvislost s trombofilními mutacemi.

V experimentální části se nám podařilo částečně zoptimalizovat metodu multiplex RFLP-PCR detekující současně polymorfismus MTHFR C677T a mutaci FV Leiden a mutaci v protrombinovém genu G20210A pro vzorky DNA odizolované z periferní krve i z bukalního stěru.

## 10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. BAUMANN, K.; BEUTER-WINKLER, P.; HACKETHAL, A.; STROWITZKI, T.; TOTH, B.; BOHLMANN, M. (2013): Maternal factor V Leiden and prothrombin mutations do not seem to contribute to the occurrence of two or more than two consecutive miscarriages in Caucasian patients. *American Journal of Reproductive Immunology*. **70**: 518 – 521. ISSN 1600–0897.

2. BICK, R. (2003): Antiphospholipid thrombosis syndromes. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. **17**(1): 115 – 147. ISSN 0889–8588.

3. BICK, R. (2002): *Disorders of thrombosis and hemostasis: Clinical and laboratory practice*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 0–397–51690–8.

4. BENEDETTO, CH.; MAROZIO, L.; SALTON, L.; MAULÀ, V.; CHIEPPA, G.; MASSOBRIO, M. (2002): Factor V Leiden and factor II G20210A in preeclampsia and HELLP syndrome. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. **81**: 1095 – 1100. ISSN 1600–0412.

5. BOSLER, D.; MATTSON, J.; CRISAN, D. (2006): Phenotypic heterogeneity in patients with homozygous prothrombin 20210AA genotype. *The Journal of Molecular Diagnostics*. **8**(4): 420 – 425. ISSN 1525–1578.

6. BROEKHUIJSEN, K.; VAN BAAREN, G.; VANPAMPUS, M.; GANZEVOORT, W.; SIKKEMA, J.; WOISKI, M.; OUDIJK, M.; BLOEMENKAMP, K.; SCHEEPERS, H.; BREMER, H.; RIJNDERS, R.; VAN LOON, A.; PERQUIN, D.; SPORKEN, J.; PAPATSONIS, D.; VAN HUIZEN, M.; VREDEVOOGD, C.; BRONS, J.; KAPLAN, M.; VAN KAAM, A.; GROEN, H.; PORATH, M.; VAN DEN BERG, P.; MOL, B.; FRANSSEN, M.; LANGENVELD, J. (2015): Immediate delivery versus expectant monitoring for hypertensive disorders of pregnancy between 34 and 37 weeks of gestation (HYPITAT-II): an open-label, randomised controlled trial. *The Lancet*. **385**(9986): 2492 – 2501. ISSN 0140–6736.

7. BROULÍKOVÁ, A. (2007): Léčba akutní žilní trombózy. *Interní medicína pro praxi*. **9**(12): 548 – 551. ISSN 1212–7299.

8. BRŮHOVÁ, H. (2011): Hluboká žilní trombóza u mladých žen (poznámky pro praktické lékaře). *Medicína Pro Praxi*. **8**(2): 83 – 85. ISSN 1803–5310. Dostupné z: <http://www.solen.cz/pdfs/med/2011/02/09.pdf>

9. BULIKOVÁ, A.; CRHA, I. (2004): Antifosfolipidové protilátky a antifosfolipidový syndrom v porodnictví. *Praktická gynekologie*. **1**: 6 – 10. ISSN 1211–6645.



- 10.** BULIKOVÁ, A.; PENKA, M. (2005): Antifosfolipidový syndrom – diagnostika a léčba. *Vnitřní lékařství*. **51**(7&8): 809 – 817. ISSN 1801–7592.
- 11.** BULTAS, J. (2009): Neskákejme na špek vitaminové lobby. *Medical Tribune*. **35**. Dostupné z: <http://www.tribune.cz/clanek/15890-neskakejme-na-spek-vitaminove-lobby>
- 12.** CAO, Y.; XU, J.; ZHANG, Z.; HUANG, X.; ZHANG, A.; WANG, J.; ZHEN, Q.; FU, L.; DU, J. (2012): Association study between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and unexplained recurrent pregnancy loss: A meta-analysis. *Gene*. **514**: 105 – 111. ISSN 0378–1119.
- 13.** CARP, H. J. A. (2014): *Recurrent pregnancy loss: Causes, controversies, and treatment*. Vyd. 2. Boca Raton (Florida): CRC Press. ISBN 9781482216141.
- 14.** CÍFKOVÁ, R. (2007): Léčba hypertenze v těhotenství. *Remedia*. **17**(3): 258 – 262. ISSN 0862–8947.
- 15.** DAĞDEVİREN, H.; ÇANKAYA, A.; CENGİZ, H.; TOMBUL, T.; KANAWATI, A.; SÜZEN ÇAYPINAR, S.; EKİN, M. (2014): Maternal and neonatal outcomes of women with preeclampsia and eclampsia at a Tertiary care center. *The Medical Bulletin of Haseki Training and Research Hospital*. **53**: 143 – 146. ISSN 1302–0072.
- 16.** DELMAS, Y.; HELOU, S.; CHABANIER, P.; RYMAN, A.; FANNY PELLUARD, F.; CARLES, D.; BOISSEAU, P.; VEYRADIER, A.; HOROVITZ, J.; COPPO, P.; COMBE, CH. (2015): Incidence of obstetrical thrombotic thrombocytopenic purpura in a retrospective study within thrombocytopenic pregnant women. A difficult diagnosis and a treatable Disease. *BMC Pregnancy and Childbirth*. **15**: 137. ISSN 1471–2393.
- 17.** DIZON-TOWNSON, D. S.; NELSON, L. M.; EASTON, K.; WARD, K. (1996): The factor V Leiden mutation may predispose women to severe preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. **175**( 4): 902 – 905. ISSN 0002–9378.
- 18.** EGAPP Working Group (2011): Recommendation from the EGAPP Working Group: Routine testing for Factor V Leiden (R506Q) and prothrombin (20210G>A) mutations in adults with a history of idiopathic venous thromboembolism and the in adult family members. *Genetics in Medicine*. **13**(1): 67 – 76. ISSN 1098–3600.
- 19.** FLAUJAC, C.; CONARD, J.; HORELLOU, M. H.; LE FLEM, L.; SAMAMA, M. M. (2007): Atypical mutations of the prothrombin gene at positions 20 209 and 20 218, and a novel mutation at

position 20 219. Report on 10 patients. *The Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **5**(5): 1064 – 1068. ISSN 1538–7836.

**20.** GAO, H.; TAO, F. (2014): Prothrombin G20210A mutation is associated with recurrent pregnancy loss: A systematic review and meta-analysis update. *Thrombosis Research*. **135**(2): 339 – 346. ISSN 0049–3848.

**21.** GOODMAN, C. S.; Coulam, C. B.; Jeyendran, R. S.; Acosta, V. A.; Roussev, R. (2006): Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? *American Journal of Reproductive Immunology*. **56**: 230 – 236. ISSN 0165–0378.

**22.** GOYETTE, P.; SUMNER, J. S.; MILOS, R.; DUNCAN, A. M. V.; ROSENBLATT, D. S.; MATTHEWS, R. G.; ROZEN, R. (1994): Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genetics*. **7**: 195 – 200. ISSN 1061–4036.

**23.** GRANDONE, E.; MARGAGLIONE, M.; COLAIZZO, D.; CAPPUCCI, G.; PALADINI, D.; MARTINELLI, P.; MONTANARO, S.; PAVONE, G.; DI MINNO, G. (1997): Factor V Leiden, C > T MTHFR polymorphism and genetic susceptibility to preeclampsia. *Thrombosis and Haemostasis*. **77**(6): 1052 – 1054. ISSN 1538 – 7836.

**24.** GUMULEC, J.; ŠIMETKA, O.; PROCHÁZKA, M. (2010): Diferenciální diagnostika trombocytopenie v těhotenství. In: *Trombocytopenie* [online]. © 2013. ISSN 1804–8382. [cit. 2015-07-29]. Dostupné z: <http://trombocytopenie.cz/clanek.php?id=15&tab=lekar>

**25.** HANOUNA, G.; MOREL, N.; HUONG, D. L. T.; JOSSELIN, L.; VAUTHIER-BROUZES, D.; SAADOUN, D.; KETTANEH, A.; LEVESQUE, K.; LE GUERN, V.; GOFFINET, F.; CARBONNE, B.; AMOURA, Z.; PIETTE, J.; NIZARD, J.; COSTEDOAT-CHALUMEAU, N. (2013): Catastrophic antiphospholipid syndrome and pregnancy: an experience of 13 cases. *Rheumatology*. **52**: 1635 – 1641. ISSN 0315–162X.

**26.** HANSON, N. Q.; ARAS, Ö.; YANG, F.; TSAIA, M. Y. (2001): C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: Incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease. *Clinical Chemistry*. **47**(4): 661 – 666. ISSN 0009–9147.

**27.** HICKEY, S. E.; CURRY, C. J.; TORIELLO, H. V. (2013): ACMG Practice Guideline: lack of evidence for MTHFR polymorphism testing. *Genetics in Medicine*. **315**(2): 153 – 156. ISSN 1098–3600.

**28.** HLUŠÍ, A.; KRČOVÁ, V. (2003): Antifosfolipidový syndrom. *Interní medicína pro praxi*. **9**: 20 – 28. ISSN 1212–7299.

**29.** HONSOVÁ, E. (2008): Trombotické mikroangiopatie: Trombotická trombocytopenická purpura (TTP) a hemolyticko-uremický syndrom (HUS). Morfologie, diferenciální diagnóza a patogeneze. *Česko-slovenská patologie*. **44**(3): 54 – 58. ISSN 1210–7875.

**30.** HRACHOVINOVÁ, I. (2015): *Výsledky mezilaboratorní kontroly kvality – stanovení vrozených genetických trombofilních markerů*. Praha.

**31.** HYÁNEK, J.; DUBSKÁ, L.; PEJZNOCHOVÁ, H.; PEHAL, F.; VAINGÁTOVÁ, S.; MARTINÍKOVÁ, V. (2009): Hyperhomocysteinémie – nepoznané, nepoznatelné a zanedbané (homocystein – užitečný marker methylačních poruch z deficitu holotranskobalaminu a folátu). *Klinická biochemie a metabolismus*. **17**(38): 83 – 92. ISSN 1210–7921.

**32.** JÄÄSKELÄINENA, E.; KESKI-NISULAA, L.; TOIVONENA, S.; ROMPPANENB, E-L.; HELISALMICD, S.; PUNNONENB, K.; HEINONENA, S. (2006): MTHFR C677T Polymorphism is Not Associated with Placental Abruption or Preeclampsia in Finnish Women. *Hypertension in Pregnancy*. **25**(2): 73 – 80. ISSN 1064–1955.

**33.** KADLEC, B.; SKŘIČKOVÁ, J. (2008): Diagnostika a léčba venózní trombózy. *Medicína pro praxi*. **5**(2): 54 – 58. ISSN 1214–8687.

**34.** KAISER, T.; BRENNECKE, S. P.; MOSES, E. K. (2001): C677T Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism is not a risk factor for pre-eclampsia/eclampsia among Australian women. *Human Heredity*. **21**(1 – 2): 20 – 2. ISSN 0001–5652.

**35.** KARATAS, A.; EROZ, R.; ALBAYRAK, M.; ÖZLÜ, T.; ÇAKMAK, B.; KESKIN, F. (2014): Evaluation of chromosomal abnormalities and common trombofilic mutations in cases with recurrent miscarriage. *African Health science*. **14** (1): 216 – 222. ISSN 1680–6905.

**36.** KHAN, S.; DICKERMAN, J. D. (2012): Hereditary thrombophilia. *Thrombosis Journal*. **4**(15): 1 – 17. ISSN 1477–9560.

**37.** KJELLBERG, U.; VAN ROOIJEN, M.; BREMME, K.; HELLGREN, M. (2010): Factor V Leiden station and pregnancy – related complications. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. **203**(5): 469. ISSN 0002–9378.

**38.** KLINE, J. A.; KABRHEL, CH. (2015): Emergency evaluation for pulmonary embolism, part 1: Clinical factors that increase risk. *The Journal of Emergency Medicine*. **48**(6): 771 – 780. ISSN 0736–4679.

**39.** KOKSAL, V.; BARIS, I.; ETLIK, O. (2007): Primer-engineered multiplex PCR–RFLP for detection of MTHFR C677T, prothrombin G20210A and factor V Leiden mutations. *Experimental and Molecular Pathology*. **83**: 1 – 3. ISSN 0014–4800.

**40.** KOSMAS, I. P.; TATSIONI, A.; IOANNIDIS, J. P. (2004): Association of C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with hypertension in pregnancy and pre-eclampsia: a meta-analysis. *Journal of Hypertension*. **22**(9):1655 – 1662. ISSN 0263–6352.

**41.** KOVACS, G.; BRIGGS, G. (2015): *Lectures in Obstetrics, Gynaecology and Women's Health*. Švýcarsko: Springer International Publishing. ISBN 978–3–319–14862–5.

**42.** KOZÁK, T. (2012): *Primární Imunitní Trombocytopenie (ITP)*. Vyd. 2. Praha: We Make Media, s. r. o. ISBN 978–80–87339–10–7.

**43.** KVASNIČKA, J. (2010): Doporučený postup pro indikaci molekulárně genetických vyšetření v rámci diagnostiky trombofilních stavů v žilním systému. *Vnitřní Lékařství*. **56**(12): 1. ISSN 0042–773X.

**44.** LECLERC, D.; SIBANI, S.; ROZEN, R. (2000): Molecular biology of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and overview of mutations/polymorphisms. *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. ISBN 1–58707–217–8.

**45.** LEEDA, M.; RIYAZI, N.; DE VRIES, J. I. P.; JAKOBS, C.; VAN GEIJN, H. P.; DEKKER, G. A. (1998): Effects of folic acid and vitamin B<sub>6</sub> supplementation on women with hyperhomocysteinemia and a history of preeclampsia or fetal growth restriction. *American Journal of Obstetric & Gynecology*. **179**(1): 135 – 139. ISSN 0002–9378.

**46.** LEUNG, A. N.; BULL, T. M.; JAESCHKE, R.; LOCKWOOD, CH. J.; BOISELLE, P.M.; HURWITZ, L. M.; JAMES, A. H.; MCCULLOUGH, L. B.; MENDA, Y.; PAIDAS, M. J.; ROYAL, H. D.; TAPSON, V. F.; WINER-MURAM, H. T.; CHERVENAK, F. A.; CODY D. D.; MCNITT-GRAY, M. F.; STAVE, C. D.; TUTTLE, B. D.; ATS/STR COMMITTEE ON PULMONARY EMBOLISM IN PREGNANCY (2012): American thoracic society documents: an official American thoracic society/society of thoracic radiology clinical practice guideline-evaluation of suspected pulmonary embolism in pregnancy. *Radiology*. **262**(2): 635 – 646. ISSN 0720–048X.

47. LINDQVIST, P. G.; DAHLBÄCK, B. (2008): Carriership of factor V Leiden and evolutionary selection advantage. *Current Medicinal Chemistry*. **15**(15): 1541 – 1544. ISSN 1875–533X.
48. LOCKWOOD, CH. J.; WENDEL, K. A. (2010): ACOG Practice Bulletin No. 138: Inherited thrombophilias in pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*. **122**(3): 706 – 17. ISSN 0029–7844.
49. MARLAR, R. A.; NEUMANN, A. (1990): Neonatal purpura fulminans due to homozygous protein C or protein S deficiencies. *Seminars In Thrombosis And Hemostasis*. **16**(4): 299 – 309. ISSN 1098–9064.
50. MEEKS, S. L.; ABSHIRE, T. C. (2008): Abnormalities of prothrombin: a review of the pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Haemophilia*. **14**: 1159 – 1163. ISSN 1365–2516.
51. MENG, K.; HUB, X.; PENG, X.; ZHANG, Z. (2015): Incidence of venous thromboembolism during pregnancy and the puerperium: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. **28**(3): 245 – 253. ISSN 1476–7058.
52. MIYAKIS, S.; LOCKSHIN, M. D.; CERVERA, R. (2006): International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **4**: 295 – 306. ISSN 1538–7836.
53. MOM, T.; KA, A. B. (2005): Genetic variations related to hypertension: a review. *Journal of Human Hypertension*. **19**: 7 – 19. ISSN 0950–9240.
54. NYTROVÁ, P.; KALISTOVÁ, H.; IVANA KOVÁŘOVÁ, I.; ROTH, J. (2009): Antifosfolipidový syndrom aneb syndrom, jenž může napodobit roztroušenou sklerózu. *Neurologie pro praxi*. **10**(1): 54 – 57. ISSN 1213–1814.
55. OCAK, Z.; ÖZLÜ, T.; OZYURT, O. (2013): Association of recurrent pregnancy loss with chromosomal abnormalities and hereditary thrombophilias. *African Health Sciences*. **13**(2): 447 – 452. ISSN 1680–6905.
56. ORENDÁČ, M. (2000): Klinický obraz homocystinurie z deficitu cystathionin B-syntázy u devatenácti českých a slovenských pacientů. *Časopis lékařů českých*. **16**: 500 – 507. ISSN 0008–7335.
57. POKORNÝ, M.; MINÁRIK, J. (2013): Negativní vliv hyperhomocysteinémie na lidskou reprodukci a možnosti její korekce suplementací vitamíny skupiny B. *New EU Magazine of Medicine*. **1 – 2**: 23 – 29. ISSN 1802–1298.

**58.** POUL, H. (2006): Trombofilní stavy významné v patogenezi žilní tromboembolické nemoci. Doporučení pro klinickou praxi. *Sekce pro trombózu a hemostázu České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně*. Dostupné z: [http://www.thrombosis.cz/sources/Guide lines-Trombofilie\\_STH\\_III062.pdf](http://www.thrombosis.cz/sources/Guide%20lines-Trombofilie_STH_III062.pdf)

**59.** POORT, S. R.; ROSENDAAL, F. R.; REITSMA, P. H.; BERTINA, R. M. (1996): 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**(10): 3698 – 3703. ISSN 3698–703.

**60.** PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE (2013): Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertility and sterility*. **99**(1): 63. ISSN 0015–0282.

**61.** PROCHÁZKA, M.; PROCHÁZKOVÁ, J.; LUBUŠKÝ, M.; SLAVÍK, L. (2004): Trombofilní stavy v porodnictví – I. část. *Praktická gynekologie*. **4**(4): 12 – 16. ISSN 1211–6645.

**62.** PROCHÁZKA, M.; KRČOVÁ, V.; PROCHÁZKOVÁ, J.; LUBUŠKÝ, M. (2003): Tromboembolická nemoc v porodnictví. *Praktická gynekologie*. **6**(3): 9 – 13. ISSN 121–6645.

**63.** RODRIGUEZ-GUILLÉN, M.; TORRES-SANCHEZ, L.; CHEN, J.; GALVÁN-PORTILLO, M.; BLANCO-MUÑOZ, J.; ARACELY ANAYA, M.; SILVA-ZOLEZZI, I.; HERNÁNDEZ-VALERO, M.; LÓPEZ-CARRILLO, L. (2009): Maternal MTHFR polymorphisms and risk of spontaneous abortion. *Salud Pública de México*. **51**(1): 19 – 25. ISSN 0036–3634.

**64.** SALIMI, S.; SARAVANI, M.; YAGHMAEI, M.; FAZLALI, Z.; MOKHTARI, M.; NAGHAVI, A.; FARAJIAN-MASHHADI, F. (2015): The early-onset preeclampsia is associated with MTHFR and FVL polymorphisms. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. **291**(6): 1303 – 1312. ISSN 0932–0067.

**65.** SERGI, C.; JISHI, T. A.; WALKER, M. (2015): Factor V Leiden mutation in women with early recurrent pregnancy loss: a meta-analysis and systematic review of the causal association. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. **291**(3): 671 – 679. ISSN 0932–0067.

**66.** SKALICKÁ, L.; CHOCHOLA, M.; MRÁZEK, V.; VAŘEJKA, P.; JIRÁT, S.; HELLER, S.; URBÁNKOVÁ, J.; ASCHERMANN, M.; KARETOVÁ, D. (2002): Trombóza a těhotenství. *Kardiologická revue*. **4**: 273 – 275. ISSN 2336–2898.

**67.** SPOLEČNOST LÉKAŘSKÉ GENETIKY (2014): *Validace mezinárodních doporučení American College of Medical Genetics ze strany naší odborné společnosti ohledně vyšetření variant v genu MTHFR u trombofilních stavů*. Praha. Dostupné z: <http://www.slg.cz/2014/testovani-polymorfismu-mthfr>

**68.** STRÁNSKÝ, M.; RYŠAVÁ (2010): *Fyziologie a patofyziologie výživy*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. ISBN: 978–80–7394–241–0.

**69.** ŠIMKOVIČ, M. (2013): ITP v těhotenství. In: *Trombocytopenie* [online]. © 2013. ISSN 1804–8382. [cit. 2015-07-2]. Dostupné z: <http://trombocytopenie.cz/clanek.php?id=15&tab=pacient>

**70.** ŠUBRT, I.; ULCOVÁ-GALLOVÁ, Z.; BIBKOVÁ, K.; MIČANOVÁ, Z.; HEJNALOVÁ, M.; ČERNÁ, M.; HRADECKÝ, L.; NOVOTNÝ, Z. (2008): Recurrent pregnancy loss and frequency of Eight Antiphospholipid Antibodies and Genetic Thrombophilic Factors in Czech Women. *American Journal of Reproductive Immunology*. **59**(3): 193 – 200. ISSN 1600–0897.

**71.** TANAKA, H.; KATSURAGI, S.; OSATO, K.; HASEGAWA, J.; NAKATA, M.; MURAKOSHI, T.; YOSHIMATSU, J.; SEKIZAWA, A.; KANAYAMA, N.; ISHIWATA, I; IKEDA, T. (2015): Increase in maternal death-related venous thromboembolism during pregnancy in Japan (2010–2013). *Circulation Journal*. **79**(6): 1357 – 1362. ISSN 1524–4539.

**72.** URBÁNKOVÁ, J.; CHOCHOLA, M.; VAŘEJKA, P.; SKALICKÁ, L.; JIRÁT, S.; HELLER, S.; KARETOVÁ, D.; ASCHERMANN, M. (2002): Hyperkoagulační stav a hluboká žilní trombóza. *Kardiologická revue*. **4**: 282 - 285. ISSN 2336–2898.

**73.** ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIK ČR. Národní registr asistované reprodukce (2014): *Asistovaná reprodukce v České republice v roce 2012*. Vypracoval ŘEŽÁBEK, K. Praha 2: ÚZIS ČR, NRAR. ISBN 978-80-7472-117-5. Dostupné také z: <http://uzis.cz/publikace/asistovana-reprodukce-ceske-republice-2012>

**74.** ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIK ČR (2001). *Potraty 2000*. Praha 2: ÚZIS ČR, NRAR. ISBN 80–7280–048–5. Dostupné také z <http://uzis.cz/publikace/potraty-2000>

**75.** ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIK ČR (2014). *Potraty v roce 2013*. Praha 2: ÚZIS ČR, NRAR. ISBN 978–8–7472–142–7. Dostupné také z <http://uzis.cz/publikace/potraty-2013>

**76.** VAN DER PUT, N.; GABREE, F.; STEVENS, E. M. B.; SMEITINK, J. A. M.; TRIJBELS, F. J. M.; ESKES, T. K. A. B.; VAN DEN HEUVEL, L. P.; BLOM, H. J. (1998): A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: An additional risk factor for neural-tube defects? *American Journal of Human Genetics*. **62**:1044 – 1051. ISSN 0002–9297.

**77.** VOLLSET, S. E.; REFSUM, H.; IRGENS, L. M.; MORK EMBLEM, B.; TVERDAL, A.; GJESSING, H. K.; BJØRKE MONSEN, A. L.; MAGNE UELAND, P. (2000): Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **71**: 962 – 968. ISSN 0002–9165.

**78.** WANG, X.; WU, H.; QIU, X. (2013): Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism and risk of preeclampsia: An updated meta-analysis based on 51 studies. *Archives of Medical Research*. **44**(3): 159 – 168. ISSN 0188–4409.

**79.** WEISBERG, I.; TRAN, P.; CHRISTENSEN, B.; SIBANI, S.; ROZEN, R. (1998): A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Molecular Genetics and Metabolism*. **64**(3): 169 – 172. ISSN 1096–7192.

**80.** YANG, B.; FAN, S.; ZHI, X.; LI, Y.; LIU, Y.; WANG, D.; HE, M.; HOU, Y.; ZHENG, Q.; SUN, G. (2014): Associations of MTHFR gene polymorphisms with hypertension and hypertension in pregnancy: A metaanalysis from 114 studies with 15411 cases and 21970 controls. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. **9**(2): 874 – 897. ISSN 0932–0067.

**81.** ZIAKAS, P.; POULOU, L. S.; PAVLOU, M.; ZINTZARAS, E. (2015): Thrombophilia and venous thromboembolism in pregnancy: A meta-analysis of genetic risk. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. **191**: 106 – 111. ISSN 1872–7654.

## INTERNETOVÉ ZDROJE

**1.** ADÁMKOVÁ, L. Příčiny trombocytopenie v těhotenství. In: *Trombocytopenie* [online]. © 2013. ISSN 1804 – 8382. [cit. 2015-07-29]. Dostupné z: <http://trombocytopenie.cz/clanek.php?id=10&tab=pacient>

**2.** Eklampsie. In: *Wikiskripta* [online]. © 2008 -. ISSN 18046517. last modified on 30. 11. 2014 [cit. 2015-10-26]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Eklampsie>

**3.** Homocystein. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida): Wikipedia Foundation, 11. 12. 2006, last modified on 3. 4. 2015 [cit. 2015-07-08]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Homocystein/>



4. HONZÍK, T. (2009): Homocystinurie. In: *Národní sdružení PKU a jiných dědičných metabolických poruch* [online]. © 2009 – 2015. [cit. 2015-10-11]. Dostupné z: <http://www.nspku.cz/nemoci/homocystinurie.html>
5. Hemokoagulace. In: *Wikiskripta* [online]. © 2008 -. ISSN 18046517. last modified on 1. 24. 2015 [cit. 2015-11-29]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Hemokoagulace>
6. Leidenská mutace. In: *Wikiskripta* [online]. © 2008 -. ISSN 18046517. last modified on 7. 12. 2014 [cit. 2015-08-05]. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Leidenska\\_mutace/](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Leidenska_mutace/)
7. MDL. Metylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR). In: *Molecular Diagnostics Laboratories* [online]. © 2014. [cit. 2015-09-22]. Dostupné z: <http://www.mdl-labs.com/providers/tests/mthfr>
8. Polymorfismus. In: *Wikiskripta* [online]. © 2008 -. ISSN 18046517. last modified on 30. 11. 2014 [cit. 2015-06-05]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Polymorfismus>
9. Protein C. In: *Wikiskripta* [online]. © 2008 -. ISSN 18046517. last modified on 30. 05. 2015 [cit. 2015-08-05]. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Protein\\_C](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Protein_C)
10. Protein S. In: *Wikiskripta* [online]. © 2008 -. ISSN 18046517. last modified on 30. 05. 2015 [cit. 2015-08-05]. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Protein\\_S](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Protein_S)
11. ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIK ČR. Národní registr reprodukčního zdraví. In: *Uzis.cz* [online]. © 2010 – 2015 [cit. 2015-09-04]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/registry/narodni-zdravotni-registry/nr-reprodukcnihozdravi>
12. Uteroplacentární insuficience. In: *Velký lékařský slovník* [online]. © 2008 -. [cit. 2015-08-27]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/uteroplacentarni-insuficience>
13. von Willebrandův faktor. In: *Wikiskripta* [online]. © 2008 -. ISSN 18046517. last modified on 26. 01. 2015 [cit. 2015-08-03]. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Von\\_Willebranduv\\_faktor/](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Von_Willebranduv_faktor/)

## 11 SEZNAM TABULEK

<b>Tab. I:</b> Procentuální zastoupení mutací MTHFR v jednotlivých světových populacích (převzato a upraveno dle MDL [online]).....	3
<b>Tab. II:</b> Procentuální aktivita enzymu MTHFR vycházející ze vztahů mezi jednotlivými genotypy (údaje převzaty z van der Put <i>et al.</i> , 1998).....	4
<b>Tab. III:</b> Vrozené a získané trombofilní poruchy (převzato a upraveno dle Bick, 2002). ....	6
<b>Tab. IV:</b> Riziko výskytu TEN v obecné populaci a u těhotných žen s Leidenskou mutací - s historií TEN a bez předchozího výskytu TEN (údaje převzaty z Lockwood & Wendel, 2010). ....	8
<b>Tab. V:</b> Riziko vzniku TEN v obecné populaci a u těhotných žen s mutací v genu pro protrombin G20210A - s historií TEN a bez předchozího výskytu TEN (údaje převzaty z Lockwood & Wendel, 2010). ....	9
<b>Tab. VI:</b> Riziko vzniku TEN v obecné populaci a u těhotných žen s mutacemi v genu pro faktor V a v genu pro protrombin G20210A - s historií TEN a bez předchozího výskytu TEN (údaje převzaty z Lockwood & Wendel, 2010).....	10
<b>Tab. VII:</b> Stupně hyperhomocysteinémie (převzato a upraveno dle Pokorný & Minárik, 2013). ....	11
<b>Tab. VIII:</b> Prevalence jednotlivých trombofilií u pacientek s TEN v těhotenství, relativní riziko TEN v těhotenství u trombofilních pacientek vztaženo k riziku netěhotných žen bez trombofilie a pravděpodobnost s těhotenstvím spojené TEN na 1 000 gravidit u jednotlivých trombofilií (převzato a upraveno dle Poul, 2006). ....	16
<b>Tab. IX:</b> Vývoj počtu potratů českých občerek a cizinek v ČR v letech 1990–2013 (údaje převzaty z ÚZIS ČR, 2014).....	24
<b>Tab. X:</b> Klasifikace hypertenze v těhotenství (převzato a upraveno dle Cífková, 2007). ....	26
<b>Tab. XI:</b> Rozdělení trombocytopenií dle závislosti na těhotenství (převzato a upraveno dle Kozák, 2012).....	31
<b>Tab. XII:</b> Reagencie a jejich potřebné množství k izolaci DNA z bukalního stěru dle protokolu PP3_GL_001_C.....	37
<b>Tab. XIII:</b> Reagencie a jejich potřebné množství k izolaci DNA z periferní krve dle protokolu PP3_GL_001_C.....	37
<b>Tab. XIV:</b> Přehled použitých primerů, PCR produkt – předpokládaná velikost amplifikovaného úseku (údaje převzaty z Koksál <i>et al.</i> , 2007).....	38
<b>Tab. XV:</b> Složení reakční směsi pro multiplex PCR.....	39

<b>Tab. XVI:</b> Teplotně - časový profil amplifikace.....	40
<b>Tab. XVII:</b> Použité reagensie nutné ke štěpení PCR produktů pomocí enzymu MnlII.....	40
<b>Tab. XVIII:</b> Procentuální zastoupení metod používaných k detekci trombofilních mutací na území ČR a SR (údaje převzaty z Hrachovinová, 2015). ....	46

## 12 SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1:** Schéma metabolismu homocysteinu (převzato a upraveno dle Pokorný & Minárik, 2013). ... 2
- Obr. 2:** Schéma koagulační kaskády (převzato a upraveno dle Lindqvist & Dahlbäck, 2008). ..... 14
- Obr. 3:** Vývoj počtu potratů dle druhu v ČR v letech 1995–2013 (převzato z ÚZIS ČR, 2014). ..... 25
- Obr. 4: Rozdělení trombocytopenií podle mechanismu vzniku (převzato a upraveno dle Kozák, 2012). ..... 30
- Obr. 5:** Schematické znázornění profilů štěpení enzymem MnlI u wild type a mutantních alel amplikonů MTHFR C677T, FVL a protrombinu G20210A (převzato z Koksál *et al.*, 2007). ..... 41
- Obr. 6:** Neštěpené PCR produkty o velikosti 169 bp (FVL) a 221 bp (protrombin) na 4% agarózovém gelu, kdy byly analyzovány různé matrice DNA (DNA získaná z periferní krve a DNA získaná z bukalního stěru). ..... 42
- Obr. 7:** Duplex RFLP-PCR analýza pro FVL a protrombin G20210A na 4% agarózovém gelu. .... 43

## 13 PŘÍLOHA

**Příloha 1:** Protokol izolace genomové DNA z bukálního stěru (DNA Isohelix DNA Isolation kit: DDK-3/DDK-50).

### **Izolace genomové DNA z bukálního stěru (DNA Isohelix DNA Isolation kit: DDK-3/DDK-50)**

Použité zkratky:

RT - pokojová teplota

PK – Proteináza K

CT – Capture buffer

TE – Re-hydration buffer TE

Reagencie a jejich skladování:

**Lysis buffer LS** skladovat při pokojové teplotě

**Proteinase K** skladovat při -20 °C

**Capture buffer CT** skladovat při pokojové teplotě

**Re-hydration buffer TE** skladovat při pokojové teplotě

Před začátkem práce si pro jeden vzorek připravit 3 1,5 ml mikrozkušavky. Nastavit suchou lázeň na 60°C. PK vyndat z mrazáku a nechat roztát při pokojové teplotě. V případě že se v PK objeví jemný bílý prášek, je třeba zkumavku před použitím zvortexovat.

Pracovní postup:

- napipetovat 500 µl LS do zkumavky s tamponem s bukálním stěrem

- přidat 20 µl PK

- krátce vortexovat a zcentrifugovat

(takto stabilizovaná DNA lze skladovat po dobu alespoň 3,5 roku)

- inkubovat hodinu při 60°C

- krátce vortexovat a zcentrifugovat

- v případě, že je pro další postup vyžadovaná jednořetězcová DNA, nastavit suchou lázeň na 80°C (viz níže)

- přepipetovat 400 µl v zorku do 1,5 ml mikrozkumavky

- tampon otočit tak, aby byl vzhůru nohama (tzn. tyčka tamponu se opírá o dno zkumavky)

- krátce zcentrifugovat

- přepipetovat supernatant k již odebraným 400 µl v zorku

- přidat 500 µl CT

- krátce vortexovat

- zkusavku zcentrifugovat při 13 tis. ot/min 7 min
- opatrně odstranit supernatant (nesmí dojít k narušení pelety DNA)
- krátce zcentrifugovat
- odebrat opatrně všechny zbylý supernatant
- k peletě DNA přidat 150 µl TE (v případě, že je potřeba vyšší koncentrace DNA, lze objem zmenšit až na objem 30 µl)
- nechat inkubovat po dobu 5 min při RT (déle v případě použití menšího objemu TE)
- krátce vortexovat
- zkusavku zcentrifugovat při 13 tis. ot/min po dobu 2 min
- odebrat supernatant do nové 1,5 ml zkusavky  
(v případě, že je pro další postup vyžadovaná jednořetězcová DNA)
- inkubace při 80°C po dobu 5 min
- krátce vortexovat a zcentrifugovat
- DNA uložit do krabičky v mrazicím boxu

**Příloha 2:** Protokol izolace genomové DNA z plné krve (Genomic DNA Mini Kit).

## **Izolace genomové DNA z plné krve (Genomic DNA Mini Kit)**

Použité zkratky:

RT - pokojová teplota

x g = rc f (relativní odstředivá síla)

Reagencie a jejich skladování:

**96% ethanol** - skladuje se v lednici. Zásobní roztok se skladuje při RT.

**GT Buffer** - skladuje se při RT.

**W1 Buffer** - skladuje se při RT.

**Wash Buffer** - dle návodu výrobce se ke koncentrátu Wash Buffer přidá 100 ml 96% etanolu, skladuje se při RT.

**Elution Buffer** - skladuje se při RT, před každým použitím vyteperovat požadovaný objem na 60°C.

**RBC Lysis Buffer** - skladuje se při RT.

Spotřební materiál:

GD Column – kolonky, jsou součástí kitu, skladují se při RT.

2 ml Collection Tube – sběrné zkumavky bez víčka, jsou součástí kitu, skladují se při RT.

1,5 ml mikrozkumavky – nejsou součástí kitu, skladují se při RT (SK47, SK71).

Špičky a rukavice

Pracovní postup:

- napipetovat 300 µl plné krve do označené 1,5 ml mikrozkumavky
- přidat 900 µl RBC Lysis Buffer, promíchat převrácením v ruce (NEVORTEXOVAT!!!)
- inkubovat 10 min. při RT
- centrifugovat 5 min. při 3000 x g (rpm) GL07, odstranit supernatant, ponechat peletu
- přidat 100 µl RBC Lysis Buffer a resuspendovat peletu
- přidat 200 µl GB Buffer, zvortexovat a krátce stočit
- inkubovat 10– 15 min. v termostatu při 60°C, lyzát je projasněný
- během inkubace převrátit zkumavku každé 3 min.
- přidat 200 µl 96% etanolu (je v lednici)
- vortexovat 10 s, krátce centrifugovat (stolní centrifuga)
- přelít nebo přepipetovat obsah mikrozkumavky (lyzát) na kolonku (GD Column), která je vložena do čisté sběrné zkumavky (2 ml Collection Tube)
- kolonku se sběrnou zkumavkou centrifugovat při 14 - 16 tis. x g po dobu 5 min.
- přendat kolonku do nové sběrné zkumavky a použitou sběrnou zkumavku s tekutinou vyhodit
- na kolonku napipetovat 400 µl W1 Buffer
- kolonku se sběrnou zkumavkou centrifugovat při 14 - 16 tis. x g/ 30 s
- ze sběrné zkumavky vylít tekutinu a kolonku do ní vrátit
- na kolonku přidat 600 µl Wash Buffer
- kolonku se sběrnou zkumavkou centrifugovat při 14 - 16 tis. x g/ 30 s
- ze sběrné zkumavky vylít tekutinu a kolonku do ní vrátit
- „suchou“ kolonku se sběrnou zkumavkou zcentrifugovat při 14 - 16 tis. x g po dobu 3 min.
- zkontrolovat kolonku zda je suchá, pokud ne - opakovat předešlou centrifugaci, dokud kolonka nebude úplně suchá

- suchou kolonku přesunout do připravené čisté 1,5 ml mikrozkumavky řádně označené štítkem (jméno a příjmení klienta, rodné číslo, LIČ vzorku, datum izolace, iniciály toho, kdo izolaci provedl)
- přímo na filtr kolonky přidat 100 µl Elution Buffer (vytemperovaného na 60°C)
- inkubovat nejméně 3 min. při RT
- kolonku s označenou 1,5 ml mikrozkumavkou zcentrifugovat při 14 - 16 tis. x g po dobu 30 s
- změřit koncentraci DNA dle PP2\_GL\_001\_C Měření koncentrace nukleových kyselin.
- DNA uložit do lednice pro pozdější použití (max. 24 hodin) nebo do mrazícího boxu (-20°C), ve kterém je DNA archivována (plastová krabička s nápisem DNA vzorky).